



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Marina J. Randelović

**ISPITIVANJE SINERGISTIČKOG EFEKTA
ANTIMIKOTIKA I ETARSKOG ULJA BILJKE
MELISSA OFFICINALIS L. (*MELISSAE
AETHEROLEUM*) NA BIOFILM GLJIVA RODA
*CANDIDA***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Marina J. Randelović

**EVALUATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF
ANTIMYCOTICS AND THE *MELISSA OFFICINALIS*
L. ESSENTIAL OIL (*MELISSAE AETHEROLEUM*) ON
THE BIOFILM OF *CANDIDA* SPP.**

DOCTORAL THESIS

Niš, 2024

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

Prof. dr Suzana Otašević, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Naslov:

Ispitivanje sinergističkog efekta antimikotika i etarskog ulja biljke *Melissa officinalis* L. (*Melissae aetheroleum*) na biofilm gljiva roda *Candida*

Rezime:

Vulvovaginalna kandidoza, ili po novom razmatranju vulvovaginalna gljivična infekcija, je oboljenje visoke prevalencije najčešće izazvano kvasnicama roda *Candida*. Ova infekcija žena predstavlja veliki zdravstveni problem usled razvoja hroniciteta, odnosno rekuretne forme, kao i mogućnosti da uslovi kongenitalnu kandidozu i da utiče na ishod trudnoće sa istorijom serklaža ili *in vitro* fertilizacije. Već više od pola veka se pokušava sa praktičnim i teorijskim rešavanjem ovog problema, a aktuelna istraživanja se bave razmatranjem uticaja osobina kvasnica na nepovoljni tok, odnosno hronicitet vulvovaginalnih gljivičnih infekcija. Ciljevi ove doktorske teze su podrazumevali ispitivanje virulentnosti, odnosno sposobnosti produkcije biofilma izolata kvasnica uzročnika genitalne infekcije žena i utvrđivanje osetljivosti ovih izolata (planktonskih ćelija i sesilnih ćelija u biofilmu) prema antigljivičnim lekovima i etarskom ulju biljke *Melissa officinalis* (EUMO – *Melissa aetheroleum*), kao i ispitivanje potencijalnog sinergističkog efekta antimikotika i EUMO na formirani biofilm. Rezultati su pokazali da je skoro polovina svih ispitivanih izolata imala sposobnost produkcije biofilma (46%). Primenom mikrodilucione antimikogram metode utvrđeno je da testirani izolati pokazuju slabu osetljivost prema flukonazolu i nistatinu, dok je najefikasniji u uslovima *in vitro* bio klotrimazol. Utvrđeno je da je

EUMO pokazalo zadovoljavajuću efikasnost prema planktonskim i sesilnim ćelijama ispitivanih izolata, dok je flukonazol imao u pojedinim slučajevima čak i podsticajni efekat na formiranje biofilma. Ispitivanjem kombinovanog efekta EUMO i antimikotika utvrđeno je sinergističko dejstvo na zrele biofilmove koje je bilo zavisno od ispitivanog soja i primenjene koncentracije korišćenih antimikotika i prirodne supstance, jer su u nekim slučajevima niže koncentracije supstanci pokazivale i antagonističke efekte. Ovi rezultati bi mogli biti osnova za buduća istraživanja moguće primene ispitivane prirodne supstance u tretmanu vulvovaginalnih gljivičnih infekcija, ali tek nakon dodatnih studija koje bi utvrdile odsustvo toksičnog efekta EUMO *in vivo*.

Naučna oblast:

Medicina

Naučna
disciplina:

Mikrobiologija

Ključne reči:

Candida spp., kvasnice, vulvovaginalna kandidoza, antimikotici, biofilm, etarsko ulje, *Melissa officinalis*, sinergizam

UDK:

579.68:615.282:616-002.818(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 230 Mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral DissertationDoctoral
Supervisor:

Prof. Suzana Otašević MD, University of Niš, Medical Faculty

Title:

Evaluation of the Synergistic Effect of Antimycotics and the *Melissa officinalis* L. Essential Oil (*Melissae aetheroleum*) on the Biofilm of *Candida* spp.

Abstract:

Vulvovaginal candidiasis, or more accurately, vulvovaginal fungal infection, is a disease of high prevalence, most often caused by *Candida* spp. This infection of women represents a major health problem due to the development of chronicity, i.e., recurrent form, as well as the possibility of causing congenital candidiasis and affecting the outcome of pregnancies with a history of cerclage or *in vitro* fertilization. For more than half a century, practical and theoretical attempts have been made to solve this problem, and current research has considered the influence of yeast properties on the chronicity of vulvovaginal fungal infections. The goals of this doctoral thesis included testing the virulence, i.e., biofilm production ability of yeast isolates that cause genital infections in women, and determining their sensitivity (planktonic cells and sessile cells in the biofilm) to antifungal drugs and the *Melissa officinalis* essential oil (MOEO - *Melissa aetheroleum*), as well as the investigation of the potential synergistic effect of antimycotics and MOEO on the formed biofilm. The results revealed that almost half of all examined isolates had the ability to produce biofilm. (46%). The microdilution antimycogram method determined that the investigated isolates showed weak sensitivity to fluconazole and nystatin, while the most effective *in vitro* was clotrimazole. It was found that MOEO showed satisfactory effectiveness against planktonic and sessile cells of the tested isolates, while fluconazole, in some cases, had even a promotional effect on biofilm formation. Examining the combined effect of MOEO and

antimycotics revealed a synergistic effect on mature biofilms depending on the tested strain and the applied concentration of antimycotics and natural substances, as in some cases, lower concentrations of the substances showed antagonistic effects. These results could be the basis for future research into the possible application of the tested natural substance in treating vulvovaginal fungal infections, but only after additional studies that would establish the absence of a toxic effect of MOEO *in vivo*.

Scientific
Field:

Medicine

Scientific
Discipline:

Microbiology

Key Words:

Candida spp.; yeasts; vulvovaginal candidosis; antimycotics; biofilm; essential oil; *Melissa officinalis*; synergism

UDC:

579.68:615.282:616-002.818(043.3)

CERIF
Classification:

B 230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Zahvalnica

Reči iskrene zahvalnosti upućujem svim dragim ljudima koji su na bilo koji način učestvovali i podržali izradu moje doktorske disertacije.

Najiskrenije se zahvaljujem

Svom mentoru, prof. dr Suzani Otašević, na planiranju i velikoj pomoći u realizaciji doktorske disertacije, bezrezervnoj podršci, zalaganju, savetima i strpljenju. Zbog neprestane želje za novim saznanjima, svoje inovativnosti i stručnosti ona je pravi uzor, a njeno iskustvo i znanje koje mi svakodnevno nesebično prenosi je neprocenjivo za moj dalji rad i napredak u karijeri,

Prof. dr Zorici Stojanović Radić na usmeravanju i podršci u oblasti eksperimentalnog dizajna naučnog istraživanja, kao i dragocenoj pomoći pri tumačenju dobijenih rezultata. Njen stvaralački duh i energija su mi dali entuzijazam i veliki podstrek tokom izrade doktorske teze.

Prof. dr Valentini Arsić Arsenijević koja je vodeći naš tim obezbedila metodologiju visokog standarda primenjenu u ovoj disertaciji. Zahvaljujem joj se na svestranoj pomoći, saradnji i korisnim savetima i sugestijama koje su bile od velikog značaja za moj naučnoistraživački rad.

Prof. dr Nataši Miladinović Tasić na nesebičnom zalaganju, konstruktivnim savetima i smernicama, kao i na veoma lepoj saradnji tokom izrade doktorske disertacije.

Prof. dr Aleksandri Ignjatović na velikoj pomoći pri statističkoj obradi podataka i tumačenju naučnih rezultata, podršci i ohrabrenju kada je bilo najpotrebnije, kao i na iskrenom prijateljstvu.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Branislavi Kocić, načelniku Centra za mikrobiologiju, kao i prof. dr Miodragu Stojanoviću, direktoru Instituta za javno zdravlje Niš, koji su podržali realizaciju eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije.

Zahvalna sam svim članovima Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Nišu kao i kolektivu Centra za mikrobiologiju IZJZ Niš na podršci i saradnji.

Beskrajnu zahvalnost dugujem dragoj kolegini Marini Dimitrijević na neprocenjivoj pomoći u izvođenju eksperimentalnog dela ove disertacije. Njena nesebična i ogromna podrška je doprinela prevazilaženju naizgled nepremostivih prepreka što je rezultiralo završnim uspehom.

Takođe se posebno zahvaljujem kolegama Ireni Nakić, Stefanu Mijatoviću, Dušanu Iliću, Vesni Mladenović kao i laboratorijskim tehničarima Vesni Kulić, Katarini Ljubenović i Milanu Milijiću na značajnoj pomoći pri izvođenju praktičnog dela ovog istraživanja.

Najveću zahvalnost na neizmernoj ljubavi, podršci i razumevanju dugujem svojoj porodici kojoj ovu tezu i posvećujem.

Istraživanja u okviru doktorske disertacije su podržana od strane Fonda za nauku Republike Srbije, u okviru projekta „Fungal case finder“ programa Ideje (Br. 7754282), pod rukovodstvom prof. dr Valentine Arsić Arsenijević.

Autor

SPISAK SKRAĆENICA

VVK – vulvovaginalna kandidoza

RVVK – rekurentna vulvovaginalna kandidoza

NAC – *ne-albicans Candida*

spp. – species, vrste

ECM – ekstracelularni matriks

ALS - eng. *agglutinin-like sequence*

porodica EPA gena – eng. *epithelial adhesin family of adhesins*

Sap – sekretorne aspartil proteaze

PL – eng. *phospholipases*

LP – eng. *lipases*

HWP – eng. *hyphal wall protein*

SDA – *Saburaud* dekstrozni agar

ISYP – Integral system Yeasts plus

MALDI TOF – eng. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Flight*

PMF – eng. *Peptide Mass Fingerprint*

CHCA – α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina

PCR – eng. *polymerase chain reaction*

POC – eng. *Point of care*

CFU – eng. *colony forming unit*

CLSI – eng. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Institut za kliničke i laboratorijske standarde

EUCAST – eng. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Evropski komitet za ispitivanje antimikrobne osetljivosti

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

RPMI – eng. *Roswell Park Memorial Institute*

S – senzitivno

I – intermedijarno

R – rezistentno

DZO/R – dozno zavisna osetljivost /rezistentnost

NY – nistatin

AMB – amfotericin B

FCY – flucitozin

ECN – ekonazol

KCA – ketokonazol

CLO – klotrimazol

MIC – mikonazol

ITR – itrakonazol

VOR – vorikonazol

FLU – flukonazol

FEN – fentikonazol

EUMO – etarsko ulje biljke *Melissa officinalis* (*Melissa aetheroleum*)

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid test

GC/FID – eng. *Gas Chromatography-Flame ionization detection*

GC/MS – eng. *Gas Chromatography-Mass spectrometry*

DMSO – dimetil sulfoksid

PBS – eng. *Phosphate-buffered saline*

CDR – eng. *Candida Drug Resistance*

Sadržaj

1 UVOD.....	1
1.1.Vulvovaginalna kandidoza-vulvovaginalna gljivična infekcija.....	2
1.2.Epidemiološki aspekt vulvovaginalne kandidoze	4
1.3.Gljive roda <i>Candida</i>	6
1.3.1. Klasifikacija.....	6
1.3.2. Morfologija gljiva roda <i>Candida</i>	7
1.3.3. Patogeneza kandidoze i faktori virulencije gljiva roda <i>Candida</i>	8
1.4.Biofilm	14
1.5.Dijagnostika vulvovaginalne kandidoze	17
1.5.1. Izolovanje i identifikacija kvasnica	17
1.5.2. Antimikogram test- ispitivanje osetljivosti kvasnica prema antigljivičnim lekovima <i>in vitro</i>	22
1.6.Tretman	23
1.7.Etarsko ulje biljke <i>Melissa officinalis</i>	27
2 CILJEVI I HIPOTEZE STUDIJE.....	31
2.1.Ciljevi.....	31
2.2.Hipoteze	32
3 MATERIJALI I METODE.....	33
3.1.Dizajn studije.....	33
3.2.Mikrobiološka analiza.....	35
3.2.1. Identifikacija kvasnica primenom masene spektrometrije.....	36
3.2.2. Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma.....	38
3.2.3. Diferenciranje vrsta i ispitivanje osetljivosti kvasnica prema antigljivičnim lekovima u uslovima <i>in vitro</i> primenom komercijalnog testa	39
3.2.4. Ispitivanje osetljivosti kvasnica prema antigljivičnim lekovima i etarskom ulju biljke <i>Melissa officinalis</i> u uslovima <i>in vitro</i> primenom bujon mikrodilucionog testa	43

3.2.5. Identifikacija i kvantifikacija komponenti odabranog etarskog ulja biljke <i>Melissa officinalis</i> gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom i gasnom hromatografijom sa plameno-jonizacionim detektorom	45
3.2.6. MTT test - određivanje vijabilnosti ćelija biofilma	46
3.3. Statistička obrada podataka	49
4 REZULTATI	51
4.1. Identifikacija kvasnica	51
4.2. Analiza dijagnostičke efikasnosti komercijalnog Integral system yeasts plus testa....	52
4.3. Ispitivanje produkcije biofilma izolovanih kvasnica	54
4.4. Ispitivanje osetljivosti sojeva prema antimikoticima primenom ISYP testa	55
4.5. <i>In vitro</i> antimikrobna osetljivost ispitivanih produkora i neprodukora biofilma	57
4.6. Hemijski sastav etarskog ulja	64
4.7. Ispitivanje osetljivosti odabranih izolata prema antimikoticima i etarskom ulju <i>Melissa officinalis</i> primenom bujon mikrodilucione metode	67
4.8. Ispitivanje efekta nistatina, flukonazola i etarskog ulja biljke <i>Melissa officinalis</i> na formirani biofilm	70
4.9. Tipovi interakcija etarskog ulja <i>Melissa officinalis</i> u kombinaciji sa flukonazolom i nistatinom na formirani biofilm	73
5 DISKUSIJA	76
5.1. Uzročnici genitalne gljivične infekcije žena	76
5.2. Dijagnostičke metode i komparativna analiza komercijalnog testa sa referentnim standardom	80
5.3. Produkcija biofilma kvasnica uzročnika vulvovaginalne kandidoze	82
5.4. Osetljivost izolata prema antimikoticima u uslovima <i>in vitro</i>	85
5.5. Zastupljenost izolata produkora biofilma slabije osetljivosti na antigljivične lekove	86
5.6. Utvrđivanje minimalne inhibitorne koncentracije antigljivičnih lekova primenom standardizovane mikrodilucione metode	88
5.7. Ispitivanje antigljivičnog dejstva etarskog ulja biljke <i>Melissa officinalis</i>	93
5.8. Antibiofilm efekat antimikotika i etarskog ulja biljke <i>Melissa officinalis</i>	95
6 ZAKLJUČCI	102
7 LITERATURA	106
IZVORI ILUSTRACIJA	130

1 UVOD

Vulvovaginalna kandidoza (VVK), ili po novom razmatranju vulvovaginalna gljivična infekcija, predstavlja jedno od najčešćih oboljenja žena. Ova infekcija se uglavnom javlja u reproduktivnom dobu i, iako nižeg morbiditeta, značajno narušava kvalitet života pacijentkinja, prvenstveno njena hronična/rekurentna forma [1]. Tri četvtine ženske populacije u svetu bar jednom u životu ima VVK, dok se kod 55% do njihovih dvadesetih godina ova infekcija razvije više puta [2]. Pored navedenog, 8-10% žena boluje od hronične, odnosno rekurentne VVK (RVVK) koja podrazumeva minimalno 3-4 manifestne infekcije u toku jedne godine. Ova infekcija se javlja kod žena svih slojeva društva, a usled izuzetno visoke incidencije i prevalencije, kao i postojanja rekurentne forme, predstavlja veliki zdravstveni problem [3].

Pokušaji utvrđivanja predisponirajućih faktora i uzroka VVK, a prvenstveno njene rekurentnosti, datiraju još od sedamdesetih godina prošlog veka. Naime, postoje dve teorije o mogućem uzroku hroniciteta, pri čemu jedna predstavlja, po mišljenju nekih autora, već prevaziđenu tezu o endogenoj ili egzogenoj reinfekciji kao uzroku njenog stalnog obnavljanja. Prema drugoj teoriji, uzrok rekurentnosti je recidiviranje infekcije koje može biti posledica osobina gljiva-kuvasnica, slabljenja nespecifičnih mehanizama zaštite, ili čak mogućnosti disregulacije imunskog odgovora domaćina na nivou mukoze. Aktuelna istraživanja obuhvataju ispitivanje faktora virulencije *Candida* spp., mehanizama otpornosti ili imunotolerancije domaćina, kao i osetljivosti, odnosno rezistencije uzročnika prema najčešće korišćenim antigljivičnim lekovima.

1.1. VULVOVAGINALNA KANDIDOZA-VULVOVAGINALNA GLJIVIČNA INFEKCIJA

Klinički simptomi i znaci VVK nisu specifični i mogu se javiti i kod genitalnih infekcija druge etiologije, poput bakterijske vaginoze, trihomonijaze ili gonoreje [4]. Najčešće kliničke manifestacije VVK su svrab i osećaj žarenja koji su praćeni bolom i iritacijom vaginalne mukoze, što dovodi do dispareunije i dizurije. Svi navedeni simptomi su često udruženi sa prisustvom gustog sekreta beličaste boje, vulvovaginalnim eritemom, edemom i nastankom fisura [5].

Jedna od predloženih klasifikacija VVK obuhvata podelu na:

- *Candida* kolonizaciju vulvovaginalne mukoze,
 - sporadične *Candida* infekcije vulvovaginalne mukoze bez komplikacija i
 - hroničnu *Candida* infekciju vulvovaginalne mukoze [6].
-
- ***Candida* kolonizacija vulvovaginalne mukoze**

Gljive roda *Candida* čine zajednicu mikroorganizama, mikrofloru/mikrobiotu prisutnu na vaginalnoj mukozi kod visokog procenta žena. Genomska konstitucija mikrobiote se naziva mikrobiom, pri čemu se individualni mikrobiom nastao nakon rođenja menja tokom života. Kooperativni odnos mikroorganizama u mikrobioti vaginalne mukoze pruža prvu liniju odbrane od infektivnih agenasa, kao i od oportunističkih patogena. Ova "zdrava" ravnoteža se naziva eubioza [7]. Najzastupljeniji mikroorganizmi vaginalne mikrobiote zdravih žena su bakterije roda *Lactobacillus*. Molekularnim tehnikama je utvrđeno prisustvo i drugih bakterijskih rodova kao što su *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Fingoldia*, *Streptococcus*, *Gardnerella*, *Sneathia*, *Mobiluncus*, *Megasphaera*, ali u znatno nižem procentu. U sklopu vaginalne mikrobiote se mogu naći i gljive, najčešće kvasnice rodova *Candida* i *Saccharomyces* [8]. Konvencionalnim metodama, koje podrazumevaju kultivaciju, utvrđeno je da su ovi mikroorganizmi izolovani iz briseva vagine oko 20% žena bez simptoma infekcije. Najčešće izolovana vrsta je *Candida (C.) albicans* (72–91%), za kojom slede i ne-*albicans Candida* vrste (NAC) kao što su *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. parapsilosis* [9]. Ipak, primenom tehnika molekularnog sekvencioniranja je utvrđeno da su vrste roda *Candida* prisutne kod čak 64,5% žena, sa očekivanom prevalencijom *C. albicans* od 82% [8].

- **Sporadična *Candida* infekcija vulvovaginalne mukoze bez komplikacija**

Narušavanje ravnoteže u mikrobioti dovodi do disbioze koja neretko može uzrokovati i inflamaciju. Između mikrobiote vagine i reproduktivne fiziologije žena postoji uzajamna korelacija, a prerastanje gljiva u reproduktivnom dobu vrlo često dovodi do nastanka vulvovaginalne gljivične infekcije [10]. Izuzetno visok procenat žena, odnosno tri četvrtine ženske populacije, bar jednom u životu oboli od VVK, ali su te infekcije najčešće samo sporadične, blažeg inteziteta i uspešno se saniraju primenom preporučenih tretmana.

- **Hronična *Candida* infekcija vulvovaginalne mukoze**

Hronična VVK se može manifestovati u vidu težeg, ozbiljnijeg oblika VVK, perzistentne *ne-albicans* infekcije i rekurentne vulvovaginalne kandidoze (RVVK). Utvrđivanje uzroka hroničnog oblika ove infekcije je predmet brojnih istraživanja tokom poslednjih pedesetak godina. Iako još uvek nije ustanovljen tačan uzrok perzistiranja VVK, nakon prvih teorija o najverovatnijoj endogenoj i egzogenoj reinfekciji, danas se došlo do važećih postulata koji podrazumevaju da osobine gljiva, odnosno virulentnost i slabija osetljivost ili rezistentnost na najčešće korišćene antigljivične lekove mogu biti uzrok neefikasnosti tretmana i recidiviranja infekcije [11]. Već dve decenije se intenzivno radi na pronalaženju i uspostavljanju terapijskih opcija koje bi bile uspešne kako kod sporadičnih tako i kod rekurentnih formi bolesti.

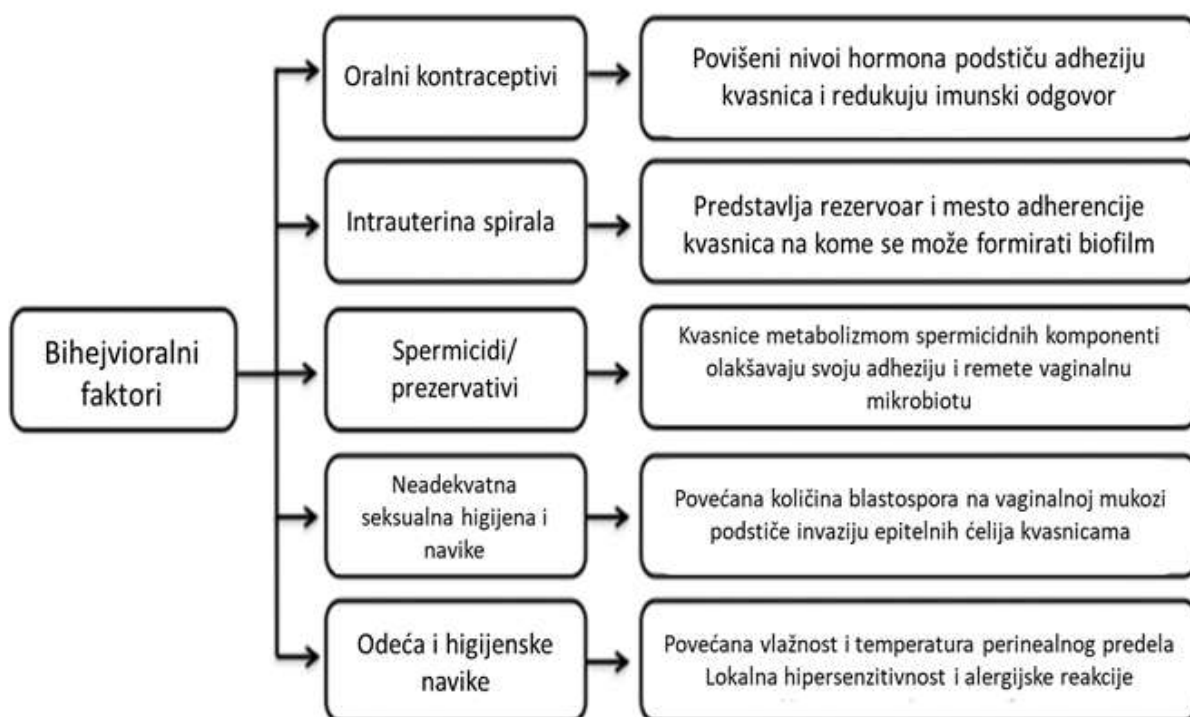
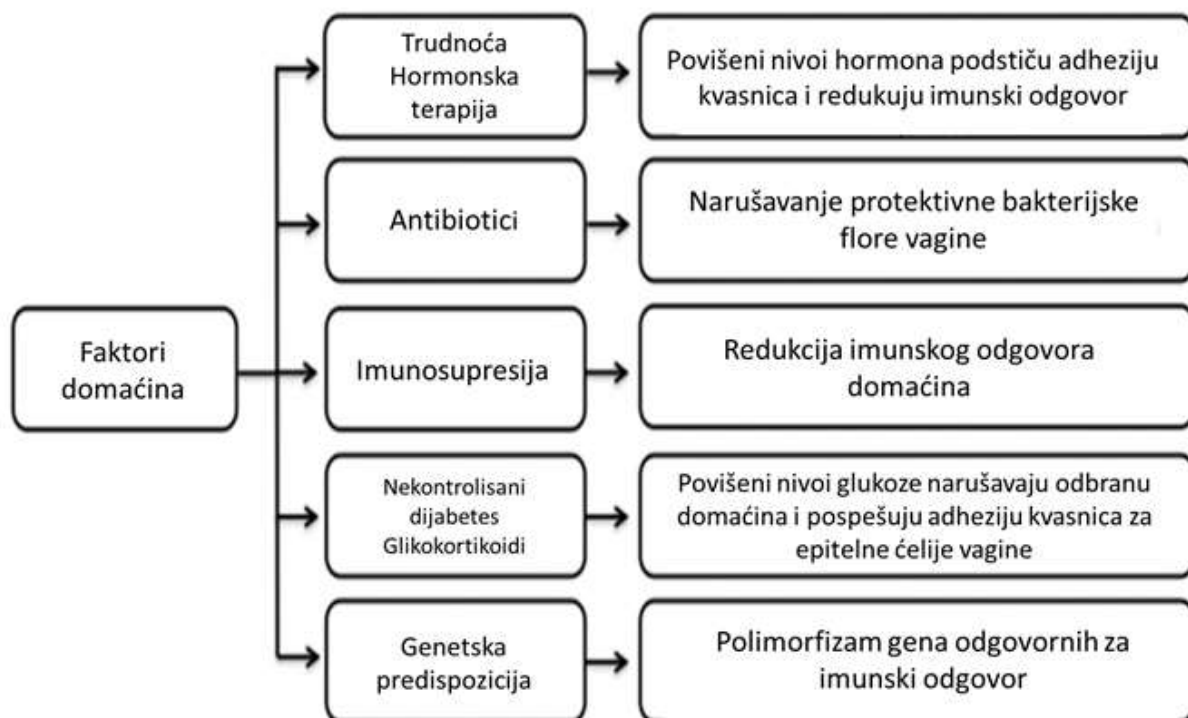
Pored navedenog, utvrđeno je da VVK može uticati i na ishod trudnoće, posebno ukoliko postoji istorija serklaža grlića materice i može predstavljati veliki problem u pokušajima vantelesne oplodnje [12]. Primenom molekularnih metoda dokazana je vertikalna transmisija ovih kvasnica kod 33% prematurusa sa malformacijama ili malom telesnom masom. Navedeni podaci o prevalenciji VVK, kao i mogući razvoj hronične forme ove infekcije, otežavaju uspostavljanje protokola koji bi imali za cilj sprečavanje infekcije novorođenčadi, prvenstveno prematurusa.

Mada retko, u slučajevima neadekvatnog lečenja VVK, može doći do razvoja komplikacija kao što su pelvična inflamatorna bolest, ektopična trudnoća, sterilitet, pelvični apscesi, spontani pobačaji i poremećaji menstrualnog ciklusa. Adekvatna mikrobiološka dijagnostika i primena odgovarajuće terapije mogu značajno doprineti sprečavanju ovih komplikacija [13].

1.2. EPIDEMIOLOŠKI ASPEKT VULVOVAGINALNE KANDIDOZE

Kvasnice roda *Candida* su široko rasprostranjene u prirodi i deo su normalne flore ljudi u vidu kolonizatora sluzokoža genitalnog, urinarnog, respiratornog i gastrointestinalnog trakta, kao i usne duplje, noktiju i kože [14]. Međutim, u određenim uslovima, prelazeći iz komensalne u virulentnu formu, ove kvasnice mogu biti i uzročnici različitih infekcija tako da se smatraju oportunističkim patogenima. Infekcije izazvane ovim mikroorganizimima su uglavnom superficijalne ali se, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata, mogu razviti i invazivne forme koje mogu ugroziti i život pacijenta [15].

S obzirom na to da su gljive roda *Candida* deo normalne flore vagine većine žena i da njihovo prisustvo često nije praćeno simptomima infekcije, smatra se da je VVK uglavnom endogenog porekla [16]. Kvasnice koje naseljavaju vaginalnu mukozu uglavnom su poreklom iz perianalne regije i nalaze se u ravnoteži sa ostalim predstavnicima mikrobiote, kao i odbrambenim mehanizmima domaćina (uspostavljena imunotolerancija) [17, 18]. Remecenje ovog balansa može dovesti do razvoja VVK, koja predstavlja drugu najčešću disbiozu nakon bakterijske vaginoze [7]. Faktori koji bi mogli biti odgovorni za narušavanje ove ravnoteže mogu poticati od samog domaćina (trudnoća, imunosupresivna stanja, stres, *Diabetes mellitus*, primena antibiotika, genetska predispozicija) ili od njegovih životnih navika (bihejvioralni faktori) kao što su primena kontraceptiva sa visokim sadržajem estrogena, neuravnotežena ishrana sa povećanim unosom ugljenih hidrata, povećana seksualna aktivnost, nošenje sintetičke odeće [14, 19, 20]. Klasifikacija faktora rizika uz posledice koje oni mogu izazivati prikazana je na slici 1.



Slika 1. Faktori rizika za razvoj vulvovaginalne kandidoze i njihovi posledični efekti

1.3. GLJIVE RODA *CANDIDA*

1.3.1. Klasifikacija

Kvasnice roda *Candida* su poslednjih godina podvrgnute brojnim reklasifikacijama, a s obzirom na veliki značaj infekcija izazvanih ovim mikroorganizmima, nova nomenklatura može izazvati poteškoće ne samo mikrobiolozima već i kliničkim lekarima. Prvobitna klasifikacija kvasnica na osnovu njihovih sličnih morfoloških osobina više ne zadovoljava opšteprihvaćene kriterijume roda koji podrazumevaju da sve vrste potiču od zajedničkog pretka, optimalan broj vrsta koji bi jedan rod trebalo da obuhvata, kao i to da bi članovi jednog roda trebalo da dele izvesne zajedničke evolutivne karakteristike [21-24]. Ekstenzivno filogenetsko proučavanje članova prvobitnog roda *Candida* rezultiralo je reklasifikacijom pri čemu su neke vrste zadržale svoje mesto u ovom rodu poput *C. albicans*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*, a kojima je pridodata i nova vrsta *C. auris*, potencijalni uzročnik veoma ozbiljnih oboljenja, koji se lako širi među pacijentima u bolničkim uslovima i pokazuje visoku stopu rezistencije prema postojećim antigljivičnim lekovima [25].

Sa druge strane, neke vrste su zbog svojih karakteristika izdvojene u druge ili novoformirane rodove [23]. Na primer, veoma zastupljena vrsta *C. glabrata* je, zajedno sa blisko srodnim vrstama *C. bracarensis* i *C. nivariensis*, svrstana u novi rod *Nakaseomyces* (*N.*), tako da su njihovi nazivi preinačeni u *N. glabrata*, *N. bracarensis* i *N. nivariensis* [26]. Takođe, jedna od prevalentnijih vrsta za humanu patologiju *C. krusei* je svrstana u rod *Pichia* (*P.*), tako da se sada navodi kao *P. kudriavzevii*. Još jedna vrsta *C. norvegensis* je takođe klasifikovana u ovaj rod tako da je njen naziv sada *P. norvegensis* [27]. Jedna od zajedničkih karakteristika rodova *Nakaseomyces* i *Pichia* je ta da uključuju vrste koje su slabije osetljive ili urođeno rezistentne prema antigljivičnim lekovima iz grupe azola [23]. Novoformirani rodovi koji sadrže vrste koje su pripadale rodu *Candida* su i *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Wickerhamomyces* i *Yarrowia* [27]. Neke od najznačajnijih vrsta roda *Candida* i njihova nova klasifikacija su prikazane na tabeli 1.

Nova klasifikacija gljiva, prvenstveno kvasnica, predstavlja dodatni problem u medicinskoj mikologiji jer usvajanje i definisanje izolata po novoj taksonomiji može dovesti do potencijalnih zabuna i konfuzija kod kliničkih lekara prilikom interpretacije mikoloških analiza. Mnogi istraživači su mišljenja da ne treba menjati stare nazive kvasnica koje su sada svrstane u izdvojene rodove ili da bi trenutno trebalo zadržati staru nomenklaturu uz pisanje

novih naziva u zagradi. Pored toga, već dugi niz godina prepoznatljiv klinički entitet “VVK” bi takođe mogao biti promenjen, bilo u “vulvovaginalna gljivična infekcija”, ili preciznije “vulvovaginalna infekcija izazvana kvasnicama”.

Tabela 1. Nova klasifikacija značajnih vrsta roda *Candida*

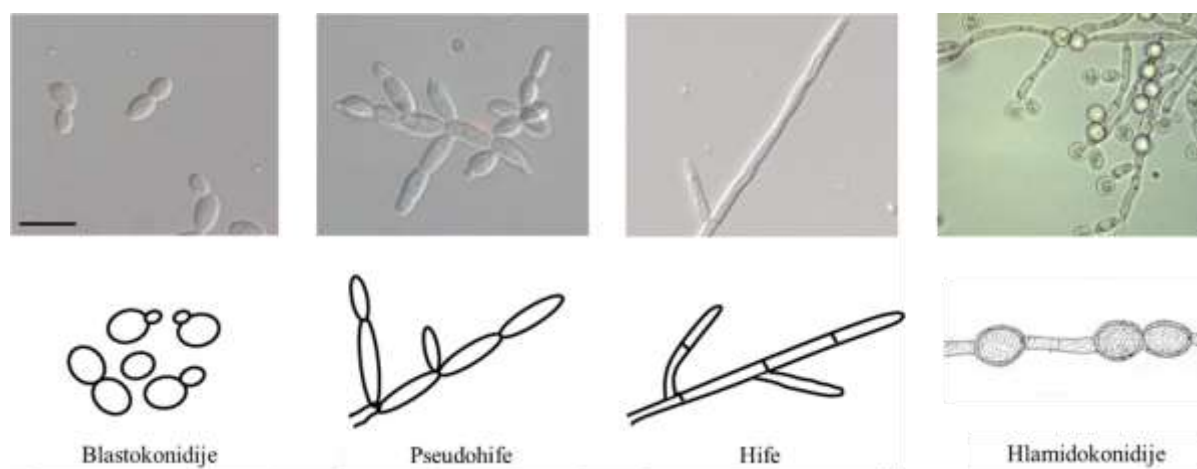
Vrste roda <i>Candida</i>	Nova taksonomija vrsta i rodova kvasnica
<i>Candida glabrata</i>	<i>Nakaseomyces glabrata</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>

Kao genetski blizak srodnik vrste *C. glabrata*, mogući kolonizator vulvovaginalne sluzokože je i kvasnica *Saccharomyces (S.) cerevisiae*. Ovo je ubikvitarna vrsta, široko rasprostranjena u spoljašnjoj sredini, koja može biti deo normalne flore respiratorne, gastrointestinalne i urogenitalne sluzokože [28]. Smatra se da je kolonizacija ovom kvasnicom češća kod osoba koje imaju neku osnovnu hroničnu bolest, ali još uvek nije utvrđeno da li predstavlja samo tranzitornu floru ili je kod nekih ljudi sastavni deo normalne flore sluzokoža [29]. Prisustvo ove kvasnice na vulvovaginalnoj mukozi bi se moglo objasniti činjenicom da je jedna od podvrsta *S. cerevisiae*, tačnije *S. boulardii*, sastavni deo mnogih probiotika, tako da iz digestivnog trakta može dospeti na vaginalnu sluzokožu. Iako neki autori veruju da prisustvo ove kvasnice ne samo da nije štetno, već može doprineti i izlečenju bakterijske vaginoze i VVK [30], drugi ipak smatraju da ona može biti uzročnik vulvovaginalnih gljivičnih infekcija [31, 32].

1.3.2. Morfologija gljiva roda *Candida*

Gljive roda *Candida* predstavljaju jednoćelijske mikroorganizme – kvasnice. Ovi eukarioti su okruženi ćelijskim zidom sastavljenim od polisaharida (hitina, glukana i manana) kovalentno vezanih za proteine, koji im daje oblik i čvrstinu [33, 34]. Ispod ćelijskog zida je smeštena dvoslojna fosfolipidna membrana čija je najvažnija komponenta ergosterol, koji

predstavlja ciljno mesto delovanja većine antigljivičnih lekova [35]. Pored jednoćelijskih formi kvasnica, odnosno blastokonidija okruglog ili ovalnog oblika, gljive roda *Candida* se mogu naći i u filamentoznim, višćelijskim formama, odnosno u vidu pseudohifa ili hifa (Slika 2). Pseudohife, kao što im samo ime kaže, nisu prave hife, elipsoidnog su oblika, sa suženjima na spojevima ćelija i tipično su veoma razgranate. Nasuprot tome, prave hife koje predstavljaju osnovne strukture tela-micelije višćelijskih gljiva poseduju paralelne ćelijske zidove, prave pregrade bez suženja i generalno su manje razgranate [36]. Važno je napomenuti da sve vrste roda *Candida* nemaju sposobnost rasta u vidu svih navedenih formi, a udeo ćelija svake od ove tri morfološke varijante može da varira među različitim vrstama ovog roda. Na primer, *C. albicans* se može naći u sva tri morfološka varijeteta, dok *C. glabrata* formira skoro isključivo samo blastokonidije. Druge vrste kao što su *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) [26] se najčešće nalaze u formi blastokonidija, mada mogu obrazovati i pseudohifalne formacije [37, 38]. Četvrtu morfološku formu predstavljaju hlamidokonidije koje se mogu naći kod nekoliko vrsta *Candida*, uključujući *C. albicans* i *C. dubliniensis*. Ovo su krupne, okrugle ćelije debelih zidova koje se tipično formiraju na krajevima hifalnih ćelija kao odgovor na nepovoljne uslove sredine [39, 40].



Slika 2. Morfologija gljiva roda *Candida*

1.3.3. Patogeneza kandidoze i faktori virulencije gljiva roda *Candida*

Do pre nekoliko decenija verovalo se da gljive roda *Candida* samo pasivno učestvuju u uspostavljanju oportunističkih gljivičnih infekcija koje su posledica pridruženih bolesti ili imunokompromitovanosti domaćina. Danas postoji konsenzus da ove kvasnice aktivno učestvuju u patogenezi bolesti uz pomoć odgovarajućih faktora virulencije koji uključuju

adheziju, formiranje biofilma, dimorfizam, kao i produkciju ekstracelularnih hidrolitičkih enzima [41].

Adhezija kvasnica za površine tkiva domaćina je neophodna kako bi došlo do inicijalne kolonizacije ovih struktura, što doprinosi perzistentnom prisustvu mikroorganizama i posledičnom nastanku infekcije [42]. Stoga je primarni događaj u razvoju VVK upravo adhezija kvasnica za epitelne ćelije vagine [43, 44]. Osim za sluzokožu, gljive roda *Candida* mogu adherirati i za površine nekih veštačkih materijala kao što su intrauterine spirale koje se koriste za kontracepciju [45]. Inicijalno vezivanje kvasnica za biotske i abiotske površine je posredovano specifičnim površinskim ćelijskim proteinima koji se nazivaju adhezini [46]. Adhezini imaju sposobnost prepoznavanja liganda domaćina kao što su serumski proteini ili komponente ekstracelularnog matriksa (ECM) tkiva domaćina (npr. laminin, fibronektin, kolagen, vitronektin i entaktin) ili podstiču vezivanje za abiotske površine putem hidrofobnih interakcija [47]. Najbolje su proučeni adhezini vrste *C. albicans* (kodirani genima ALS - eng. *agglutinin-like sequence*), pri čemu je utvrđeno da se glavna grupa ovih molekula sastoji od osam članova (ALS1-7, 9) [48]. Takođe je dokazano da ekspresija svakog od gena koji kodiraju ove adhezine zavisi od lokacije kvasnica u organizmu odmaćina, tako da su kod vaginalnih izolata zabeležene najizraženije ekspresije gena ALS1, ALS2, ALS3 i ALS9 [49]. Kod vrste *C. glabrata* identifikovana su 23 različita gena koji kodiraju epitelne adhezine (porodica EPA gena – eng. *epithelial adhesin family of adhesins*) među kojima je utvrđeno da najizraženiju ekspresiju u rekonstituisanom humanom vaginalnom epitelu inficiranom vrstom *C. glabrata* imaju geni EPA1, EPA6 i EPA7 [50]. Kod vrste *C. parapsilosis* je identifikovano 11 gena koji kodiraju adhezini slične proteine [51], dok je za najmanje tri ALS proteina ustanovljeno da imaju ulogu u adheziji kod vrsta *C. tropicalis* i *C. dubliniensis* [52]. Ipak, za razliku od *C. albicans*, kod mnogih NAC vrsta funkcija ovih molekula i dalje nije dovoljno proučena i zahteva dodatna istraživanja.

Adhezija kvasnica za epitelne ćelije domaćina je prvi korak u **formiranju biofilma** koji predstavlja strukturnu zajednicu mikroorganizama adheriranih za abiotsku ili biotsku površinu, ukalupljenih u ECM koji sami produkuju. Mikroorganizmi u biofilmu su zaštićeni od nepovoljnih uticaja iz spoljašnje sredine, prvenstveno od dejstva antigljivičnih lekova, koji i ne dostižu efikasnu koncentraciju u bifilmu, bilo da se lek aplikuje lokalno ili primenjuje sistemski [53]. Zbog svega navedenog ova ćelijska zajednica predstavlja važan faktor virulencije gljiva roda *Candida*.

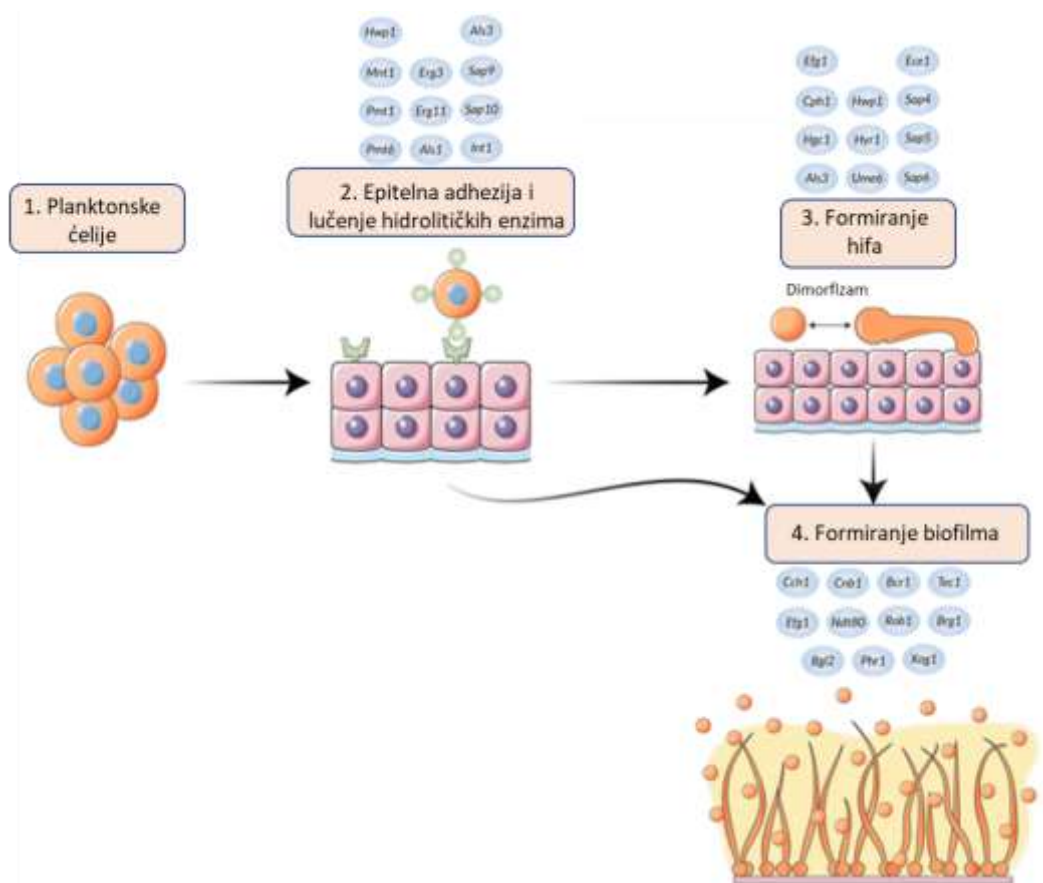
Pored adhezije i sposobnosti formiranja biofilma, gljive roda *Candida* mogu proizvoditi i više **hidrolitičkih enzima** koji imaju važnu ulogu u adheziji, penetraciji, invaziji

i destrukciji tkiva domaćina [54]. Najvažniji među njima su sekretorne aspartil proteaze (Sap), kao i fosfolipaze (eng. *phospholipases* – PL), lipase (eng. *lipases* – LP) i hemolizini [42]. Sekretorne aspartil proteaze olakšavaju adheziju na tkivima što posledično dovodi do njihovog oštećenja i povezane su sa promenama u imunskom odgovoru domaćina [55]. Do danas je identifikovano 10 SAP gena (SAP1-10) kod *C. albicans* [56], tri (SAPP1-3) kod *C. parapsilosis* [57] i najmanje četiri (SAPT1-4) kod *C. tropicalis* [58, 59], ali je i u ovom slučaju većina gena NAC vrsta ostala nedovoljno okarakterisana. Takođe, samo jedna studija je pokazala sposobnost vrste *C. glabrata* da produkuje proteaze, ali njihov tip je i dalje nepoznat [60]. Važno je istaći da, za razliku od drugih vrsta proteaza, Sap proteaze ispoljavaju svoju aktivnost samo pri pH 4, a s obzirom na to da ovi uslovi odgovaraju vaginalnoj sredini, može se zaključiti da je uloga ovih enzima veoma važna za patogenezu VVK [5, 61]. Što se tiče fosfolipaza, to su enzimi koji hidrolizuju jednu ili više estarskih veza u glicerofosfolipidima doprinoseći oštećenju membrane ćelije domaćina i adheziji kvasnica za tkiva. Nekoliko vrsta roda *Candida* ima sposobnost produkcije ekstracelularnih fosfolipaza, s tim što NAC vrste proizvode značajno niže nivoe u poređenju sa *C. albicans* kod koje je identifikovano sedam gena koji kodiraju ove enzime (PLA, PLB1-2, PLC1-3 i PLD1) [62]. Takođe, utvrđeno je da je produkcija fosfolipaza individualna karakteristika svakog soja [63]. Enzimi lipaze su uključeni u hidrolizu triacilglicerola i njihova aktivnost je povezana sa adhezijom kvasnica i posledičnim oštećenjem tkiva domaćina, a uočen je i njihov uticaj na imunske ćelije [64]. Kod *C. albicans* lipaze kodira 10 gena (LIP1-10), slične sekvence su identifikovane i kod *C. tropicalis*, dva gena kod *C. parapsilosis* (CpLIP1-2), dok kod vrste *C. glabrata* nije utvrđen nijedan gen koji kodira ove enzime [42]. Lipaze su manje proučavane od Sap proteaza i fosfolipaza, posebno u pogledu njihove specifične povezanosti sa anatomskim mestom infekcije. Kvasnice roda *Candida* proizvode i hemolizine koji razgrađuju hemoglobin, olakšavajući oslobađanje gvožđa koje je neophodno za preživljavanje i perzistiranje ovih mikroorganizama. Iako je sinteza ovih proteina već opisana kod vrsta *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*, genetska ekspresija hemolitičke aktivnosti je i dalje nedovoljno proučena [65, 66].

Još jedan važan faktor virulencije gljiva roda *Candida* je **reverzibilna morfološka alteracija** između jednoćelijske forme kvasnica, odnosno blastokonidija, i filamentoznih pseudohifa i višćelijske forme, odnosno hifa [42]. Sposobnost formiranja pseudohifa i pravih hifa je karakteristika najznačajnije vrste ovog roda, *C. albicans*, a uočena je i kod vrste *C. dubliniensis*, dok se za *C. tropicalis* smatra da može formirati pseudohife, a po nekim navodima u literaturi poseduje i mogućnost formiranja hifalnih formacija. Pseudohife mogu formirati i

vrste *C. krusei* i *C. parapsilosis*, dok se *C. glabrata* može naći samo u formi blastokonidija [42]. Utvrđeno je da je jednoćelijska forma obično prisutna kod zdravih asimptomatskih žena, za razliku od višećelijske za koju se smatra da predstavlja prvu kariku u patogenetskom lancu VVK [67]. Naime, filamentozni oblici poboljšavaju kolonizaciju i invaziju tkiva domaćina i pokazuju povećanu otpornost na fagocitozu [42, 68]. Veruje se da hife igraju važnu ulogu u tkivnoj invaziji jer su istraživanja u uslovima *in vitro* pokazala da su eksperimentalni sojevi *C. albicans*, koji su prethodno onemogućeni da obrazuju filamentozne forme, pokazali nižu sposobnost invazije tkiva u poređenju sa sojevima sa pomenutom sposobnošću [69]. Na konverziju jednoćelijske u višećelijsku formu utiču kako faktori sredine, tako i drugi faktori virulencije samih kvasnica. Na primer, prisustvo fosfolipaze D (PLD1) *C. albicans* je neophodno za tranziciju blastokonidija u hife [70], a tokom razvoja hifa dolazi i do ekspresije nekih SAP gena (SAP4-6) [71], kao i gena za hifalni zidni protein (HWP1 – engl. *hyphal wall protein 1*) koji predstavlja specifični adhezin odgovoran za kovalentno vezivanje kvasnica za epitelne ćelije domaćina [50]. Dokazano je i da smanjeno prisustvo hranljivih materija, alkalna sredina, temperatura od 37 °C i niska koncentracija ćelija *Candida* (<10⁷ ćelija/mL) simultano utiču na modulaciju profila ekspresije gena odgovornih za formiranje hifa, što je praćeno sintezom specifičnih adhezina koji omogućavaju vezivanje za vaginalne epitelne ćelije [72, 73].

Pored faktora virulencije samih kvasnica, za patogenost *Candida* spp. odgovorni su i neki spoljašnji uticaji, a jedan od najvažnijih su hranljive materije iz kojih kvasnice koriste ugljenik. Mnoge studije su pokazale da različiti **izvori ugljenika** imaju uticaj na strukturu ćelijskog zida ovih gljiva, što dalje može uticati na njihovu virulenciju i interakcije sa imunskim ćelijama domaćina [74, 75]. Korišćenje ugljenika iz glikogena, njegovih proizvoda razgradnje, pa čak i iz mlečne kiseline kao alternativnog izvora ovog elementa, značajno utiče na to koja će od navedenih formi ovih kvasnica biti prisutna u vagini [76]. Interakcije između gljiva i bakterija takođe igraju važnu ulogu u održavanju homeostaze vaginalne mikrobiote. Pored fizičkih interakcija, razmene hemijskih supstanci, korišćenja metaboličkih produkata i uticaja na imunski sistem, bakterijske ćelije se nadmeću sa ćelijama kvasnica za adherentno mesto na vaginalnoj mukoziji jer imaju veći afinitet za receptore epitelnih ćelija [77-79]. Takođe, nizak pH i baktericidna jedinjenja koja luče laktobacili imaju tendenciju da suzbiju prekomerni rast *Candida* kvasnica i njihov prelazak iz avirulentne jednoćelijske forme u virulentni hifalni oblik [72, 77], kao i formiranje biofilma [80]. Šema patogeneze infekcija gljiva roda *Candida* sa najvažnijim faktorima virulencije prikazana je na slici 3.



Slika 3. Šematski prikaz patogeneze infekcija izazvanih gljivama roda *Candida*

Ipak, patogenetski mehanizmi koji dovode do razvoja VVK još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Faktore odgovorne za promenu morfoloških oblika kvasnica i dalje je teško razumeti, a imunski mehanizmi zaštite se još uvek razmatraju. S obzirom na to da je ustanovljeno da su neki sojevi *Candida* spp. virulentni, dok sa druge strane postoje i avirulentni sojevi koji nemaju sposobnost dimorfne tranzicije [81], u cilju boljeg razumevanja ovih razlika primenjena je komparativna genomika. Ranije studije su pokazale da perzistentno prisustvo istog soja *Candida* spp. dovodi do genetske mikroevolucije, što se smatra odgovornim za nastanak VVK [82]. Skorašnja istraživanja bazirana na sekvencioniranju kompletnog genoma vrsta roda *Candida* izolovanih kod VVK sugerišu da vremenom dolazi do modulacije gena pod uticajem mikrosredine vulvovaginalne mukoze koja utiče na rast i razmnožavanje ćelija *Candida* spp. [83, 84]. Očekuje se da buduća genetska istraživanja reše enigmnu prelaska ćelija *Candida* spp. iz jedne forme u drugu koji se dešava kao odgovor na prisutne predisponirajuće faktore rizika.

Kao što je već navedeno, uzročnici VVK su kvasnice roda *Candida*, a najdominantnija među njima je vrsta *C. albicans*. Visoka prevalencija ove vrste kao uzročnika infekcija

objašnjava se njenom značajnom sposobnošću adherencije, konverzije iz jednoćelijske u višećelijsku formu sa posledično izraženom sposobnošću produkcije biofilma, kao i lučenjem različitih enzima koji doprinose destrukciji tkiva, što su jedne od njenih najvažnijih karakteristika [85, 86]. Međutim, poslednjih godina su kao uzročnici sporadičnih i rekurentnih VVK sve više prepoznate i NAC vrste, kao što su *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*. Prema nedavno objavljenim istraživanjima, NAC vrste mogu biti deo vaginalne mikrobiote kod žena u reproduktivnom dobu u značajnom broju slučajeva [87]. Analizom distribucije vrsta među različitim starosnim grupama dolazi se do podatka da je povećanje procenta NAC vrsta u korelaciji sa starošću pacijentkinja [88]. Utvrđeno je da se prevalencija gljivičnih infekcija genitalnog trakta značajno smanjuje tokom menopauze, osim u slučajevima kada žene koriste hormonsku supstitucionu terapiju i kod onih u postmenopauzi sa loše kontrolisanim dijabetesom, bez obzira na njihov hormonski status [89]. Kod ovih žena se obično beleže veće stope kolonizacije NAC vrstama [90, 91].

Ipak, iako se smatra da su NAC vrste manje virulente od *C. albicans*, u nekim skorašnjim istraživanjima je utvrđeno da ove kvasnice svoju virulentnost ispoljavaju na sasvim drugi način. Tako su, na primer, neke studije pokazale da u tkivima domaćina dolazi do opadanja ekspresije gena NAC vrsta koji stimulišu prelazak u višećelijsku formu koja je jedna od osnovnih karakteristika *C. albicans* [92]. Takođe je pokazano da sposobnost formiranja filamentoznih struktura *C. parapsilosis* ne korelira sa virulentnošću ove vrste [93]. Zbog toga se smatra da bi faktore virulencije ove velike grupe kvasnica trebalo izučavati posebno u odnosu na *C. albicans*.

Pored navedenih vrsta roda *Candida*, u literaturi postoje dokazi da bi i neke ne-*Candida* vrste kao što je kvasnica *S. cerevisiae* takođe mogle biti uzročnici genitalnih gljivičnih infekcija. U prilog tome idu i rezultati skorašnjih istraživanja mikrobioma vaginalne mukoze koji pokazuju da je i ova kvasnica predstavnik mikro zajednice [94]. Objašnjenje mogućnosti razvoja vulvovaginalne gljivične infekcije izazvane sojevima *Saccharomyces* kvasnica moglo bi biti slično objašnjenju nastanka kandidoze. Naime, uz prisutne faktore rizika, prerastanje gljiva ovog roda bi moglo posledično dovesti do disbioze, a nakon toga i do infekcije. Konvencionalna mikološka dijagnostika ne omogućava diferenciranje *Candida* od *Saccharomyces* infekcije, a determinisanje vrsta unutar samog roda *Saccharomyces* bi dodatno zahtevalo primenu najsavremenijih dijagnostičkih procedura. Ovo je važno jer se trenutno u lečenju infekcija digestivnog trakta, kao i drugih hroničnih gastrointestinalnih oboljenja, tokom dužeg vremenskog perioda propisuju probiotici koji sadrže soj *S. cerevisiae-bulardi*. Razlikovanje sojeva *Saccharomyces* spp. koji mogu biti potencijalni uzročnici infekcije od

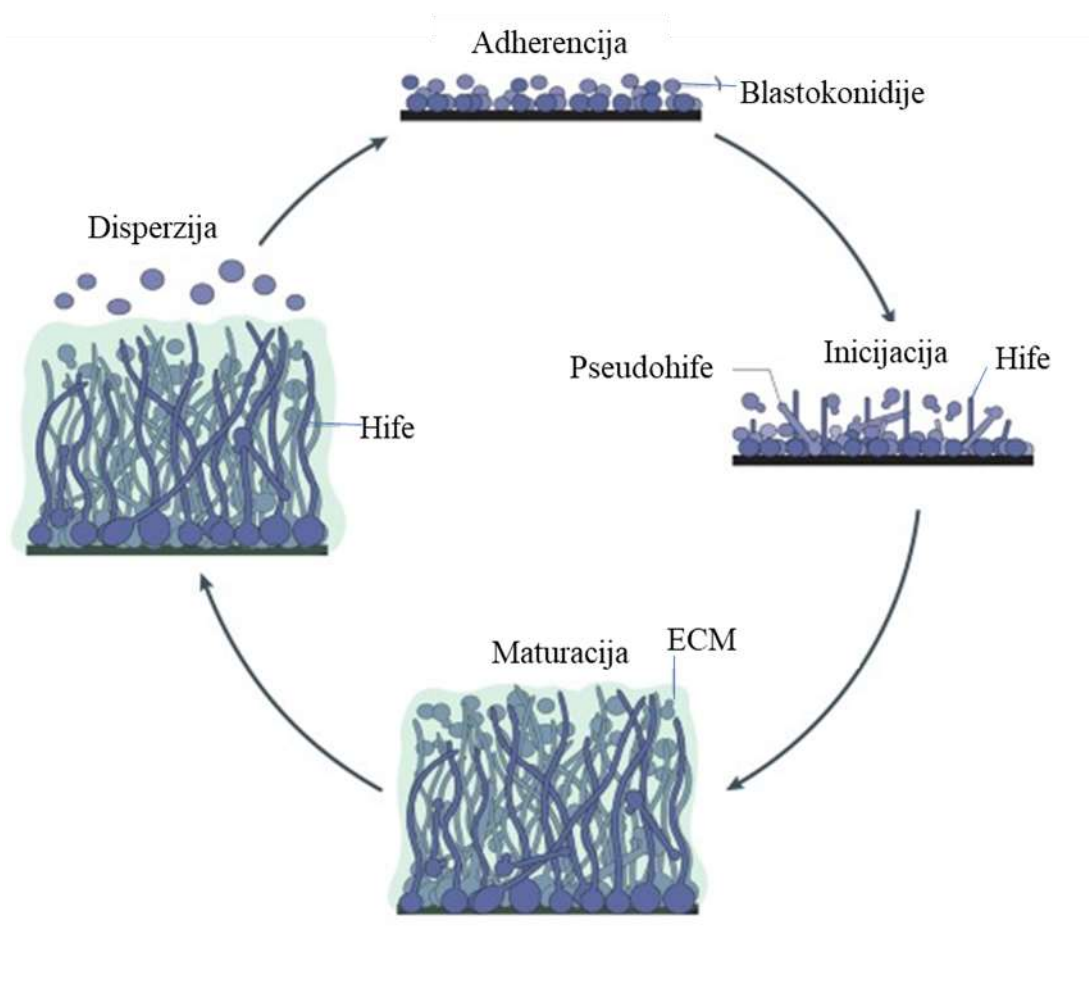
moгуće kolonizacije sojem prisutnim u probiotiku nije izvodljivo čak ni u laboratorijama u kojima je determinacija kvasnica uvedena u rutinski rad jer samo primena molekularnih tehnika omogućava diferenciranje sojeva *S. bulardi*. Sve navedeno uslovljava da još uvek nema zvaničnog stava po pitanju virulentnosti ove kvasnice, a s obzirom na to da je molekularnim tehnikama prisustvo sojeva *S. bulardi* poreklom iz probiotika utvrđeno i u vaginalnim uzorcima određenog broja pacijentkinja, definisanje uloge ove vrste u nastanku genitalne infekcije biće moguće tek nakon budućih istraživanja [30].

1.4. BIOFILM

Prva zapažanja koja se odnose na postojanje biofilma potiču još iz sedamnaestog veka, dok je u prvoj polovini dvadesetog veka biofilm definisan kao zajednica mikroorganizama koji imaju sposobnost da se vežu, pričvrste i razmnožavaju na nekim čvrstim površinama [95]. Danas je poznato da je ova ćelijska zajednica okružena ECM i da se može formirati kako na veštačkim materijalima kao što su različiti implantati, veštačke valvule, proteze ili kateteri, tako i na sluzokožama, pre svega oralnoj i vaginalnoj mukozi [96, 97]. Takođe je poznata činjenica da je biofilm jedan od važnih faktora virulencije gljiva roda *Candida* jer su ćelije u ovoj zajednici zaštićene od različitih nepovoljnih uticaja. Do sada je najbolje izučen proces formiranja biofilma vrste *C. albicans* koji se odvija u četiri faze (Slika 4).

- **Prva** faza podrazumeva adherenciju blastokonidija za odgovarajuću površinu živog ili neživog materijala. Ova faza u uslovima *in vitro* traje oko 60-90 minuta, pri čemu se jedan deo ćelija vezuje za površinu dok se preostale slobodne ćelije mogu lako ukloniti nakon čega ostaje formiran bazalni sloj adheriranih blastokonidija. Za ovu fazu su od suštinskog značaja hidrofobne reakcije između ćelija kvasnica i materijala za koji one adheriraju jer doprinose savladavanju sila odbijanja i ireverzibilnom vezivanju ćelija za odgovarajuću površinu.
- **Druga** faza formiranja biofilma se odnosi na početak proliferacije ireverzibilno vezanih ćelija, kao i na početak filamentacije i odvija se između 11-20h od početka adherencije. Biofilm u ovoj fazi predstavlja dvoslojnu strukturu koja se sastoji od blastokonidija sa začecima germinacionih tuba i hifa uronjenih u ECM koji je produkovan od strane samih ćelija. Proliferacija ćelija kao i njihova međusobna komunikacija su pod

kontrolom signalnih takozvanih “*quorum sensing*” molekula koji im omogućavaju da funkcionišu kao jedna kompaktna celina.



• **Slika 4.** Šematski prikaz formiranja biofilma *C. albicans*

- **Treću** fazu, koja se dešava između 31-72h, prati sazrevanje biofilma koje podrazumeva nastanak složene mreže sastavljene od nekoliko slojeva polimorfnih ćelija uključujući hife (lance cilindričnih ćelija), pseudohife (elipsoidne ćelije spojenih krajeva) i blastokonidije koje su u celini okružene ECM. U ovoj fazi biofilm dobija gust i strukturisan izgled i zaštićen je od dejstva imunskog sistema, kao i od fizičkih i hemijskih agenasa (u koje spadaju i antimikotici) jer mehanički sprečava njihov prodor i transport. Sinteza ECM koga čine ugljeni hidrati, proteini, lipidi, nukleinske kiseline, kao i velika količina vode je najizraženija u ovoj fazi zbog njegove uloge u odvijanju komunikacije između ćelija pomoću signalnih molekula kao i preraspodele vode, hrane i kiseonika.

- **Četvrta** i poslednja faza formiranja biofilma, koja se još naziva i fazom disperzije, karakteriše se odvajanjem pojedinih blastokonidija od samog biofilma pod dejstvom različitih saharolitičnih enzima koji razlažu ECM, pri čemu ove raspršene ćelije mogu adherirati na nekim drugim mestima i formirati nove biofilmove [98-107].

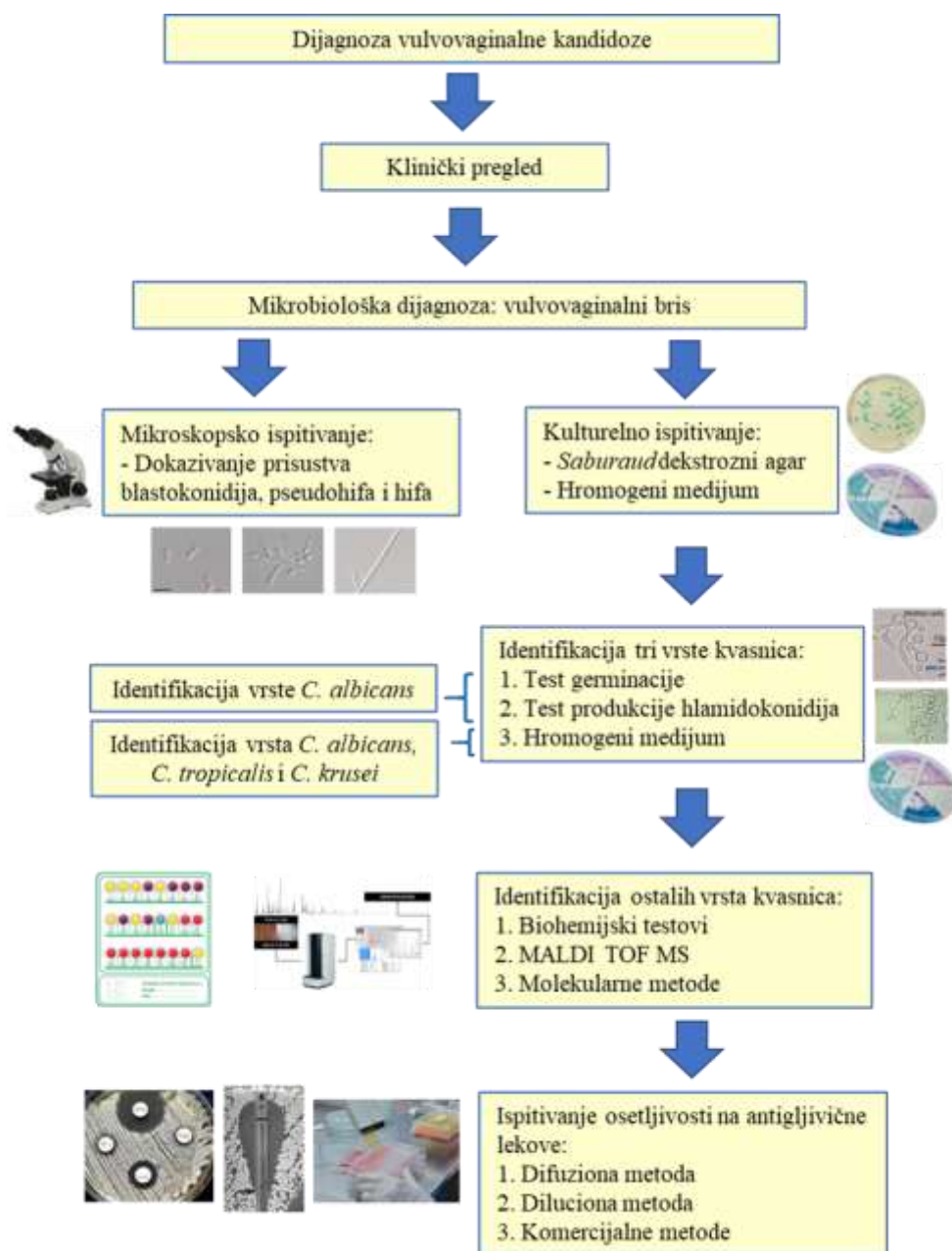
Ćelije kvasnica u biofilmu se mogu naći u sesilnoj i u planktonskoj formi. Sesilne ćelije su adherirane za površinu i okolne ćelije preko ECM, nalaze se u dubljim slojevima biofilma, otpornije su na dejstvo spoljašnjih faktora, pokazuju niže stope rasta i slabije su metabolički aktivne. Najdublje slojeve zauzimaju takozvane ćelije perzisteri sa maksimalno redukovanom metaboličkom aktivnošću. Sa druge strane, planktonske ćelije se mogu odvojiti od zrelog biofilma i imaju sposobnost kolonizacije drugih površina sa tendencijom formiranja novih biofilmova. Ove ćelije su metabolički aktivnije, virulentnije, ali i osetljivije na dejstvo antigljivičnih lekova. Naime, koncentracije antigljivičnih lekova koje su delotvorne prema planktonskim ćelijama su uglavnom potpuno neefikasne prema sesilnim ćelijama biofilma. Iako bi značajno više koncentracije antimikotika mogle biti efikasne u uslovima *in vitro*, ovo su doze koje se ne mogu primeniti u lečenju jer mogu dovesti do neželjenih efekata na ćelije domaćina, oštećujući pre svega jetru i bubrege [108].

Iako u nekim nedavno sprovedenim studijama na osnovu histopatoloških nalaza nije dokazana mogućnost formiranja biofilma gljiva roda *Candida* na vaginalnoj mukozii *in vivo* [109], druga istraživanja su pokazala da ove kvasnice nakon adherencije imaju sposobnost stvaranja zrelog biofilma na površini epitela sluzokože [101, 110]. Ovaj proces je pod kontrolom određenih regulatora transkripcije – Efg1, Tec1, Bcr1, Rob1, Ndt80 i Brg1 [111, 112], pri čemu je utvrđeno da uklanjanje bilo kog od njih može dovesti do greške u formiranju biofilma *in vivo* [113]. Pored toga, ulogu u formiranju biofilma takođe imaju i faktori Als3 i Hwp1 [112]. Kada se umnoži dovoljan broj ćelija kvasnica dolazi do aktivacije inflamatornih ćelija, što posledično dovodi do vaginalnih simptoma uključujući iritaciju, pruritus, peckanje i gustu beličastu sekreciju [114]. Ovaj sekret sadrži hife, inflamatorne ćelije i lizirane ostatke epitelnih ćelija i jedan je od karakterističnih kliničkih simptoma VVK. Formiranje *Candida* biofilma je veliki problem jer je povezan sa višom virulencijom ovih kvasnica kao i otpornošću na imunski odgovor domaćina i antifungalne agense, što posledično dovodi do terapijskog neuspeha i rekurentnih infekcija [115]. Metabolička fleksibilnost, složena struktura i površinski sloj biofilma su neki od faktora odgovornih za njegovu otpornost, dok disperzija ćelija iz biofilma doprinosi porastu virulencije [116].

1.5. DIJAGNOSTIKA VULVOVAGINALNE KANDIDOZE

1.5.1. Izolovanje i identifikacija kvasnica

Dijagnoza VVK se najčešće postavlja na osnovu kliničkog pregleda ili se klinički nalaz potvrđuje i mikroskopskim ispitivanjem. Samo manji broj slučajeva VVK se dijagnostikuje laboratorijskom potvrdom i identifikacijom vrste. Šema dijagnostičke procedure VVK prikazana je na slici 5.



Slika 5. Šematski prikaz mikološke dijagnostičke procedure vulvovaginalne kandidoze

Nakon uzorkovanja brisa sa vaginalne sluzokože i adekvatnog transporta u mikološku laboratoriju, dijagnostička procedura u većini slučajeva obuhvata konvencionalne metode koje podrazumevaju mikroskopski pregled i kultivaciju gljiva. Direktna mikroskopija nativnih preparata napravljenih od briseva pacijentkinja predstavlja jedan od najbržih načina za dokazivanje blastokonidija, kao i pseudohifalnih i hifalnih formacija kvasnica. Ipak, značajan nedostatak ove metode je nedovoljna osetljivost (40-70%) čak i kada je sprovedena od strane eksperata [1]. Iz ovog razloga se kultivacija i dalje smatra zlatnim standardom, uprkos tome što predstavlja skupu i dugotrajnu proceduru. Kultivacija gljiva se vrši na *Saburaud* dekstroznom agaru (SDA) sa visokim sadržajem šećera (4% ili 2% dekstroza/glukoza ili maltoza agar) na kome kvasnice, nakon inkubacije od 72h na 37 °C, formiraju krupne okrugle kolonije beličaste ili krem boje. U laboratorijskoj medicini se danas koriste i hromogeni medijumi koji pored izolacije gljiva roda *Candida* omogućavaju i diferencijaciju vrsta *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei*. Tokom postupka primarne izolacije *C. albicans* formira zelene, *C. tropicalis* plave, a *C. krusei* kolonije ružičaste boje, hrapave površine i nazubljenih ivica [117].

Za utvrđivanje fenotipskih karakteristika *C. albicans* koriste se dva testa kojima se ova vrsta može diferencirati od preostalih NAC vrsta. Prvi je test germinacije kojim se utvrđuje sposobnost *C. albicans* da iz jednoćelijske pređe u micelijumsku, odnosno višećelijsku formu rasta. Izvodi se inokulacijom ispitivane kulture u serum ili neki drugi koloidni rastvor, nakon čega se vrši inkubiranje na 37 °C tokom dva do tri sata. Nalaz filamenata, odnosno germinacionih tuba (koje predstavljaju začetke hifa) na mikroskopskim preparatima napravljenim od ovog inokuluma, potvrđuje pripadnost vrsti *C. albicans* jer je ta fenotipska varijacija zabeležena samo kod ove vrste. Drugi test za diferencijaciju *C. albicans* podrazumeva ispitivanje produkcije hlamidokonidija koje ova vrsta formira u nepovoljnim uslovima. Hlamidokonidije se mogu uočiti na preparatima sa kulture nakon odgovarajuće inkubacije na kukuruznom agaru sa dodatkom Tween 80 ili pirinčanom agaru (RAT medijumu) [118].

Iako su fenotipski testovi korisni pri diferenciranju *C. albicans* od NAC vrsta, a hromogeni medijumi za identifikaciju tri navedene vrste roda *Candida*, ova testiranja ipak ne omogućavaju identifikaciju većine NAC vrsta, kao i ne-*Candida* vrsta poput *S. cerevisiae*. Da bi se sproveda adekvatna dijagnostika koja podrazumeva identifikaciju uzročnika potrebno je koristiti i dodatne biohemijske testove, masenu spektrometriju ili molekularne metode.

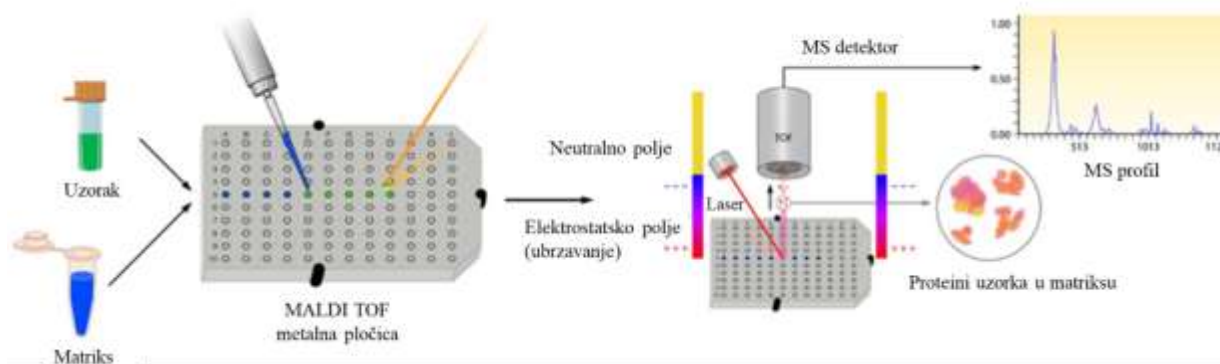
Biohemijski testovi za identifikaciju kvasnica se zasnivaju na detekciji ugljenih hidrata iz kojih gljiva može koristiti ugljenik i azot, a njihovo očitavanje vrši mikrobiolog na osnovu pojave zamućenja ili promene boje indikatora. Primer su komercijalni Fungifast test (*ELITech Microbiology Reagents*, Francuska) i Integral system Yeasts plus (ISYP) test (*Liofilchem®*, Italija), koji omogućavaju diferenciranje kvasnica rodova *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Geotrichum* i *Trichosporon*. Ovi testovi se smatraju skrining testovima, a pored identifikacije omogućavaju i ispitivanje osetljivosti izolata na antigljivične lekove, što je dodatno korisno u rutinskom radu [119, 120].

Pored ovih testova, danas se kao referentni standard za identifikaciju vrsta kvasnica preporučuje MALDI TOF (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Flight*) masena spektrometrija kao brza, tačna i ekonomična metoda za identifikaciju infektivnih agenasa. Ova analitička tehnika za detekciju i karakterizaciju smese organskih molekula je osmišljena 1985. godine. Tada su proizvedeni prvi komercijalni uređaji koji danas imaju široku primenu u identifikaciji struktura i koriste se u naučne, analitičke i industrijske svrhe [121]. MALDI TOF masena spektrometrija se koristi za analizu proteina i peptida, pri čemu se nepoznati protein prvo fragmentiše na peptide čije se apsolutne mase mogu precizno odrediti, dajući njihove masene spektre: „fingerprint“ mase peptida (eng. *Peptide Mass Fingerprint – PMF*) ili „fingerprint“ proteina (eng. *Protein Fingerprinting*).

Ova metoda predstavlja trostepeni proces koji obuhvata:

- **MALDI jonizaciju** (kada se testirani uzorak sjedinjen sa odgovarajućim matriksom izlaže kratkim impulsima laserskih zraka),
- **TOF analizu** [pri kojoj pod dejstvom jakog električnog akceleratorskog polja stvoreni joni dobijaju istu kinetičku energiju, ali se zbog svojih različitih masa kreću različitim brzinama, pri čemu TOF analizator utvrđuje vreme koje je neophodno da jon pređe određenu distancu (eng. *time of flight* - vreme preleta)] i
- **detekciju** (koja podrazumeva registrovanje grupe jona razdvojenih na osnovu vremena preleta od strane detektora nakon čega se generiše maseni spektar analiziranog uzorka) [122].

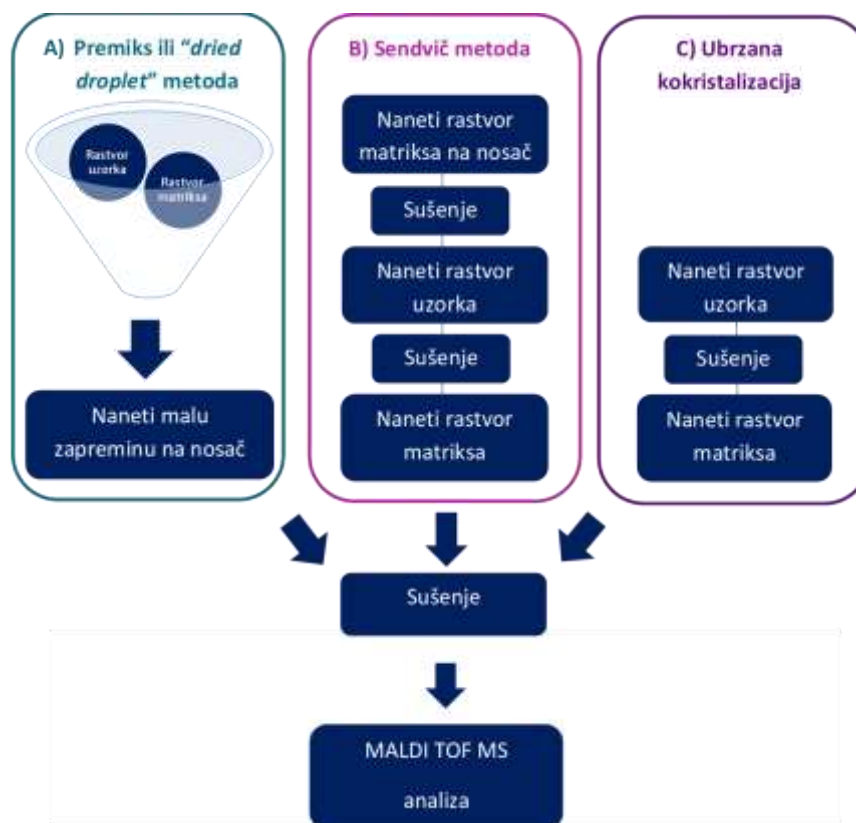
Princip rada MALDI TOF masenog spektrometra je prikazan na slici 6.



Slika 6. Princip rada MALDI TOF masenog spektrometra

U mikrobiologiji se ova metoda koristi za identifikaciju izolovanih mikroorganizama (bakterija, gljiva i virusa), kao i za njihovu detekciju direktno u uzorcima pacijenata, jer analizira jonizovane biološke molekule što omogućava determinaciju njihovih struktura. Identifikacija infektivnog agensa se vrši na osnovu poređenja dobijenog masenog spektra peptida (PMF) ispitivanog uzorka sa bazom podataka koja sadrži poznate proteinske sekvence. Ova procedura je vremenski veoma kratka i jako precizna jer za razliku od konvencionalnih metoda koje traju između 24h do više dana pa i nedelja, MALDI TOF masena spektrometrija traje oko 1h. Prvi korak ove analize podrazumeva sjedinjavanje uzorka sa matriksom čija se uloga ogleda u olakšavanju procesa jonizacije uzorka pod dejstvom laserskog zračenja. U mikrobiologiji se koriste različiti matriksi za različite analize, a u sastav ovih čvrstih, neisparljivih materijala ulaze npr. α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA) i 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina. Postoje tri metode za sjedinjavanje uzorka i matriksa kao i za njihovo nanošenje na metalnu pločicu (Slika 7):

- premiks ili “*dried droplet*” metoda (zasićeni rastvor matriksa i uzorka se prethodno pomešaju, a zatim se mala zapremina nanese na metalnu ploču),
- sendvič metoda (nanošenje matriksa pre i posle dodavanja uzorka pri čemu je između svakog koraka neophodno sušenje) i
- metoda ubrzane kokristalizacije (nanošenje uzorka, a zatim i matriksa, pri čemu je neophodno sušenje svakog od slojeva) [123].



Slika 7. Šematski prikaz pripreme uzorka za MALDI TOF masenu spektrometriju

S obzirom na to da je MALDI TOF masena spektrometrija dizajnirana na način koji omogućava unapređenje novim analizama, najnoviji dizajn ove metode podrazumeva detekciju i identifikaciju infektivnog agensa direktno u pojedinim bolesničkim materijalima (krv, urin i likvor). Brza i tačna identifikacija izolovanog mikroorganizma omogućava blagovremeno donošenje odluke o terapiji, što je ključno za pravilan tretman pacijenata i ishod infekcije, posebno kod imunokompromitovanih i pacijenata sa autoimunskim bolestima. Kada je u pitanju dijagnostika kvasnica ovom metodom, do danas je utvrđeno i uspostavljeno skoro 800 prilagođenih, spremljenih referentnih spektara za kvasnice roda *Candida* sa senzitivnošću višom od 90% za identifikaciju do nivoa roda i višom od 78,5% do nivoa vrste. S obzirom na sve navedene prednosti i odlične rezultate dobijene ovom metodom, MALDI TOF masena spektrometrija se danas koristi u mnogim istraživanjima, a pored reakcije lančane polimeraze (eng. *Polymer Chain Reaction* – PCR) može se smatrati i referentnim standardom za identifikaciju kvasnica [124, 125].

U cilju brze dijagnostike VVK danas se dizajniraju, validiraju i standardizuju još uvek *in house non-culture* metode kao što su imunohromatografski testovi, nazvani i POC (eng. *Point of care*) testovi kojima se brzo i jednostavno može utvrditi prisustvo vrsta roda *Candida*

direktno u uzorku iz genitalnog trakta. Primenom anti-*Candida* manan poliklonskih antitela potvrđuju se kvasnice u vaginalnim brisevima [126], pri čemu testovi detektuju prisustvo *C. albicans* u količini od 10^4 ćelija koje formiraju kolonije u jednom mililitru (eng. *Colony Forming Unit/ml* – CFU/ml), odnosno vrste *C. glabrata* u količini 10^5 CFU/ml. Međutim, ovi testovi se još uvek usavršavaju u smislu poboljšanja osetljivosti koja trenutno iznosi do 80%. Njihovom širom primenom i komercijalizacijom bi se značajno smanjio broj netačnih nalaza i omogućila brza dijagnostika vaginalne gljivične infekcije, kao i monitoring od strane samih pacijentkinja.

1.5.2. Antimikogram test- ispitivanje osetljivosti kvasnica prema antigljivičnim lekovima *in vitro*

Pored identifikacije vrste kvasnice, kod hroničnih ili rekurentnih formi VVK se u cilju propisivanja adekvatne terapije preporučuje i *in vitro* testiranje osetljivosti sojeva na antigljivične lekove. Ovo je posebno značajno za vrste *C. glabrata* i *C. krusei* jer je poznato da su one u visokom procentu rezistentne na triazole, posebno na flukonazol (FLU) i itrakonazol (ITR) koji predstavljaju sistemske antimikotike najčešće korišćene u terapiji VVK.

Jedina standardizovana metoda antimikograma od strane dva relevantna udruženja, Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (eng. *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI) i Evropskog komiteta za ispitivanje antimikrobne osetljivosti (eng. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – EUCAST), je bujon mikrodiluciona metoda. Iako postoje izvesne razlike kada su u pitanju veličina inokuluma i način određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), preporuke oba udruženja za sprovođenje ove metode su usaglašene, tako da postoji visok stepen podudarnosti između dobijenih rezultata. Princip bujon mikrodilucije je inokulacija ispitivane kulture kvasnica u RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) ili SDA medijum, kao i dodavanje dvostruko razblaženih ispitivanih antimikotika. Nakon odgovarajuće inkubacije, porast se detektuje u vidu zamućenja (SDA) ili promene boje (RPMI) medijuma, vizuelno (CLSI) ili korišćenjem spektrofotometra (EUCAST). Uzimajući u obzir distribucije vrednosti MIK, farmakokinetičke i farmakodinamske parametre, mehanizme rezistencije, kao i kliničke ishode uglavnom za izolate *Candida* spp. koji izazivaju invazivne gljivične infekcije, CLSI i EUCAST su uspostavili granične tačke (eng. *breakpoints*) za pojedine antimikotike. Međutim, zvanične smernice i preporuke za granične vrednosti anitmikotika kada su u pitanju uzročnici

superficialnih gljivičnih infekcija u koje spada i VVK još uvek nedostaju jer se ove infekcije često leče empirijski, bez laboratorijskog dokaza [127].

Od strane CLSI su za ispitivanja osetljivosti kvasnica, pored mikrodilucione metode, standardizovani i disk difuziona metoda i E test. Disk difuziona metoda je, za razliku od mikrodilucionog testa, manje zahtevna, ekonomična i podesna za rutinski rad. Ova metoda se koristi za ispitivanje antimikotika koji su rastvorljivi u vodi (flucitozin-FCY, FLU i VOR), kao i za ehinokandine. Korelacija zone inhibicije rasta (izražene u mm) sa rezultatima MIK ($\mu\text{g/ml}$) se može uočiti nakon konstruisanja regresione krive, na osnovu koje se vrši tumačenje difuzione metode i rezultati kvalitativno izražavaju u tri kategorije: S (senzitivno), I (intermedijarno) i R (rezistentno). Za derivate triazola CLSI koristi kategoriju dozno zavisne osetljivosti/rezistentnosti (DZO/R) umesto „I“ jer je u ovom slučaju moguće povećati terapijsku dozu leka, ukoliko je to neophodno. Za ispitivanje osetljivosti izolata kvasnica koristi se i E test koji podrazumeva primenu strip traka natopljenih antimikoticima opadajućeg gradijenta koncentracije tako da je ovim testom moguće određivanje vrednosti MIK. Kod E testa je, pri ispitivanju izolata *C. albicans*, opisana pojava različitih vrednosti MIK za triazole koje u periodu od 24 do 48h mogu porasti čak i do 512 puta [128].

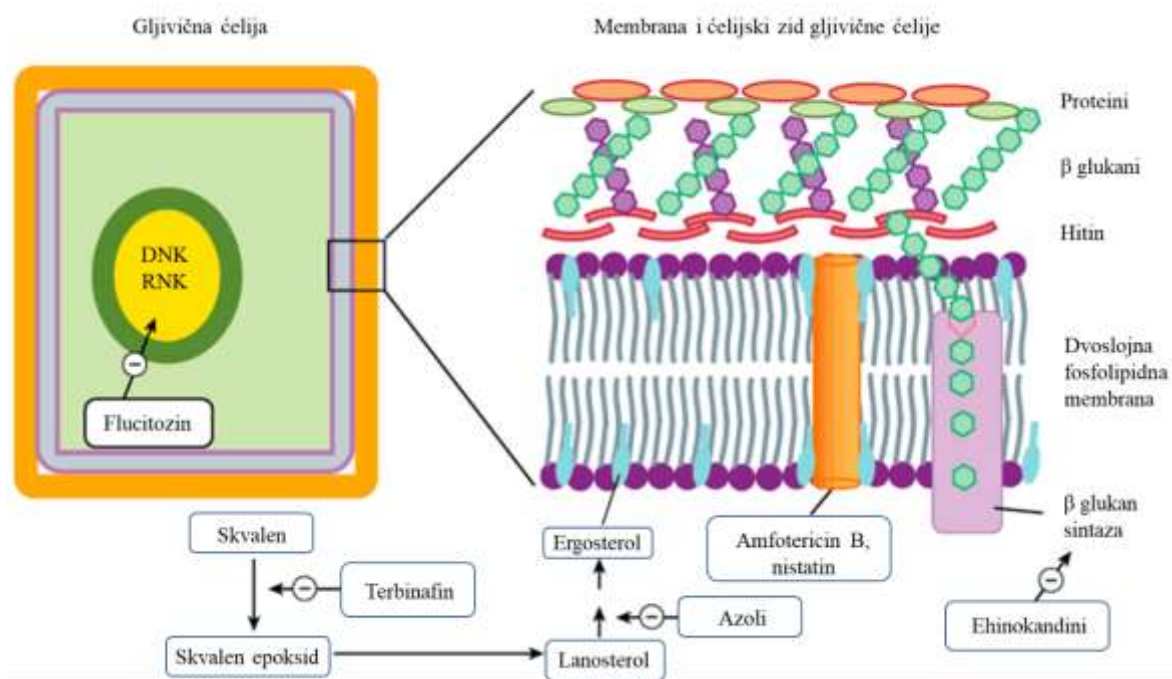
Pored ovih testova danas postoje i druge komercijalne metode za ispitivanje osetljivosti gljiva na antimikotike koje obuhvataju kolorimetrijske testove ili automatizovane sisteme. U kolorimetrijske testove spadaju Fungifast, ISYP test, Fungitest (*Bio-Rad*, SAD), koji se osim za identifikaciju mogu koristiti i za ispitivanje osetljivosti kvasnica. Za ovo testiranje se u uslovima *in vitro* mogu koristiti i automatizovani sistemi poput Vitek2 sistema (*BioMérieux*, Francuska) [129].

1.6. TRETMAN

S obzirom na činjenicu da kvasnice, ukoliko su prisutne u manjem procentu, mogu biti deo normalne flore vaginalne sluzokože, stavovi koji se odnose na lečenje asimptomatskih nosilaca ovih mikroorganizama su još uvek kontroverzni. Sa druge strane, kada je u pitanju simptomatska infekcija, odnosno VVK, preporučuje se personalizovano lečenje, odnosno individualni pristup svakoj pacijentkinji u skladu sa težinom infekcije, što određuje izbor i trajanje terapije [1]. Ukoliko gljive roda *Candida* tokom infekcije genitalne mukoze formiraju i biofilm onda je tretman ovih infekcija veliki izazov, s obzirom na činjenicu da su ćelije gljiva zaštićene u biofilmu, a ujedno mogu biti slabije osetljive ili rezistentne na antimikotike. Pored

navedenog, značajna je i činjenica da biofilm može biti rezervoar i izvor infekcije [101]. Ginekolozi bi mogli doprineti rešavanju ovog problema time što, pre sprovođenja terapije antimikoticima, mogu mehanički ukloniti gljivične naslage.

Jedni od najvažnijih antigljivičnih agenasa koji se i najduže koriste u terapiji VVK su polieni koji interaguju sa ergosterolom ćelijske membrane gljiva formirajući pore, čime je destabilišu i posledično dovode do smrti ćelija. Polienski antimikotik za lokalnu primenu koji se najčešće koristi u ove svrhe je nistatin (NY). Još jednu veliku grupu antimikotika koji se primenjuju u lečenju ove infekcije čine derivati azola u koje spadaju imidazoli i triazoli. Najveću primenu među imidazolima imaju klotrimazol (CLO), mikonazol (MIC) i fentikonazol (FEN), dok se od derivata triazola koriste ITR i FLU. Ova velika grupa antimikotika inhibira enzim sterol 14- α -demetilazu čime se sprečava sinteza ergosterola, jedne od najvažnijih komponenti dvoslojne fosfolipidne membrane gljivičnih ćelija, i onemogućava ćelijska proliferacija [108]. Mehanizmi dejstva antigljivičnih lekova prikazani su na slici 8.



Slika 8. Mehanizmi dejstva antimikotika

Najčešća podela VVK na osnovu koje se propisuje terapija podrazumeva klasifikaciju na nekomplikovanu i komplikovanu formu ove infekcije. Nekomplikovana forma se odnosi na sporadične epizode uzrokovane vrstom *C. albicans*, dok se komplikovanim infekcijama smatraju one koje su izazvane NAC vrstama, RVVK, VVK tokom trudnoće, kao i infekcije udružene sa drugim stanjima poput dijabetesa ili različitih imunodeficijencija [130].

Smatra se da nekomplikovanu formu čini do 90% svih slučajeva VVK [131], a terapija ovog oblika infekcije je bazirana na lokalnoj ili sistemsnoj primeni antimikotika iz grupe derivata azola. Iako nije utvrđena razlika u terapijskom efektu između ova dva načina primene, treba uzeti u obzir činjenicu da je oralna primena lekova obično povezana sa mogućim ozbiljnijim sistemskim neželjenim efektima [132]. Oralni tretman FLU se sastoji u primeni jedne doze od 150 mg leka, međutim, treba imati u vidu to da ovaj lek može izazvati abdominalni bol, glavobolju, mučninu, a moguć je i hepatotoksični efekat, kao i oštećenje fetusa kod trudnica. Takođe je utvrđeno da se kod približno 50% pacijentkinja lečenih FLU nakon 6 meseci može javiti recidiv VVK [133]. Zbog toga se, prema smernicama Centra za kontrolu i prevenciju bolesti iz 2021. godine, za lečenje nekomplikovane VVK preporučuju preparati za lokalnu primenu u kratkom vremenskom periodu. Terapija lokalnim azolima (CLO, MIC i butokonazol) obično traje 3 dana, a povlačenje simptoma se očekuje u roku od 2-3 dana nakon završetka terapije. Ipak, treba imati u vidu da primena ovih lekova može biti praćena neželjenim efektima poput svraba i peckanja [130, 134]. Američko društvo za infektivne bolesti preporučuje istovremenu i lokalnu i oralnu primenu derivata azola [135]. Terapija jednom dozom primenjenom na bilo koji od ovih načina bi trebalo da bude efikasna kod blage do umerene forme bolesti. Vaginalno aplikovan CLO u vidu supozitorije od 500 mg, butokonazol kao bioadheziv i oralno primenjen FLU (150 mg) poseduju farmakokinetiska svojstva kojima se postiže terapijska koncentracija u vagini do 5 dana nakon primene jedne doze [136]. Tokom trudnoće, lokalni azoli su delotvorniji od NY i njima se postižu prihvatljive stope izlečenja, mada uz moguću prolongiranu primenu u trajanju od 7 dana [137].

U sklopu terapije VVK se mogu primeniti i neki alternativni tretmani koji mogu podrazumevati upotrebu probiotika. Međutim, iako su neke studije pokazale da egzogeni laktobacili koji se nalaze u sastavu ovih preparata mogu inhibirati formiranje biofilma *C. albicans*, kao i da su određeni probiotici u poređenju sa terapijom CLO dali bolje rezultate u lečenju VVK, uz odsustvo neželjenih efekata i čak dvostruko manji procenat relapsa [138, 139], smernice Centra za kontrolu i prevenciju bolesti ipak ukazuju na nedostatak dokaza za upotrebu probiotika u lečenju ovih infekcija [140]. Još jedan preparat koji se pokazao kao dobra alternativa antimikoticima je hlorheksidin, mada je utvrđeno da i on može izazvati slične neželjene efekte kao i primena antigljivičnih lekova [141].

Kod pacijentkinja sa komplikovanim formama VVK, pojedinačne doze antimikotika i kratkotrajni tretman često ne daju željene rezultate zbog čega je u ovim slučajevima potrebno značajno duže sprovođenje terapije. Sve prevalentniji NAC izolati koji uzrokuju VVK, pokazuju rezistenciju prema antimikoticima preporučenim protokolima, što usložnjava

problem, odnosno izbor dovoljno efikasnog leka [91, 142]. Tretman infekcija izazvanih ovim vrstama predstavlja veliki izazov zbog njihove veoma česte rezistencije prema derivatima azola i činjenice da je kod skoro 50% inficiranih žena prisutna oskudna simptomatologija [140].

S obzirom na to da je približno dvostruko više sojeva vrste *C. glabrata* rezistentno na FLU u odnosu na vaginalne izolate *C. albicans* [143, 144], prema nemačkim smernicama iz 2021. godine se, u slučaju infekcije ovom vrstom, može razmotriti lokalna primena NY ili ciklopiroksolamina [145]. U slučaju recidiva, prema smernicama Američkog centra za kontrolu i prevenciju bolesti, može se sprovesti terapija koja uključuje 600 mg borne kiseline u želatinskoj kapsuli koja se aplikuje vaginalno, jednom dnevno tokom 2 nedelje [134]. Ipak, treba imati u vidu da primena borne kiseline može negativno uticati na plodnost i da može biti embriotoksična, zbog čega se ne preporučuje ženama u reproduktivnom dobu [145]. Kod pacijentkinja gde nije moguće primeniti bornu kiselinu ili se ona nije pokazala kao efikasno rešenje, u preko 90% slučajeva zadovoljavajuće rezultate dala je dvonedeljna lokalna primena FCY [146]. Ipak, zbog potencijalnog razvoja rezistencije vaginalnu primenu ovog antimetabolita bi trebalo svesti na minimum. Takođe je utvrđeno i da se FCY može kombinovati sa polienskim antimikotikom, amfotericinom B (AMB) [147]. Što se tiče osetljivosti ostalih NAC vrsta, *C. dubliniensis* se pokazala kao osetljiva na imidazole, *C. tropicalis* i *C. guilliermondii* se mogu uspešno lečiti kao infekcije izazvane *C. albicans*, dok neki istraživači vrstu *C. kefyr* svrstavaju u retke izazivače vaginitisa [148]. Za sojeve vrste *C. krusei* se smatra da su otporni na FLU i FCY, ali i da se vaginalne infekcije izazvane sojevima ove vrste mogu lečiti bornom kiselinom i drugim azolima [149].

Kod pacijentkinja sa RVVK se preporučuje indukciona terapija koja podrazumeva lokalnu aplikaciju antimikotika ili oralnu primenu FLU u dozi od 150 mg tokom 10–14 dana, nakon čega se terapija FLU u istoj dozi u vidu režima održavanja može nastaviti i u trajanju od šest meseci. Rezistencija na ovaj antimikotik je veoma česta kod žena sa RVVK, s tim što bi trebalo isključiti mogućnost njegove nepravilne upotrebe [150, 151]. Režimi održavanja, pored navedene primene FLU, mogu podrazumevati i primenu ketokonazola (KCA) u dozi od 100 mg dnevno ili aplikaciju supozitorija CLO od 500 mg [1]. Dugotrajno lečenje FLU povezano je sa visokim troškovima i neželjenim efektima, a ustanovljeno je da oko 50% žena doživljava recidiv simptoma nekoliko meseci nakon završetka lečenja primenom bilo kog od navedenih režima održavanja [151, 152].

Predloženi terapijski pristupi takođe uključuju i promenu metode kontracepcije sa hormonske na mehaničku, lečenje seksualnog partnera i lokalno korišćenje gencijane violet [153]. Lokalni tretman RVVK može uključivati CLO, MIC, terkonazol i bornu kiselinu, kao i

NY, mada je u literaturi sugerisano da su derivati azola efikasniji od NY [154]. Ograničena efikasnost lečenja ovim preparatima ukazuje na važnost primene novih, efikasnijih terapija za RVVK koje se mogu koristiti dugoročno, bez značajnih neželjenih efekata i sa smanjenim rizikom za razvoj rezistencije. Jedna od potencijalnih opcija lečenja VVK u budućnosti može biti oralna primena otesekonazola. Mehanizam dejstva ovog leka koji podrazumeva selektivnu inhibiciju lanosterol demetilaze gljivičnih ćelija (CIP51A1), omogućava minimalne neželjene efekte i bolju efikasnost [145]. Otesekonazol je u skorašnjim studijama pokazao snažnu aktivnost prema vrsti *C. albicans* kao i prema NAC vrstama otpornim na derivate azola, poput *C. glabrata* i *C. krusei*, i u lečenju hronične RVVK, bez utvrđenih recidiva i nakon 48 nedelja [155]. Ovaj antimikotik za sada ispoljava manji broj neželjenih efekata u odnosu na prethodnu generaciju antimikotika iz grupe azola. Podaci o visokoj efikasnosti i bezbednosti otesekonazola ukazuju na njegovu potencijalnu primenu u lečenju VVK izazvanih svim vrstama roda *Candida*, kako osetljivim tako i otpornim na derivate azola, kod žena koje se ne mogu lečiti na druge načine [2, 150]. Još jedan nedavno sintetisan antigljivični lek je i ibreksafungerp koji pripada grupi ehinokandina [156]. Mehanizam dejstva ove grupe lekova se zasniva na inhibiciji β -1,3-D-glukan sintaze, ključnog enzima u biosintezi β -(1,3)-D-glukana, glavne komponenta ćelijskog zida gljiva. Pretkliničke studije su pokazale da ibreksafungerp pokazuje istovetnu ili bolju aktivnost *in vitro* prema rezistentnim sojevima vrste *C. glabrata*, u poređenju sa ranije sintetisanim ehinokandinima kao što su kaspofungin i mikafungin [156]. Ustanovljeno je i da je ovaj lek efikasan prema skoro svim vrstama roda *Candida* rezistentnim na derivate azola, sa izuzetkom *C. krusei* prema kojoj pokazuje slabije dejstvo [157, 158].

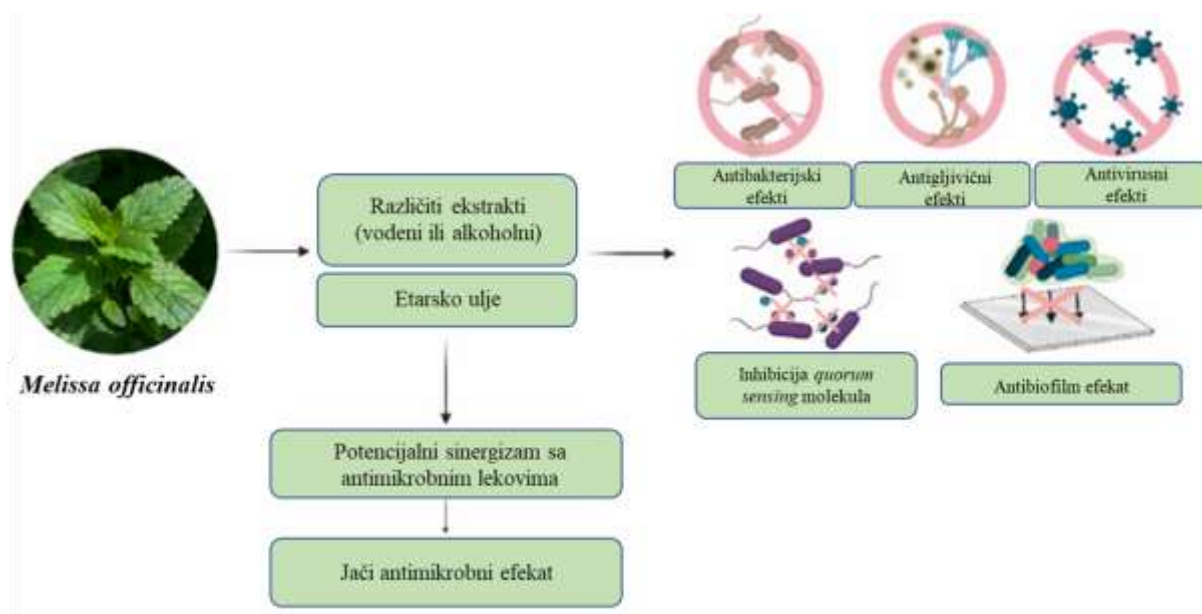
1.7. ETARSKO ULJE BILJKE *MELISSA OFFICINALIS*

Upotreba biljaka u cilju poboljšanja zdravlja zabeležena je od davnina. Tokom vekova, različite civilizacije su razvijale tradicionalne meleme na biljnoj bazi, a od početka 19. veka počinje se i sa izolovanjem aktivnih jedinjenja iz biljaka. Bez obzira na činjenicu da se usled napretka u oblasti hemije, od 20. veka povećala i proizvodnja sintetičkih jedinjenja [159], većina zemalja u razvoju nastavlja da koristi lekove napravljene od prirodnih supstanci [160].

Lekovite biljke imaju raznovrsna biološka svojstva, zbog čega mogu imati važnu ulogu u prevenciji i lečenju različitih bolesti [161]. Ove biljke predstavljaju bogat izvor biološki aktivnih agenasa koji se mogu koristiti za razvoj novih, polusintetičkih lekova. Aktivne supstance se mogu naći u različitim delovima biljaka, a mogu se ekstrahovati iz semena,

korena, listova, plodova, cvetova, pa čak i cele biljke. Aktivna jedinjenja ekstrahovana iz lekovitog bilja imaju direktne ili indirektne terapijske efekte i već dugo predstavljaju predmet mnogih istraživanja [162, 163]. Ustanovljeno je da su za antioksidativni efekat uglavnom odgovorne hidroksilne grupe njihovih fenolskih komponenti, dok antimikrobno dejstvo potiče od terpena, terpenoida i drugih molekula koji zbog svojih izraženih hidrofobnih svojstava interaguju sa ćelijskim membranama mikroorganizama menjajući njihovu propustljivost i inaktivišu različite enzimske mehanizme [164].

Melissa officinalis L. je jestiva i lekovita biljka koja se koristi u tradicionalnoj medicini širom sveta. U narodu je najpoznatija kao matičnjak ili limunova trava (eng. *lemon balm*) i pripada porodici nane (Lamiaceae) i podfamiliji Nepetoideae [165]. Ova višegodišnja zeljasta biljka raste u vidu žbuna i poreklo vodi iz južne i centralne Evrope, regiona Mediterana i centralne Azije. Ima razgranat korenov sistem, što biljku čini prilagodljivijom na različite uslove životne sredine, pri čemu gornji delovi biljke odumiru početkom zime i ponovo se pojavljuju u rano proleće. Najčešće se može naći blizu tekućih voda ili u listopadnim šumama gde cveta od početka do sredine jula, dok joj seme sazreva krajem avgusta [166]. List biljke *Melissa officinalis* L. sadrži flavonoide (kvercitrin, ramnocitrin, luteolin), polifenolna jedinjenja (ruzmarinsku, kafeinsku i protokatehuinsku kiselinu), monoterpenoidni aldehid, monoterpenske glikozide, triterpene (ursolinsku i oleanolinsku kiselinu), seskviterpene, tanine i citral [167]. Zbog svog hemijskog sastava i brojnih farmakoloških efekata ova biljka se intenzivno proučava, dok visoki sadržaj biološki aktivnih agenasa njenim ekstraktima daje specifična svojstva. Već su dobro proučena njena sedativna, antipiretična, antihipertenzivna, spazmolitična i antiseptična dejstva, a ustanovljeno je i da može biti od velike pomoći pri lečenju astme, bronhitisa, faringitisa, kašlja, amenoreje, srčane insuficijencije, aritmije i bolova različitog porekla [165, 166]. Takođe, ima povoljan uticaj na bolesti gastrointestinalnog i nervnog sistema kao i na saniranje rana, a pozitivni efekti matičnjaka su opisani i kod čireva, afti, herpesa, besnila i nekih parazitskih infekcija [165]. Lokalni preparati koji sadrže ekstrakte, sokove ili homogenate ove biljke imaju široku primenu zbog svojih dezinfekcionih i antiinfektivnih svojstava (Slika 9) [165, 168].



Slika 9. Antimikrobni efekti ekstrakata i etarskog ulja biljke *Melissa officinalis*

S obzirom na činjenicu da uprkos primeni novosintetisanih antimikotika većina gljivičnih infekcija i dalje ostaje ozbiljan medicinski problem, smatra se da bi trebalo razmotriti agense sa novim mehanizmima delovanja koji bi se koristili u ove svrhe. Veoma interesantan trend svetskih studija je moguće sinergističko dejstvo između agenasa biljnog porekla i antibiotika ili drugih hemoterapeutika koje može rezultirati snažnom inhibicijom rasta čak i multirezistentnih sojeva mikroorganizama [169]. Etarska ulja predstavljaju prirodne komplekse koji nastaju sekundarnim metabolizmom biljaka i mogu se ekstrahovati iz njihovih različitih delova. To su složene mešavine isparljivih jedinjenja koja su tečna, bistra i rastvorljiva u organskim rastvaračima i vodi [164]. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja biljke *Melissa officinalis* (EUMO – *Melissa aetheroleum*) je već dokazana u brojnim *in vitro* studijama u kojima je utvrđena njegoa antibakterijska [170], antigljivična [171], antivirusna [172], antibiofilm [173] i “*anti-quorum sensing*” aktivnost [174].

Aktuelna istraživanja koja se bave rešavanjem problema tretmana VVK imaju za cilj ustanovljavanje i uspostavljanje novih, efikasnih antimikotika za lokalnu ili sistemsku primenu [115, 175-178], ali i ispitivanje mogućeg sinergističkog dejstva antimikotika i prirodnih supstanci na formirani biofilm *Candida* sojeva koji predstavlja jedan od najvažnijih faktora virulencije ovih kvasnica [178-181]. Prethodna istraživanja na temu antibiofilm aktivnosti sekundarnih metabolita biljaka sadržanih u etarskim uljima pokazala su značajnu aktivnost u prevenciji stvaranja i inhibiciji rasta već formiranih biofilмова kako bakterija, tako i gljiva [171, 182, 183]. Međutim, svega nekoliko studija se bavilo ispitivanjem efekta EUMO na

formiranje biofilma [171, 184], dok je u samo jednoj dokazano da komponente ovog ulja mogu uticati na zrele biofilmove kvasnice *C. albicans* [185]. S obzirom na to da sinergističko dejstvo EUMO i antimikotika na zrele biofilmove gljiva roda *Candida* do sada još uvek nije ispitivano, utvrđivanje potencijalno efikasnog dejstva kombinacije ovih agenasa na gljive u biofilmu moglo bi da doprinese poboljšanju i uspješnijem tretmanu ove infekcije.

2. CILJEVI I HIPOTEZE STUDIJE

2.1. CILJEVI

1. Korišćenjem konvencionalne mikološke analize (metodama za utvrđivanje morfoloških i biohemijskih karakteristika) selektovati 150 sojeva *C. albicans* i 150 sojeva NAC vrsta i ne-*Candida* kvasnica uzročnika vulvovaginalne gljivične infekcije;
2. Primenom MALDI TOF masene spektrometrije, kao referentnog standarda u identifikaciji kvasnica i korišćenjem ISYP testa, diferencirati izolate kvasnica iz materijala žena sa genitalnom infekcijom;
3. Na osnovu rezultata dobijenih primenom MALDI TOF masene spektrometrije validirati rezultate dobijene ISYP testom;
4. Nakon selekcije i identifikacije kvasnica, ispitati sposobnost produkcije biofilma 150 sojeva *C. albicans*, kao i 150 sojeva NAC vrsta i ne-*Candida* kvasnica primenom metode po Stepanoviću;
5. Korišćenjem komercijalnog ISYP testa ispitati osetljivost sojeva na dejstvo antigljivičnih lekova u uslovima *in vitro*;

6. Primenom antimikogram mikrodilucione metode utvrditi MIK EUMO kao i MIK antigljivičnih lekova (NY, CLO, FLU i FEN) koji se koriste u terapiji VVK za odabrane sojeve na osnovu sposobnosti produkcije biofilma koji su u skriningu ispitivanja osetljivosti ISYP testom pokazali nižu osetljivost;
7. Ispitati pojedinačni efekat antimikotika (NY i FLU) i EUMO kao i potencijalni sinergistički efekat EUMO u kombinaciji sa navedenim antimikoticima prema zrelim biofilmovima odabranih sojeva kod kojih je prethodno bujon mikrodilucionom metodom utvrđena niža osetljivost/rezistentnost na ispitivane antimikotike, kao i sposobnost produkcije biofilma.

2.2. HIPOTEZE

Na osnovu podataka iz referentne literature, kao i na osnovu dosadašnjih rezultata u okviru našeg istraživačkog rada, mogu se postaviti sledeće radne hipoteze:

1. Visok procenat izolata *Candida* i ne-*Candida* kvasnica ima sposobnost produkcije biofilma;
2. Visok procenat izolata *Candida* i ne-*Candida* kvasnica, ispitivanjem osetljivosti gljiva na dejstvo antimikotika u uslovima *in vitro*, prvenstveno primenom standardizovane mikrodilucione antimikogram metode, pokazuje slabiju osetljivost na antigljivične lekove koji se najčešće preporučuju i propisuju u tretmanu VVK;
3. Prirodna supstanca, odnosno EUMO ima zadovoljavajuću efikasnost prema izolatima kvasnica uzročnika VVK koji pokazuju slabiju osetljivost prema antimikoticima;
4. Kombinovanjem antimikotika (koji su pokazali nižu efikasnost prema planktonskim ćelijama) i prirodnih supstanci (EUMO) može se dokazati njihov sinergistički efekat prema već formiranim-zrelim biofilmovima kvasnica visoke virulentnosti (biofilm produkujućim i rezistentnim na antimikotike);
5. Rezultati ove teze mogu biti dobra osnova za dalja istraživanja sa ciljem ustanovljavanja novih principa i strategija u tretmanu VVK.

3 MATERIJALI I METODE

3.1. DIZAJN STUDIJE

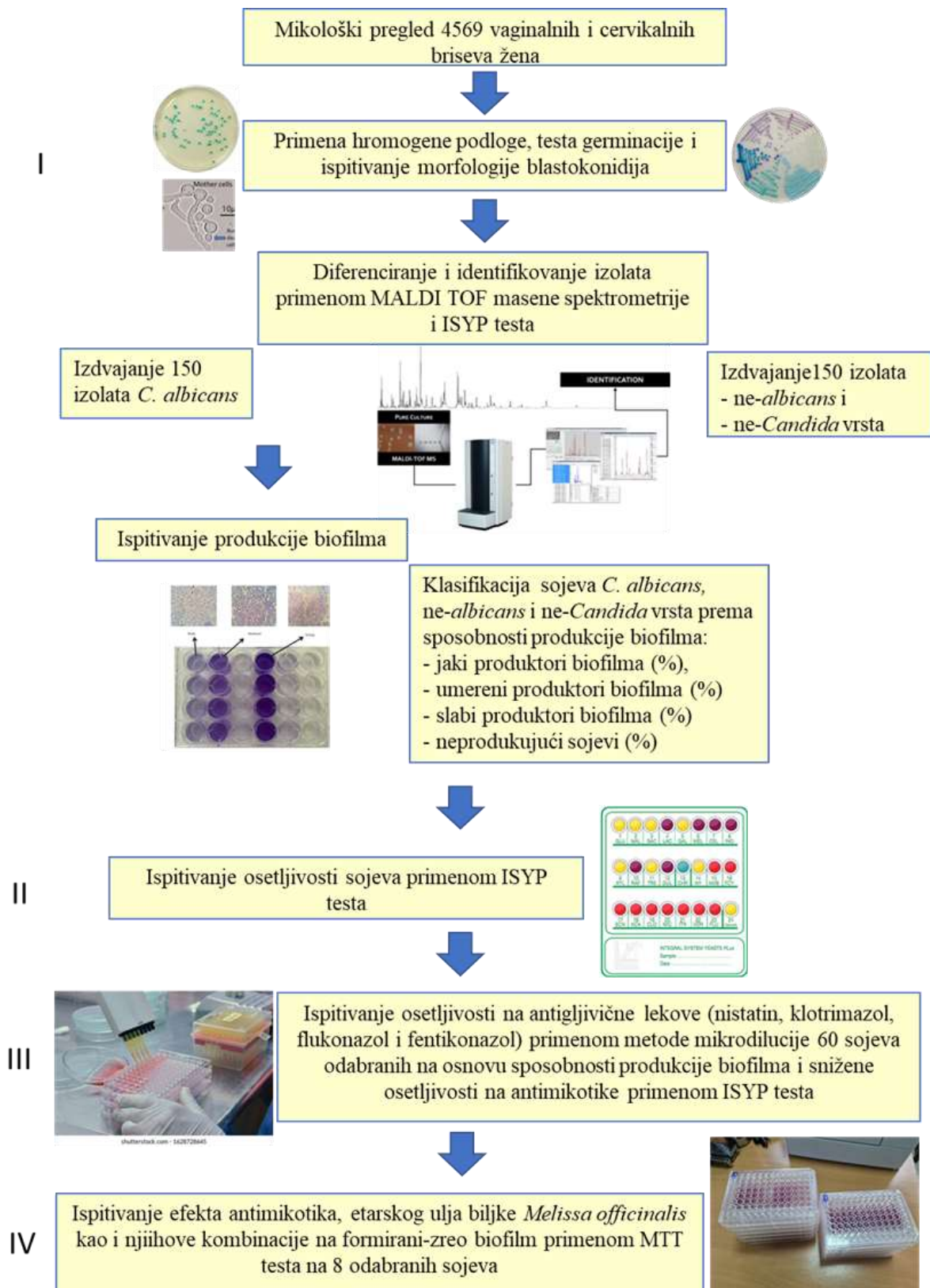
Doktorska teza je dizajnirana kao prospektivna studija koja je sprovedena u laboratorijama: I) Centra za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Niš; II) Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu; III) Departmana za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu; IV) kao i Nacionalne referentne laboratorije za mikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Instituta za javno zdravlje Niš (br. 02-679; 24.03.2022. godine) kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (br.12-11238/2-5; 12.10.2022. godine).

Istraživanje je sprovedeno u četiri faze i obavljeno je od novembra 2022. do decembra 2023. godine (Slika 10).

U **prvoj fazi** je nakon izolovanja kvasnica, uzročnika genitalne infekcije žena, i njihovog diferenciranja na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika, kao i primenom MALDI TOF masene spektrometrije, izabrano 300 sojeva (150 sojeva vrste *C. albicans* i 150 NAC izolata kao i ne-*Candida* izolata) uz kriterijum da su kod pacijentkinja kvasnice utvrđene kao jedini potencijalni uzročnik infekcije. Izabrani izolati su ispitivani sa ciljem utvrđivanja sposobnosti produkcije biofilma primenom metode po Stepanoviću sa modifikacijama.

Uporo, izolati su za naredne faze istaživanja zamrzavani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kako bi se izbegle njihove promene u toku subkultivisanja.



Slika 10. Šematski prikaz dizajna studije

U **drugoj fazi** istraživanja svi sojevi su ispitivani antimikogram ISYP testom radi utvrđivanja njihove osetljivosti na antigljivične lekove u uslovima *in vitro*.

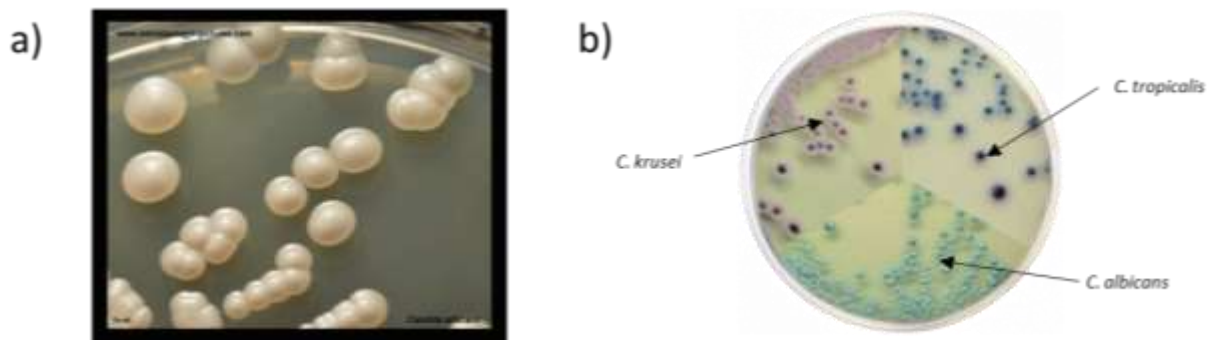
Treća faza istraživanja je podrazumevala utvrđivanje osetljivosti na antigljivične lekove (NY, CLO, FLU i fentikonazol-FEN), kao i na EUMO primenom metode mikrodilucije (po preporukama CLSI – četvrto izdanje M27 suplementa iz 2008.god.). Ovom fazom istraživanja obuhvaćeno je 60 sojeva odabranih na osnovu sposobnosti produkcije biofilma i snižene osetljivosti na antimikotike primenom ISYP testa. Identifikovanje i kvantifikovanje komponenti EUMO je izvršeno primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (eng. *Gas Chromatography-Mass spectrometry* – GC/MS) i gasne hromatografije sa upotrebom plameno-jonizacionog detektora (eng. *Gas Chromatography-Flame ionization detection* – GC/FID).

U **četvrtoj fazi** je, nakon prethodnih analiza, odabrano 8 sojeva koji pokazuju sposobnost produkcije biofilma i kod kojih je ustanovljena viša vrednost MIK ispitivanih antimikotika (slabija osetljivost ili rezistentnost na ispitivane antimikotike u dilucionom testu). Antibofilmsko dejstvo (delovanje na formirani, zreo biofilm) antimikotika, EUMO, kao i antimikotika u kombinaciji sa EUMO ispitano je primenom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) testa.

3.2. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Mikrobiološki pregled uzoraka iz genitalnog trakta žena sa simptomima i znacima infekcije obuhvatio je primenu standardne bakteriološke analize [mikroskopski pregled, zasejavanje materijala na krvnom i čokoladnom agaru (*Thermo Fisher Scientific*, Nemačka) i korišćenje testova za utvrđivanje infekcija izazvanih vrstama *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*], parazitološke analize (mikroskopsko ispitivanje u cilju detekcije protozoe *Trichomonas vaginalis*), kao i mikološke analize koja je obuhvatila zasejavanje materijala na selektivnim podlogama za izolovanje kvasnica, SDA (*Liofilchem Diagnostici, Roseto degli Abruzzi*, Italija) i *Candida* hromogenom agaru (*Liofilchem/Bacteriology products*, Italija). Porast kvasnica na ovim hranljivim podlogama prikazan je na slici 11. Za dalje analize odabrano je po 150 sojeva *C. albicans* i NAC vrsta. Nakon prvog skrininga (na osnovu boje kolonija na hromogenoj podlozi i testa germinacije), svi sojevi su identifikovani i diferencirani primenom MALDI TOF masene spektrometrije.

Odabrani su izolati kvasnica koji su bili jedini potencijalni uzročnici infekcije, odnosno kod ovih pacijentkinja bakteriološkom i parazitološkom analizom nije utvrđeno prisustvo patogenih ili uslovno patogenih bakterija, kao ni protozoe *Trichomonas vaginalis*. Pomenuti izolati su zatim zamrznuti na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (po tri ependorfe sa glicerolom) i za dalje eksperimentalne faze odmrzavani i presejavani na SDA i *Candida* hromogeni agar.

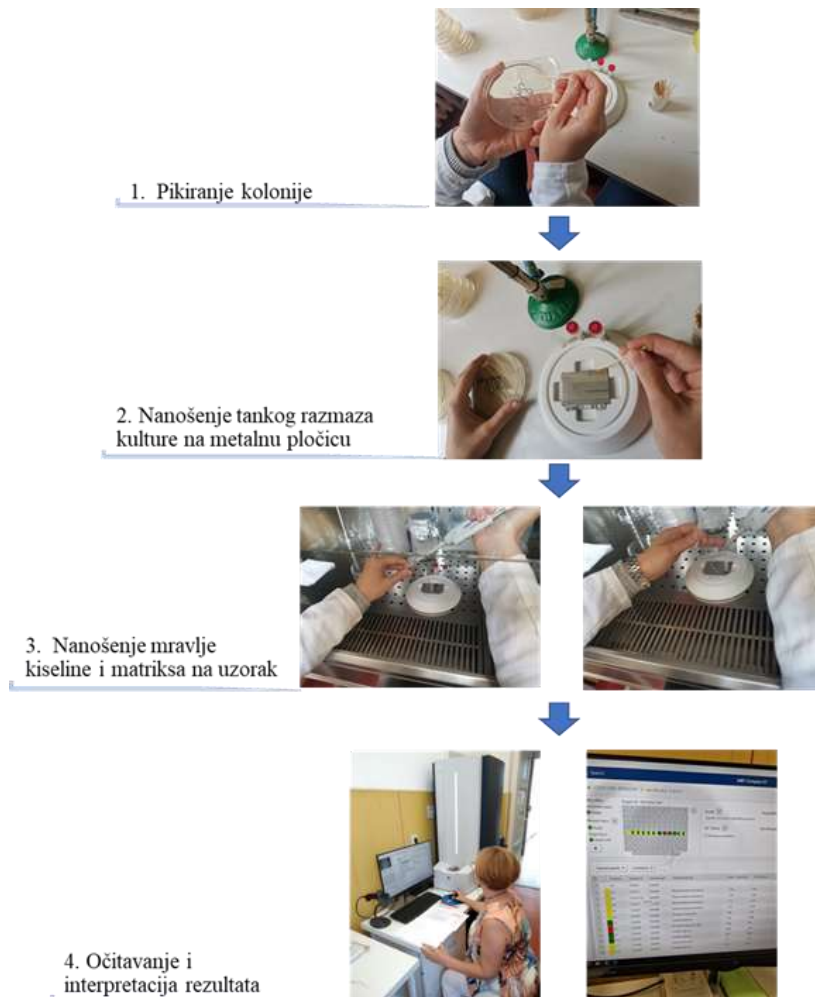


Slika 11. a) Kolonije (porast) gljiva roda *Candida* na Saburaud dekstroznom agaru i b) *Candida* hromogenom agaru

3.2.1. Identifikacija kvasnica primenom masene spektrometrije

Rodovi i vrste kvasnica su u ovom istraživanju determinisani primenom MALDI TOF masene spektrometrije (Slika 12). Ova analitička tehnika kombinuje MALDI jonizator sa TOF masenim analizatorom i tako detektuje i karakteriše smese organskih molekula, najčešće proteina. Procedura ove metode je podrazumevala najpre pikiranje jedne kolonije ispitivanog soja sa SDA pomoću tankog drvenog štapića od koje je pravljen ravnomeran razmaz u tankom sloju na jednom od 96 polja MALDI metalne pločice. Naneti uzorak se sušio na sobnoj temperaturi, a zatim je prelivan $1\ \mu\text{l}$ 70% mravlje kiseline. Nakon ponovnog sušenja, aplikovan je $1\ \mu\text{l}$ matriksa (CHCA) najkasnije 30 min od nanošenja uzorka. Kada su svi pripremljeni uzorci bili suvi, metalna pločica je postavljana u aparat MALDI TOF maseni spektrometar Biotyper Sirius one IVD System (*Bruker Daltonics*, Bremen, Nemačka). Kao pozitivna kontrola korišćen je standardni bakterijski soj, obezbeđen od strane proizvođača (*Bruker Daltonics*, Bremen, Nemačka). Pre pokretanja procesa identifikacije skenirani su barkodovi sa radnih lista dodeljenih svakom ispitivanom uzorku, kao i barkod MALDI metalne pločice. Kada su parametri podešeni i provereni aparat je automatski generisao proteinske spektre za uzorke koji su identifikovani korišćenjem softvera *MBT Compass*, ver. 4.1.100 u mehaničkim ciklusima upravljanim programom *flexControl*, ver. 3.4.207.20 (*Bruker Daltonics*, Bremen,

Nemačka). Generisani spektri su automatski upoređivani sa sojevima iz baze podataka (*MBT Compass Library, Revision H* sa 3893 vrsta) i vršena je identifikacija ispitivanih izolata. Koristeći pomenute Biotyper MALDI Automation control softver i Biotyper biblioteku koja sadrži referentne spektre, aparat je generisao skor uz koji je prikazivana određena boja na sledeći način: skor ≥ 2 označen zelenom bojom je podrazumevao **dobru identifikaciju**, skor od 1,7-1,99 označen žutom bojom **dovoljnu identifikaciju**, dok je vrednost skora $< 1,7$ označena crvenom bojom ukazivala na to da **identifikacija nije bila moguća**. Svaki ispitivani soj je rađen u duplikatu, a nemogućnost identifikacije podrazumevala je potrebu za ponavljanjem postupka i revidiranjem validacije rezultata. Identifikacija je u ovom istraživanju prihvatana kada je vrednost skora bila veća od 1,7. Determinacija sojeva primenom MALDI TOF masene spektrometrije je urađena u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za mikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Srbija).



Slika 12. Procedura izvođenja MALDI-TOF masene spektrometrije

3.2.2. Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma

Sposobnost produkcije biofilma ispitivanih sojeva vršeno je metodom po Stepanoviću sa modifikacijama [186, 187] koja je prikazana na slici 13.

Priprema suspenzije kvasnica u fiziološkom rastvoru turbiditeta 0,5 Mc Farland jedinica



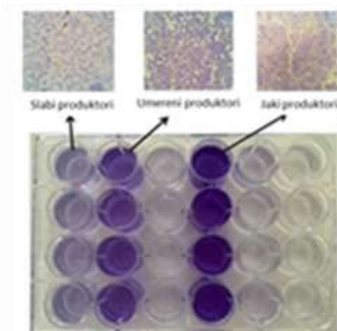
Inokulacija suspenzije kvasnica i RPMI-1640 medijuma u mikrotitar ploče, ispiranje fosfatnim puferom nakon inkubacije i dodavanje rastvora kristal-violet boje i etanola



Očitavanje rezultata nakon prebacivanja rastvora u novu mikrotitar ploču primenom ELISA čitača



Klasifikacija sojeva na osnovu sposobnosti produkcije biofilma na jake, umerene, slabe produktore i neprodukujuće sojeve



Slika 13. Procedura ispitivanja sposobnosti produkcije biofilma kvasnica metodom po Stepanoviću

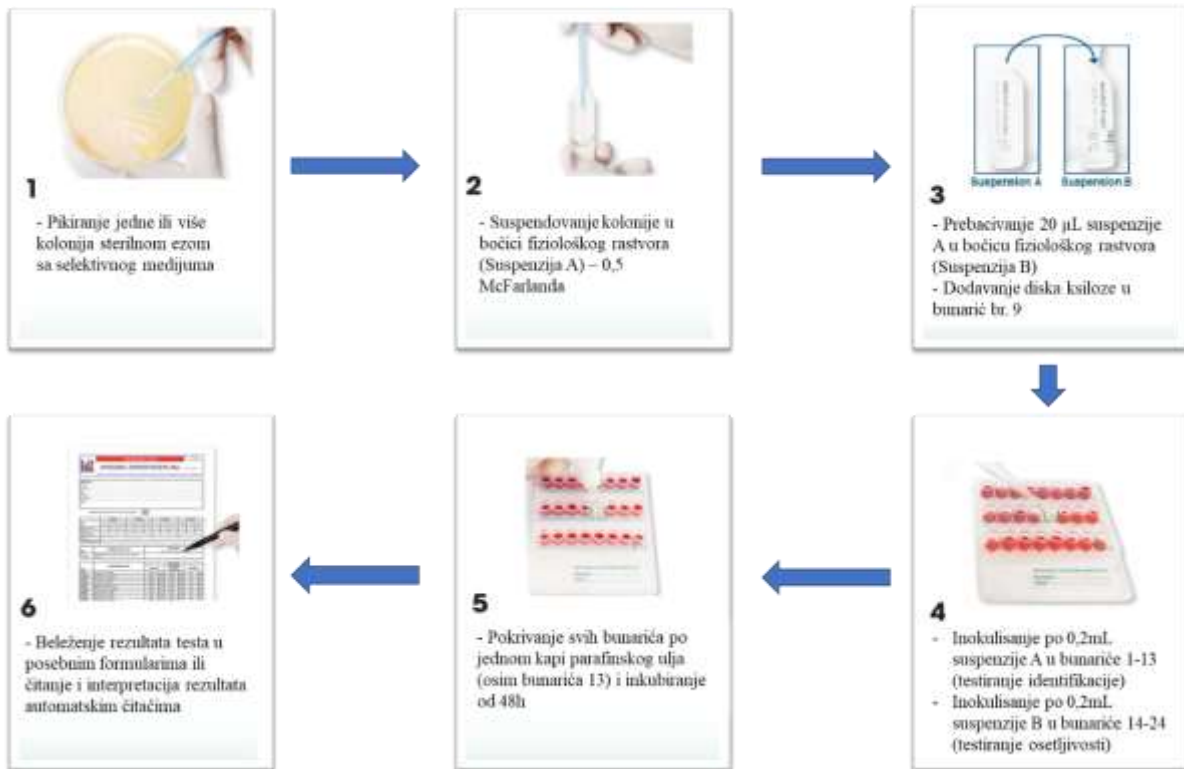
Procedura ovog testa je podrazumevala pravljenje suspenzija kvasnica u fiziološkom rastvoru turbiditeta 0,5 Mc Farland jedinica. Po 2 μL tako pripremljenih suspenzija je inokulisano u mikrotitar ploče sa 198 μL standardnog RPMI-1640 medijuma suplementiranog sa 0,8% glukozom (koncentracija od 5×10^5 ćelija kvasnica u mililitru). Nakon inkubacije plejtova na 35 °C u trajanju od 48 h sadržaj svakog bunarića je pažljivo aspiriran (u cilju uklanjanja planktonskih ćelija), a zatim su bunarići dva puta isprani fosfatnim puferom (eng. *Phosphate-buffered saline* – PBS, pH=7,4), osušeni i obojeni 0,5% rastvorom kristal violet boje. Posle 20 minuta nevezana boja je uklonjena i u svaki bunarić je dodato po 250 μl 96% etanola. Nakon 45 minuta iz svakog bunarića je aspirirano po 150 μl sadržaja koji je prebačen u novu mikrotitar ploču, a zatim je merena apsorbanca rastvora na 595 nm pomoću ELISA čitača (*Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™, Nemačka*). Svaki soj ispitivan je u triplikatu. Na osnovu sposobnosti produkcije biofilma sojevi su klasifikovani u četiri grupe: jaki produktori biofilma (JPBF), umereni produktori biofilma (UPBF), slabi produktori biofilma (SPBF) kao i neprodukujući (NPBF) sojevi [183].

3.2.3. Diferenciranje vrsta i ispitivanje osetljivosti kvasnica prema antigljivičnim lekovima u uslovima *in vitro* primenom komercijalnog testa

3.2.3.1. Priprema suspenzije izolata i procedura testa

Komercijalni ISYP test ima 24 bunarića i to 13 za identifikaciju [12 koji sadrže ugljene hidrate (glukozu, maltozu, saharozu, laktozu, galaktozu, melibiozu, celobiozu, inozitol, ksilozu, rafinozu, trehalozu i dulcitol) i jedan sa hromogenim supstratom], 10 za ispitivanje osetljivosti na antimikotike i jedan koji odgovara kontroli rasta.

Ovaj test se izvodi po uputstvu proizvođača tako što se najpre nekoliko kolonija izolovane kulture kvasnica suspenduje u fiziološkom rastvoru do turbiditeta 0,5 Mc Farland jedinica. Na ovaj način se priprema suspenzija A koja se koristi u delu testa za diferenciranje vrsta. Za ispitivanje osetljivosti gljiva na antimikotike koristi se suspenzija B koja se dobija dodavanjem 20 μL suspenzije A u bočicu fiziološkog rastvora (dobijenog od strane proizvođača). Procedura izvođenja ovog testa prikazana je na slici 14.

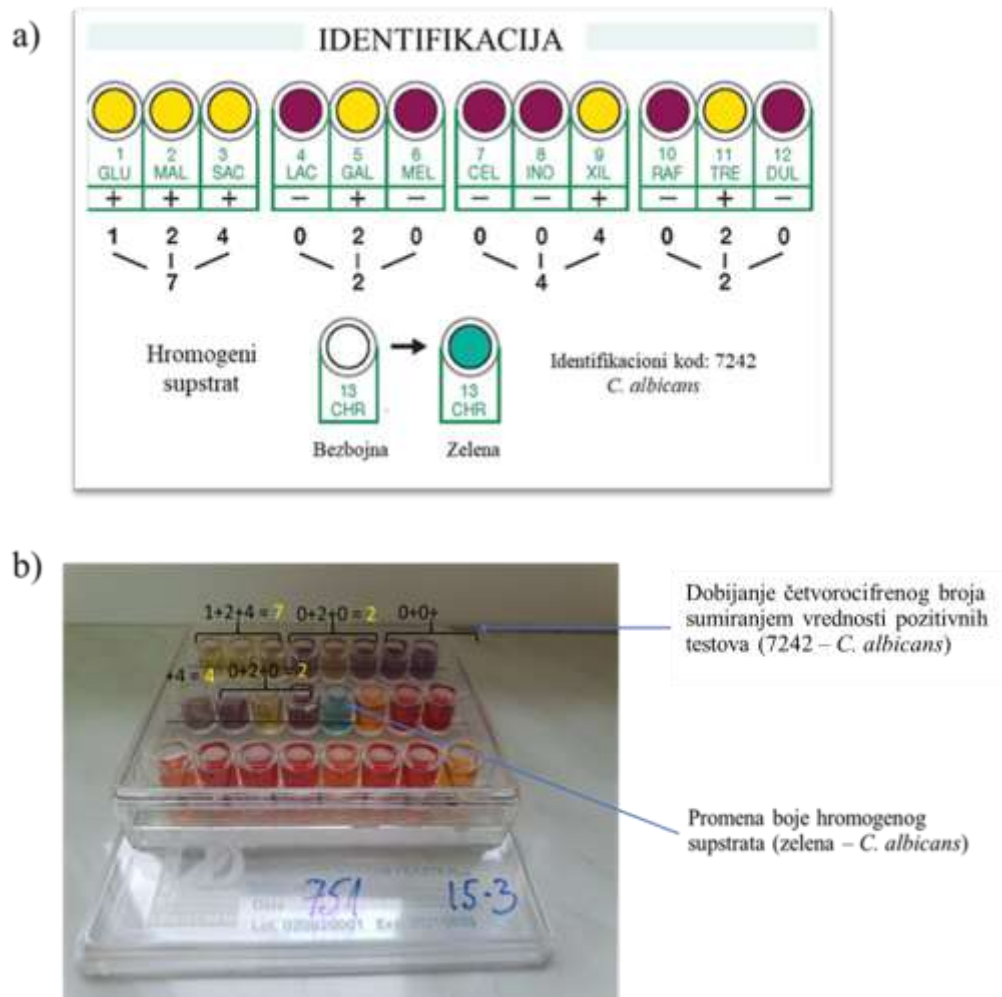


Slika 14. Procedura izvođenja Integral system yeasts plus testa

3.2.3.2. Identifikacija kvasnica

Primenom ISYP testa sojevi su ispitani u cilju identifikacije vrsta koja je zasnovana na detekciji prisustva ili odsustva različitih enzima. Ovo je omogućeno posredstvom biohemijskih reakcija čiji produkti menjaju pH i dovode do promene boje indikatora iz ljubičaste u žutu u odgovarajućim bunarićima za svaku asimilaciju šećera i hromogeni supstrat. U cilju diferenciranja vrsta, po 0,2 mL suspenzije A je aplikovano u bunariće za identifikaciju (1-13), pokriveno parafinskim uljem, a nakon propisane inkubacije očitavana je promena boje. Promena boje, koja podrazumeva pozitivnu biohemijsku reakciju, u svakom bunariću očitava se po šemi i dodeljuje joj se odgovarajuća vrednost: 1 za poziciju 1, 2 za poziciju 2 i 4 za poziciju 3. Negativan test označava se vrednošću nula. Sumiranjem vrednosti pozitivnih testova svake grupe, dobija se četvorocifreni broj na osnovu kojeg se vrši identifikacija kvasnica upotrebom tabele kodova po uputstvu proizvođača, ali uz obaveznu proveru morfoloških karakteristika izolata (produkcija pravih hifa, pseudohifa, grananje pseudohifa, veličina i oblik blastokonidija). Hromogeni supstrat u trinaestom bunariću na osnovu promene boje, kao i pri diferenciranju kolonija primoizolata na hromogenom medijumu, omogućava

diferenciranje vrsta *C. albicans*, *C. krusei* i *C. tropicalis*. Primer identifikacije soja primenom ISYP testa prikazan je na slici 15.

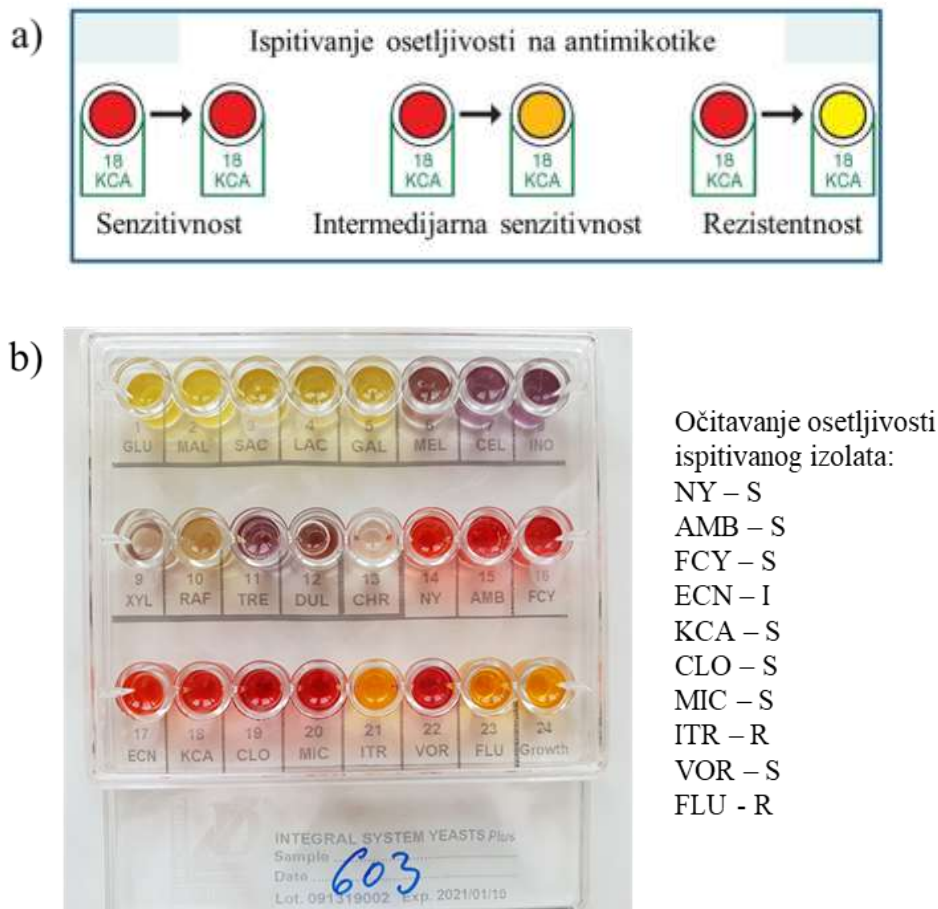


Slika 15. Komercijalni Integral System Yeasts Plus test - identifikacija kvasnica. a) uputstvo proizvođača, b) primer identifikacije soja

3.2.3.3. Ispitivanje osetljivosti kvasnica na antimikotike

Primenom ISYP testa ispitivana je i osetljivost sojeva na 10 različitih antimikotika. Svaki bunarić u sklopu ovog testa na pozicijama od 14-23 sadrži selektivni medijum i po jedan antimikotik u određenoj koncentraciji sledećim redom – NY (1,25 µg/mL), AMB (2 µg/mL), FCY (16 µg/mL), ekonazol-ECN (2 µg/mL), KCA (0,5 µg/mL), CLO (1 µg/mL), MIC (2 µg/mL), ITR (1 µg/mL), vorikonazol-VOR (2 µg/mL) i FLU (64 µg/mL). Nakon pripreme suspenzije B, u svaki bunarić koji sadrži antigljivični lek aplikovano je po 0,2 mL ove suspenzije, bunarići su zatim preliveni parafinskim uljem, a potom je vršena inkubacija tokom

48h na 37 °C. Nakon propisane inkubacije porast je evidentiran na osnovu promene boje medijuma, pri čemu je crvena boja označavala inhibiciju porasta gljiva, odnosno senzitivnost na odgovarajuću koncentraciju antimikotika. Narandžasta boja je označavala delimičnu inhibiciju rasta što je podrazumevalo intermedijarnu osetljivost, dok je žuta boja ukazivala na dobar porast ispitivanog soja i rezistenciju na ispitivanu koncentraciju datog antimikotika (Slika 16). Pre čitanja i interpretacije osetljivosti, uvek je proveravan rast kvasnica u kontrolnom bunariću. Kontrola procedure celog testa izvršena je ispitivanjem referentnih sojeva *C. albicans* ATCC 24433 i *C. parapsilosis* ATCC 22019.



Slika 16. Komercijalni Integral System Yeasts Plus test - izvođenje antimikograma. a) uputstvo proizvođača, b) primer očitavanja osetljivosti ispitivanog izolata

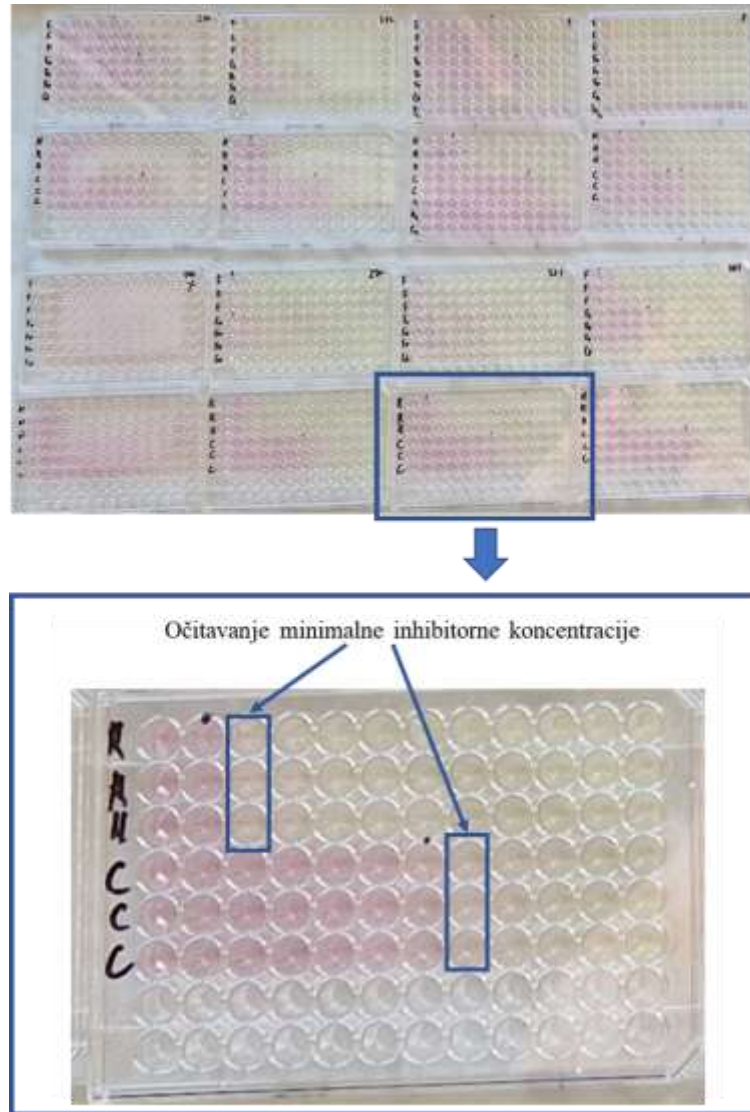
NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR -Itrakonazol, VOR-Vorikonazol-, FLU-Flukonazol, S-senzitivno, I-intermedijarno, R-rezistentno

3.2.4. Ispitivanje osetljivosti kvasnica prema antigljivičnim lekovima i etarskom ulju biljke *Melissa officinalis* u uslovima *in vitro* primenom bujon mikrodilucionog testa

Za 60 sojeva, odabranih na osnovu sposobnosti produkcije biofilma kao i otpornosti na antimikotike primenom ISYP testa, ispitivana je osetljivost na antigljivične lekove najčešće propisivane u terapiji VVK, kao i na EUMO, primenom bujon mikrodilucionog testa, po preporukama CLSI – M27 suplementa A3 iz 2008. godine sa određenim modifikacijama [188]. Antigljivični lekovi korišćeni za ovaj deo eksperimenta su FLU, NY, FEN i CLO (*Sigma-Aldrich Company*, Nemačka).

3.2.4.1. Ispitivanje osetljivosti kvasnica prema antigljivičnim lekovima

Početne suspenzije kvasnica turbiditeta 0,5 Mc Farland jedinica pripremane su u fiziološkom rastvoru od kultura sa SDA inkubiranog 24h na 37 °C primenom *Vitek Densichek* turbidimetra (*BioMérieux*, Francuska). Štok rastvori antimikotika napravljeni u dimetil-sulfoksidu (DMSO) u koncentracijama: FLU-640µg/ml, FEN-640µg/ml, NY-160 µg/ml i CLO-160 µg/ml su zatim desetostruko razblaženi u fiziološkom rastvoru. Nakon toga su pravljena dvostruka razblaženja u mikrotitar pločama tako da je svaki antimikotik bio pripremljen u 12 koncentracija. Po 20 µL tako dobijenih rastvora antimikotika je potom prebačeno u nove mikrotitar ploče sa 96 bunarića u koje je prethodno dodato po 180 µL RPMI 1640 medijuma (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) sa L glutaminom bez bikarbonata. Na kraju je dodato po 2 µL prethodno pripremljenih suspenzija kvasnica tako da je koncentracija kvasnica iznosila $2,5 \times 10^3$ CFU/mL, dok su koncentracije FLU i FEN iznosile između 0,031 i 64 µg/mL, a NY i CLO između 0,008 i 16 µg/mL. Istovremeno su rađene i kontrole za sve antimikotike (bez suspenzija kvasnica), za DMSO, kao i kontrola porasta za svaki soj (bez antimikotika). Bujon mikrodilucioni test je izvođen u triplikatu za svaki ispitivani soj. Tako pripremljene ploče su zatim inkubirane 48h na 37 °C. Na kraju je vršeno očitavanje vidljivog porasta u vidu zamućenja u bunarićima kao i promene boje medijuma iz ružičaste u žutu (Slika 17). Minimalna inhibitorna koncentracija je definisana kao 100% inhibicija rasta u prisustvu NY i inhibicija rasta od 50% u prisustvu preostala tri antimikotika. Kao kontrolni sojevi korišćeni su *C. albicans* ATCC 24433 i *C. parapsilosis* ATCC 22019.



Slika 17. Mikrotitar ploče nakon izvođenja metode bujon mikrodilucije

3.2.4.2. Ispitivanje osetljivosti kvasnica prema etarskom ulju biljke *Melissa officinalis*

Početni rastvor EUMO je dobijen razblaživanjem 10 mg etarskog ulja u 1 ml DMSO. Nakon toga, ovaj rastvor je serijski razblažen u RPMI 1640 medijumu sa L-glutaminom bez bikarbonata tako da su konačne koncentracije etarskog ulja iznosile od 0,078 mg/ml do 10 mg/ml. Ostatak postupka je bio isti kao i za ispitivanje osetljivosti odabranih sojeva na antimikotike. Minimalna inhibitorna koncentracija je definisana kao 100% inhibicija rasta u prisustvu etarskog ulja.

3.2.5. Identifikacija i kvantifikacija komponenti odabranog etarskog ulja biljke *Melissa officinalis* gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom i gasnom hromatografijom sa plameno-jonizacionim detektorom

3.2.5.1. Etarsko ulje

Uzorak komercijalno dostupnog etarskog ulja (LOT broj 8606110004031) biljne vrste *Melissa officinalis* proizvođača Promontis (selo Vilandrica, Srbija) je odmah nakon nabavke analiziran primenom GC/MS i GC/FID i čuvan na temperaturi od 4 °C.

3.2.5.2. Gasna hromatografija-masena spektrometrija

Gasno-hromatografska analiza etarskog ulja je izvršena na gasnom hromatografu *Agilent Technologies 7890B*, sa nepolarnom HP-5MS kapilarnom kolonom (5% fenilmetilsiloksan, dimenzije 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm; *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Gasni hromatograf je bio direktno povezan sa masenim detektorom 5977A iste kompanije. Uslovi analize: radna temperatura injektora 220 °C, odnosno detektora 320 °C; linearni temperaturni program zagrevanja kolone u opsegu od 60 °C do 246 °C sa brzinom povećanja temperature od 3 °C/min. Injektiran je rastvor uzorka etarskog ulja u etru (1 µl rastvora koncentracije 1 mg u 1 ml dietil-etra), u pulsnom „split” modu (40:1), pri protoku helijuma od 1,0 ml/min. Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV, sa akvizicijom m/z vrednosti u opsegu od 41 do 415 i brzinom skeniranja na 0,32 s po skenu. Procentualni sastav pojedinih sastojaka je određen na osnovu odnosa površina pikova, bez korišćenja korekcionih faktora. Obrada ukupnog jonskog hromatograma (*Total Ion Current – TIC*) je izvršena korišćenjem softvera *MSD ChemStation*, *MassHunter Qualitative Analysis* i *AMDIS_32* (*Agilent Technologies*, SAD).

3.2.5.3. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom

Gasno-hromatografska analiza sa plameno-jonizacionim detektorom je izvršena pod identičnim eksperimentalnim uslovima kao GC/MS. Parametri FID detektora: temperatura

grejača 300 °C; He protok 1 ml/min; N₂ protok, 25 ml/min; H₂ protok, 30 ml/min; protok vazduha, 400 ml/min; frekvencija beleženja signala, 20Hz.

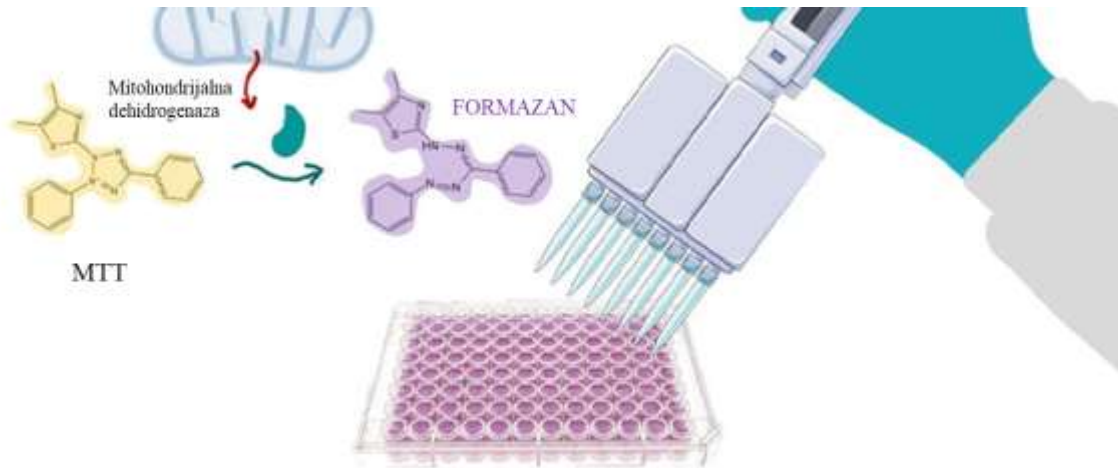
3.2.5.4. Identifikacija sastojaka etarskog ulja biljke *Melissa officinalis*

Linearni retencioni indeksi svih sastojaka analiziranih uzoraka su određeni koinjekcijom uzorka sa homologom serijom n-alkana od C₉-C₁₇. Hemijski sastav etarskog ulja je određen upoređivanjem linearnih retencionih indeksa sastojaka sa literaturnim vrednostima [189], kao i na osnovu poređenja masenih spektara jedinjenja sa spektrima jedinjenja iz biblioteka *Wiley Registry of Mass Spectral Data 11th Edition*, *NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 07*, *MassFinder 2.3*, *RTLPEST3*, i *Adams* [189] biblioteka. Gde god je bilo moguće, vršena je i analiza uzorka sa koinjektiranim odgovarajućim standardom.

3.2.6. MTT test - određivanje vijabilnosti ćelija biofilma

3.2.6.1. Princip MTT testa

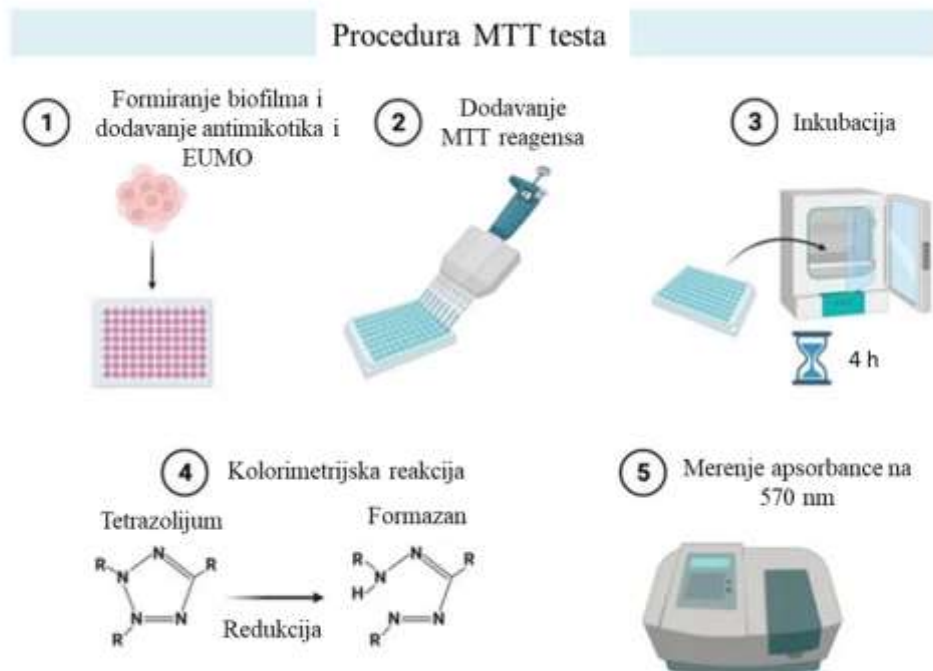
Za osam odabranih sojeva koji su pokazali izraženu sposobnost produkcije biofilma i visoke MIK vrednosti za ispitivane antimikotike bujon mikrodilucionom metodom ispitivan je potencijalni efekat antimikotika (FLU i NY) i etarskog ulja EUMO, kao i efekat EUMO u kombinaciji sa istim antimikoticima ponaosob, prema formiranom biofilmu izolata roda *Candida* primenom MTT metode. Ova metoda se primenjuje za utvrđivanje metaboličke aktivnosti ćelija u biofilmu, čime se realnije procenjuje inhibitorni/fungicidni efekat testiranih supstanci na izolate kvasnica. Test je baziran na redukciji tetrazolijumske soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromida) koja se pod dejstvom mitohondrijalnih dehidrogenaza redukuje do formazana. U ovom procesu promena boje iz žute (tetrazolijumska so) u ljubičastu (formazan) ukazuje na prisustvo živih ćelija (Slika 18). Apsorbanca koja je srazmerna koncentraciji formazana formiranog od strane živih, metabolički aktivnih ćelija očitava se ELISA čitačem.



Slika 18. Princip MTT testa citotoksičnosti

3.2.6.2. Procedura MTT testa

Za sve eksperimente, biofilmovi su prethodno formirani u mikrotitar pločama sa 96 bunarića i ravnim dnom na taj način što je u svaki bunarić dodato po 200 μL suspenzije ćelija kvasnica u RPMI-1640 medijumu tako da je koncentracija iznosila između $1-5 \times 10^6$ ćelija/mL. Nakon inkubacije na 35 °C tokom 48 h formirani su biofilmovi i uklonjene neadherentne ćelije nakon čega je vršeno dalje testiranje (Slika 19).



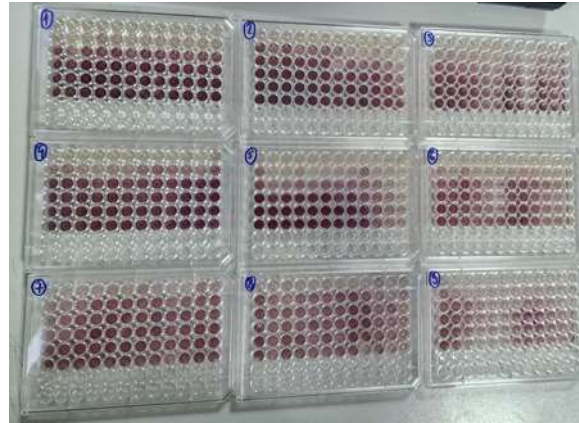
Slika 19. Procedura izvođenja MTT testa

3.2.6.3. Ispitivanje efekta etarskog ulja biljke *Melissa officinalis* i antimikotika na zreli biofilm

Za određivanje efekta EUMO, FLU i NY na zreli biofilm dodato je po 200 μL suspenzije svake od ispitivanih supstanci u RPMI 1640 medijum u koncentracijama od $2 \times \text{MIK}$, MIK i $\text{MIK}/2$ za svaki ispitivani soj. Nakon inkubacije od 24h na 35 °C sadržaj je uklonjen, a bunarići su tri puta isprani rastvorom PBS (pH 7,4). U svaki bunarić je potom dodato po 100 μL MTT rastvora (*Sigma-Aldrich Company*, Nemačka) u koncentraciji od 5 mg/mL. Ploče su inkubirane 4 h na 35 °C u mraku, nakon čega je uklonjen supernatant. Zatim je u svaki bunarić dodato po 100 μL DMSO pa su ploče ponovo inkubirane na 35 °C tokom 10 minuta, zaštićene od svetlosti. Nakon toga je po 80 μL rastvora prebačeno iz svakog bunarića u odgovarajuće bunariće novih ploča i očitavana je apsorbancija na 570 nm primenom ELISA čitača (*MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo ScientificTM*, Nemačka). Svi testovi su rađeni u triplikatu i za svaku ploču urađene su kontrole rasta i sterilnosti. Rezultati su predstavljeni kao odnos očitanih apsorbanci između tretiranih kultura i kontrola (bez etarskog ulja i antimikotika).

3.2.6.4. Metoda šahovske table (“*Checkerboard*” test)

Na osnovu dobijenih vrednosti MIK ispitivanih supstanci za planktonske ćelije svakog soja, za ispitivanje kombinovanog dejstva etarskog ulja i antimikotika na već formirane biofilmove testiranih sojeva korišćena je i metoda šahovske table (“*Checkerboard*” test). Nakon izvođenja prethodno navedenog postupka formiranja biofilma u mikrotitar pločama, uklonjene su neadherentne (planktonske) ćelije i u svaki bunarić je dodato po 150 μL RPMI, 25 μL serijski razblaženog EUMO horizontalno i 25 μL serijski razblaženog antimikotika (FLU u jednoj ploči i NY u drugoj) vertikalno, tako da su dobijene koncentracije svih testiranih supstanci iznosile $\text{MIK}/16$, $\text{MIK}/8$, $\text{MIK}/4$, $\text{MIK}/2$, MIK i $2 \times \text{MIK}$ (za svaki izolat posebno). Bunarići koji su redom sadržali samo formirani biofilm, zatim RPMI-1640 medijum, kao i svaku supstancu ponaosob, uključeni su kao kontrole u sklopu svake ploče. Ploče su zatim inkubirane na 35 °C tokom 24h, a nakon uklanjanja sadržaja i tri ispiranja fosfatnim puferom, dodato je po 100 μL MTT rastvora, a biofilmovi su dalje kvantifikovani kao što je već opisano. Mikrotitar ploče nakon izvedenog MTT testa prikazane su na slici 20.



Slika 20. Mikrotitar ploče nakon izvedenog MTT testa

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Određivanje uzorka za ovo istraživanje vršeno je korišćenjem internet kalkulatora <https://epitools.ausvet.com.au/oneproportion> pri čemu su definisani početni parametri za snagu studije 80% i verovatnoću greške prve vrste (α) od 0,05 za dvosmerno testiranja nulte hipoteze na osnovu prevalencije. Na osnovu pilot istraživanja, sprovedenog sa 30 izolata, utvrđena je prevalencija od 16,7%, pri čemu je dobijena minimalna reprezentativna veličina uzorka od 207 sojeva. U statističkoj obradi podataka korišćene su standardne metode deskriptivne statistike. Poređenje numeričkih obeležja je vršeno t testom ili Mann-Whitney testom u zavisnosti od distribucije podataka. Poređenje kategorijskih obeležja je vršeno Hi-kvadrat testom ili Fisherovim testom. Slaganje metoda je određivano na osnovu gradacije vrednosti Kohen kappa pri čemu su vrednosti od $\leq 0,4$ predstavljale slabo slaganje, od 0,41-0,60 umereno, od 0,61-0,80 znatno, $> 0,80$ skoro savršeno i vrednost 1 koja je označavala savršeno slaganje metoda. Hipoteze su testirane sa pragom značajnosti $p < 0,05$. Statistička obrada podataka koji su se odnosili na identifikaciju izolata, ispitivanje produkcije biofilma kao i osetljivost na antimikrobne lekove je vršena u programskom paketu *R* i *RStudio* (ver 2021.09.0+351, 2021-09-20 for Windows).

Eksperimentalni rezultati pojedinačnih kao i kombinovanih efekata ispitivanih supstanci na biofilm su izražavani kao srednja vrednost \pm SD, a razlike u statističkim značajnostima su determinisane korišćenjem dvosmerne analize varijanse (ANOVA) praćenom Tukijevim post-hoc testom za višestruka poređenja (*Graphpad Prism* ver. 6). Vrednosti verovatnoće (p) manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

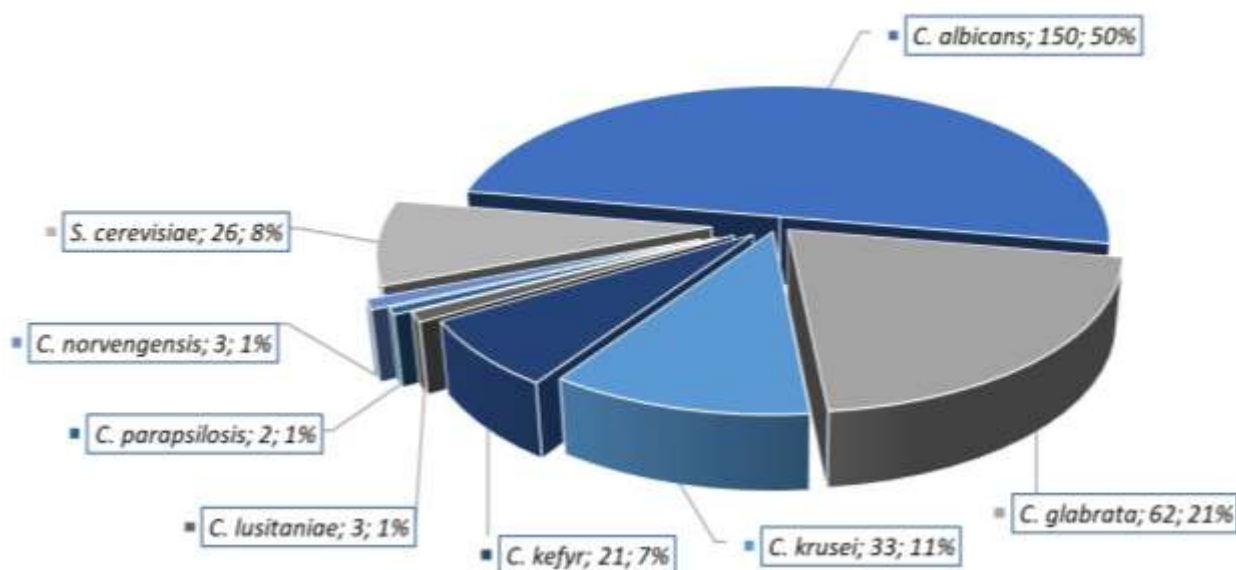
Za modeliranje interakcije između EUMO i antifungalnih agenasa (FLU i NY), primenjena je analiza površine odgovora (eng. *Response-surface analysis* - RSA) zasnovana na Blissovom modelu nezavisnosti [48]. Površina odgovora na dozu u RSA je modelovana korišćenjem krive odgovora na dozu svakog antifungalnog agenasa (krive odgovora na dozu pojedinačnog agenasa), što je odražavalo brzinu rasta dobijenu u svakom bunariću izloženom jednom agensu [49]. Analiza površine odgovora se takođe može primeniti nezavisno od krajnje tačke inhibicije, za koju je odlučeno da bude 90% u ispitivanom skupu podataka ove studije. Rezultat analize površine odgovora modela interakcije lekova zasnovanog na Bliss-nezavisnosti je predstavljen kroz trodimenzionalnu osenčenu površinu interakcije i matricu distribucije sinergije gde su prikazani rezultati Bliss sinergije za svaki par koncentracija antigljivičnih agenasa. RSA je sprovedena korišćenjem softvera *Combenefit* (ver. 2.021) [48].

4. REZULTATI

4.1. IDENTIFIKACIJA KVASNICA

Ovo istraživanje je obuhvatilo 300 sojeva kvasnica izolovanih iz uzoraka genitalnog trakta žena sa simptomima i znacima infekcije kod kojih nisu utvrđeni drugi potencijalni uzročnici. Na osnovu porasta gljiva, strukture i boje kolonija na hromogenoj podlozi, kao i testa germinacije, za dalja ispitivanja odabrano je 150 sojeva *C. albicans* i 150 sojeva NAC vrsta. Identifikacija ovih izolata urađena je korišćenjem MALDI TOF masene spektrometrije i ISYP testa.

U izabranoj grupi kvasnica primenom MALDI TOF masene spektrometrije potvrđeno je 150 sojeva vrste *C. albicans*. U grupi izdvojenih NAC vrsta, masenom spektrometrijom je identifikovano njih 124, pri čemu su dominantne bile vrste *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) i *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) jer su ukupno činile 76,6% NAC izolata. Značajno zastupljena bila je i vrsta *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*-16,9%), dok su vrste *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) i *C. norvengensis* (*Pichia norvengensis*) zabeležene u signifikantno nižem procentu. U grupi odabranih NAC sojeva, identifikovano je i 26 sojeva ne-*Candida* kvasnica koji su determinisani kao vrsta *S. cerevisiae* (Grafikon 1).



Grafikon 1: Distribucija ispitivanih izolata kvasnica

4.2. ANALIZA DIJAGNOSTIČKE EFIKASNOSTI KOMERCIJALNOG INTEGRAL SYSTEM YEASTS PLUS TESTA

Pored identifikacije izolata kvasnica MALDI TOF masenom spektrometrijom, svi izolati su testirani i diferencirani i primenom komercijalnog ISYP testa. Ovo ispitivanje je imalo za cilj utvrđivanje slaganja rezultata navedenog rutinskog testa sa rezultatima MALDI TOF metode, koja se zbog svoje efikasnosti i pouzdanosti u ovom istraživanju smatra referentnim standardom. Komercijalni ISYP test je interpretiran bez razmatranja rezultata dobijenih ispitivanjem MALDI TOF masenom spektrometrijom tako da je omogućena validacija ISYP testa, kao i procena njihove usaglašenosti.

Poređenjem rezultata MALDI TOF masene spektrometrije i ISYP testa zabeleženo je njihovo potpuno podudaranje u slučaju identifikacije vrste *C. albicans*. Međutim, identifikacija NAC i ne-*Candida* vrsta komercijalnim testom nije bila tako efikasna. Naime, u slučaju vrste *C. glabrata* podudarnost između primenjenih testova je iznosila 87,30%, jer je od 71 soja ove vrste identifikovanih ISYP testom MALDI TOF masenom spektrometrijom utvrđeno da ovoj vrsti pripada 62 soja, dok su preostali izolati odgovarali vrstama *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) i *C. kefir* (*Kluyveromyces marxianus*). Takođe, od 30 izolata *S. cerevisiae* identifikovanih ISYP testom, MALDI TOF masenom spektrometrijom je utvrđeno da 26 sojeva pripada ovoj vrsti dok je četiri identifikovano kao *C. kefir* (*Kluyveromyces marxianus*), tako da je slaganje bilo prisutno u 86,70% slučajeva. Potpuno neslaganje primenom ISYP testa zabeleženo je u

slučaju identifikacije vrsta *C. tropicalis* i *C. zeynaloides*. Naime, primenom MALDI TOF masene spektrometrije, oba izolata *C. tropicalis* determinisana su kao *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) dok su sva tri soja *C. zeynaloides* odgovarala vrsti *C. norvengensis* (*Pichia norvengensis*). Za dva izolata koja nisu identifikovana primenom komercijalnog testa do nivoa vrste, masenom spektrometrijom je prethodno utvrđeno da pripadaju vrstama *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) i *C. kefyri* (*Kluyveromyces marxianus*). Slaganje rezultata ISYP testa sa rezultatima MALDI TOF masene spektrometrije prikazano je na tabeli 2.

Tabela 2. Procenat slaganja rezultata ISYP testa sa rezultatima MALDI TOF masene spektrometrije

Vrste kvasnica identifikovane primenom ISYP testa		Rezultati MALDI TOF masene spektrometrije			
		Slaganje u identifikaciji (broj i % izolata)		Neslaganje u identifikaciji (broj i % izolata)	
<i>C. albicans</i> (n=150)		150	100,00%	0	0,00%
Ne- <i>albicans</i> <i>Candida</i> spp. (n=150)	<i>C. glabrata</i> (n=71)	62	87,30%	9	12,7%
	<i>C. kefyri</i> (n=9)	9	100,00%	0	0,00%
	<i>C. krusei</i> (n=30)	30	100,00%	0	0,00%
	<i>C. lusitaniae</i> (n=1)	1	100,00%	0	0,00%
	<i>C. parapsilosis</i> (n=2)	2	100,00%	0	0,00%
	<i>C. tropicalis</i> (n=2)	0	0,00%	0	0,00%
	<i>C. zeynaloides</i> (n=3)	0	0,00%	3	100,00%
	<i>Candida</i> sp. (n=2)	0	0,00%	0	0,00%
<i>S. cerevisiae</i> (n=30)		26	86,70%	4	13,30%

Na tabeli 3 je prikazano slaganje ISYP testa pri identifikaciji ispitivanih vrsta kvasnica u poređenju sa MALDI TOF masenom spektrometrijom. Kvantitativna mera slaganja ovih metoda izražena je u vidu Kohen kappa vrednosti sa odgovarajućom statističkom značajnošću. Ove vrednosti su pokazale savršeno slaganje za vrste *C. albicans* i *C. parapsilosis*, skoro savršeno slaganje za vrste *C. glabrata*, *C. krusei* i *S. cerevisiae*, dok je umereno slaganje bilo prisutno kod vrsta *C. kefyri* i *C. lusitaniae*.

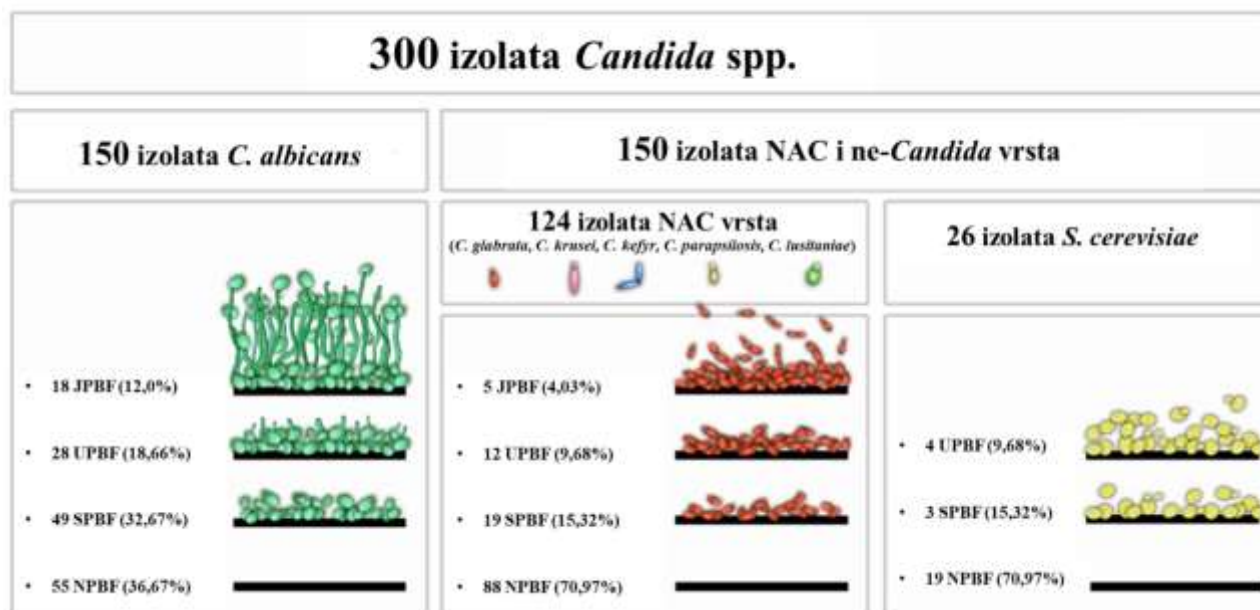
Tabela 3. Slaganje ISYP testa u poređenju sa MALDI TOF masenom spektrometrijom pri identifikaciji kvasnica

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeynaloides</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Kappa	1,0	0,913	0,582	0,898	0,497	1,0			0,921
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001			<0,001

4.3. ISPITIVANJE PRODUKCIJE BIOFILMA IZOLOVANIH KVASNICA

U cilju utvrđivanja sposobnosti kvasnica da produkuju biofilm primenjena je metoda po Stepanoviću sa modifikacijama. Ovim testiranjem je zabeleženo da skoro polovina svih odabranih izolata pokazuje sposobnost formiranja biofilma (138; 46%) među kojima je bilo 23 (16,7%) JPBF, 44 (31,9%) UPBF i 71 (51,5%) SPBF.

Analizom po vrstama, utvrđeno je da najveći broj izolata produkora pripada vrsti *C. albicans* (95; 68,84%), dok su NAC vrste pokazale značajno slabiju sposobnost produkcije biofilma (36; 26,1%). Grupa koju su činila 23 JPBF je obuhvatila 18 sojeva *C. albicans*, predstavljajući značajnu većinu u odnosu na jake produktore drugih vrsta (po dva soja *C. glabrata* i *C. kefyr* i jedan soj *C. lusitaniae*). Među 44 UPBF, 28 su bili izolati *C. albicans*, njih 12 je pripadalo NAC vrstama (9 sojeva *C. glabrata* i tri izolaza *C. kefyr*), a četiri vrsti *S. cerevisiae*. Od ukupno 71 SPBF, 49 sojeva je pripadalo vrsti *C. albicans*, 19 NAC vrstama (10 sojeva *C. glabrata*, pet *C. kefyr* i po dva *C. krusei* i *C. lusitaniae*) i tri vrsti *S. cerevisiae*. Što se tiče sojeva koji nisu imali sposobnost produkcije biofilma, u ovoj grupi je bilo 162 izolata i to 55 *C. albicans*, 88 izolata NAC vrsta (41 izolat *C. glabrata*, 31 *C. krusei*, 11 *C. kefyr*, tri *C. norvegensis* i dva *C. parapsilosis*) i 19 *S. cerevisiae*. Distribucija vrsta na osnovu sposobnosti produkcije biofilma je prikazana na slici 21.



Slika 21. Sposobnost produkcije biofilma ispitivanih sojeva

*NAC- Ne-*albicans* *Candida* vrste, JPBF-jaki produktori biofilma, UPBF-umereni produktori biofilma, SPBF-slabi produktori biofilma, NPBF-neprodukujući sojevi

4.4. ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI SOJEVA PREMA ANTIMIKOTICIMA PRIMENOM ISYP TESTA

Rezultati ispitivanja osetljivosti sojeva na antigljivične lekove primenom komercijalnog ISYP testa prikazani su na Tabeli 4.

Razmatranjem efekta antimikotika iz grupe poliena na sojeve vrste *C. albicans*, utvrđeno je da je 88,7% njih bilo osetljivo na AMB, dok je više od polovine ovih sojeva pokazalo smanjenu osetljivost prema NY (53,3%). Što se tiče ostalih antigljivičnih lekova, zadovoljavajuća osetljivost sojeva ove vrste dokazana je i prema antimetabolitima (FCY=94,0%), kao i prema derivatima imidazola (MIC=90,0%, KCA=86,7%, ECN=80,7%, CLO=77,3%) i derivatima triazola (VOR=88,0%, FLU=80,7%, ITR=79,3%).

Analizom NAC sojeva, takođe je utvrđena bolja osetljivost prema AMB (70,2%) u odnosu na NY (56,5%) kada su u pitanju polienski antimikotici, dok je 85,5% ovih izolata bilo senzitivno na FCY. Izolati NAC vrsta su pokazali varijabilnu osetljivost prema derivatima imidazola, pri čemu su najsenzitivniji bili na KCA (73,4%), zatim na ECN (62,9%) i MIC (58,1%), dok su najslabiju osetljivost pokazali prema CLO (35,5%). Najefikasniji prema ovim sojevima među derivatima triazola bio je VOR (79,8%), za kojim je sledio FLU (68,5%), dok je na ITR bila osetljiva oko polovina NAC izolata (54,8%).

Tabela 4. In vitro osetljivost ispitivanih sojeva primenom Integral system Yeasts plus testa

	NY		AMB		FCY		ECN		KCA		CLO		MIC		ITR		VOR		FLU		
	S	I/R	S	I/R	S	I/R	S	I/R	S	I/R	S	I/R	S	I/R	S	I/R	S	I/R	S	I/R	
<i>C. albicans</i>	N	70	80	133	17	141	9	121	29	130	20	116	34	135	15	119	31	132	18	121	29
	%	46,7	53,3	88,7	11,3	94,0	6,0	80,7	19,3	86,7	13,3	77,3	22,7	90,0	10,0	79,3	20,7	88,0	12,0	80,7	19,3
NAC	N	70	54	87	37	106	18	78	46	91	33	44	80	72	52	68	56	99	25	85	39
	%	56,5	43,5	70,2	29,8	85,5	14,5	62,9	37,1	73,4	26,6	35,5	64,5	58,1	41,9	54,8	45,2	79,8	20,2	68,5	31,5
<i>C. glabrata</i>	N	40	22	49	13	56	6	48	14	40	22	15	47	38	24	24	38	46	16	37	25
	%	64,5	35,5	79,0	21,0	90,3	9,7	77,4	22,6	64,5	35,5	24,2	75,8	61,3	38,7	38,7	61,3	74,2	25,8	59,7	40,3
<i>C. lusitanae</i>	N	2	1	1	2	2	1	3	0	3	0	2	1	3	0	2	1	3	0	3	0
	%	66,7	33,3	33,3	66,7	66,7	33,3	100,0	0,0	100,0	0,0	66,7	33,3	100,0	0,0	66,7	33,3	100,0	0,0	100,0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>	N	1	1	2	0	2	0	0	2	2	0	1	1	0	2	2	0	2	0	2	0
	%	50,0	50,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	50,0	50,0	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
<i>C. kefyr</i>	N	6	15	11	10	18	3	19	2	20	1	18	3	19	2	19	2	20	1	19	2
	%	28,6	71,4	52,4	47,6	85,7	14,3	90,5	9,5	95,2	4,8	85,7	14,3	90,5	9,5	90,5	9,5	95,2	4,8	90,5	9,5
<i>C. krusei</i>	N	19	14	21	12	25	8	6	27	23	10	6	27	10	23	18	15	25	8	21	12
	%	57,6	42,4	63,6	36,4	75,8	24,2	18,2	81,8	69,7	30,3	18,2	81,8	30,3	69,7	54,5	45,5	75,8	24,2	63,6	36,4
<i>C. norvegensis</i>	N	2	1	3	0	3	0	2	1	3	0	2	1	2	1	3	0	3	0	3	0
	%	66,7	33,3	100,0	0,0	100,0	0,0	66,7	33,3	100,0	0,0	66,7	33,3	66,7	33,3	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
<i>S. cerevisiae</i>	N	17	9	20	6	25	1	23	3	18	8	6	20	16	10	5	21	19	7	20	6
	%	65,4	34,6	76,9	23,1	96,2	3,8	88,5	11,5	69,2	30,8	23,1	76,9	61,5	38,5	19,2	80,8	73,1	26,9	76,9	23,1

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol-, FLU-Flukonazol, S-senzitivno, I/R-intermedijarno/rezistentno; NAC-ne-albicans Candida sojevi

Oko dve trećine sojeva *S. cerevisiae* je bilo senzitivno na polienske antimikotike (NY=65,4%, AMB=76,9%), dok je najbolja osetljivost zabeležena prema antimetabolitima (FCY=96,2%). I u slučaju ove vrste, osetljivost prema derivatima imidazola je bila varijabilna i to najbolja prema ECN (88,5%), zatim prema KCA (69,2%) i MIC (61,5%), dok je manje od četvrtine sojeva *S. cerevisiae* bilo senzitivno na CLO (23,1%). Kada su u pitanju derivati triazola, bez obzira na relativno zadovoljavajuću osetljivost prema FLU (76,9%) i VOR (73,1%), značajno slabija osetljivost je zabeležena prema ITR na koji je bilo senzitivno manje od petine sojeva ove vrste (19,2%).

Upoređivanjem efikasnosti antigljivičnih lekova, uočena je značajna razlika u procentu osetljivih sojeva *C. albicans*, NAC vrsta i vrste *S. cerevisiae*, tj. da se osetljivost na ispitivane antimikotike statistički značajno razlikuje u zavisnosti od vrste kvasnice (Grafikon 2).

	<i>C. albicans</i>	NAC spp.	<i>S. cerevisiae</i>	P	Ca vs NAC	Ca vs Sc	NAC vs Sc
Nistatin	46.7%	56.5%	65.4%	0,066			
Amfotericin B	88.7%	70.2%	76.9%	0,001	<0,001	0,185	0,649
Flucitozin	94.0%	85.5%	96.2%	0,085			
Ekonazol	80.7%	62.9%	88.5%	0,001	0,002	0,499	0,022
Ketokonazol	86.7%	73.4%	69.2%	0,001	0,009	,051	0,849
Klotrimazol	77.3%	35.5%	23.1%	<0,001	<0,001	<0,001	0,321
Mikonazol	90.0%	58.1%	61.5%	<0,001	<0,001	<0,001	0,914
Itrakonazol	79.3%	54.8%	19.2%	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
Vorikonazol	88.0%	79.8%	73.1%	0,042	0,093	0,088	0,616
Flukonazol	80.7%	68.5%	76.9%	0,006	0,030	0,861	0,541

Grafikon 2. Statistička značajnost u osetljivosti sojeva utvrđenoj primenom ISYP testa

NAC – ne-albicans *Candida* sojevi; Ca vs NAC – *C. albicans* u poređenju sa NAC vrstama, Ca vs Sc – *C. albicans* u poređenju sa vrstom *S. cerevisiae*, NAC vs Sc – NAC vrste u poređenju sa vrstom *S. cerevisiae*

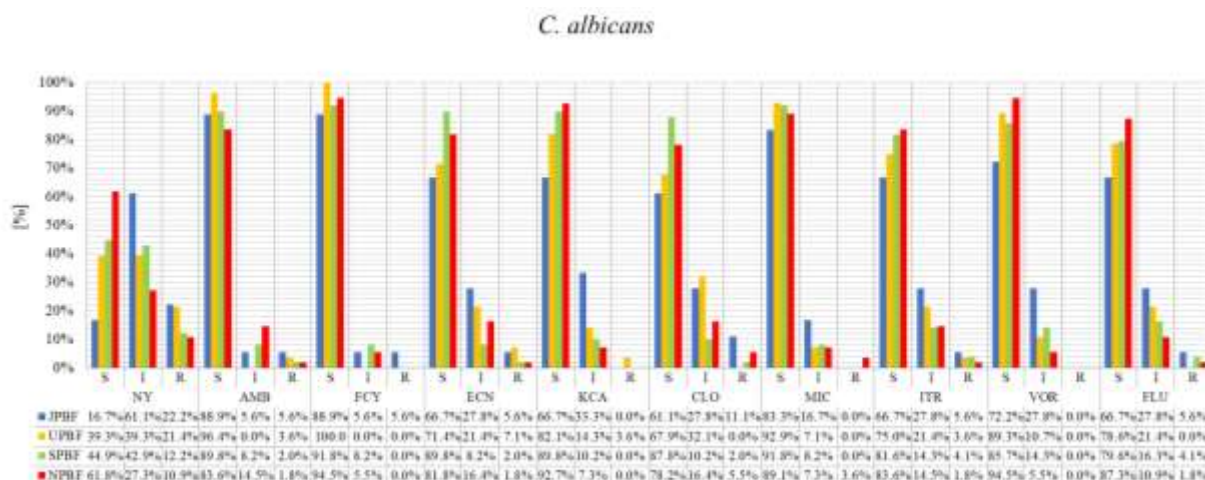
Pri upoređivanju *C. albicans* i NAC izolata ustanovljeno je da su NAC sojevi pokazali značajno nižu osetljivost na većinu ispitivanih antigljivičnih lekova [AMB=70,2% ($p<0,001$), ECN=62,9% ($p=0,002$), KCA=73,4% ($p=0,009$), CLO=35,5% ($p<0,001$), MIC=58,1% ($p<0,001$), ITR=54,8 ($p<0,001$), FLU=68,5% ($p=0,030$)]. Za razliku od ovih vrsta, sojevi *S. cerevisiae* su bili značajno osetljiviji od NAC izolata na ECN (88,5%; $p=0,022$), ali i značajno slabije osetljivi na CLO (23,1%; $p<0,001$) i MIC (61,5%; $p<0,001$) u poređenju sa sojevima *C. albicans*. Većina izolata *S. cerevisiae* pokazala je značajno nižu osetljivost na ITR (19,2%; $p<0,001$) u poređenju sa svim sojevima roda *Candida*.

4.5. IN VITRO ANTIMIKROBNA OSETLJIVOST ISPITIVANIH PRODUKTORA I NEPRODUKTORA BIOFILMA

Evaluacija dobijenih rezultata, odnosno osetljivosti ispitivanih sojeva različitih vrsta kvasnica na antimikotike utvrđena ISYP testom u odnosu na njihovu sposobnost produkcije biofilma prikazana je na grafikonima 3-8.

Na grafikonu 3 su prikazani svi ispitivani sojevi vrste *C. albicans* pri čemu je uočljiva njihova značajno niža osetljivost prema NY u odnosu na druge ispitivane antimikotike i to naročito JPBF (83,3%), za kojima slede UPBF (60,7%) i SPBF (55,1%) dok je slabiju osetljivost na ovaj antimikotik pokazalo 38,2% NPBF. Iako je senzitivnost ispitivanih izolata

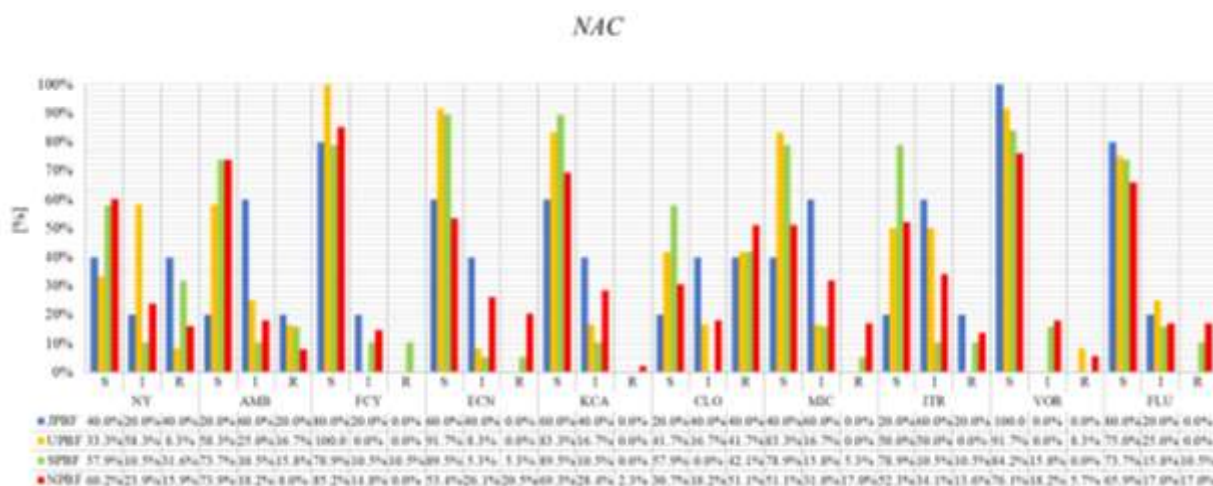
C. albicans na preostale antimikotike bila značajno viša, može se uočiti da su najslabiju osetljivost pokazali JPBF i to 38,9% prema CLO i po 33,3% prema ECN, KCA, ITR i FLU.



Grafikon 3. Osetljivost sojeva vrste *C. albicans* na antimikotike

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol

Analizom grafikona 4 na kome su prikazani sojevi NAC vrsta, zapaža se da je njihova osetljivost značajno niža u odnosu na sojeve *C. albicans*. Iako je prema FCY, ECN, KCA, VOR i FLU zabeležena relativno dobra senzitivnost (53,4-100%), JPBF su u odnosu na UPBF i SPBF kao i u odnosu na NPBF pokazali značajno slabiju osetljivost prema NY, AMB, CLO, MIC i ITR koja je utvrđena kod 60-80% ovih izolata.

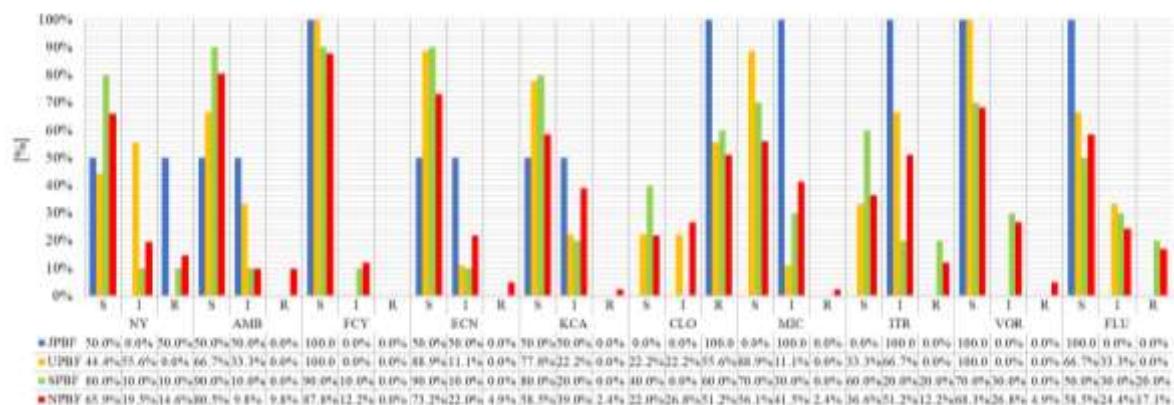


Grafikon 4. Osetljivost sojeva NAC vrsta na antimikotike

NAC-ne-albicans *Candida* sojevi; NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol

Najzastupljenija vrsta među NAC sojevima čiji su pripadnici činili polovinu izolata ove grupe kvasnica je *C. glabrata*. Slično kao i u slučaju razmatranja svih NAC sojeva i izolati ove vrste su pokazali najbolju osetljivost prema FCY, ECN, KCA, VOR i FLU (50-100%), dok je slabija osetljivost svih JPBF registrovana prema CLO, MIC i ITR. Za razliku od NAC sojeva u celini, sojevi vrste *C. glabrata* su pokazali nešto bolju osetljivost prema antimikoticima iz grupe poliena i to 44,4-80% prema NY i 50-90% prema AMB (Grafikon 5).

C. glabrata

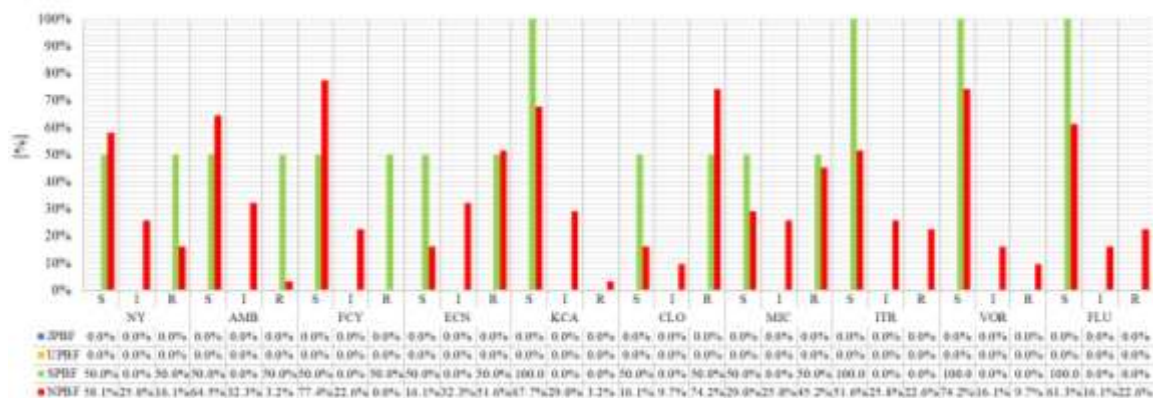


Grafikon 5. Osetljivost sojeva vrste *C. glabrata* na antimikotike

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol

Druga najzastupljenija vrsta među NAC sojevima je *C. krusei*. Među izolatima ove vrste je bilo samo neprodukujućih ili slabih produkatora, pri čemu su svi sojevi sa sposobnošću produkcije biofilma bili osetljivi prema svim ispitivanim triazolima, kao i prema KCA. Osetljivost na preostale imidazole je bila znatno niža (16,1-50%), dok se osetljivost na poliene kretala između 50-64,5% (Grafikon 6).

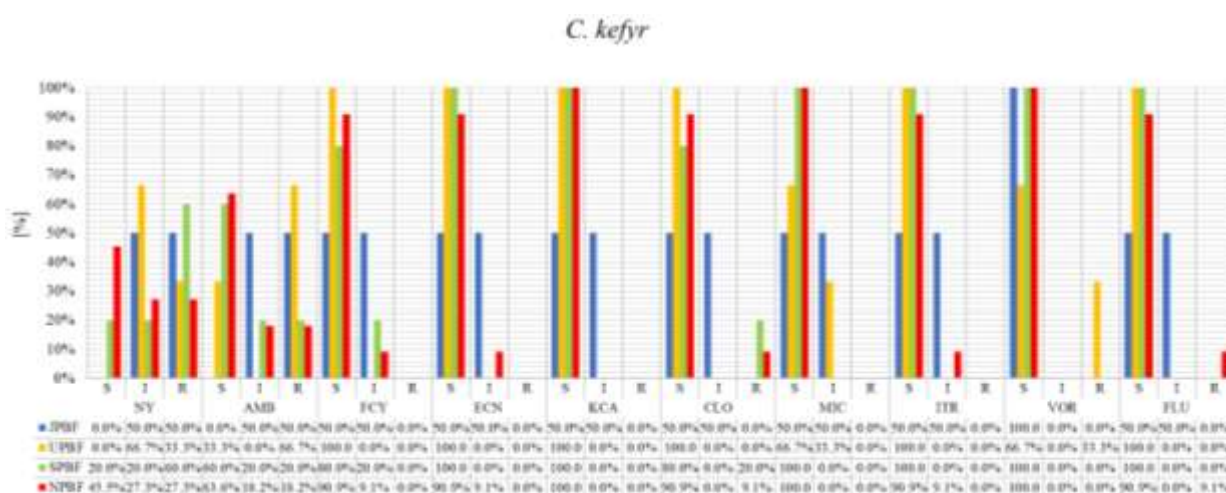
C. krusei



Grafikon 6. Osetljivost sojeva vrste *C. krusei* na antimikotike

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol

Kada je u pitanju vrsta *C. kefyr*, na grafikonu 7 se može uočiti da su sojevi ove vrste najslabiju osetljivost pokazali prema AMB i NY, pri čemu su senzitivni bili samo neki NPBF, SPBF i UPBF (20-63,6%), dok nijedan JPBF nije pokazao osetljivost prema polienskim antimikoticima. Sa druge strane, sojevi ove vrste su pokazali veoma dobru osetljivost prema svim ostalim antimikoticima, posebno NPBF kao i SPBF i UPBF. Nešto slabiju senzitivnost su ispoljili JPBF koji su bili osetljivi samo na VOR, dok je polovina ovih sojeva bila osetljiva na FCY, sve imidazole, ITR i FLU.

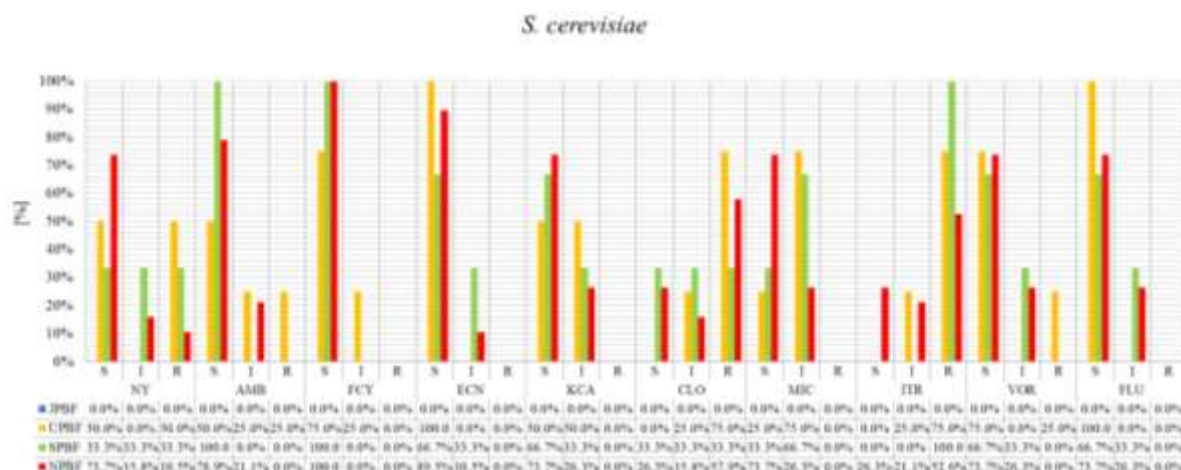


Grafikon 7. Osetljivost sojeva vrste *C. kefyr* na antimikotike

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol

Što se tiče ostalih NAC vrsta, među ispitivanim sojevima *C. lusitaniae* su se našli samo JPBF i UPBF koji su bili osetljivi na ECN, KCA, MIC, VOR i FLU. Jaki produktori su pokazali nižu osetljivost prema AMB, CLO i ITR, a UPBF prema NY i FCY. Sojevi *C. parapsilosis* i *Pichia norvegensis* nisu imali sposobnost produkcije biofilma i svi su bili osetljivi na AMB, FCY, KCA i triazole. Obe vrste su nešto nižu osetljivost pokazale prema NY, ECN, CLO i MIC.

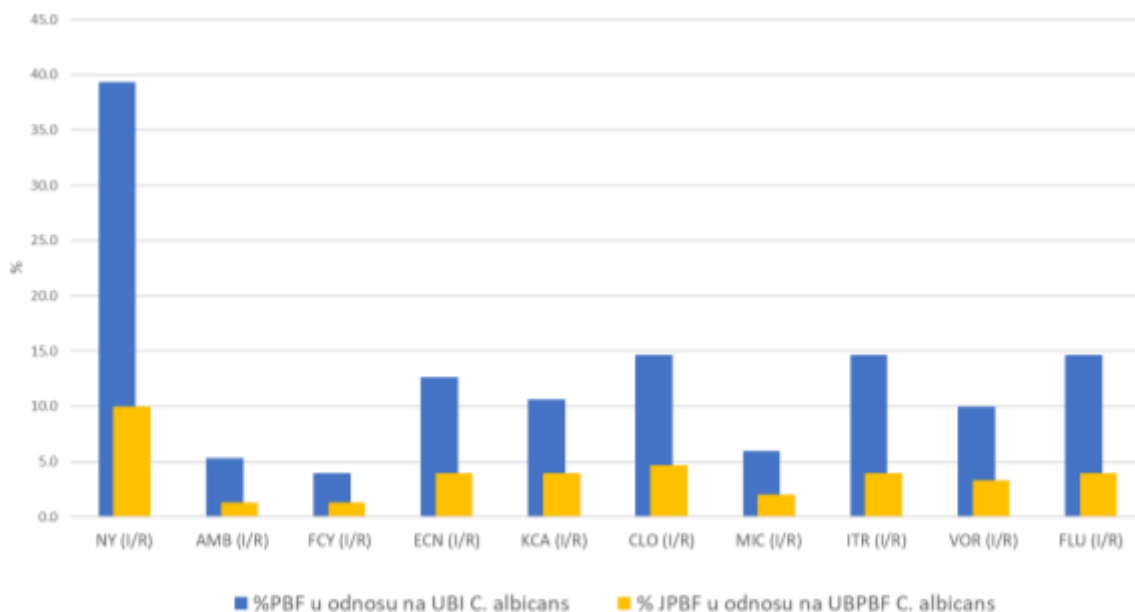
Većina sojeva vrste *S. cerevisiae*, među kojima su utvrđeni NPBF, UPBF i SPBF, je pokazala dobru osetljivost prema AMB, FCY, ECN, VOR i FLU. Varijabilna osetljivost je zabeležena prema NY i KCA, dok su ovi sojevi najrezistentniji bili na ITR i CLO (Grafikon 8).



Grafikon 8. Osetljivost sojeva vrste *S. cerevisiae* na antimikotike

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol-, FLU-Flukonazol

S obzirom na to da sojevi kvasnica sa izraženom virulentnošću, odnosno sa sposobnošću produkcije biofilma koji ujedno pokazuju i nižu osetljivost prema antigljivičnim lekovima, predstavljaju najveći problem u terapiji vaginalnih gljivičnih infekcija, sumirani su i analizirani rezultati ispitivanja ovih osobina za izolate *C. albicans* jer se među ovim sojevima nalazilo značajno više produkatora biofilma (PBF) u odnosu na druge vrste (Grafikon 9 i Tabela 5). Razmatranjem osetljivosti na dva poliena iz ISYP testa, utvrđeno je da je vrlo visok procenat (39,3%) izolata *C. albicans* sa sposobnošću produkcije biofilma bio rezistentan ili slabije osetljiv (I/R) na NY, pri čemu su JPBF činili 25,4% ovih sojeva. Gotovo identičan procenat JPBF utvrđen je i među sojevima koji su bili slabije osetljivi na AMB, pri čemu je u ukupnom zbiru značajno manji broj biofilm produkujućih sojeva pokazao nižu osetljivost na ovaj antimikotik (5,3%). Ispitivanjem osetljivosti na FCY, dokazano je da samo kod 4,0% sojeva produkatora, među kojima su trećinu činili JPBF, ovaj antigljivični lek iz grupe antimetabolita nije pokazao zadovoljavajuću efikasnost. Takođe je utvrđeno i da su izolati sa višom virulencijom pokazali sličnu osetljivost na derivate imidazola i derivate triazola pri čemu je oko trećina ovih sojeva pripadala JPBF (ECN-I/R + PBF = 12,7/JPBF 31,6%; KCA-I/R + PBF = 10,7/ JPBF 37,5%; CLO-I/R + PBF = 14,7/ JPBF 31,8%; MIC-I/R + PBF = 6,0/ JPBF 33,3%); derivati triazola (ITR-I/R + PBF = 14,7/ JPBF 27,3%; VOR-I/R + PBF = 10,0/ JPBF 33,3%; FLU-I/R + PBF = 14,7/ JPBF 27,3%].



Grafikon 9. Procentualna zastupljenost slabije osjetljivih sojeva *C. albicans* produktora biofilma različitih kategorija u odnosu na ispitivane antimikotike

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR-Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol. PBF-produktori biofilma, UBI-ukupan broj izolata, JPBF-jaki produktori biofilma, UBPF-ukupan broj produktora biofilma, I/R – niže osjetljivi i rezistentni sojevi

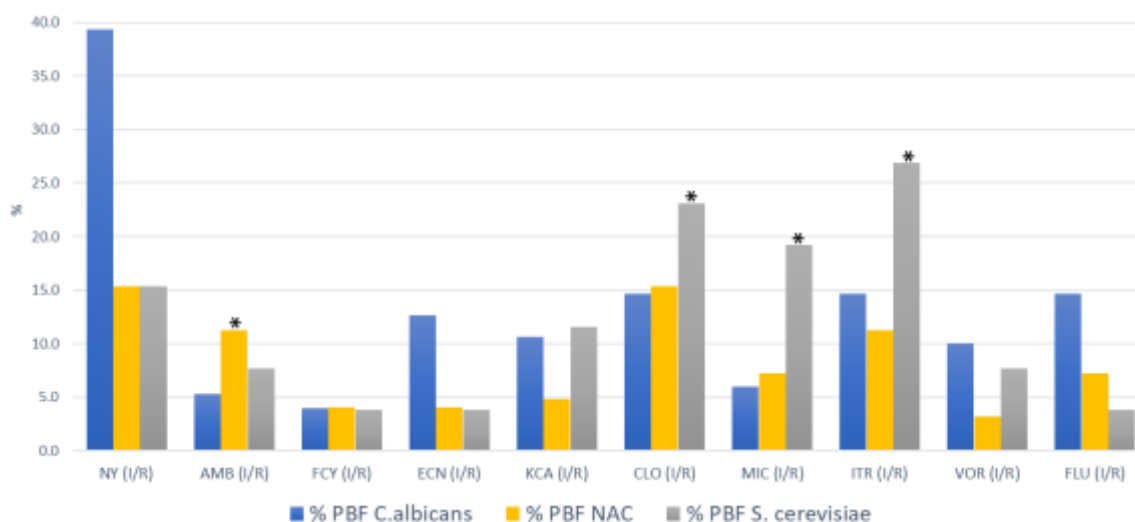
Analiziranjem virulentnosti NAC vrsta, utvrđeno je da među ovim izolatima najveći procenat sojeva PBF pokazuje nižu osjetljivost prema NY (NY-I/R + PBF = 15,3/ JPBF 15,7%) i CLO (CLO-I/R + PBF = 15,3/ JPBF 21,1%), za kojima slede AMB (AMB-I/R + PBF = 11,3/ JPBF 28,6%) i ITR (ITR-I/R + PBF = 11,3/ JPBF 28,6%). U okviru NAC vrsta, *C. glabrata* pokazuje sposobnost produkcije biofilma uz smanjenu osjetljivost u najvećem procentu prema CLO (CLO-I/R + PBF = 24,2%/ JPBF 13,3%), ITR (ITR-I/R + PBF = 19,4%/ JPBF 16,7%), FLU (FLU-I/R + PBF = 12,9%) i NY (NY-I/R + PBF = 11,3%/ JPBF 14,3%). Nasuprot tome, produktori biofilma vrste *C. kefyr* su pokazali nižu osjetljivost jedino prema derivatima poliena (NY-I/R + PBF = 42,9%/ JPBF 22,2% i AMB-I/R + PBF = 28,6%/ JPBF 33,3%). Sposobnost produkcije biofilma je utvrđena kod malog broja izolata vrste *C. krusei*, a prema svega 3,0% sojeva produktora ustanovljena je i niža efikasnost derivata poliena, FCY, ECN, CLO i MIC. Iako nijedan soj vrste *S. cerevisiae* nije bio JPBF, u grupi ovih kvasnica je utvrđeno da je pored ITR (ITR-I/R + PBF = 26,9%) i CLO (CLO-I/R + PBF = 23,1%), najviši procenat sojeva sa sposobnošću produkcije biofilma bio slabije osjetljiv na MIC (MIC-I/R + PBF = 19,2%), NY (NY-I/R + PBF = 15,4%) i KCA (KCA-I/R + PBF = 11,5%). Analiza virulentnosti ispitivanih kvasnica prikazana je na tabeli 5.

Tabela 5. Analiza virulentnosti ispitivanih kvasnica

%	<i>C. albicans</i>			NAC			<i>C. glabrata</i>			<i>C. krusei</i>			<i>C. kefyr</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	S+ NPBF	I/R+ PBF	I/R+ JPBF	S+ NPBF	I/R+ PBF	I/R+ JPBF	S+ NPBF	I/R+ PBF	I/R+ JPBF	S+ NPBF	I/R+ PBF	I/R+ JPBF	S+ NPBF	I/R+ PBF	I/R+ JPBF	S+ NPBF	I/R+ PBF	I/R+ JPBF
NY	22,7	39,3	25,4	42,7	15,3	15,7	43,5	11,3	14,3	54,5	3,0	0	23,8	42,9	22,2	53,8	15,4	0
AMB	30,7	5,3	25,0	52,4	11,3	28,6	53,2	8,1	30,0	60,6	3,0	0	33,3	28,6	33,3	57,7	7,7	0
FCY	34,7	4,0	33,3	60,49	4,0	20,0	58,1	1,6	0	72,7	3,0	0	47,6	9,5	50,0	73,1	3,8	0
ECN	30,0	12,7	31,6	37,9	4,0	40,0	48,4	4,8	33,3	15,2	3,0	0	47,6	4,8	100	65,3	3,8	0
KCA	34,0	0,7	37,5	49,2	4,8	33,3	38,7	8,1	20,0	63,6	0	0	52,4	4,8	100	53,8	11,5	0
CLO	28,7	14,7	31,8	21,7	15,3	21,1	14,5	24,2	13,3	15,2	3,0	0	47,6	9,5	50,0	19,2	23,1	0
MIC	32,7	6,0	33,3	36,3	7,3	33,3	37,1	9,7	33,3	27,3	3,0	0	52,4	9,5	50,0	53,8	19,2	0
ITR	30,7	14,7	27,3	37,1	11,3	28,6	24,2	19,4	16,7	48,5	0	0	47,6	4,8	100	19,2	26,9	0
VOR	34,7	10,0	33,3	54,0	3,2	0	45,2	4,8	0	69,7	0	0	52,4	4,8	0	53,8	7,6	0
FLU	32,0	14,7	27,3	46,8	7,3	11,1	38,7	12,9	0	57,6	0	0	47,6	4,8	100	53,8	3,8	0

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR -Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol, S+NPBF-senzitivni sojevi koji ne proizvode biofilm, I/R+PBF- rezistentni ili slabije osjetljivi sojevi koji proizvode biofilm, I/R+JPBF- rezistentni ili slabije osjetljivi sojevi jaki produktori biofilma

Na grafikonu 10 je predstavljen uporedni prikaz zastupljenosti sojeva *C. albicans*, NAC vrsta i *S. cerevisiae* visoke virulentnosti u odnosu na korišćene antimikotike.

**Grafikon 10.** Uporedni prikaz zastupljenosti sojeva *C. albicans*, NAC vrsta i *S. cerevisiae* visoke virulentnosti u odnosu na korišćene antimikotike

NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR -Itrakonazol, VOR-Vorikonazol-, FLU-Flukonazol, PBF- produktori biofilma, I/R – niže osjetljivi i rezistentni sojevi, * $p < 0,001$

Može se uočiti da su NAC produktori biofilma bili statistički značajno niže osetljivi prema AMB u poređenju sa izolatima *C. albicans* i *S. cerevisiae*, dok je kod sojeva *S. cerevisiae* sa sposobnošću produkcije biofilma zabeležena značajno veća otpornost prema CLO, MIC i ITR u odnosu na druge ispitivane vrste kvasnica.

Kada su u pitanju sojevi sa sposobnošću produkcije biofilma, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti među vrstama ovih uzročnika prema sledećim antimikoticima: AMB ($p < 0,001$), CLO ($p < 0,001$), MIC ($p < 0,001$), ITR ($p < 0,001$) i FLU ($p = 0,013$). Navedeni rezultati prikazani su na tabeli 6.

Tabela 6. Osetljivost na antimikotike produktora biofilma u odnosu na uzročnike

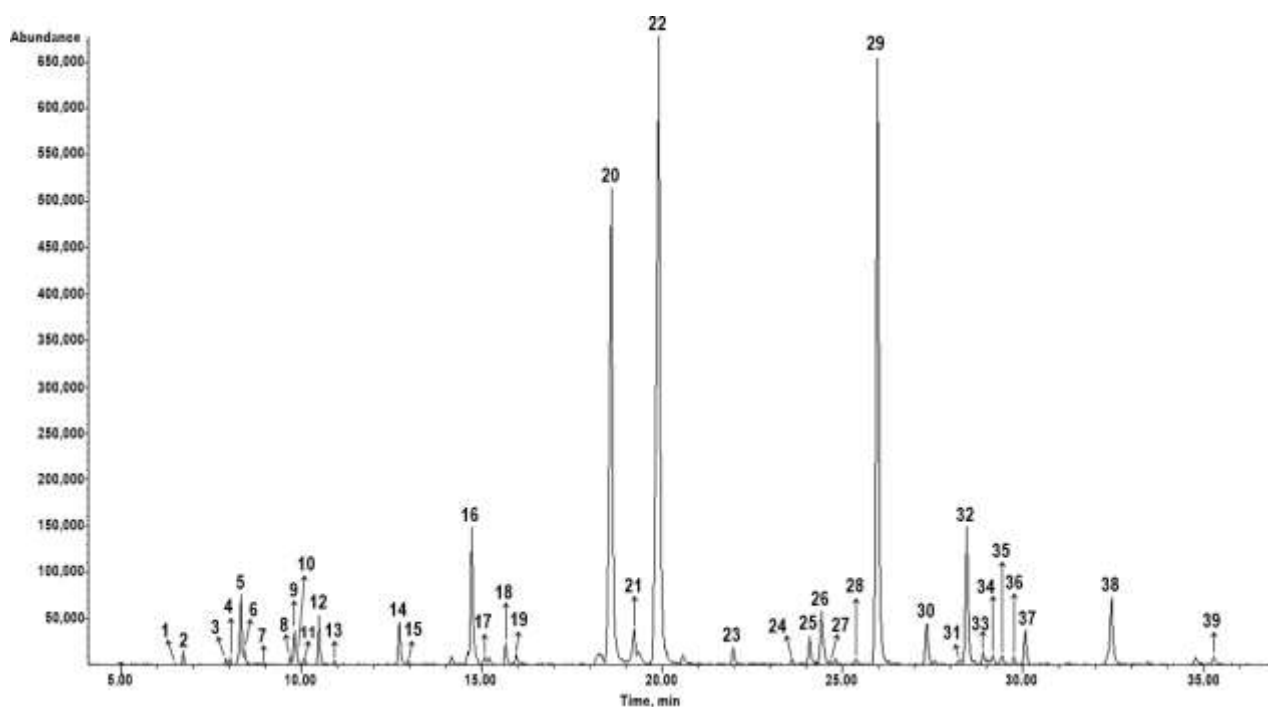
	<i>C. albicans</i>		NAC		<i>S. cerevisiae</i>		p ¹
	N	%	N	%	N	%	
NY	36	37,9	17	47,2	3	42,9	0,622
AMB	87	91,6	22	61,1	5	71,4	<0,001
FCY	89	93,7	31	86,1	6	85,7	0,362
ECN	76	80,0	31	86,1	6	85,7	0,684
KCA	79	83,2	30	83,3	4	57,1	0,294
CLO	73	76,8	17	47,2	1	14,3	<0,001
MIC	86	90,5	27	75,0	2	28,6	<0,001
ITR	73	76,8	22	61,1	0	0,0	<0,001
VOR	80	84,2	32	88,9	5	7,4	0,511
FLU	73	76,8	27	75,0	6	85,7	0,013

¹ – Hi-kvadrat test. NY-Nistatin, AMB-Amfotericin B, FCY-Flucitozin, ECN-Ekonazol, KCA-Ketokonazol, CLO-Klotrimazol, MIC-Mikonazol, ITR -Itrakonazol, VOR-Vorikonazol, FLU-Flukonazol

I među produktorima biofilma su sojevi *C. albicans* bili najsenzitivniji pri čemu su od njih statistički značajno slabije osetljivi bili NAC produktori i to prema AMB ($p < 0,001$), CLO ($p = 0,002$) i MIC ($p = 0,043$) i produktori biofilma vrste *S. cerevisiae* na CLO ($p = 0,002$) i ITR ($p < 0,001$). Između sojeva NAC vrsta i *S. cerevisiae* sa sposobnošću produkcije biofilma utvrđena je statistički značajna razlika u osetljivosti prema ITR ($p = 0,011$).

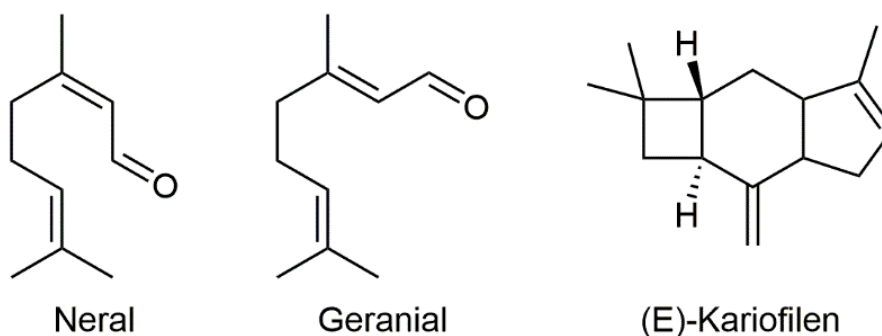
4.6. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA

Primenom GC/MS analize sastava komercijalno dostupnog EUMO je identifikovano ukupno 39 sastojaka koji su činili 99,8% ukupnih površina pikova u GC hromatogramu (Grafikon 11). Terpenoidi su imali najveći udeo među komponentama etarskog ulja, sa oksigenovanim monoterpenima kao najzastupljenijom klasom (61,4%).



Grafikon 11. Ukupni jonski hromatogram (TIC) uzorka etarskog ulja biljne vrste *Melissa officinalis*

Uz oksigenovane monoterpene, etarsko ulje je sadržalo sastojke iz klase seskviterpenskih ugljovodonika (29,9%), oksigenovanih seskviterpena (4,0%) i monoterpenskih ugljovodonika (2,3%). Glavni sastojci ulja su bili geranial (31,0%), neral (19,7%), (E)-kariofilen (19,4%), čije su strukture prikazane na slici 22.



Slika 22. Glavni identifikovani sastojci etarskog ulja

Pored pomenutih glavnih sastojaka, u relativnom procentu većem od 1% su bili identifikovani i germakren D (5,3%), citronelal (4,6%), kariofilen-oksidi (3,5%), 6-metil-5-hepten-2-on (2,2%), geranil-acetat (2,0%), α -humulen (1,4%), linalol (1,3%), δ -kadinen (1,3%), α -kopaen (1,2%), (E)- β -ocimen (1,2%) i metil-citronelat (1,1%). Hemijski sastav EUMO je prikazan na tabeli 7.

Tabela 7. Hemijski sastav etarskog ulja biljne vrste *Melissa officinalis*

No ^a	RI ^b	RI ^c	Sastojak	[%] ^d	ID ^e
1	926	924	α -Tujen	tr	RI, MS
2	934	932	α -Pinen	0,2	RI, MS, Co-I
3	974	969	Sabinen	tr	RI, MS
4	979	974	β -Pinen	tr	RI, MS, Co-I
5	989	981	6-Metil-5-hepten-2-on	2,2	RI, MS
6	993	988	Mircen	tr	RI, MS
7	1008	1001	(3E)-Heks-3-en-1-il-acetat	tr	RI, MS
8	1028	1020	<i>p</i> -Cimen	tr	RI, MS
9	1028	1024	Limonen	0,9	RI, MS, Co-I
10	1033	1026	1,8-Sineol	tr	RI, MS, Co-I
11	1039	1032	(Z)- β -Ocimen	tr	RI, MS
12	1049	1044	(E)- β -Ocimen	1,2	RI, MS
13	1061	1054	γ -Terpinen	tr	RI, MS, Co-I
14	1105	1095	Linalol	1,3	RI, MS, Co-I
15	1114	1106	<i>cis</i> -Ruža-oksid	tr	RI, MS
16	1156	1148	Citronelal	4,6	RI, MS
17	1165	1158	<i>trans</i> -Pinokamfon	tr	RI, MS
18	1179	1172	<i>cis</i> - Pinokamfon	0,6	RI, MS
19	1186	1177	(E)-Izocitral	0,4	RI, MS
20	1245	1235	Neral	19,7	RI, MS, Co-I
21	1263	1257	Metil-citronelat	1,1	RI, MS
22	1274	1264	Geranial	31,0	RI, MS, Co-I
23	1327	1322	Metil-geranat	0,7	RI, MS
24	1367	1359	Neril-acetat	tr	RI, MS
25	1378	1374	α -Kopaen	1,2	RI, MS
26	1386	1379	Geranil-acetat	2,0	RI, MS
27	1392	1387	β -Kubeben	tr	RI, MS
28	1409	1408	(Z)-Kariofilen	tr	RI, MS
29	1425	1417	(E)-Kariofilen	19,4	RI, MS
30	1458	1452	α -Humulen	1,4	RI, MS
31	1481	1478	γ -Murolen	tr	RI, MS
32	1486	1487	Germakren D	5,3	RI, MS
33	1497	1500	Biciklogermakren	0,6	RI, MS
34	1504	1500	α -Murolen	tr	RI, MS
35	1510	1505	(E,E)- α -Farnezen	0,4	RI, MS
36	1519	1513	γ -Kadinen	0,3	RI, MS
37	1527	1522	δ -Kadinen	1,3	RI, MS
38	1590	1582	Kariofilen-oksid	3,5	RI, MS
39	1662	1652	α -Kadinol	0,5	RI, MS
			Ukupno identifikovano	99,8	
			Monoterpenoidi (ugljovodonici): 1-4, 6, 8, 9, 11-13	2,3	
			Monoterpenoidi (oksigenovani): 10, 14-24, 26	61,4	
			Seskviterpenoidi (ugljovodonici): 25, 27-37	29,9	
			Seskviterpenoidi (oksigenovani): 38, 39	4,0	
			Ostali: 5, 7	2,2	

^a Redni broj sastojaka po redosledu eluiranja sa GC kolone; ^b RI = eksperimentalno određeni retencioni indeksi na HP-5MS koloni koinjekcijom homologe serije n-alkana; ^c RI = odgovarajući literaturni retencioni indeksi (Adams, 2007); ^d tr = trag (< 0.05%); ^e ID = Identifikacija; MS = identitet jedinjenja je potvrđen poređenjem njihovih masenih spektara sa spektrima iz Wiley 6, Nist 02, MassFinder 2.3, RI = identitet jedinjenja je potvrđen poređenjem izračunatih retencionih indeksa sa literaturnim vrednostima (Adams, 2007), Co-I = identitet jedinjenja je potvrđen koinjekcijom etarskog ulja sa odgovarajućim standardom

4.7. ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI ODABRANIH IZOLATA PREMA ANTIMIKOTICIMA I ETARSKOM ULJU *MELISSA OFFICINALIS* PRIMENOM BUJON MIKRODILUCIONE METODE

Pored komercijalnog ISYP testa, osetljivost sojeva je ispitana i primenom bujon mikrodilucione metode. Ovo ispitivanje je urađeno na planktonskim ćelijama 60 izolata, koji su odabrani na osnovu sposobnosti produkcije biofilma (prethodno utvrđenih metodom po Stepanoviću) kao i najviših stopa rezistencije (utvrđenih ISYP testom). Osetljivost odabranih sojeva (19 *C. albicans*, 35 sojeva NAC vrsta - 19 *C. krusei*, 15 *C. glabrata* i jedan *C. kefir*, kao i šest sojeva *S. cerevisiae*) sumirana je u tabeli 8.

Tabela 8. Rezultati osetljivosti odabranih izolata primenom mikrodilucione antimikogram metode

br	Vrsta kvasnica	Kategorizacija produkcije biofilma	NY MIK (µg/ml)	CLO MIK (µg/ml)	FLU MIK (µg/ml)	FEN MIK (µg/ml)	EUMO MIK (mg/ml)
1	<i>C. albicans</i>	JPBF	4	0,063	>64*	>64	1,25
2	<i>C. albicans</i>	JPBF	8	0,5	>64	>64	0,63
3	<i>C. albicans</i>	JPBF	8	0,25	>64	>64	0,63
4	<i>C. albicans</i>	JPBF	8	0,5	>64	>64	0,63
5	<i>C. albicans</i>	JPBF	8	0,5	64	64	0,63
6	<i>C. albicans</i>	JPBF	8	0,5	>64	64	0,31
7	<i>C. albicans</i>	JPBF	8	0,5	>64*	>64	0,16
8	<i>C. albicans</i>	JPBF	4	0,5	>64	>64	0,31
9	<i>C. albicans</i>	UPBF	8	0,5	>64	64	0,63
10	<i>C. albicans</i>	UPBF	8	1	>64	>64	0,16
11	<i>C. albicans</i>	UPBF	8	0,5	>64	>64	0,16
12	<i>C. albicans</i>	UPBF	8	0,5	>64	>64	0,31
13	<i>C. albicans</i>	UPBF	8	1	64	64	0,63
14	<i>C. albicans</i>	SPBF	8	0,25	>64	>64	0,63
15	<i>C. albicans</i>	SPBF	8	0,5	32	64	0,31
16	<i>C. albicans</i>	SPBF	2	0,5	>64	>64	0,16
17	<i>C. albicans</i>	SPBF	4	1	>64	>64	0,31
18	<i>C. albicans</i>	SPBF	4	1	>64	>64	0,63
19	<i>C. albicans</i>	SPBF	16	1	64	64	0,63

Tabela 8. Rezultati osetljivosti odabranih izolata primenom mikrodilucione antimikogram metode (nastavak)

20	<i>C. glabrata</i>	JPBF	4	0,063	4	0,5	1,25
21	<i>C. glabrata</i>	JPBF	8	0,25	4	1	1,25
22	<i>C. glabrata</i>	UPBF	8	8	64	64	1,25
23	<i>C. glabrata</i>	UPBF	8	8	64	64	1,25
24	<i>C. glabrata</i>	UPBF	4	2	8	2	1,25
25	<i>C. glabrata</i>	UPBF	4	2	32	2	1,25
26	<i>C. glabrata</i>	UPBF	8	1	16	16	1,25
27	<i>C. glabrata</i>	UPBF	4	0,125	16	1	1,25
28	<i>C. glabrata</i>	UPBF	4	0,125	4	1	1,25
29	<i>C. glabrata</i>	UPBF	8	0,125	2	1	2,5
30	<i>C. glabrata</i>	SPBF	4	1	16	2	1,25
31	<i>C. glabrata</i>	SPBF	4	0,125	32	1	1,25
32	<i>C. glabrata</i>	SPBF	4	2	64	8	1,25
33	<i>C. glabrata</i>	SPBF	8	0,5	8	2	1,25
34	<i>C. glabrata</i>	SPBF	8	0,25	8	1	0,63
35	<i>C. kefyr</i>	UPBF	2	0,063	>64	>64	0,31
36	<i>C. krusei</i>	SPBF	8	0,25	32	2	0,63
37	<i>C. krusei</i>	SPBF	8	0,25	64	64	0,31
38	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	64	0,63
39	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	16	0,63
40	<i>C. krusei</i>	NPBF	4	0,25	>64	>64	0,63
41	<i>C. krusei</i>	NPBF	4	0,125	64	64	0,31
42	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,125	64	64	0,31
43	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	64	0,63
44	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	64	0,31
45	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	32	0,63
46	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,5	>64	2	0,31
47	<i>C. krusei</i>	NPBF	16	0,5	64	32	0,31
48	<i>C. krusei</i>	NPBF	16	0,5	>64	64	0,63
49	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	2	0,31
50	<i>C. krusei</i>	NPBF	16	0,25	64	64	0,31
51	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	32	0,63
52	<i>C. krusei</i>	NPBF	4	0,125	64	4	0,31
53	<i>C. krusei</i>	NPBF	4	0,25	64	64	0,63
54	<i>C. krusei</i>	NPBF	8	0,25	64	64	0,63
55	<i>S. cerevisiae</i>	UPBF	4	0,125	2	0,5	0,16
56	<i>S. cerevisiae</i>	UPBF	4	0,125	4	1	0,16
57	<i>S. cerevisiae</i>	UPBF	4	0,25	8	1	0,16
58	<i>S. cerevisiae</i>	UPBF	8	0,125	2	1	0,31
59	<i>S. cerevisiae</i>	SPBF	8	0,125	4	1	0,16
60	<i>S. cerevisiae</i>	SPBF	4	0,5	8	1	0,31

*za sojeve je naknadno rađena mikrodilucinona metoda sa većim početnim koncentracijama FLU nakon čega je utvrđeno da su vrednosti MIK = 128 µg/ml. NY-Nistatin, CLO-Klotrimazol, FLU-Flukonazol, FEN-Fentikonazol. EUMO-etarsko ulje biljke *Melissa officinalis*, JPBF-jaki produktori biofilma, UPBF-umereni produktori biofilma, SPBF-slabi produktori biofilma, NPBF-neprodukujući sojevi

Prema klasifikaciji antimikrobne osetljivosti CLSI dokumenta M27-A3, koja se uglavnom koristi kako za sistemske infekcije tako i za infekcije sluzokoža [188], izolati vrsta roda *Candida* svrstavaju se u osetljive na FLU ukoliko je vrednost MIK ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$, u kategoriju DZO sa MIK vrednostima od 16-32 $\mu\text{g/ml}$, i rezistentne ukoliko ove vrednosti iznose ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$. Prema ovim kriterijumima, rezultati našeg istraživanja su pokazali da je 18/19 (94,73%) sojeva *C. albicans* i 22/35 (62,86%) sojeva NAC vrsta bilo otporno na FLU, dok su svi izolati *S. cerevisiae* bili osetljivi na ovaj antimikotik. Među izolatima NAC vrsta, 94,73% sojeva *C. krusei*, kao i jedini ispitivani soj *C. kefyr* su bili otporni na FLU, dok je skoro polovina sojeva *C. glabrata* (7/15; 46,67%) bila osetljiva na ovaj antimikotik.

S obzirom na to da ne postoje zvanične smernice za granične vrednosti MIK za CLO, u našem istraživanju su usvojeni kriterijumi koje su predložili Richter i saradnici [144], a prema kojima su sojevi sa MIK >1 $\mu\text{g/ml}$ za CLO kategorisani kao rezistentni. Analizirajući efikasnost ovog antimikotika uočeno je da su svi testirani sojevi *C. albicans* i *S. cerevisiae* bili osetljivi na CLO, dok je među NAC vrstama niža osetljivost dokazana kod 5/35 (14,29%) ovih sojeva, pri čemu su svi rezistentni sojevi pripadali vrsti *C. glabrata*.

Iako CLSI i EUCAST smernice ne sadrže definisane granične vrednosti MIK za NY, neki autori su predložili da se vulvovaginalni izolati kvasnica mogu smatrati osetljivim ukoliko su minimalne koncentracije lokalno aplikovanog NY koje inhibiraju njihov rast ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ [144, 190]. Shodno tome, svi odabrani sojevi u ovoj studiji bili su otporni na ovaj antigljivični agens.

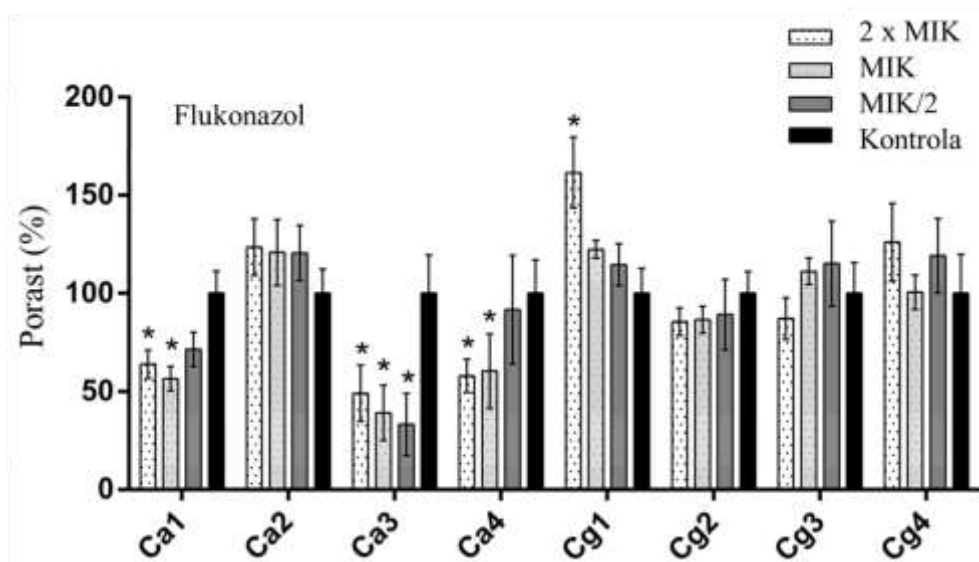
Fentikonazol predstavlja antimikotik iz grupe imidazola za koji ne postoje granične vrednosti, kako u zvaničnim smernicama tako ni u naučnim publikacijama. Na osnovu utvrđenih MIK, sojevi *C. albicans* su se pokazali kao najrezistentniji na ovaj antigljivični lek jer su ove koncentracije za sve sojeve iznosile ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$. Vrednosti MIK ovog antimikotika su u slučaju NAC vrsta bile varijabilne i kretale su se između 0,5- >64 $\mu\text{g/ml}$, dok su kod svih ispitivanih izolata *S. cerevisiae*, koji su se pokazali kao najsenzitivniji na FEN, ove vrednosti iznosile ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$. Minimalna koncentracija koja je inhibirala porast jedinog soja *C. kefyr* je bila >64 $\mu\text{g/ml}$, dok je vrednost MIK za 11 (57,89%) sojeva *C. krusei* iznosila ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, a za preostalih 8 (42,11%) između 2 i 32 $\mu\text{g/ml}$. Sa druge strane, za čak 11 (73,33%) sojeva vrste *C. glabrata* MIK za FEN su bile ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$,

Kada je u pitanju EUMO, MIK ovog etarskog ulja za sve ispitivane sojeve su iznosile između 0,16 mg/ml i 2,5 mg/ml, pri čemu su ove vrednosti za sojeve *C. albicans* bile 0,16-1,25 mg/ml, za izolate NAC vrsta 0,31-2,5 mg/ml, dok su najniže bile za sojeve *S. cerevisiae* i kretale su se između 0,16-0,31 mg/ml. Kao najotporniji su se pokazali sojevi vrste *C. glabrata* sa MIK vrednošću EUMO za najotporniji soj od 2,5 mg/ml, zatim od 1,25 mg/ml za 13

(86,67%) izolata, dok je za najsenzitivniji soj iznosila 0,63 mg/ml. Minimalna inhibitorna koncentracija ispitivanog etarskog ulja za samo jedan soj *C. albicans* je iznosila 1,25 mg/ml, dok su koncentracije EUMO koje su inhibirale rast većine sojeva ove vrste (9; 47,37%), bile 0,63 mg/ml i niže za preostale sojeve. Koncentracija koja je inhibirala rast soja *C. kefyri* iznosila je 0,31 mg/ml. U slučaju *C. krusei*, minimalne koncentracije EUMO za inhibiciju rasta sojeva ove vrste iznosile su 0,63 mg/ml za 10 (52,63%) i 0,31 mg/ml za 9 (47,37%) ispitivanih izolata. Vrednost MIK EUMO za dva soja *S. cerevisiae* je iznosila 0,31 mg/ml, a za preostala četiri 0,16 mg/ml.

4.8. ISPITIVANJE EFEKTA NISTATINA, FLUKONAZOLA I ETARSKOG ULJA BILJKE *MELISSA OFFICINALIS* NA FORMIRANI BIOFILM

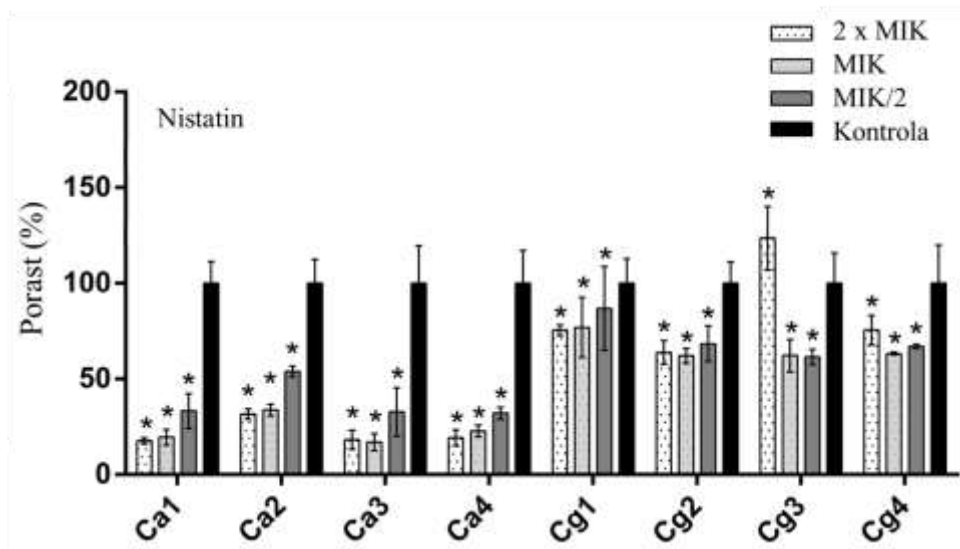
Antibiofilm efekti NY, FLU i EUMO su testirani na po četiri soja vrsta *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, koji su redom odgovarali brojevima 1, 5, 7 i 13 u tabeli 8) i *C. glabrata* (Cg1, Cg2, Cg3, Cg4, koji su redom odgovarali brojevima 22, 23, 25 i 26 u tabeli 8). Utvrđeno je da je FLU imao veoma slab efekat na redukciju zrelog biofilma ispitivanih sojeva, pri čemu je kod mnogih, suprotno očekivanom, nakon tretiranja ovim agensom zabeležena povećana produkcija biofilma (Grafikon 12).



Grafikon 12. Antibiofilm efekat flukonazola na odabrane sojeve vrsta *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4) i *C. glabrata* (Cg1, Cg2, Cg3, Cg4); MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; *statistička značajnost $p < 0,05$

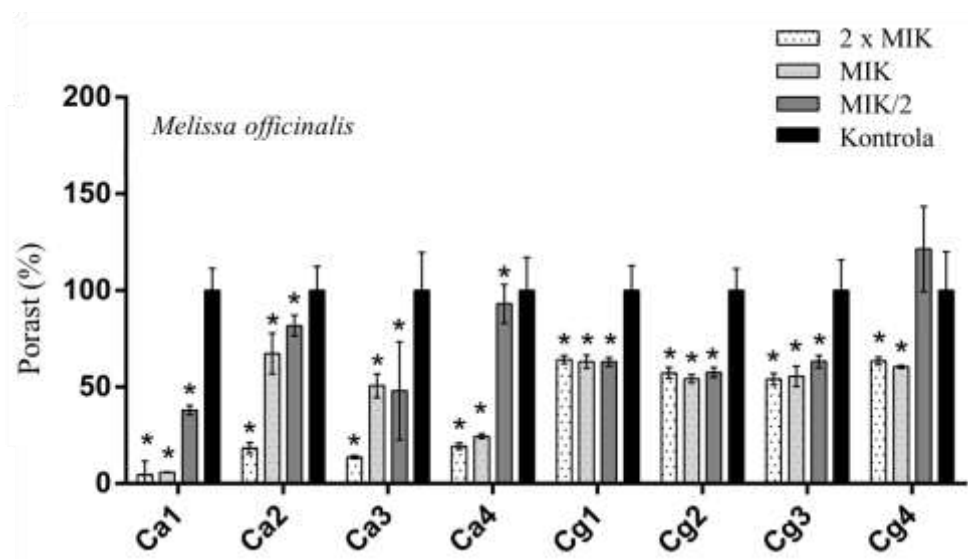
Na osnovu dobijenih rezultata se ne može uočiti pravilnost u dejstvu FLU na zreo biofilm u odnosu na njegovu koncentraciju, a efekat različitih koncentracija se razlikovao među sojevima. Najizraženiji efekat ovog antimikotika zabeležen je kod sojeva Ca3 i Ca1, dok je najslabiji efekat zabeležen kod sojeva Ca2 i Cg1, pri čemu je masa zrelog biofilma soja Cg1 pri duplo većim koncentracijama od MIK FLU za planktonske ćelije bila čak za 48,8% veća od odgovarajuće kontrole. Iako efikasan u slučajevima dva navedena soja (smanjenjem mase zrelog biofilma do 43,39% za soj Ca1 i 66,76% za soj Ca3), pravilnost zavisnosti dejstva FLU na zreo biofilm u odnosu na njegovu koncentraciju je zabeležena samo kod soja Ca3.

Posmatrajući efekat NY uočeno je da je, u odnosu na FLU, ovaj antimikotik mnogo efikasnije delovao na redukciju zrelog biofilma, do čak 82,97% u slučaju soja Ca3. Nistatin je, pored navedenog, slično dejstvo imao na biofilmove sojeva Ca1 i Ca4. Sa druge strane, najveća tolerancija prema ovom antimikotiku je zabeležena kod sojeva Cg1, Cg2 i Cg3. Uz to je u slučaju soja Cg3 uočena i promocija rasta biofilma, gde je u prisustvu najveće testirane koncentracije ($2 \times$ MIK) masa zrelog biofilma bila uvećana za 20,21% u odnosu na kontrolu. Međutim, treba naglasiti da su dve niže koncentracije efektivno redukovale masu biofilma i to MIK za 39,46% a MIK/2 za 40,19%. Pravilnost zavisnosti dejstva NY na zreo biofilm u odnosu na njegovu koncentraciju uočena je samo kod sojeva *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3 i Ca4), dok ova pravilnost nije postojala u slučaju NAC sojeva (Grafikon 13).



Grafikon 13. Antibiofilm efekat nistatina na odabrane sojeve vrsta *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4) i *C. glabrata* (Cg1, Cg2, Cg3, Cg4); MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; *statistička značajnost $p < 0,05$

Etarsko ulje biljke *Melissa officinalis* je pokazalo značajnu redukciju zrelog biofilma i to u rasponu od 18,24-95,36%, uz najizraženije dejstvo na soj Ca1. Veća apsorbancija (koja je proporcionalna masi zrelog biofilma) u odnosu na kontrolu je izmjerena samo kod soja Cg4. Ovo povećanje je iznosilo 18,76% i detektovano je u slučaju dejstva koncentracije MIK/2 EUMO na već formirani biofilm. Pravilnost zavisnosti dejstva EUMO na zrelo biofilm u odnosu na njegovu koncentraciju uočena je kod sojeva Cg3, Ca2 i Ca4 (Grafikon 14).

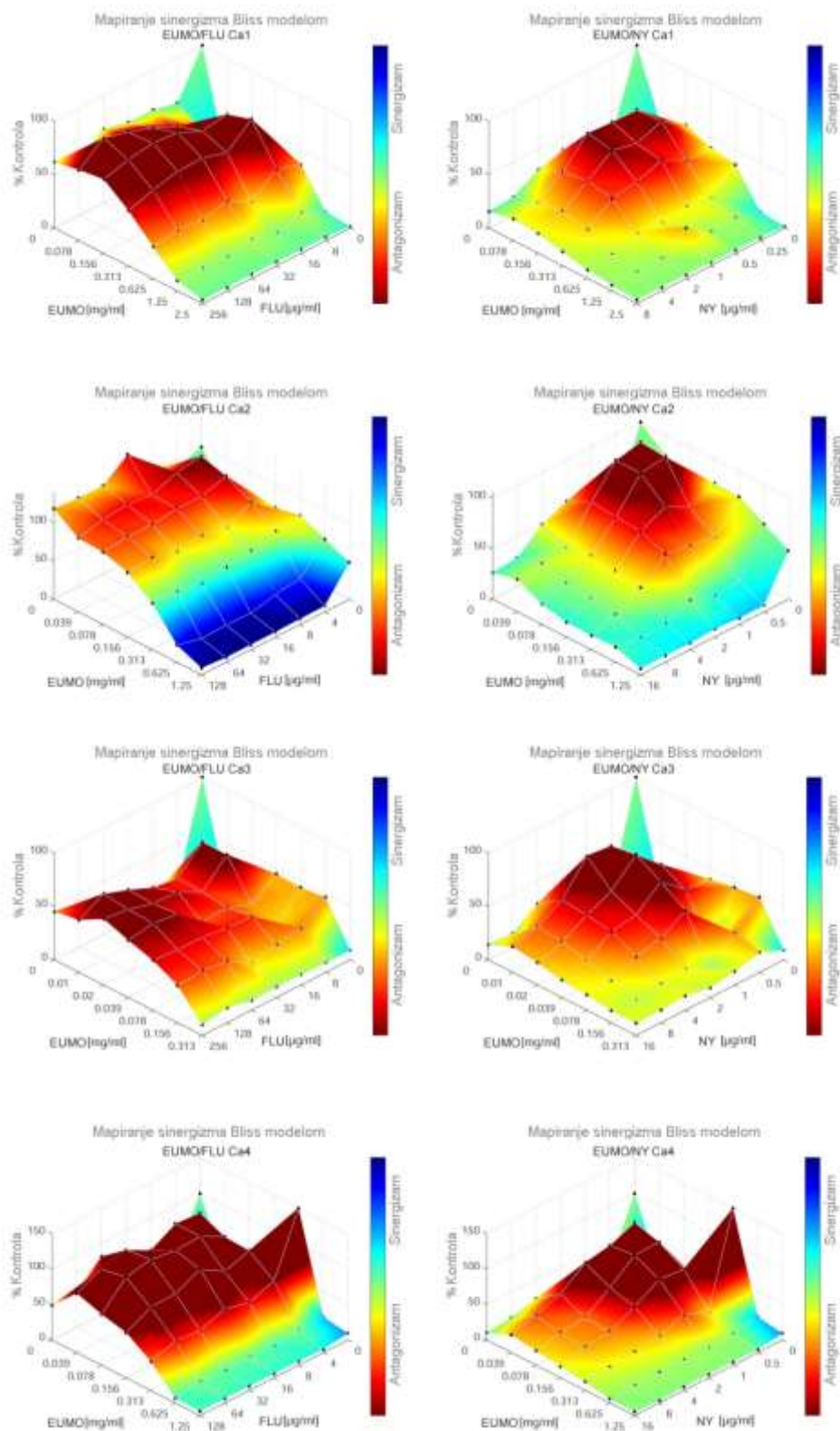


Grafikon 14. Antibiofilm efekat etarskog ulja *Melissa officinalis* na odabrane sojeve vrsta *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4) i *C. glabrata* (Cg1, Cg2, Cg3, Cg4); MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; *statistička značajnost $p < 0,05$

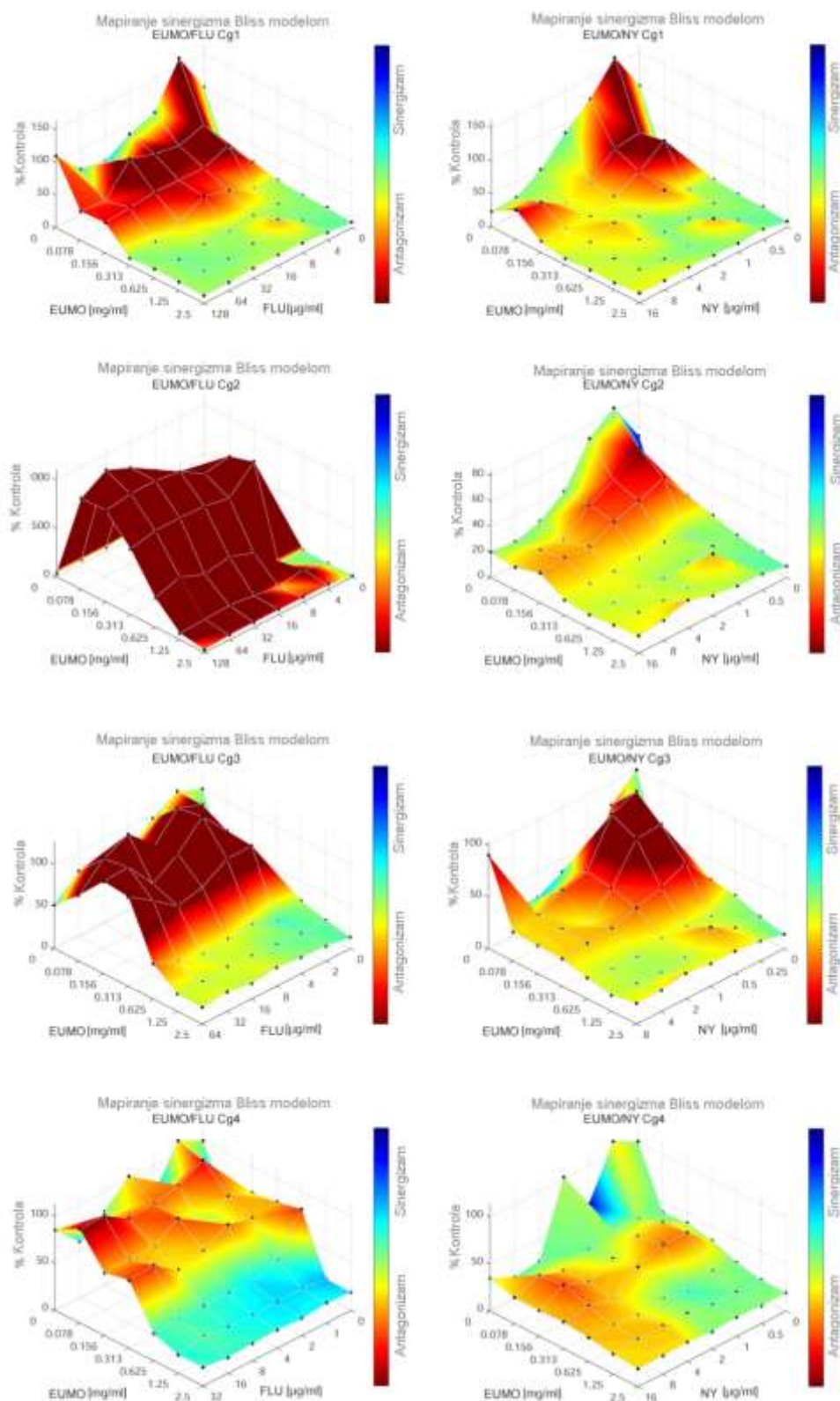
4.9. TIPOVI INTERAKCIJA ETARSKOG ULJA *MELISSA OFFICINALIS* U KOMBINACIJI SA FLUKONAZOLOM I NISTATINOM NA FORMIRANI BIOFILM

S obzirom na ustanovljen efekat EUMO na zreo biofilm, u cilju istraživanja potencijalnog korišćenja navedenog etarskog ulja kao podrške antigljivičnoj terapiji, ponaosob su ispitivani kombinovani efekti EUMO sa FLU i NY na biofilmove sojeva *C. albicans* (Grafikon 15) i *C. glabrata* (Grafikon 16). Rezultati Bliss analize su pokazali da je pri dejstvu kombinacije EUMO i FLU sinergistički efekat ovih supstanci uočen kod 3/8 (37,5%), dok je sinergistički efekat u slučaju kombinacije EUMO i NY zabeležen kod 2/8 (25%) sojeva. Na formirane biofilmove izložene kombinovanom dejstvu EUMO i FLU utvrđeni su sinergistički efekti pri koncentracijama EUMO od $2 \times \text{MIK}$, MIK i MIK/2 kao i pri svim testiranim koncentracijama FLU kod sojeva Ca2 i Cg4. Sa druge strane, u slučaju soja Cg3, sinergizam je bio prisutan samo pri kombinacijama koncentracija od $2 \times \text{MIK}$ i MIK za EUMO i najniže testirane koncentracije FLU. Razmatrajući kombinaciju NY sa EUMO, rezultati su ukazali na sinergizam ovih supstanci samo kod dva soja (Ca2 i Cg4), pri čemu je ova vrsta interakcije uočena za kombinacije agenasa u koncentracijama $2 \times \text{MIK}$ i MIK za NY pri svim koncentracijama EUMO u slučaju soja Ca2, kao i MIK/4 i nižih koncentracija za NY u kombinaciji sa skoro svim koncentracijama EUMO u slučaju soja Cg4.

Pored sinergizma, u nekim slučajevima je ustanovljen i antagonistički efekat ispitivanih supstanci koji je bio izraženiji pri kombinovanom dejstvu EUMO i FLU, mada takođe nezanemarljiv i kod druge ispitivane kombinacije. Čak i kod sojeva gde je zabeležena sinergistička interakcija, ispitivani agensi su u pojedinim koncentracijama imali suprotan efekat. Najizraženiji antagonizam je ustanovljen kod sojeva Ca1, Ca4, Cg2 i Cg3. Kod svih navedenih sojeva osim Cg2, ovaj efekat je bio prisutan pri dejstvu EUMO u koncentracijama MIK/2 i nižim u kombinaciji sa svim testiranim koncentracijama FLU. U slučaju soja Cg2, antagonizam je bio značajno uočljiv s obzirom na to da je detektovan pri svim kombinacijama FLU i EUMO. Kombinovana primena NY i EUMO je kod većine sojeva (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, Cg1 i Cg3) takođe imala antagonistički efekat ispoljen pri dejstvu nižih koncentracija oba agenasa i to MIK/2 i nižim za EUMO i MIK/4 i nižim za NY.



Grafikon 15. Tipovi interakcije etarskog ulja biljke *Melissa officinalis* (EUMO) u kombinaciji sa flukonazolom (FLU) i nistatinom (NY) na formirane biofilmove sojeva *C. albicans* (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4)



Grafikon 16. Tipovi interakcije etarskog ulja biljke *Melissa officinalis* (EUMO) u kombinaciji sa flukonazolom (FLU) i nistatinom (NY) na formirane biofilmove sojeva *C. glabrata* (Cg1, Cg2, Cg3, Cg4)

5 DISKUSIJA

5.1. UZROČNICI GENITALNE GLJIVIČNE INFEKCIJE ŽENA

Vulvovaginalna kandidoza predstavlja jednu od najčešćih infekcija sluzokože reproduktivnog trakta žena. Iako se VVK uglavnom manifestuje u vidu akutnih sporadičnih epizoda, kod 8-10% žena se ova infekcija može ponoviti najmanje 3-4 puta godišnje kada se definiše kao RVVK. Već je dugo poznata činjenica da je dominantni uzročnik genitalnih gljivičnih infekcija vrsta *C. albicans*, ali se sve češće kao uzročnici ovih infekcija beleže i NAC vrste, posebno kod težih, rekurentnih formi [191]. Na značaj zastupljenosti NAC sojeva kao uzročnika hroničnog oblika VVK ukazuju i rezultati jedne američke studije gde je istaknuto da je udeo ovih vrsta kao izazivača VVK dostigao čak 50% [192].

U mnogim studijama je kao najučestaliji uzročnik VVK među NAC vrstama utvrđena *C. glabrata*, za kojom su ređe ili češće bili zastupljeni sojevi *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* i *C. guilliermondii*, dok su druge vrste identifikovane u veoma malom procentu [144, 193-195]. U studiji sprovedenoj na našem području od strane Ignjatović i saradnika ustanovljeno je da je prevalencija RVVK izazvane NAC vrstama od utvrđenih 5% krajem prošlog veka sada signifikantno povišena na čak 26%. U ovoj studiji je kao najprevalentniji uzročnik RVVK utvrđena vrsta *C. albicans* sa udelom od 74%, za kojom su sledile vrste *C. glabrata* (14%) i *C. krusei* (6%) [3].

Usled ranije dominacije *C. albicans* kao uzročnika VVK, kao i činjenice da su simptomi vaginitisa izazvanog NAC vrstama često blažeg inteziteta u odnosu na simptome izazvane *C. albicans*, dugo se verovalo da ovi sojevi nemaju sposobnost izazivanja infekcija distalnih delova reproduktivnog trakta žena [196]. Međutim, današnja iskustva su drugačija jer se smatra da je preterana upotreba empirijski propisivanih derivata azola dovela do selekcije sojeva rezistentnih na ove antimikotike, što može dodatno komplikovati tretman VVK izazvane NAC vrstama [19, 197-199]. Zbog toga je za izlječenje ove infekcije često potrebno prolongirano ordiniranje antigljivične terapije, uz primenu alternativnih tretmana poput vaginalnih supozitorija sa bornom kiselinom [200, 201]. S obzirom na nižu terapijsku efikasnost antigljivičnih lekova, nije neočekivano da nedavna istraživanja ukazuju na povećanu stopu incidencije VVK, kao i RVVK izazvanih NAC vrstama [202, 203]. Međutim, ova zapažanja treba razmatrati sa oprezom, jer simptomi VVK mogu biti slični simptomima drugih infekcija distalnog reproduktivnog trakta, a pored toga je i razlikovanje kolonizacije od infekcije nekada veoma teško. Nedavna istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da zbog nedostataka odgovarajućih faktora virulencije izolati NAC vrsta nisu u stanju da izazovu zapaljenje vaginalne sluzokože kao što je to slučaj sa sojevima *C. albicans* [204, 205]. Međutim, treba naglasiti da je vaginalna infekcija navedenih životinjskih modela prouzrokovana veštački izazvanim hormonskim stimulansima tako da na osnovu ovih istraživanja nije moguće utvrditi tačnu ulogu NAC vrsta u patogenezi vaginalnih infekcija. Takođe, ovi rezultati nisu u skladu sa iskustvom iz prakse jer se beleži veoma velika učestalost vaginitisa izazvanih NAC sojevima, posebno vrstom *C. glabrata* [192]. Sve navedeno ide u prilog tome da postoji značajna heterogenost, kako u faktorima virulencije i metaboličkim putevima među različitim kliničkim izolatima, tako i u osetljivosti sluzokože na kvasnice, što bi moglo doprineti pojašnjenju povezanosti NAC izolata sa razvojem VVK.

U literaturi postoje dokazi da je, pored vrsta roda *Candida*, i kvasnica *S. cerevisiae* takođe potencijalni uzročnik vulvovaginalnih infekcija, mada stavovi po ovom pitanju još uvek nisu usaglašeni. Naime, već je utvrđeno da su kvasnice deo normalne flore vagine mnogih žena kada nisu prisutne u velikom broju, a ustanovljeno je i da se one često nalaze i u njihovom digestivnom traktu [206]. S obzirom na to da je *S. cerevisiae*, tačnije njegova podvrsta *S. boulardii*, sastavni deo mnogih probiotika, prisustvo ove kvasnice u vaginalnoj flori moglo bi se objasniti i na ovaj način. U studiji iz 2020. godine sprovedenoj u Francuskoj prvi put je primenom molekularnih metoda u vaginalnim uzorcima dokazano prisustvo sojeva *Saccharomyces* spp. iz probiotika nakon njegove oralne administracije [30]. U nekim studijama novijeg datuma navodi se da bi se probiotici na bazi ove kvasnice mogli uspešno koristiti i u

terapiji vaginalnih infekcija i to bakterijske vaginoze ili vaginalne kandidoze [207]. Utvrđeno je da *S. cerevisiae* sprečava prelazak *C. albicans* iz forme kvasnice u hifalnu formu, što je jedna od ključnih karika njene virulentnosti [94]. Za razliku od ovih stavova neki autori ipak smatraju da *S. cerevisiae* može biti odgovoran za razvoj genitalnih infekcija žena na isti način kao i gljive roda *Candida*, jer su i ove kvasnice deo mikrobiote na vaginalnoj mukozii. U studiji iz 2011. godine sprovedenoj u Grčkoj iz vaginalnih briseva 262 žene izolovano je 16 sojeva *S. cerevisiae*, pri čemu je utvrđeno da su svi bili rezistentni na FLU i ITR [208]. Uočeno je i da se infekcije izazvane ovom vrstom klinički ne razlikuju od VVK, kao i da je porast ove kvasnice na standardnim hranljivim podlogama veoma sličan porastu gljiva roda *Candida*, što dodatno može otežati etiološku dijagnozu i sprovođenje adekvatnog tretmana [209].

Upravo zbog različitog trenda rezistencije različitih vrsta kvasnica, diferencijacija ovih mikroorganizama je veoma važna. Ovoj temi je danas posvećena velika pažnja jer konvencionalne metode identifikacije gljiva zasnovane na ispitivanju morfoloških i fenotipskih karakteristika odavno više nisu dovoljne da obuhvate sve, danas već poznate, mikroorganizme sposobne da izazovu infekcije, posebno kod imunokompromitovanih domaćina. Nedavno usvajanje identifikacije gljiva na osnovu molekularnih istraživanja dovelo je do opsežnih promena u njihovoj nomenklaturi i taksonomiji. Nakon vršenja genotipskih poređenja, baziranih na detaljnim filogenetskim analizama, mnoge vrste su detektovane kao nove, neke od njih su revidirane u smislu premeštanja u druge rodove, dok su u klasifikaciju uvedeni i novi rodovi [26].

U cilju izbegavanja stalnih i ponekad nepotrebnih revizija nomenklature, radne grupe i komiteti osnovani pod pokroviteljstvom Međunarodne komisije za taksonomiju gljiva (*International Commission on the Taxonomy of Fungi – ICTF*) i Odbora za nomenklaturu gljiva (*Nomenclature Committee for Fungi – NCF*) su predložili liste zadržanih (zaštićenih) i odbačenih naziva za ključne vrste/rodove, pri čemu su prihvaćene samo definitivne promene [26]. Trenutno ne postoji jedinstven izvor koji obuhvata sve nomenklaturne promene predložene za gljive od medicinskog značaja, s obzirom na to da su ove promene veoma dinamične i kontinuirano se objavljuju u relevantnim naučnim publikacijama. Ipak, Međunarodna organizacija za nomenklaturu algi, gljiva i biljaka (*International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants – ICN*) je dala smernice da sve prihvaćene korekcije budu registrovane u priznatim online bibliotekama među kojima se izdvajaju *Mycobank* (<http://www.mycobank.org/>) i *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org>).

Pomenute nove klasifikacije i taksonomija kvasnica značajno komplikuju razmatranje zastupljenosti pojedinih vrsta kvasnica u nastanku vaginalnih infekcija. Nakon sprovedenih revizija, važno je istaći da trenutna nomenklatura više ne svrstava neke vrlo značajne vrste u rod *Candida*, pa se tako *C. glabrata* u novije vreme pominje kao *Nakaseomyces glabrata*, a *C. krusei* kao *Pichia kudriavzevii* [26]. Neki autori smatraju da su ove dve vrste isključene iz roda *Candida* jer su, između ostalog, manje virulentne za zdrave, imunokompetentne žene [210]. Takođe, skreće se pažnja da je *C. glabrata* genetski srodnik roda *Saccharomyces* i da je generalno precenjena kao vaginalni patogen, jer je skoro uvek kolonizator, posebno kod žena u peri/postmenopauzi [133]. Pored ispitivanja patogenosti, istraživači smatraju da ova revidirana taksonomija bolje korelira i sa profilima otpornosti određenih patogena [211, 212]. Tako se, na primer, urođena rezistencija vrste *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) na FLU i FCY obično ne uočava kod patogenih vrsta roda *Candida*, ali je karakteristika svih vrsta koje pripadaju rodu *Pichia* [26, 212]. Zbog toga se veruje da je revidiranje ovih klasifikacija korisno i za kliničare u cilju sprovođenja adekvatnog tretmana. Pored navedenih, neke od značajnijih novoklasifikovanih vrsta identifikovanih i u ovom istraživanju su *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*), *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) i *C. norvengensis* (*Pichia norvengensis*).

Ipak, u medicinskoj mikologiji se smatra da bi nova nomenklatura dovela do velike zabune po pitanju interpretacije rezultata mikoloških analiza. Shodno tome, jedan od predloga je da se vrste još uvek označavaju po prethodnoj klasifikaciji tako da se u mnogim istraživanjima sve pomenute vrste i dalje navode kao predstavnici roda *Candida*, što se odnosi i na ovu studiju.

S obzirom na činjenicu da se još uvek razmatra virulentnost NAC vrsta, kao i kvasnica roda *Saccharomyces*, ova studija je obuhvatila ispitivanje 300 odabranih sojeva i to 150 vrste *C. albicans* i 150 sojeva ne-*albicans* kvasnica. U grupi NAC izolata najveći procenat (76%) su činile vrste *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) i *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), za kojima sledi *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*-16,9%), dok su vrste *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) i *C. norvengensis* (*Pichia norvengensis*) zastupljene u značajno manjem procentu. Za svih 26 sojeva ne-*Candida* kvasnica je utvrđeno da pripadaju samo jednoj vrsti – *S. cerevisiae*.

5.2. DIJAGNOSTIČKE METODE I KOMPARATIVNA ANALIZA KOMERCIJALNOG TESTA SA REFERENTNIM STANDARDOM

Dijagnostika VVK se u rutinskom radu uglavnom postavlja primenom konvencionalnih metoda koje podrazumevaju mikroskopsko ispitivanje i kultivaciju. Iako je test germinacije od pomoći pri diferenciranju *C. albicans* od NAC vrsta, a hromogeni medijum za identifikaciju tri različite vrste kvasnica ovog roda (*C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei*), ova testiranja ipak ne zadovoljavaju potrebe savremene dijagnostike jer ne omogućavaju identifikaciju velikog broja NAC vrsta, kao i ne-*Candida* vrsta poput *S. cerevisiae*. U te svrhe se danas koriste testovi kojima se ispituju biohemijske osobine kvasnica, masena spektrometrija ili molekularne metode. U našem istraživanju kvasnice su identifikovane primenom MALDI TOF masene spektrometrije, kao i komercijalnog ISYP testa. S obzirom na to da se MALDI TOF masena spektrometrija smatra referentnim standardom za identifikaciju kvasnica, rezultati dobijeni ISYP testom su validirani poređenjem sa ovom metodom. U slučaju identifikacije vrste *C. albicans* utvrđeno je potpuno slaganje navedenih metoda, dok su pri diferencijaciji NAC vrsta rezultati bili veoma varijabilni, od zabeleženog potpunog slaganja za vrste *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* i *C. parapsilosis*, do kompletnog odstupanja za vrste *C. tropicalis* i *C. zeynaloides*. Podudarnost za vrstu *C. glabrata* je iznosila 87,30%, dok se identifikacija za jedinu ne-*Candida* vrstu, *S. cerevisiae*, slagala u 86,70% slučajeva. Na osnovu izračunatih Kohen kappa vrednosti ustanovljeno je savršeno slaganje rezultata primenjenih testova za vrste *C. albicans* i *C. parapsilosis*, skoro savršeno slaganje za vrste *C. glabrata*, *C. krusei* i *S. cerevisiae*, i umereno slaganje za vrste *C. kefir* i *C. lusitaniae*.

Na osnovu ovih rezultata može se konstatovati da je identifikacija sojeva primenom ISYP testa bila veoma uspešna kada su u pitanju vrste koje su u istraživanju bile zastupljene u najvećem procentu. Ovo se pre svega odnosi na vrstu *C. albicans*, za kojom sledi *C. krusei*. Sa druge strane, najverovatnije zbog veoma male učestalosti, rezultati identifikacije vrsta *C. norvegensis* i *C. lusitaniae* nisu bili zadovoljavajući. Naime, *C. norvegensis* (*Pichia norvegensis*) nije deo palete za identifikaciju ISYP testa, tako da su sva tri soja identifikovana kao *C. zeynaloides*, a u slučaju *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) je utvrđeno slaganje za jedan soj, dok su preostala dva primenom ISYP testa identifikovana kao *C. tropicalis*. Takođe je zanimljivo da nijedan soj među 150 NAC izolata nije pripadao vrsti *C. tropicalis* koja je u drugim istraživanjima potvrđena kao uzročnik VVK [144, 192, 193, 213]. Izuzetak ove konstatacije je vrsta *C. parapsilosis* za koju je slaganje primenjenih metoda, bez obzira na

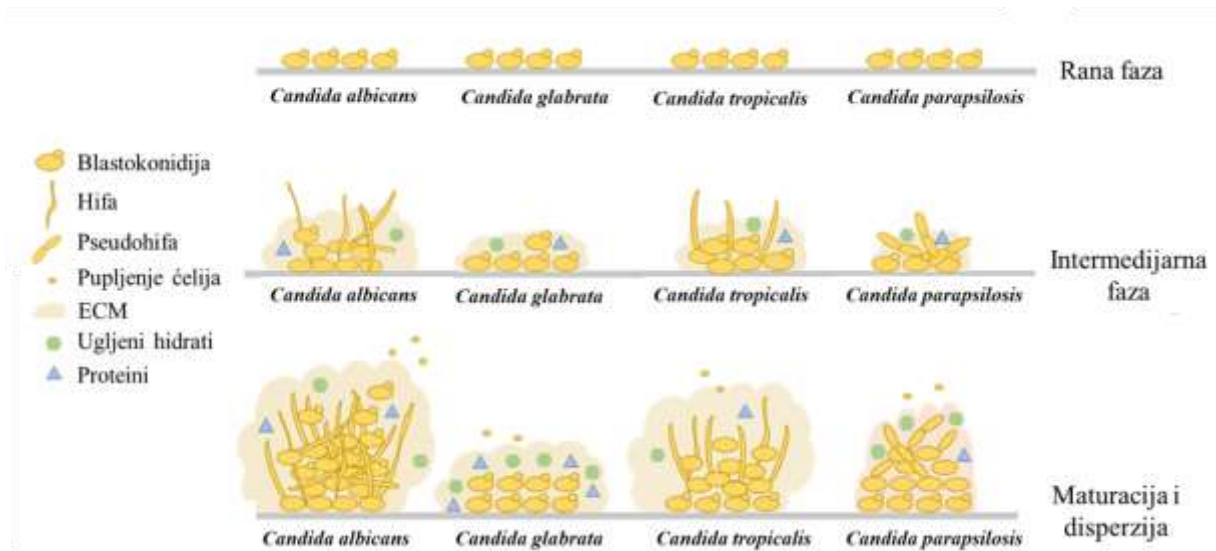
njenu malu učestalost, bilo idealno. Za četiri soja *S. cerevisiae* kod kojih je zabeleženo neslaganje primenom MALDI TOF masene spektrometrije je utvrđeno da pripadaju vrsti *C. kefyri*, mada ovi rezultati nisu bili iznenađujući s obzirom na to da navedene vrste imaju sličan biohemizam tako da ih je lako zameniti. Određeni broj neslaganja bio je prisutan i kod druge najzastupljenije vrste u ovom istraživanju, odnosno *C. glabrata*, kada su primenom ISYP testa identifikovani sojevi *C. kefyri* i *C. krusei*. Probleme sa identifikacijom vrste *C. glabrata* primenom ISYP testa imali su i poljski istraživači koji su, upoređujući rezultate ovog komercijalnog testa sa referentnom PCR metodom, zabeležili poklapanje u samo 18 od 65 slučajeva (27,7%). U ovoj studiji je kao glavni problem navedeno razlaganje ksiloze i dulcitolu zbog čega dobijeni kodovi nisu odgovarali nijednoj ponuđenoj kvasnici po uputstvu proizvođača [214]. U našem istraživanju je pri ispitivanju sličnog broja izolata (62/71 – 87,3%) procenat poklapanja bio znatno veći, dok je za razliku od navedene studije razlog neslaganja uglavnom bilo razlaganje maltoze. Još svega tri istraživanja su se bavila validacijom identifikacije ISYP testa, poredivši ga sa PCR metodama i API biohemijskim testovima. U svim ovim studijama je potvrđen relativno visok procenat poklapanja identifikacije za vrstu *C. albicans*, dok su rezultati diferencijacije NAC vrsta bili veoma nezadovoljavajući. U studiji koju su sprovedli Barati i saradnici poklapanje rezultata za NAC vrste je iznosilo svega 11,2%, pri čemu je kao glavni problem kod svih vrsta navedeno razlaganje dulcitolu čije bi zanemarivanje pri formiranju identifikacionog koda omogućilo značajno veću efikasnost ISYP testa [215]. Bicmen i saradnici su u svom istraživanju koje je obuhvatilo 116 izolata ustanovili slaganje za 54 (46,6%), ali kao što je već navedeno, uglavnom na račun vrste *C. albicans*, dok je ovo podudaranje registrovano kod samo 3/56 (5,4%) sojeva NAC vrsta [119]. U studiji koja se bavila identifikacijom 20 vaginalnih izolata kvasnica, slaganje ISYP testa sa PCR metodom je zabeleženo kod svih slučajeva *C. albicans* (7/7-100%), dok je podudaranje za NAC sojeve iznosilo 23,1% (3/13) [216]. Verovatno objašnjenje za značajno bolju efikasnost ISYP testa u našem istraživanju (po 86,7% uspešno identifikovanih NAC vrsta i *S. cerevisiae*) je da su u sklopu identifikacije, pored biohemizma razmatrani i porast na hromogenoj podlozi, test germinacije, kao i morfologija blastokonidija, što je uticalo na to da ova neslaganja u značajnoj meri budu redukovana. Činjenica da je identifikacija kvasnica veoma značajna radi sprovođenja adekvatnog tretmana, posebno zbog sve češće prisutne rezistencije prema široko primenjivanim antigljivičnim lekovima, ukazuje na potrebu uvođenja skrining testova u cilju brze diferencijacije ovih mikroorganizama. S obzirom na to da je utvrđeno zadovoljavajuće slaganje dva primenjena testa u ovom istraživanju, komercijalni ISYP test bi mogao biti korišćen u rutinskom radu kao jednostavnija i ekonomski isplativa metoda, ali samo uz

utvrđivanje morfoloških karakteristika, kao i uz ispitivanje testa filamentacije u slučaju vrste *C. albicans*.

5.3. PRODUKCIJA BIOFILMA KVASNICA UZROČNIKA VULVOVAGINALNE KANDIDOZE

Smatra se da je RVVK posledica uticaja mnogih faktora koji mogu poticati od domaćina (genetska predispozicija, imunski i hormonalni status, životne navike), neuravnoteženosti vaginalnog mikrobioma, kao i od povećane virulentnosti uzročnika [217]. Pretpostavlja se da je, pored adhezije i izbegavanja imunskog odgovora domaćina, sposobnost produkcije biofilma veoma važan faktor virulencije kvasnica, što je veoma značajno za patogenezu infekcija izazvanih ovim mikroorganizmima [176].

U literaturi se mogu naći različiti podaci koji se odnose na produkciju biofilma kvasnica. Primenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa ustanovljeno je da se strukturne varijacije ove ćelijske zajednice razlikuju među vrstama [218]. Šematski prikaz ovih razlika ilustrovan je na slici 23.



Slika 23. Šematski prikaz formiranja biofilma vrsta *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* [prikazane su različite komponente kao i kapaciteti za proizvodnju ekstracelularnog matriksa (ECM) i različite morfologije ćelija]

Na primer, *C. albicans* formira biofilm čiji se bazalni sloj sastoji od blastokonidija na koji se nadovezuju hifalne formacije koje čine gustu ćelijsku mrežu okruženu ekstracelularnim

matriksom. Suprotno, biofilm koji formira vrsta *C. glabrata* je značajno tanji i sastoji se od samo jednog ili par slojeva blastokonidija okruženih ECM koji sadrži velike količine ugljenih hidrata i proteina [53, 176, 219, 220]. Biofilm *C. tropicalis* se uglavnom sastoji od blastokonidija, iako je moguće prisustvo i filamentoznih formi okruženih ECM sa niskim sadržajem ugljenih hidrata i proteina [221]. Struktura biofilma *C. parapsilosis* može varirati u zavisnosti od soja, ali ga obično čine blastokonidije i pseudohife stvarajući kompaktne višeslojne ćelijske agregate. Pokazalo se da je produkcija ECM biofilma *C. parapsilosis* manja u odnosu na druge vrste i da se on sastoji od ugljenih hidrata sa niskim nivoom proteina [219, 222]. *Candida krusei* formira gust i kompleksan biofilm sačinjen od pseudohifalnih struktura u polimernom matriksu [218].

Pored razlike u odnosu na vrstu kvasnice koja ih produkuje, takođe je uočena i značajna razlika među biofilmovima u zavisnosti od mesta njihovog formiranja u organizmu. U studiji koje je sproveo Pannanusorn sa saradnicima ispitivani su izolati kvasnica iz krvi, pri čemu je ustanovljena manja učestalost izolata *C. albicans* sa sposobnošću produkcije biofilma u poređenju sa produktorima NAC vrsta [223]. Slični rezultati su dobijeni i u drugim studijama [224, 225], ali takođe i u istraživanjima koja su pored izolata iz krvi obuhvatila i sojeve dobijene iz drugih kliničkih uzoraka kao što su urin, sekreti iz respiratornog trakta ili peritonealni dijalizati. Pored navedenog, primećeno je i da su NAC sojevi sa sposobnošću produkcije biofilma značajno češće izolovani iz krvi u odnosu na druge uzorke. Takođe, među biofilm-pozitivnim izolatima, najveći broj NAC sojeva je spadao u grupu JPBF, pri čemu su sojevi *C. albicans* u ovom slučaju uglavnom bili SPBF [226, 227]. Suprotno ovim nalazima, Hasan i saradnici su nakon ispitivanja 126 izolata kvasnica iz krvi dokazali da su se najjači PBF našli među izolatima vrsta *C. albicans* i *C. krusei*, što su bili i rezultati grupe istraživača koja je testirala šest referentnih sojeva *Candida* spp. [218, 228]. Slični rezultati su dobijeni i u istraživanju koje je obuhvatilo sojeve *Candida* spp. izolovane iz sputuma, bronhoalveolarnih lavata, usne duplje i ženskog reproduktivnog trakta [220].

Ipak, bez obzira na već utvrđenu ulogu biofilma u patogenezi mnogih infekcija, produkcija biofilma *Candida* vrsta na vaginalnoj mukozii *in vivo* i njegova uloga u nastanku VVK je i dalje kontroverzna. Iako su zbog nedostataka dokaza u vidu histološke potvrde neka istraživanja dovela u pitanje ovu činjenicu [109, 229], naglašavajući pri tom da je najveći broj eksperimenata sproveden u uslovima *in vitro* [175, 230], brojne studije su, sa druge strane, sugerisale da je proces formiranja biofilma, posebno kada je u pitanju vrsta *C. albicans*, veoma važan za razvoj VVK [53, 101, 176, 231, 232]. Studija koju je sproveo Wu sa saradnicima je ovu teoriju potkrepila dokazima i pokazala da je razvoj biofilma vrste *C. albicans* na

vaginalnom epitelu udružen sa histološkim oštećenjima epitelnih ćelija sluzokože i lokalnom inflamacijom [233]. Takođe, postoje izveštaji koji ukazuju na to da biofilm koji formira *C. albicans* ima važnu ulogu u nastanku i održavanju ćelija sa sposobnošću dugog preživljavanja (ćelije perzisteri), koje se smatraju najodgovornijim za rezistenciju na antigljivične lekove i posledični nastanak RVVK [234, 235]. McCloud i saradnici su primenom kristal violet metode ispitivali sposobnost produkcije biofilma 33 soja *Candida* spp. izolovanih sa vulvovaginalne mukoze, pri čemu su na osnovu čitanja apsorbanci izolati klasifikovani na slabe, umerene i jake produktore. Utvrđeno je da su sojevi *C. albicans* razvili kompaktne biofilmove sa svim varijacijama u produkciji koje su bile jednako zastupljene među ovim izolatima, dok su se NAC sojevi pokazali kao slabi produktori. Iako neki autori osporavaju prisustvo biofilma kod RVVK [229], u ovoj studiji su detektovane heterogene formacije biofilma vrste *C. albicans* kao i agregati blastospora i hifalnih formacija koji su bili jasno uočljivi u vaginalnim lavatima pacijentkinja sa dokazanom RVVK [232]. Ipak, suprotno ovim nalazima, Alikhani i saradnici su nakon ispitivanja 50 vulvovaginalnih izolata pokazali da nije postojala statistički značajna razlika u produkciji biofilma između vrsta *C. albicans* (48,7%) i *C. glabrata* (54,5%) [236].

U našoj studiji je ustanovljeno da je od 300 ispitivanih uzročnika VVK 138 (46%) imalo sposobnost produkcije biofilma. Od 150 ispitivanih sojeva *C. albicans* ovu sposobnost je imalo 95 (68,84%), među kojima je bilo 18 JPBF (12%), 28 UPBF (18,66%) i 49 SPBF (32,67%). Slični rezultati su dobijeni i u drugim istraživanjima gde je ustanovljeno da su sojevi *C. albicans* bili ne samo najučestaliji već i najjači produktori biofilma [232, 237]. Već je poznata činjenica da je biofilm *C. albicans* organizovan u vidu višeslojne strukture koja se sastoji od blastospora sa izraženim potencijalom za formiranje pseudohifa i hifa. Ova tranzicija iz jednoćelijske u višećelijsku formu rasta predstavlja esencijalni faktor koji doprinosi razvijanju debljih i postojanijih formi biofilma karakterističnih za ovu vrstu kvasnica [238]. Sa druge strane, kao što je već pomenuto, za NAC vrste je utvrđeno da imaju značajno slabiju sposobnost produkcije biofilma. Poznato je da biofilmovi nekih od ovih vrsta kao što su *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* mogu u sklopu svoje građe imati filamentozne ćelije, ali je čest i slučaj da se ova forma ćelijske zajednice može sastojati isključivo od blastospora, kao kod vrste *C. glabrata* [239]. S obzirom na navedene činjenice, rezultati ove studije su i bili očekivani jer je od 124 ispitivana NAC soja svega 36 (29,03%) imalo sposobnost produkcije biofilma, među kojima je bilo pet (4,03%) JPBF, 12 (18,66%) UPBF i 19 (15,32%) SPBF. Takođe, ispitivanjem 26 ne-*Candida* izolata uzročnika VVK, sposobnost produkcije biofilma je utvrđena kod njih sedam (26,91%). Svi ovi sojevi su pripadali vrsti *S. cerevisiae* i među njima je četiri klasifikovano u grupu UPBF (15,38%), a tri u grupu SPBF (11,53%). Rezultati ove studije su pokazali da je značajan

procenat izolata, ne samo *C. albicans* već i NAC vrsta i *S. cerevisiae*, imao sposobnost produkcije biofilma, što ukazuje na visoku virulenciju ovih infektivnih agenasa i može biti jedan od predisponirajućih faktora za terapijski neuspeh i rekurentnost infekcije [217].

5.4. OSETLJIVOST IZOLATA PREMA ANTIMIKOTICIMA U USLOVIMA *IN VITRO*

Pored sposobnosti produkcije biofilma, uz ostale faktore virulencije, na terapijski neuspeh infekcija izazvanih ovim mikroorganizmima može uticati još jedna njihova važna karakteristika, a to je rezistencija na antigljivične lekove. Bez obzira na kontinuiranu visoku prevalenciju *C. albicans* kao primarnog uzročnika genitalnih gljivičnih infekcija, NAC vrste kao što su *C. glabrata* i *C. krusei* se sve češće izoluju iz uzoraka pacijentkinja, kako sa sporadičnim tako i sa rekurentnim fomama ovih infekcija. Smatra se da su rekurentne infekcije uzrokovane NAC vrstama u konstantnom porastu upravo zbog njihove više stope rezistencije na antimikotike [197]. Međutim, bez obzira na to što se već dugo smatra da je značajno visok procenat izolata *C. albicans*, najčešćih uzročnika VVK, osetljiviji na antimikotike u odnosu na druge vrste ovog roda, nedavno je ustanovljeno da stopa rezistencije i kod ove vrste raste. Ovo može biti posledica prekomernog izlaganja tretmanu u režimima održavanja, ali i kontinuirane upotrebe ovih lekova koji su propisani od strane lekara ili samoinicijativno primenjivani od strane pacijentkinja [150].

S obzirom na činjenicu da se terapija VVK najčešće i sprovodi bez laboratorijskih dokaza, medikamenti se uglavnom propisuju empirijski, na osnovu aktuelnih vodiča i preporuka [240]. U tretmanu kako sporadičnih, tako i hroničnih, a prvenstveno rekurentnih formi VVK, primenjuju se lokalni i sistemski antimikotici po preporukama svetskih asocijacija lekara i ginekologa [*World Health Organisation (WHO) (2018), The Societies of Gynaecology and Obstetrics of Germany, Austria, and Switzerland (2021), British Association for Sexual Health and HIV (BASHH) United Kingdom (2019), Centers for Disease Control and Prevention United states (2021), Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (2015), Brazilian guidelines for the management of candidiasis (2013), Australasian sexual health alliance (2018)*]. Zvanični protokoli obuhvataju preporuke za primenu antimikotika u sklopu inicijalne terapije za sporadične slučajeve, kao i preporučeni tretman za rekurentne forme u cilju održavanja remisije sa definisanim dozama antigljivičnog leka i trajanjem terapije održavanja. Sumirano, sve organizacije preporučuju primenu CLO i NY za lokalnu aplikaciju

kao i FLU ili ITR za sistemsko lečenje. Za održavanje remisije kod rekurentnih formi kao prvi izbor preporučuje se FLU koji u slučaju NAC uzročnika ili vrsta rezistentnih na ovaj antimikotik, može biti zamenjen lokalnom primenom CLO, NY i borne kiseline ili sistemskom primenom ITR [150].

U našoj studiji je za utvrđivanje senzitivnosti ispitivanih sojeva na antimikotike iz grupe poliena, imidazola kao i triazola korišćen komercijalni ISYP test, a rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika u senzitivnosti među različitim vrstama. Kada su u pitanju preporučivani i najčešće primenjivani antimikotici u terapiji VVK, izolati *C. albicans* su pokazali najslabiju osetljivost prema NY (46,7%). Sa druge strane, osetljivost sojeva ove vrste prema ostalim antimikoticima je bila značajno viša (80,7% sojeva osetljivo prema FLU; 77,3% sojeva osetljivo prema CLO). Suprotno ovim nalazima, utvrđena je statistički značajna razlika u osetljivosti NAC sojeva u odnosu na vrstu *C. albicans*, odnosno NAC izolati su se pokazali kao znatno rezistentniji na ispitivane antimikotike. Svega 35,5% ovih sojeva je bilo senzitivno na CLO, dok je 54,8% njih bilo osetljivo na ITR, a 68,5% na FLU. Među NAC sojevima, najviše stope rezistencije pokazale su vrste *C. glabrata* i *C. krusei* pri čemu je 40,3% sojeva vrste *C. glabrata* bilo slabije osetljivo na FLU, a 61,3% na ITR, dok je 36,4% sojeva *C. krusei* bilo slabije osetljivo na FLU, a 45,5% na ITR. Poređenjem sojeva *S. cerevisiae* sa izolatima *C. albicans* i NAC vrsta uočeno je da su sojevi ove ne-*Candida* vrste pokazali statistički značajno slabiju osetljivost prema ITR (80,8%), dok su u poređenju sa izolatima *C. albicans* ovi sojevi pokazali slabiju osetljivost na CLO (76,9%) i MIC (38,5%).

5.5. ZASTUPLJENOST IZOLATA PRODUKTORA BIOFILMA SLABIJE OSETLJIVOSTI NA ANTIGLJIVIČNE LEKOVE

U cilju utvrđivanja virulentnosti ispitivanih sojeva razmatrana je efikasnost antimikotika utvrđena ISYP testom među različitim kategorijama produktora biofilma *C. albicans*, NAC vrsta i vrste *S. cerevisiae*. Utvrđeno je da su sojevi *C. albicans* najslabiju osetljivost pokazali prema NY u poređenju sa ostalim antimikoticima, pri čemu je ovo bila karakteristika većine JPBF (83,3%), nešto više od polovine sojeva sa umerenom i slabom sposobnošću produkcije biofilma, kao i preko trećine neprodukujućih sojeva ove vrste. Ukoliko bi se u razmatranje uzeli sojevi *C. albicans* sa višom virulentnošću, odnosno sa sposobnošću produkcije biofilma i smanjenom osetljivošću na određeni antimikotik, slabija osetljivost prema NY utvrđena je kod 39,3% sojeva sa ovim karakteristikama, pri čemu su 25,4% činili JPBF. Sličan procenat JPBF

je bio slabije osetljiv i na AMB, iako je većina sojeva ove vrste bila senzitivna na ovaj antimikotik.

Bez obzira na značajno višu osetljivost svih izolata *C. albicans* na ostale ispitivane antimikotike, JPBF su se izdvojili kao najrezistentniji među njima i to najviše prema CLO (38,9%), dok je trećina ovih sojeva ispoljila nižu osetljivost na ECN, KCA, ITR i FLU. Kod sojeva produktora biofilma smanjena osetljivost na derivate imidazola se kretala između 6% (MIC) i 14,7% (CLO), dok je kada su u pitanju triazoli iznosila po 14,7% za ITR i FLU i 10,0% za VOR.

Pri razmatranju virulentnosti NAC vrsta, bez obzira na njihovu slabiju sposobnost produkcije biofilma u odnosu na sojeve *C. albicans*, ustanovljeno je da su ovi izolati, očekivano, pokazali značajno nižu osetljivost na antigljivične lekove. I u ovom slučaju su se JPBF izdvojili kao najrezistentniji prema većini antimikotika koji se najčešće koriste u terapiji VVK (NY, CLO, MIC i ITR), sa izuzetkom FLU prema kome je zabeležena relativno zadovoljavajuća osetljivost. Najzastupljenije vrste među NAC sojevima bile su *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. kefyr* pri čemu je najviše produktora biofilma pripadalo vrsti *C. glabrata*. Među sojevima ove vrste sa višom virulentnošću najveća otpornost je zabeležena prema CLO (24,2%), ITR (19,4%), FLU (12,9%) i NY (11,3%), upravo onim antimikoticima koji su deo empirijske terapije genitalnih gljivičnih infekcija. Sojevi *C. kefyr* su se iz grupe NAC vrsta izdvojili po nižoj osetljivosti prema polienima (NY=42,9%, AMB=28,6%), dok je svega 3% sojeva *C. krusei* bilo slabije osetljivo na poliene, FCY, ECN, CLO i MIC. Uz to da su sojevi *S. cerevisiae*, u celini, bili najrezistentniji na ITR i CLO, značajno je da je i oko četvrtina sojeva ove vrste sa višom virulentnošću pokazala slabiju osetljivost prema navedenim antimikoticima (ITR=26,9%, CLO=23,1%). Značajno slabija osetljivost zabeležena je i prema MIC (19,2%), NY (15,4%) i KCA (11,5%).

Postoji više studija koje su se bavile ovom temom i u svakoj od njih su rezultati pokazali da su ispitivani sojevi *C. albicans* sa sposobnošću produkcije biofilma bili rezistentni na FLU [176, 179]. Zbog toga mnogi autori smatraju da je, pored rezistencije na antigljivične lekove, produkcija biofilma gljiva roda *Candida* veoma važna za patogenezu VVK [101, 115].

Sumirano, rezultati naše studije pokazuju da visok procenat izolata, pored slabije osetljivosti na antigljivične lekove, ima i sposobnost produkcije biofilma što dodatno utiče na terapijski neuspeh. Praktično gledano, na osnovu naših nalaza, može se istaći da bi dve od tri žene sa VVK bile neadekvatno lečene ukoliko bi im bio propisan NY, otprilike bi u trećini slučajeva terapija CLO bila neefikasna, dok bi kod svake četvrte pacijentkinje empirijska terapija FLU bila bez željenog efekta. To bi značilo da ovi izolati sa visokom virulentnošću

potencijalno mogu biti uzrok hroničnih i rekurentnih genitalnih gljivičnih infekcija žena. Treba uzeti u obzir i činjenicu da su ovo rezultati ispitivanja *in vitro* i da bi sigurno postojale razlike kada bi se istraživanja sprovedela *in vivo*, s obzirom na činjenicu da manje žena ima rekurentni oblik VVK, a da se kod većine primenjuje empirijska terapija bez mikrobioloških analiza. Buduće studije, koje bi uključivale i praćenje terapijskog efekta uz laboratorijske nalaze, omogućile bi bolje sagledavanje najdelotvornijih tretmana u slučaju uzročnika niže osetljivosti na antimikotike sa sposobnošću produkcije biofilma.

5.6. UTVRĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ANTIGLJIVIČNIH LEKOVA PRIMENOM STANDARDIZOVANE MIKRODILUCIONE METODE

Bez obzira na široku rutinsku primenu komercijalnog ISYP testa za utvrđivanje senzitivnosti izolata kvasnica, važno je naglasiti da ovaj antimikogram test ima ograničenje jer sadrži samo po jednu koncentraciju antimikotika. Zbog toga je u našem istraživanju sprovedeno i testiranje izolata primenom bujon mikrodilucije koja predstavlja standardizovanu metodu za ispitivanje osetljivosti na antigljivične lekove. Ovom metodom je ispitano 60 izolata kvasnica od kojih je većina pokazala sposobnost produkcije biofilma, a koji su primenom ISYP testa pokazali slabiju osetljivost na NY, CLO i FLU (najčešće korišćene i preporučivane antimikotike u lečenju VVK). Takođe, ovom metodom je ispitana i osetljivost na FEN, antimikotik koji nije obuhvaćen ISYP testom i koji se posle dužeg vremenskog perioda ponovo koristi u lečenju VVK. Među odabranim sojevima nalazilo se 19 izolata *C. albicans* (8 JPBF, 5 UPBF i 6 SPBF), 15 sojeva *C. glabrata* (2 JPBF, 8 UPBF i 5 SPBF), šest *S. cerevisiae* (4 UPBF i 2 SPBF), jedan UPBF *C. kefir*, kao i 19 sojeva *C. krusei* među kojima su samo dva bila SPBF, a preostali sojevi nisu imali sposobnost produkcije biofilma. Ustanovljeno je da su MIK vrednosti za odabrane sojeve *C. albicans* bile u opsegu između 2-16 µg/ml za NY, 0,063-1 µg/ml za CLO i 32->64 µg/ml za FLU. U slučaju NAC vrsta, ove vrednosti su iznosile 2-16 µg/ml za NY, 0,063-8 µg/ml za CLO i 2->64 µg/ml za FLU. Za sojeve vrste *C. glabrata* vrednosti MIK su iznosile 4-8 µg/ml za NY, 0,063-4 µg/ml za CLO i 2-64 µg/ml za FLU; za sojeve *C. krusei* 4-16 µg/ml za NY, 0,125-0,5 µg/ml za CLO i 32->64 µg/ml za FLU, dok su za sojeve *S. cerevisiae* utvrđene MIK vrednosti od 4-8 µg/ml za NY, 0,125-0,5 µg/ml za CLO i 2-8 µg/ml za FLU. Minimalne inhibitorne koncentracije za jedini soj *C. kefir* bile su 2 µg/ml za NY, 0,063 µg/ml za CLO i >64 µg/ml za FLU. Kada je u pitanju osetljivost ispitivanih

sojeva prema FEN, vrednosti MIK su iznosile ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ za izolate *C. albicans*, 0,5->64 $\mu\text{g/ml}$ za NAC sojeve (0,5-64 $\mu\text{g/ml}$ za sojeve *C. glabrata*, 2->64 $\mu\text{g/ml}$ za izolate *C. krusei*, i za jedini soj *C. kefir* >64 $\mu\text{g/ml}$), dok su za sojeve *S. cerevisiae* ove vrednosti iznosile između 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$.

S obzirom na to da su NY, FLU i CLO sastavni deo palete ISYP testa, rezultate osetljivosti dobijene korišćenjem ove dve metode je bilo moguće uporediti. Nakon poređenja su ustanovljena značajna odstupanja u osetljivosti sojeva *C. albicans* na CLO zato što su svi sojevi testirani mikrodilucionom metodom bili senzitivni na ovaj antimikotik, dok je primenom ISYP testa utvrđeno da je oko trećina ispitivanih izolata bila slabije osetljiva. Sa druge strane, mikrodilucioni test je pokazao suprotne rezultate osetljivosti na FLU jer je ovom metodom registrovano čak 94,73% sojeva rezistentnih na ovaj antimikotik. Slabija osetljivost na NY utvrđena je primenom oba testa. Vrlo značajan podatak je i da je najveći broj rezistentnih sojeva ove vrste pripadao grupi JPBF. Što se tiče sojeva *C. glabrata* mikrodilucioni test je pokazao njihovu slabiju senzitivnost na NY u odnosu na rezultate ISYP testa. Sa druge strane, osetljivost prema CLO je bila značajno niža u ISYP testu, dok je i jednom i drugom metodom registrovana niža osetljivost na FLU. I u slučaju ove vrste, JPBF su pokazali najnižu osetljivost na ispitivane antimikotike. U našem istraživanju je samo 6,06% izolata *C. krusei* imalo sposobnost produkcije biofilma, pri čemu su svi bili SPBF. Ispitivanjem ovih sojeva mikrodilucionim testom ustanovljeno je da su svi bili otporni na NY, većina na FLU (94,73%), dok su, sa druge strane, svi sojevi bili senzitivni na CLO. U slučaju ove vrste, rezultati dobijeni mikrodilucionom metodom nisu bili u skladu sa rezultatima ISYP testa ni za jedan ispitivani antimikotik. Ukoliko bi se sagledale NAC vrste u celini, slično sojevima *C. albicans*, i kod ovih izolata je utvrđena viša senzitivnost prema CLO mikrodilucionom metodom u odnosu na rezultate dobijene ISYP testom, dok je osetljivost prema NY takođe bila značajno niža primenom mikrodilucione metode. Mikrodilucionim testom je utvrđeno da su sojevi *S. cerevisiae* bili znatno rezistentniji na NY, dok je senzitivnost ovih sojeva na CLO bila značajno viša u odnosu na rezultate dobijene ISYP testom. Osetljivost prema FLU se nije značajno razlikovala poređenjem primenjenih metoda kada je u pitanju ova vrsta. Sumiranjem navedenih rezultata dobijenih primenom referentne mikrodilucione metode za utvrđivanje antimikrobne osetljivosti može se konstatovati da se CLO pokazao kao najefikasnija opcija među antimikoticima najčešće korišćenim u lečenju genitalnih gljivičnih infekcija. Poređenja radi, mikrodilucionim testom je utvrđeno da su i FLU i NY imali ograničenu efikasnost prema ispitivanim vulvovaginalnim izolatima.

Multirezistentni sojevi roda *Candida* imaju veoma važnu ulogu u patogenezi RVVK jer se njihovo prisustvo uglavnom povezuje sa terapijskim neuspehom. U slučaju vulvovaginalnih izolata, jedan od glavnih problema predstavlja otpornost na najčešće propisivane antimikotike, uključujući FLU, CLO i NY. Do početka ovog veka dokumentovano je samo nekoliko slučajeva vulvovaginalnih infekcija izazvanih sojevima *C. albicans* otpornim na FLU [241, 242]. Međutim, u narednim godinama rezultati istraživanja su pokazali značajan porast rezistentnih sojeva ne samo NAC vrsta, već i *C. albicans*. U studiji koju su sproveli Bauters i saradnici, među 123 vulvovaginalna izolata kvasnica detektovano je 19 sojeva *C. albicans*, tri *C. glabrata*, i jedan soj *C. krusei* sa MIK vrednostima za FLU ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, što je činilo 21,14% svih ispitivanih izolata [143]. U studiji Sobela i saradnika 14 sojeva *C. albicans* (3,6%) i dva soja *C. glabrata* (11,1%) su bili rezistentni na FLU [143, 243]. Rezistencija prema ovom antimikotiku ustanovljena je i kod 6,7% izolata *C. albicans* i 10,3% NAC sojeva u studiji sprovedenoj u Italiji, gde je ispitivano 800 kliničkih izolata kvasnica roda *Candida* [244]. U istraživanju koje je obuhvatilo 100 vulvovaginalnih sojeva kvasnica izolovanih iz materijala pacijentkinja jedne univerzitetske bolnice u Turskoj nižu osetljivost ili rezistentnost prema FLU pokazalo je 19 (40,4%) sojeva *C. albicans*, dok su sva 43 ispitivana soja *C. glabrata* bila slabije osetljiva na ovaj antigljivični agens [245]. Ipak, treba napomenuti da postoje studije u kojima, bez obzira i na dovoljno veliki broj ispitivanih izolata, nije detektovana rezistencija vrste *C. albicans* prema FLU [144, 152, 190, 193, 246-248], što se sa druge strane ne može reći za NAC vrste. Primer je opsežna studija koju je sprovela Sandra Richter sa saradnicima, u kojoj je testirana antimikrobna osetljivost 593 vulvovaginalna izolata kvasnica prema imidazolima i triazolima pri čemu je svih 420 izolata *C. albicans* bilo osetljivo na FLU, dok je 17 (15,2 %) sojeva *C. glabrata* i 5 (41,7 %) sojeva *C. krusei* bilo rezistentno na ovaj antimikotik. U ovoj studiji je ispitivana osetljivost i na druge antimikotike koji su deo standardne terapije VVK kao što je CLO, pri čemu je utvrđeno je da su svi sojevi *C. albicans* i *C. krusei* bili senzitivni na ovaj antimikotik, dok je rezistentnost ustanovljena kod 18 (30,4%) sojeva *C. glabrata*. Ipak, najniža osetljivost svih izolata je zabeležena prema NY, prema kome je bilo rezistentno čak 99,8% sojeva *C. albicans*, 97,3% sojeva *C. glabrata*, kao i svi ispitivani sojevi *C. krusei*. Svih 30 izolata *C. parapsilosis* i osam *C. tropicalis* je bilo senzitivno na FLU i CLO, ali i rezistentno na NY. Takođe je svih devet izolata *S. cerevisiae*, kao ne-*Candida* vrste u ovoj studiji, bilo senzitivno na FLU i CLO, dok je 88,9% njih bilo rezistentno na NY [144]. U još jednom veoma obimnom istraživanju sprovedenom u Kini, koje je obuhvatilo 1781 vulvovaginalni izolat kvasnica, testiranjem mikrodilucionom metodom je utvrđeno da je od 1272 soja *C. albicans*, njih 3,3% bilo rezistentno na FLU, dok su svi bili senzitivni na CLO.

Zanimljivo je da među 267 sojeva *C. glabrata* nijedan nije bio rezistentan na FLU, kao ni na CLO, dok je od 54 soja *C. krusei* 2,9% bilo rezistentno na FLU, a nijedan od njih na CLO. Svih 12 ispitivanih sojeva *S. cerevisiae* je bilo osjetljivo i na CLO kao i na FLU. Minimalna inhibitorna koncentracija NY za 90% svih sojeva *C. albicans*, *C. glabrata* i *S. cerevisiae* je iznosila 8 µg/ml, a za 90% sojeva *C. krusei* 1 µg/ml [193]. Autori francuske studije iz 2014. godine, koja je ispitivanjem obuhvatila 200 vulvovaginalnih izolata kvasnica, utvrdili su da su se MIK vrednosti CLO za 113 ispitivanih sojeva *C. albicans* kretale između 0,015 i 4 µg/ml, pri čemu je rast 90% izolata ove vrste inhibirala koncentracija od 0,06 µg/ml. Raspon ovih vrednosti za 54 soja *C. glabrata* je bio od 0,25-8 µg/ml (90% sojeva je bilo inhibirano koncentracijom od 4 µg/ml), dok je po 11 ispitivanih sojeva *C. krusei*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* bilo osjetljivo na CLO sa najvećom vrednošću MIK od 0,5 µg/ml. Ispitivanjem dejstva NY na ove izolate, dobijene vrednosti MIK za sojeve *C. albicans* su bile između 1-4 µg/ml, za sojeve *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* 2-4 µg/ml, dok su za sve izolate *C. glabrata* i *C. krusei* iznosile 4 µg/ml [198]. Značajno je i istraživanje koje je sproveo Nelson sa saradnicima 2013. godine kada je ispitivana osjetljivost 94 vulvovaginalna izolata kvasnica prema najčešće korišćenim antimikoticima. Utvrđeno je da je 95% izolata *C. albicans* bilo osjetljivo na FLU, 3,33% je pokazalo doznu zavisnost dok je 1,67% bilo rezistentno prema ovom antimikotiku. Senzitivnost na FLU je utvrđena kod 42,85% izolata *C. glabrata*, dozna zavisnost kod polovine sojeva, dok su preostali bili rezistentni na ovaj antigljivični lek. Svi sojevi *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* su bili senzitivni na FLU. Ukoliko bismo graničnom vrednošću MIK za CLO smatrali koncentraciju od 1 µg/ml (kao što je to slučaj u našem istraživanju) moglo bi se konstatovati da je u ovoj studiji 33,3% sojeva *C. albicans*, 10,7% izolata *C. glabrata*, kao i po jedan soj *C. krusei* (50%) i *C. tropicalis* (33,3%) bilo rezistentno na CLO, dok je jedini ispitivani soj *C. parapsilosis* bio osjetljiv na ovaj antimikotik. Rezistenciju prema NY pokazalo je 58,33% sojeva *C. albicans*, 57,14% sojeva *C. glabrata*, dva izolata (66%) *C. tropicalis* kao i jedan ispitivani izolat (50%) *C. krusei* [190].

U našoj studiji je na osnovu rezultata mikrodilucione metode utvrđeno da su, ukoliko se kao granična vrednost MIK usvoji 1 µg/ml, svi testirani sojevi bili rezistentni na NY. Na FLU su najslabije osjetljivi bili odabrani izolati vrste *C. albicans* i *C. krusei* sa po 94,73% rezistentnih sojeva na ovaj antimikotik, dok je otporan bio i jedini ispitivani soj *C. kefyr*. Sa druge strane, FLU je bio značajno efikasniji prema preostale dve ispitivane vrste jer je svega 20% izolata *C. glabrata* bilo rezistentno, dok su svi sojevi *S. cerevisiae* bili senzitivni na ovaj antigljivični lek. Kao najbolja terapijska opcija se na osnovu rezultata mikrodilucione metode svih sprovedenih istraživanja, uključujući i naše, pokazao CLO. Ovaj antimikotik je gotovo u potpunosti bio

efikasan prema svim ispitivanim vrstama kvasnica osim prema sojevima *C. glabrata*. U našoj studiji je kod 33,3% odabranih izolata ove vrste zabeležena rezistencija prema CLO, dok je u drugim navedenim istraživanjima vrednost MIK od $>1 \mu\text{g/ml}$ registrovana kod 10,7-30,4% ispitivanih izolata *C. glabrata*, vrste koja je nakon *C. albicans* najčešći uzročnik VVK, kao i rekurentnog oblika ove infekcije i čija prevalentnost raste poslednjih godina.

Pored FLU, CLO i NY, u ovoj studiji je ispitivano i dejstvo FEN na odabrane sojeve kvasnica. Fentikonazol je derivat imidazola koji je od osamdesetih godina prošlog veka uveden kao, tada, nova alternativa u lečenju superficijalnih gljivičnih infekcija. U više sprovedenih studija dokazana je efikasnost ovog leka, ne samo prema različitim gljivama kao što su kvasnice, dermatofiti i dimorfne gljive [249], već i prema različitim bakterijskim vrstama koje mogu biti uzročnici vaginalnih infekcija kada se mogu formirati mešoviti bakterijski i gljivični biofilmovi [250, 251]. Pored gljiva i nekih baterija (*Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp.), ustanovljeno je da i protozoa *Trichomonas vaginalis* može biti osetljiva na dejstvo FEN [252-254], što dodatno daje prednost ovom medikamentu u empirijskoj terapiji vulvovaginalnih infekcija. U studijama koje su se bavile ispitivanjem antigljivičnog dejstva FEN na kvasnice koje su bile uzročnici VVK ustanovljeno je da je njegovo dejstvo bilo veoma zadovoljavajuće. U jednoj italijanskoj studiji ispitivano je dejstvo FEN na 318 uzročnika vulvovaginitisa, od kojih su 132 bile bakterije, a 186 izolati kvasnica, među kojima su se našle vrste *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*. U ovoj studiji su vrednosti koncentracija FEN koje su inhibirale porast izolata kvasnica bile u opsegu od 0,008-0,5 $\mu\text{g/ml}$ [255]. Predmet istraživanja studije iz 2009. godine sprovedene u Grčkoj bio je ispitivanje efekata derivata azola na 260 vulvovaginalnih izolata kvasnica i dok su se vrednosti MIK za FLU koje su inhibirale porast 50% ispitivanih sojeva kretale između 0,12 i $>64 \mu\text{g/ml}$, pri čemu su se kao najrezistentnije vrste pokazale *C. krusei* i *C. glabrata*, MIK FEN su za obe navedene vrste kao i za izolate vrsta *C. albicans* i *C. parapsilosis* iznosile između 0,03-2 $\mu\text{g/ml}$ [256]. Murina i saradnici su se u svojoj studiji takođe bavili ispitivanjem dejstva FLU i FEN kod pacijentkinja sa VVK, pri čemu su ustanovili da su oba leka bila efikasna, s tim što je FEN značajnije uticao na smanjenje pruritusa [257]. U još jednom istraživanju sprovedenom u Italiji ispitivan je efekat FEN na 50 sojeva kvasnica (30 *C. albicans* i 20 *C. glabrata*) kod kojih je prethodno utvrđena senzitivnost na FLU, pri čemu je 46 njih izolovano sa orofaringealne ili vulvovaginalne mukoze. Utvrđena je zadovoljavajuća efikasnost FEN jer su se kod izolata *C. albicans* senzitivnih na FLU vrednosti MIK za FEN kretale između 0,25-2 $\mu\text{g/ml}$, dok su kod FLU rezistentnih sojeva te vrednosti iznosile 1-8 $\mu\text{g/ml}$. Takođe, ispitivanjem sojeva vrste *C. glabrata*, kod izolata senzitivnih na

FLU vrednosti MIK za FEN bile su između 0,5-2 µg/ml, a kod sojeva rezistentnih na FLU one su iznosile 0,5-4 µg/ml [142]. Pored testiranja na antigljivične lekove u uslovima *in vitro*, upoređivan je klinički efekat FEN i CLO, pri čemu su rezultati četiri studije pokazali da između ova dva antimikotika nema velikih razlika i da oba imaju zadovoljavajuće dejstvo [258-261].

Zanimljivo je da je u našem istraživanju dejstvo FEN visoko koreliralo sa dejstvom FLU, prvenstveno prema sojevima vrste *C. albicans* jer su kod sojeva ove vrste sve vrednosti MIK za FEN iznosile ≥ 64 µg/ml, a iste vrednosti su zabeležene prema FLU kod čak 94,73% ovih izolata. Isto je bilo i kod jedinog soja *C. kefyr* gde su vrednosti MIK za oba navedena antimikotika iznosile >64 µg/ml. Kod tri soja vrste *C. glabrata* utvrđene su iste vrednosti MIK za FLU i FEN i iznosile su 64 µg/ml (dva soja) i 16 µg/ml (jedan soj). Međutim, prema preostalim izolatima vrste *C. glabrata* FEN se pokazao kao značajno efikasniji jer su zabeležene MIK iznosile od 0,5-8 µg/ml, što je bilo 4-16 puta niže u odnosu na minimalne koncentracije FLU koje su inhibirale rast sojeva ove vrste. Slično je bilo i u slučaju izolata *S. cerevisiae* kod kojih su MIK za FEN iznosile između 0,5-1 µg/ml i bile 2-8 puta niže od MIK FLU. Što se tiče sojeva *C. krusei* koji su u potpunosti bili rezistentni na FLU, MIK od ≥ 64 µg/ml za FEN je zabeležena kod 11 (57,89%) sojeva, dok su za preostale sojeve ove koncentracije iznosile između 2 i 32 µg/ml. Na osnovu naših rezultata, može se konstatovati da ni FEN ne pokazuje zadovoljavajući efekat prema ispitivanim uzročnicima VVK. Ovaj derivat imidazola imao je najslabije dejstvo prema sojevima *C. albicans* i *C. krusei*, dok je bio znatno efikasniji prema vrstama *C. glabrata* i *S. cerevisiae*.

5.7. ISPITIVANJE ANTIGLJIVIČNOG DEJSTVA ETARSKOG ULJA BILJKE *MELISSA OFFICINALIS*

Zbog sve više prevalencije sojeva kvasnica rezistentnih prema antigljivičnim lekovima, danas se radi na pronalaženju novih, alternativnih rešenja i strategija koje bi omogućile što uspešnije lečenje gljivičnih infekcija ljudi. Sve češće se, sa pomenutim ciljem, izučavaju i prirodne supstance koje pored ostalih mogu imati i antigljivična svojstva. Među ovim prirodnim produktima značajno mesto zauzimaju etarska ulja koja mogu imati širok antimikrobni spektar. Iako je utvrđeno da su deo mnogih biljaka, etarska ulja familije Lamiaceae se zbog visokog sadržaja terpenoida izdvajaju kao veoma značajna u potencijalnom lečenju gljivičnih infekcija. Terpenoidi su velika i raznovrsna klasa prirodnih organskih

jedinjenja sa dokazanim antigljivičnim svojstvima u koja spadaju kamfor, karvakrol, 1,8-cineol, citral, p-cimen, geraniol, linalol, mentol, pinen, terpinen, timol i dr. [262].

Iako je sprovedeno dosta studija koje su ispitivale antimikrobne efekte EUMO na bakterije [170, 263], mnogo manji broj njih se bavio istraživanjem delovanja ovog etarskog ulja na gljive roda *Candida* [171], dok nijedno istraživanje nije posvećeno njegovom uticaju na vulvovaginalne izolate kvasnica. Ipak, predmet brojnih studija je bio ispitivanje dejstva pojedinih komponenti etarskih ulja na mikroorganizme, pa je tako u studiji Rauta i saradnika analiziran efekat odabranih terpenoida na referentni soj *C. albicans* ATCC 90028. Devet ispitivanih terpenoida ulazilo je u sastav etarskog ulja korišćenog za potrebe ove studije, a rezultati su pokazali da su MIK citronelala i mircena iznosile 1 mg/ml; linalola, α -pinena i β -pinena 2 mg/ml; 1,8-cineola 4 mg/ml, a geranil acetata i p-cimena >4 mg/ml [264]. Dve odvojene studije sprovedene u SAD i Srbiji, bavile su se ispitivanjem efekata EUMO na jedan referentni soj *C. albicans* (ATCC 18804) kao i na jedan klinički izolat *C. albicans*, pri čemu su vrednosti MIK ispitivanog etarskog ulja u obe studije iznosile 0,3 mg/ml [181, 265]. Grupa poljskih autora je u nedavno sprovedenom istraživanju takođe ispitivala dejstvo EUMO na različite vrste roda *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. guilliermondii*) i ustanovljeno je da su se vrednosti MIK kretale između 0,39-1,41 mg/ml [184]. U našem istraživanju MIK EUMO za sve ispitivane sojeve kvasnica su iznosile od 0,16 do 2,5 mg/ml. Ove vrednosti su za sojeve *C. albicans* iznosile 0,16-1,25 mg/ml, za izolate NAC vrsta 0,31-2,5 mg/ml, dok su najniže bile za sojeve *S. cerevisiae* i kretale su se između 0,16-0,31 mg/ml. Najviše koncentracije ovog etarskog ulja su bile potrebne za inhibiranje rasta sojeva vrste *C. glabrata* i to 2,5 mg/ml za najrezistentniji među njima, a za većinu preostalih 1,25 mg/ml. Minimalna koncentracija EUMO potrebna da spreči rast najrezistentnijeg soja vrste *C. albicans* je iznosila 1,25 mg/ml, dok su se ove koncentracije za preostale sojeve kretale između 0,16 i 0,63 mg/ml. Koncentracija od 0,31 mg/ml bila je potrebna za inhibiciju rasta soja *C. kefir* kao i za dva soja *S. cerevisiae*, a za preostale sojeve ove ne-*Candida* vrste, koja se pokazala kao najsenzitivnija na EUMO, MIK je iznosila 0,16 mg/ml. Porast 10 sojeva *C. krusei* je bio inhibiran koncentracijom od 0,63 mg/ml, dok je za preostalih devet bilo dovoljno delovati sa 0,31 mg/ml EUMO. U poređenju sa prethodno navedenim studijama, rezultati ovog istraživanja nisu pokazala odstupanja u koncentracijama EUMO potrebnim za inhibiciju rasta kvasnica.

Brojne studije su se bavile upoređivanjem sastava i antimikrobnog dejstva etarskih ulja dobijenih iz različitih delova biljaka ili iz biljaka u različitim fenološkim fazama (fazama razvoja). U jednom od takvih istraživanja sprovedenom u Španiji ispitivan je efekat etarskog

ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) prema referentnim bakterijskim sojevima i zaključeno je da on zavisi od faze razvoja biljke [266]. U istraživanju sprovedenom u Turskoj utvrđivan je efekat etarskog ulja biljke roda *Satureja* iz porodice Lamiaceae na nekoliko bakterijskih vrsta i dve vrste kvasnica, *C. albicans* i *C. tropicalis*. Ustanovljeno je da su MIK etarskog ulja bile najniže kada je ono dobijeno iz biljke u stadijumu cvetanja za sojeve *C. albicans* (0,125mg/ml), ili u stadijumu nakon cvetanja za sojeve *C. tropicalis* (0,063mg/ml) [162]. Mounira i saradnici su utvrdili da etarsko ulje bosiljka (*Ocimum basilicum*) dobijeno takođe u fazi cvetanja ima najbolje dejstvo prema plesnima roda *Aspergillus* [267]. Do sličnog zaključka se došlo i u studiji u kojoj je utvrđeno da najjače antimikrobno dejstvo prema određenim vrstama bakterija i *C. albicans* pokazuju etarska ulja roda *Thymus* dobijena u fazi cvetanja [268]. U nekim istraživanjima je najbolji antimikrobni efekat dobijen primenom prirodnih supstanci ekstrahovanih u fazi pupljenja kao što je to slučaj sa etarskim uljem geranijuma (*Pelargonium graveolens*) [269]. U našem istraživanju EUMO dobijeno je iz nadzemnog dela ove biljke koja se nalazila u fazi cvetanja.

5.8. ANTIBIOFILM EFEKAT ANTIMIKOTIKA I ETARSKOG ULJA BILJKE *MELISSA OFFICINALIS*

Sposobnost kvasnica roda *Candida* da produkuju biofilm predstavlja veliki izazov za konvencionalnu antigljivičnu terapiju. Smatra se da je veća otpornost ćelija u biofilmu posledica postojanja ECM, promena u genskoj ekspresiji odgovornih za regulaciju efluks pumpi, sadržaja ergosterola i odgovora na stres, kao i postojanja sesilnih ćelija perzistera.

Na primer, sticanje otpornosti tokom formiranja biofilma dokazano je u studiji u kojoj je utvrđeno da zreli biofilmovi *C. albicans* pokazuju pet do osam puta veću rezistenciju na sve antigljivične lekove u poređenju sa planktonskim ćelijama [270]. Na ovo povećanje otpornosti tokom formiranja biofilma može uticati nekoliko faktora, a jedan od njih je porast metaboličke aktivnosti koji se dešava tokom rane faze razvoja biofilma. Chandra i saradnici su pokazali da je, iako su MIK vrednosti AMB, FLU, NY i hlorheksidina iznosile redom 0,5, 1, 8 i 16 µg/mL u ranoj fazi formiranja biofilma *C. albicans* na polimetilmetakrilatnim trakama, otpornost ćelija rasla sa razvojem biofilma, tako da su već nakon 72 h ove koncentracije bile dva do čak 16 puta više za navedene antigljivične supstance [271]. Za veću otpornost zrelog biofilma odgovorne su ćelije perzisteri, odnosno ćelije koje se ne dele i imaju visoku toleranciju na antimikrobne lekove. Veruje se da je ova tolerancija moguća zahvaljujući mirovanju ćelija,

kada ih vezivanje antimikrobnih lekova za ciljnu strukturu ne može oštetiti [272]. Dokazano je da su u mnogim slučajevima ćelije perzisteri biofilma *C. albicans* otporne na FLU, dok su planktonske ćelije ove vrste osetljive na ovaj antimikotik. Zapaženo je da ćelije perzisteri u biofilmu pokazuju povećanu ekspresiju CDR (eng. *Candida Drug Resistance*) gena [273]. Ovaj fenomen je takođe primećen kod ćelija *C. albicans* u biofilmu izloženom AMB i hlorheksidinu, ali nezavisno od ekspresije gena za efluks pumpe [274].

Zanimljivi su i rezultati jedne studije u kojoj su sojevi kvasnica sa određenim defektima gena odgovornih za sintezu biofilma, sposobni da formiraju samo jednoslojne strukture sastavljene od izduženih ćelija, pokazali istu otpornost prema FLU i AMB, kao i odgovarajući sojevi bez mutacija. Ovi rezultati sugerišu da je otpornost na antigljivične lekove povezana i sa adherencijom, bez obzira na dalje formiranje biofilma [273]. Što se tiče moguće uloge ECM u otpornosti na antimikotike, neki autori ističu da ova struktura predstavlja barijeru koja sprečava difuziju lekova, dokazujući da su ćelije kvasnica u 20% slučajeva otpornije na dejstvo AMB kada su okružene ECM, u poređenju sa istim ćelijama nakon njegovog uklanjanja [275]. Takođe, ispitivanje ne samo ECM u celini, već i određenih hemijskih komponenti matriksa, preciznije određenih glukana koji imaju sposobnost vezivanja za AMB i FLU, pokazalo je da ove komponente remete dejstvo navedenih antimikotika, dok njihovo odsustvo iz matriksa povećava osetljivost *C. albicans* na ove antigljivične lekove [276, 277].

Promene u ekspresiji gena tokom sinteze biofilma *C. albicans* uključuju povećanje regulacije CDR i MDR (eng. *Multidrug resistance*) gena koji kodiraju transportere (efluks pumpe) odgovorne za rezistenciju na derivate azola [273]. Pretpostavlja se da je ova regulacija važna za razvoj antigljivične rezistencije u ranoj fazi formiranja biofilma, dok se smatra da su u procesu sazrevanja za otpornost relevantnije promene u sastavu sterola [275]. Ipak, pokazalo se da sojevi *C. albicans* sa delecijom gena za kodiranje efluks pumpi mogu formirati biofilm otporan na antigljivične agense, što predstavlja dokaz da otpornost biofilma na antimikotike ne zavisi samo od jednog mehanizma [273]. Prekomerna ekspresija CDR gena je takođe primećena u biofilmovima *C. glabrata* [278, 279], a pokazano je da su i biofilmovi ove vrste znatno otporniji od planktonskih ćelija [278, 280]. Zanimljivo je da u jednoj studiji izlaganje 80 µg/mL FLU nije dovelo do promena u ekspresiji gena u biofilmu referentnog soja *C. albicans* SC5314, dok je izlaganje kaspofunginu ili AMB uticalo na izraženiju ekspresiju gena, što ukazuje na to da ćelije biofilma mogu biti rezistentne prema derivatima azola [281].

Svi navedeni faktori doprinose održavanju infekcija izazvanih sojevima koji produkuju biofilm, što na kraju rezultira neefikasnošću antimikotika i čestim terapijskim neuspesima [282]. Zreo biofilm je posebno važan jer predstavlja najrezistentniju formu ovih ćelijskih

zajednica, a istovremeno i mesto koje omogućava dalje održavanje i širenje infekcije [283]. Zbog toga je predmet mnogih studija pronalaženje novih antigljivičnih lekova, a posebno onih koji bi imali efikasno dejstvo na već formirani biofilm, što bi doprinelo unapređenju terapijskih protokola. U našem istraživanju su ispitivani samostalni efekti EUMO, FLU i NY na zrele biofilmove kao i kombinovano dejstvo svakog od navedenih antimikotika ponaosob sa EUMO. Rezultati su pokazali da je ubedljivo najefikasnije dejstvo imalo EUMO nakon čijeg dejstva je masa već formiranog biofilma bila smanjena do čak 95,36%. Ipak, treba napomenuti i veoma zadovoljavajuće antibiofilm dejstvo samog NY sa postignutom redukcijom biofilma do 82,97%. Kada je u pitanju FLU, efekat je bio znatno slabiji, pri čemu je u nekim slučajevima došlo i do potenciranja produkcije biofilma umesto redukovanja njegove mase. Moglo bi se pretpostaviti da je ovaj fenomen posledica pojačane genske ekspresije u stanju izloženosti nepovoljnim uslovima, što rezultira jačom aktivacijom efluks pumpi i pokreće dodatne mehanizme preživljavanja [284]. Ovo se takođe može povezati i sa većom stopom rezistencije ispitivanih sojeva na FLU za koju se i ispostavilo da je izraženija kada su ćelije organizovane u formi biofilma. Bolje dejstvo NY u odnosu na FLU se može objasniti i različitim mehanizmima dejstva ovih antimikotika. Naime, kao što je već navedeno, FLU je derivat triazola čije se dejstvo bazira na inhibiciji enzima sterol 14- α -demetilaze koji učestvuje u sintezi ergosterola, važne komponente membrane gljivičnih ćelija. S obzirom na to da je u ovoj studiji ispitivano dejstvo antimikotika na zrele biofilmove čiji se najveći broj ćelija nalazi u stanju mirovanja, moglo se pretpostaviti da će antigljivični lek koji deluje na nivou ćelijske proliferacije imati i slabije dejstvo. Sa druge strane, NY je polienski antimikotik koji nakon vezivanja za ergosterol dovodi do nastanka pora na ćelijskim membranama, čime se narušava njihova permeabilnost, što rezultira citolizom. Ovaj mehanizam dejstva koji dovodi do direktne destrukcije ćelija omogućava NY da efikasnije deluje na biofilm od FLU.

Još jedan važan podatak, do koga se došlo razmatranjem dobijenih rezultata, je da je pod dejstvom svih ispitivanih agenasa redukcija biofilma sojeva *C. albicans* bila procentualno mnogo značajnija u odnosu na redukciju biofilma NAC vrsta. Naime, iako su sojevi *C. albicans* pokazali i do 17 puta izraženiju sposobnost produkcije biofilma u odnosu na NAC sojeve, utvrđeno je da je primenom ispitivanih agenasa postignuta veoma zadovoljavajuća redukcija biofilma bez obzira na masivnost ili složenost njegove strukture. Ipak, i u ovom slučaju je postojao izuzetak kao što je soj Ca2 kod koga je masa biofilma bila veća nakon dejstva svih ispitivanih koncentracija FLU, što samo potvrđuje teoriju da otpornost biofilмова kvasnica na antimikotike zavisi od više različitih faktora.

Ispitivanje dejstva FLU na biofilmove *Candida* vrsta je bilo predmet mnogih studija u kojima je pokušano da se nedovoljna efikasnost ovog antimikotika kompenzuje povećavanjem njegove koncentracije. U studiji koju su sproveli Bozo i saradnici ustanovljeno je da su se za uzročnike VVK antibiofilm koncentracije FLU kretale u rangu od 4 do >512 µg/ml [285]. U drugoj studiji je Liu sa saradnicima testirao efekat FLU na biofilmove sojeva *C. albicans* za koje je prethodno utvrđeno da su rezistentni na ovaj antimikotik i ustanovio da koncentracije od 128 µg/ml nisu bile dovoljne za njihovu eradikaciju [286]. Raut je, ispitujući biofilmove dva referentna soja *C. albicans*, utvrdio da ni koncentracije FLU od 512 µg/ml nisu bile efikasne za uklanjanje već formiranih biofilmova ispitivanih sojeva [264]. Konačno, najveća koncentracija FLU zabeležena u literaturi, koja takođe nije dala rezultate u eradikaciji već formiranih zrelih biofilmova, je iznosila 1024 µg/ml. Flukonazol u ovoj koncentraciji nije bio efikasan ni u studijama koje su sproveli Li sa saradnicima na četiri soja *C. albicans* za koje je prethodno utvrđena rezistencija na derivate azola [287], zatim u studiji Gongga sa saradnicima na tri soja *C. albicans* [288], kao i na 15 sojeva iste vrste ispitivanih u istraživanju koje je sproveo Pan sa saradnicima [289]. U našoj studiji MIK za FLU nisu određivane zbog toga što redukcija zrelog odnosno formiranog biofilma nije bila veća od 80%, koliko je potrebno za utvrđivanje ove koncentracije prema kriterijumima koje su ustanovili Li i saradnici [287].

Suprotno FLU, znatno manji broj studija se bavio ispitivanjem efekata NY na već formirani biofilm. Franciskoni i saradnici su testirali ovaj antimikotik na sojevima *C. albicans* izolovanim iz uzoraka pacijenata sa dijabetesom i hroničnim periodontitisom kao i na referentnom soju *C. albicans* SC 5314, pri čemu je utvrđeno da je NY bio efikasan prema zrelim biofilmovima u koncentracijama između 4–128 µg/ml [290]. U studiji sprovedenoj u Iranu na 40 sojeva *C. albicans*, izolovanih iz lezija pacijenata sa oralnom kandidozom koji su ujedno imali i neki od maligniteta krvi, utvrđeno je da je za uspešno dejstvo na zrele biofilmove ovih izolata bila dovoljna koncentracija NY od 0,25–2 µg/mL [291]. U istoj studiji je koncentracija ovog antimikotika koja je redukovala biofilm referentnog soja *C. albicans* ATCC 10231 iznosila 16 µg/mL. U našem istraživanju je redukcija biofilma od 80% postignuta u slučaju tri ispitivana soja, pri čemu se koncentracije koje su dovele do navedene redukcije smatraju MIK [287] i one su za sojeve Ca1, Ca3 i Ca4 redom iznosile 4, 8 i 16 µg/mL.

Bez obzira na to što se u literaturi još uvek ne mogu naći podaci o efektima EUMO na zrelo biofilm, jedna skorašnja studija se bavila ispitivanjem dejstva odabranih terpenoida koji ulaze u sastav mnogih etarskih ulja, kako na planktonske tako i na sesilne ćelije zrelog biofilma referentnog soja *C. albicans* ATCC 90028. Eliminacijom biofilma pod dejstvom terpenoida se smatrala redukcija mase >50% u odnosu na kontrolu. Minimalne inhibitorne koncentracije

citrala i linalola su iznosile 2 mg/ml, citronelala 4 mg/ml, dok su ove koncentracije za 1,8-cineol, geranil acetat, α -pinen, β -pinen, p-cimen i mircen bile >4 mg/ml [184]. U našem istraživanju MIK EUMO za biofilm soja Ca1 je iznosila 1,25 mg/ml, a za soj Ca3 0,31 mg/ml. Za preostala dva soja *C. albicans* MIK vrednosti su bile $>1,25$ mg/ml, dok su ove koncentracije za sve ispitivane izolate vrste *C. glabrata* iznosile $>2,5$ mg/ml, na osnovu čega se može zaključiti da je EUMO bilo efikasnije u redukciji biofilmova *C. albicans* u poređenju sa biofilmovima vrste *C. glabrata*.

Porast rezistencije kvasnica na antigljivične lekove predstavlja veliki izazov za terapiju gljivičnih infekcija, posebno rekurentnih i hroničnih formi, što se najčešće objašnjava sposobnošću gljiva da proizvode biofilm. Shodno tome, deo nove strategije antigljivične terapije potencijalno može biti pospešivanje efikasnosti jednog antimikrobnog leka kombinovanjem njegovog dejstva sa drugom supstancom koja ima slične efekte. Ako bi uz to supstanca dala sinergističko dejstvo, odnosno redukovala porast sojeva otpornih na prvobitno upotrebljeni antimikotik, značaj ovog kombinovanja bi bio još veći.

S obzirom na zadovoljavajući antibiofilm efekat EUMO utvrđen u našem istraživanju, ali i na nešto slabije dejstvo antimikotika, posebno FLU koji se pokazao kao neefikasan prema zrelim biofilmovima, ispitivan je efekat kombinovanog dejstva EUMO sa oba antimikotika ponaosob na već formirane biofilme gljiva roda *Candida*. Cilj ovog ispitivanja bio je da se dođe do odgovarajuće kombinacije koja bi eventualno pospešila dejstvo FLU ili NY i tako povećala šansu za uspešnu terapiju ovim antimikoticima, posebno kada su u pitanju infekcije izazvane multirezistentnim sojevima koji uz to imaju i sposobnost produkcije biofilma. Rezultati su pokazali da su efekti bili zavisni, kako od ispitivanog soja, tako i od koncentracija ispitivanih agenasa.

Kada je u pitanju kombinovano dejstvo FLU i EUMO, dokazan je sinergistički efekat ove kombinacije kod 37,5% sojeva, i to za sojeve Ca2 i Cg4 pri koncentracijama EUMO od $2 \times$ MIK, MIK i MIK/2 sa svim testiranim koncentracijama FLU, kao i za soj Cg3 pri kombinaciji EUMO u koncentracijama od $2 \times$ MIK i MIK sa najnižom testiranom koncentracijom FLU. Posebno je značajno naglasiti sinergističko dejstvo ovih supstanci u slučaju soja Ca2 jer je FLU u kombinaciji sa EUMO uticao na redukciju zrelog biofilma, dok je njegovo samostalno dejstvo dovelo do pospešivanja produkcije biofilma. Sa druge strane, čak i kod sojeva gde je registrovana sinergistička interakcija zabeleženo je i antagonističko dejstvo navedenih supstanci koje je bilo izraženije pri kombinovanju EUMO sa FLU. Antagonizam je bio najoučljiviji kod soja Cg2 jer je bio prisutan pri svim kombinacijama EUMO i FLU, kao i kod

sojeva Ca1, Ca4 i Cg3 gde je zabeležen pri kombinaciji EUMO u koncentracijama MIK/2 i nižim sa svim testiranim koncentracijama FLU.

Što se tiče dejstva NY i EUMO, sinergistički efekat ove kombinacije je dokazan u 25% slučajeva. Kod soja Ca2 je sinergizam zabeležen pri koncentracijama $2 \times \text{MIK}$ i MIK za NY pri svim koncentracijama EUMO, dok je za soj Cg4 ova interakcija uočena pri koncentracijama od MIK/4 i nižim za NY u kombinaciji sa većinom ispitivanih koncentracija EUMO. I kod ove kombinacije agenasa je zabeležen antagonizam i to kod većine sojeva (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, Cg1 i Cg3) pri kombinaciji NY u koncentracijama $\leq \text{MIK}/4$ sa EUMO u koncentracijama $\leq \text{MIK}/2$.

Takođe se mora naglasiti da su, u sklopu ove analize, uzeta u obzir dejstva svih kombinacija koncentracija ispitivanih supstanci što omogućava bolje razumevanje njihovih interakcija. Do danas je sinergističko dejstvo na *Candida* biofilmove testirano za neke prirodne produkte kao što su pseudolarna kiselina A [292], katehini [293], peonol [289], alil izotiocijanat [294], timol i eugenol [295], karvakrol, timol i eugenol [296], alicin [297] i druge produkte biljnog porekla poput kvercetina [179] ili šikonina [298]. Do sada su jedinu studiju koja se bavila kombinovanim efektima etarskih ulja i antimikotika prema biofilmovima kvasnica roda *Candida* sproveli Jafri i Ahmad, kada je ustanovljeno sinergističko dejstvo etarskog ulja biljke *Thymus vulgaris* i timola prema multirezistentnim sojevima *C. albicans* i *C. tropicalis* [299]. Ipak, mnoge od ovih studija su izvodile klasična izračunavanja indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (FICI) koji ne pruža informacije o efektima supstanci kada deluju u nižim dozama. Ovako dobijeni rezultati ne omogućavaju sveobuhvatno razmatranje kombinovanog dejstva ispitivanih supstanci zbog čega bi se morala sprovesti i dodatna istraživanja u cilju njihove kliničke primene.

Kao što je već rečeno, terpenoidi su jedinjenja koja ulaze u sastav mnogih prirodnih produkata i predstavljaju glavne komponente i nosioce njihove antimikrobne aktivnosti. U mnogim istraživanjima je utvrđeno da ova jedinjenja mogu pospešiti dejstvo FLU na *Candida* biofilmove, pri čemu su u jednoj studiji timol, mentol i eugenol među prvima prepoznati kao supstance koje su sa ovim antimikotikom dovele do sinergističkog efekta na biofilmove kvasnica sa FICI vrednošću od 0,37 [295]. U još jednom istraživanju koje se bavilo ispitivanjem dejstva terpenoida na *Candida* biofilmove je utvrđen sinergizam eugenola i FLU kao i karvakrola i FLU [296]. Ipak, graničnom vrednošću za određivanje MIK se smatrala redukcija od 50% mase zrelog biofilma kontrola, dok su FICI vrednosti iznosile 0,374 za kombinaciju karvakrola i FLU i 0,312 pri kombinovanom delovanju eugenola i FLU. Isti kriterijum je bio primenjen u studiji u kojoj je testiran sinergistički efekat izotiocijanata i FLU,

gde je FICI iznosio između 0,132 i 0,312 [294]. U već pomenutom istraživanju kombinovanog dejstva etarskog ulja biljke *Thymus vulgaris* i timola, utvrđen je sinergizam ovih supstanci u koncentracijama vrednosti MIK/2 uz značajnu redukciju biofilma *Candida* sojeva [299]. Azijatična kiselina je, kao sastavna komponenta mnogih biljaka, takođe testirana na sinergizam sa FLU na sojevima *C. albicans* za koje je prethodno ustanovljena rezistencija na ovaj antimikotik i utvrđen je FICI u vrednosti od 0,25 uz definiciju MIK pri redukciji mase biofilma kontrola od 80% [300]. Ipak, važno je napomenuti da je u ovoj studiji ispitivano dejstvo na biofilm u fazi formiranja, a ne na zreo biofilm koji predstavlja mnogo rezistentniju formu ove ćelijske zajednice.

Ukoliko bi se za potrebe naše studije koristio metod izračunavanja FICI, dobijeni rezultati bi bili potpuno drugačiji [301]. Na primer, ako bi se u slučaju soja Ca1 za kombinaciju EUMO i NY, graničnom vrednošću MIK smatrala redukcija biofilma od 50%, dobio bi se FICI u vrednosti od 0,31, ali ako bi granična vrednost bila 90% FICI bi iznosio 1,06 i interakcija između ove dve supstance bi se smatrala antagonističkom umesto prethodno utvrđenog sinergizma. Na osnovu toga se može zaključiti da rezultati mogu biti veoma varijabilni u zavisnosti od odabranih graničnih vrednosti i primenjene metodologije za proračun. Za potrebe naše studije je odlučeno da se primene rigorozniji kriterijumi u cilju dobijanja najvalidnijih rezultata. Ovi kriterijumi su korišćeni i zbog toga što redukcija zrelog biofilma od 50% ne podrazumeva uvek i uspešnu terapiju jer bi mogućnost recidiva sa preostalih 50% mase biofilma bila značajno veća nego kada bi ova masa iznosila 10% ili manje.

Kada se sve navedeno uzme u obzir, može se konstatovati da EUMO ima visok potencijal redukcije zrelih biofilmova multirezistentnih sojeva roda *Candida*, čak i onih čiji su biofilmovi bili rezistentni na samostalno dejstvo FLU, kao u slučaju sojeva Cg4 i Ca2, ili NY kod soja Cg4. Takođe, prethodne studije su uglavnom obuhvatale ispitivanje samo jednog ili malog broja sojeva, dok je u ovom istraživanju opservirano osam sojeva pri čemu, nakon ispitivanja sinergije testiranih supstanci, nije ustanovljena zavisnost u odnosu na vrstu. Zbog svega navedenog bi se potencijalnom dizajniranju novog terapijskog sredstva moralo pristupiti sa oprezom, s obzirom na to da je pri kombinovanju ispitivanih supstanci pored sinergizma ustanovljen i antagonizam kada su one delovale u nekim drugim koncentracijama.

6 ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata aktuelnih istraživanja kao i podataka iz referentne literature može se zaključiti da osobine kvasnica mogu uticati na pojavu hroniciteta genitalne gljivične infekcije odnosno njene rekurentne forme. Rezultati ove studije ukazuju na to da značajan procenat izolata kvasnica uzročnika genitalnih gljivičnih infekcija ima izraženu virulentnost jer poseduje sposobnost produkcije biofilma i slabije je osetljiv na antigljivične lekove. Shodno činjenici da bi ove kvasnice visoke virulentnosti predstavljale problem u tretmanu, kombinovanje antigljivičnih lekova i prirodnih supstanci bi moglo biti iskorišćeno kao osnova za buduća istraživanja potencijalnih novih terapijskih opcija. Na osnovu rezultata istraživanja ove doktorske teze mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Primenom MALDI TOF masene spektrometrije identifikovano je 150 sojeva vrste *C. albicans*, 124 NAC soja (62 *C. glabrata*, 33 *C. krusei*, 21 *C. kefyr*, 3 *C. lusitaniae*, 3 *C. norvengensis* i 2 *C. parapsilosis*), kao i 26 sojeva ne-*Candida* kvasnica determinisanih kao vrsta *S. cerevisiae*. Uporednom analizom rezultata identifikacije vrste/roda kvasnica dobijenih primenom ISYP testa sa MALDI TOF masenom spektrometrijom, na osnovu dobijenih Kohen kappa vrednosti, utvrđeno je savršeno slaganje primenjenih metoda za vrste *C. albicans* i *C. parapsilosis*, skoro savršeno

	<p>slaganje za vrste <i>C. glabrata</i>, <i>C. krusei</i> i <i>S. cerevisiae</i>, i umereno slaganje za vrste <i>C. kefir</i> i <i>C. lusitaniae</i>.</p>
2.	<p>U ovoj studiji skoro polovina izolata je ispoljila sposobnost produkcije biofilma (138/300; 46%), što upućuje na zaključak da značajan procenat uzročnika genitalne gljivične infekcije žena poseduje ovaj faktor virulencije.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Među izolatima vrste <i>C. albicans</i> je bilo znatno više produktora biofilma (95/138; 68,84%) u odnosu na NAC vrste (36/138; 26,1%) i sojeve <i>S. cerevisiae</i> (7/138; 5,07%).
3.	<p>Ispitivanjem izolata kod kojih je ISYP testom utvrđena niža osetljivost, primenom mikrodilucione antimikogram metode potvrđeno je da ovi izolati pokazuju slabu osetljivost prema FLU i NY. Međutim, niža osetljivost prema CLO utvrđena ISYP testom nije dokazana i korišćenjem standardizovanog <i>in vitro</i> antimikogram testa.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Niža osetljivost prema FLU i NY u ISYP testu potvrđena je bujon mikrodilucinom metodom kod značajnog procenta izolata <i>C. albicans</i> [MIK za FLU ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ kod 18/19 (94,73%) sojeva i MIK za NY > 1 $\mu\text{g/ml}$ kod 19/19 (100%) sojeva], kao i kod NAC vrsta [MIK za FLU ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ kod 22/35 (62,86%) sojeva i MIK za NY > 1 $\mu\text{g/ml}$ kod 35/35 (100%) sojeva], dok niska osetljivost na FLU nije potvrđena ni kod jednog soja <i>S. cerevisiae</i>, ali je potvrđena u slučaju NY. Ispitivanjem sojeva mikrodilucionom metodom najveća razlika utvrđena je u osetljivosti na CLO, jer je niža osetljivost dokazana samo kod 5/35 (14,29%) NAC sojeva i to kod vrste <i>C. glabrata</i>.
4.	<p>Korišćenjem standardizovane mikrodilucione antimikogram metode kod svih odabranih sojeva vrste <i>C. albicans</i> zabeležene su najviše vrednosti MIK za FEN (≥ 64 $\mu\text{g/ml}$). Ove vrednosti su u slučaju NAC vrsta bile varijabilne i kretale su se između 0,5->64 $\mu\text{g/ml}$, dok je zadovoljavajuća efikasnost FEN dokazana prema svim sojevima <i>S. cerevisiae</i> (MIK ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$).</p>
5.	<p>Ispitivanjem antigljivičnog dejstva EUMO dokazana je zadovoljavajuća efikasnost prema planktonskim ćelijama izolata uzročnika VVK.</p>

- Vrednosti MIK za sojeve *C. albicans* su iznosile 0,16-1,25 mg/ml, za izolate NAC vrsta 0,31-2,5 mg/ml, dok su najniže bile za sojeve *S. cerevisiae* i kretale su se između 0,16-0,31 mg/ml.

6.

Analizom potencijalnog antibiofilm efekta pojedinačnih antimikotika i EUMO utvrđeno je da je najefikasnije dejstvo prema zrelim biofilmovima imalo EUMO sa redukcijom mase biofilma do čak 95,36%. Veoma zadovoljavajuća redukcija je postignuta i primenom NY (do 82,97%), dok je efekat FLU bio znatno slabiji pri čemu je kod pojedinih sojeva došlo i do potenciranja produkcije biofilma umesto redukovanja njegove mase.

7.

Ispitivanjem kombinovanih efekata FLU i EUMO kao i NY i EUMO prema zrelim biofilmovima utvrđeno je da su ovi efekti bili zavisni, kako od ispitivanog soja, tako i od koncentracija testiranih agenasa. Korelacija dejstva kombinovane primene EUMO i antimikotika na biofilmove sojeva različitih vrsta kvasnica nije utvrđena.

- Ispitivane kombinacije različitih koncentracija FLU i EUMO pokazale su sinergistički efekat kod 3/8 (37,5%) izolata. Kod jednog soja *C. albicans* i jednog soja *C. glabrata* sinergizam je zabeležen pri višim koncentracijama EUMO i svim koncentracijama FLU. Sinergističko dejstvo primenom viših koncentracija EUMO i najniže koncentracije FLU je bilo prisutno kod još jednog soja *C. glabrata*, s tim što se kod ovog soja beleži i antagonistička interakcija pri dejstvu nižih koncentracija EUMO u kombinaciji sa svim testiranim koncentracijama FLU.
- Analizom antibiofilm efekta NY i EUMO sinergistički efekat dokazan je kod 2/8 (25%) izolata. Kod jednog soja *C. albicans* je sinergizam zabeležen pri visokim koncentracijama NY i svim koncentracijama EUMO, dok je ova interakcija kod jednog soja *C. glabrata* uočena pri niskim koncentracijama NY u kombinaciji sa većinom ispitivanih koncentracija EUMO. Kod većine sojeva, uključujući i soj *C. albicans* kod koga je zabeležen sinergizam, utvrđen je i antagonizam ovih agenasa pri kombinaciji NY u koncentracijama $\leq \text{MIK}/4$ sa EUMO u koncentracijama $\leq \text{MIK}/2$.

8.

Hipoteza da EUMO može da ispolji određen antigljivični i antibiofilm efekat na kvasnice, uročnike VVK je dokazana. Utvrđeno je sinergističko dejstvo EUMO sa korišćenim antimikoticima, ali je u zavisnosti od primenjene koncentracije zabeležen i suprotan efekat (antagonizam). Ovakav nalaz upućuje na zaključak da bi potencijalnu primenu EUMO sa odgovarajućim antimikotikom trebalo uskladiti sa izolatom uzročnikom VVK. Dobijeni rezultati otvaraju novu perspektivu za dalja *in vivo* istraživanja koja bi dokazala odsustvo toksičnih efekata, što je preduslov za primenu kombinacije etarskih ulja i antimikotika u lečenju VVK, a prvenstveno u prevenciji razvoja rekurentne forme kao i kontroli ove infekcije.

7 LITERATURA

1. Sobel, J.D., *Vulvovaginal candidosis*. The Lancet, 2007. **369**(9577): p. 1961-1971.
2. Sobel, J.D. and P. Nyirjesy, *Oteseconazole: an advance in treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis*. Future Microbiol, 2021. **16**: p. 1453-1461.
3. Ignjatović, A., et al., *Recurrent vulvovaginal candidosis and cluster analysis of clinical signs and symptoms: A laboratory-based investigation*. Journal of Fungi, 2020. **6**(3): p. 113.
4. Anderson, M.R., K. Klink, and A. Cohrssen, *Evaluation of vaginal complaints*. Jama, 2004. **291**(11): p. 1368-79.
5. Sobel, J.D., *Genital candidiasis*. Medicine, 2005. **33**(10): p. 62-65.
6. Blostein, F., et al., *Recurrent vulvovaginal candidiasis*. Ann Epidemiol, 2017. **27**(9): p. 575-582.e3.
7. Martin, D.H., *The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease*. The American journal of the medical sciences, 2012. **343**(1): p. 2-9.
8. Cauchie, M., S. Desmet, and K. Lagrou, *Candida and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen*. Research in microbiology, 2017. **168**(9-10): p. 802-810.
9. Barousse, M., et al., *Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents*. Sexually transmitted infections, 2004. **80**(1): p. 48.

10. Farage, M. and H. Maibach, *Lifetime changes in the vulva and vagina*. Archives of gynecology and obstetrics, 2006. **273**: p. 195-202.
11. Kalia, N., J. Singh, and M. Kaur, *Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2020. **19**(1): p. 5.
12. Drell, T., et al., *Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54379.
13. Nwadioha, I., et al., *Risk factors for vaginal candidiasis among women attending primary health care centers of Jos, Nigeria*. J Clin Med Rese, 2010. **2**.
14. Gonçalves, B., et al., *Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors*. Critical reviews in microbiology, 2016. **42**(6): p. 905-927.
15. Ascioğlu, S., et al., *Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(1): p. 7-14.
16. Beigi, R.H., et al., *Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study*. Obstet Gynecol, 2004. **104**(5 Pt 1): p. 926-30.
17. Bertholf, M.E. and M.J. Stafford, *Colonization of Candida albicans in vagina, rectum, and mouth*. J Fam Pract, 1983. **16**(5): p. 919-24.
18. Ferrer, J., *Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors*. Int J Gynaecol Obstet, 2000. **71 Suppl 1**: p. S21-7.
19. Sobel, J.D., et al., *Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **178**(2): p. 203-11.
20. Nyirjesy, P., et al., *Evaluation of vulvovaginal symptoms and Candida colonization in women with type 2 diabetes mellitus treated with canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor*. Curr Med Res Opin, 2012. **28**(7): p. 1173-8.
21. Daniel, H.M., M.A. Lachance, and C.P. Kurtzman, *On the reclassification of species assigned to Candida and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014. **106**(1): p. 67-84.
22. Kurtzman, C.P. and C.J. Robnett, *Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species*. FEMS Yeast Res, 2013. **13**(1): p. 23-33.
23. Stavrou, A.A., et al., *The changing spectrum of Saccharomycotina yeasts causing candidemia: phylogeny mirrors antifungal susceptibility patterns for azole drugs and amphotericin B*. FEMS Yeast Res, 2019. **19**(4).

24. Gill, F.B., B. Slikas, and F.H. Sheldon, *Phylogeny of titmice (Paridae): II. Species relationships based on sequences of the mitochondrial cytochrome-b gene*. The Auk, 2005. **122**(1): p. 121-143.
25. Du, H., et al., *Candida auris: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence*. PLoS Pathog, 2020. **16**(10): p. e1008921.
26. Borman, A.M. and E.M. Johnson, *Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2018 to 2019*. J Clin Microbiol, 2021. **59**(2).
27. Kidd, S.E., A. Abdolrasouli, and F. Hagen, *Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game*. Open Forum Infectious Diseases, 2023. **10**(1).
28. Aucott, J.N., et al., *Invasive Infection with Saccharomyces cerevisiae: Report of Three Cases and Review*. Reviews of Infectious Diseases, 1990. **12**(3): p. 406-411.
29. Popiel, K.Y., et al., *Invasive Saccharomyces cerevisiae in a liver transplant patient: case report and review of infection in transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2015. **17**(3): p. 435-41.
30. Decherf, A., et al., *Recovery of Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 in Vaginal Samples of Healthy Women after Oral Administration*. Nutrients, 2020. **12**(8).
31. SOBEL, J.D., *Candidal vulvovaginitis*. Clinical obstetrics and gynecology, 1993. **36**(1): p. 153-165.
32. Odds, F.C., *Ecology and epidemiology of Candida species*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A, 1984. **257**(2): p. 207-12.
33. Poulain, D., *Candida albicans, plasticity and pathogenesis*. Crit Rev Microbiol, 2015. **41**(2): p. 208-17.
34. Chaffin, W.L., et al., *Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 130-80.
35. Lv, Q.Z., L. Yan, and Y.Y. Jiang, *The synthesis, regulation, and functions of sterols in Candida albicans: Well-known but still lots to learn*. Virulence, 2016. **7**(6): p. 649-59.
36. Sudbery, P., N. Gow, and J. Berman, *The distinct morphogenic states of Candida albicans*. Trends Microbiol, 2004. **12**(7): p. 317-24.
37. Kadosh, D. and V. Mundodi, *A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in Candida Species*. J Fungi (Basel), 2020. **6**(1).
38. Thompson, D.S., P.L. Carlisle, and D. Kadosh, *Coevolution of morphology and virulence in Candida species*. Eukaryot Cell, 2011. **10**(9): p. 1173-82.

39. Staib, P. and J. Morschhäuser, *Chlamyospore formation in Candida albicans and Candida dubliniensis--an enigmatic developmental programme*. Mycoses, 2007. **50**(1): p. 1-12.
40. Chabasse, D., et al., [*Candida albicans chlamyospores observed in vivo in a patient with AIDS*]. Ann Biol Clin (Paris), 1988. **46**(10): p. 817-8.
41. Tamura, N.K., et al., [*Virulence factors for Candida spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands*]. Rev Soc Bras Med Trop, 2007. **40**(1): p. 91-3.
42. Silva, S., et al., *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(2): p. 288-305.
43. King, R.D., J.C. Lee, and A.L. Morris, *Adherence of Candida albicans and other Candida species to mucosal epithelial cells*. Infect Immun, 1980. **27**(2): p. 667-74.
44. Vidotto, V., et al., *Adherence of Candida albicans and Candida dubliniensis to buccal and vaginal cells*. Rev Iberoam Micol, 2003. **20**(2): p. 52-4.
45. Demirezen, S., O.O. Dirlik, and M.S. Beksaç, *The association of Candida infection with intrauterine contraceptive device*. Cent Eur J Public Health, 2005. **13**(1): p. 32-4.
46. Verstrepen, K.J. and F.M. Klis, *Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts*. Mol Microbiol, 2006. **60**(1): p. 5-15.
47. Chaffin, W.L., *Candida albicans cell wall proteins*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(3): p. 495-544.
48. Hoyer, L.L., et al., *Discovering the secrets of the Candida albicans agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit*. Med Mycol, 2008. **46**(1): p. 1-15.
49. Cheng, G., et al., *Comparison between Candida albicans agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1656-63.
50. Alves, C.T., et al., *Candida albicans promotes invasion and colonisation of Candida glabrata in a reconstituted human vaginal epithelium*. J Infect, 2014. **69**(4): p. 396-407.
51. Butler, G., et al., *Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 657-62.
52. Hoyer, L.L., et al., *Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans Candida and phylogenetic analysis of the ALS family*. Genetics, 2001. **157**(4): p. 1555-67.
53. Rodríguez-Cerdeira, C., et al., *Biofilms and vulvovaginal candidiasis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019. **174**: p. 110-125.

54. Schaller, M., et al., *Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans*. Mycoses, 2005. **48**(6): p. 365-77.
55. Pichová, I., et al., *Secreted aspartic proteases of Candida albicans, Candida tropicalis, Candida parapsilosis and Candida lusitaniae. Inhibition with peptidomimetic inhibitors*. Eur J Biochem, 2001. **268**(9): p. 2669-77.
56. Odds, F.C., *Secreted proteinases and Candida albicans virulence*. Microbiology (Reading), 2008. **154**(Pt 11): p. 3245-3246.
57. Merkerová, M., et al., *Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from Candida parapsilosis*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(7): p. 1018-26.
58. Togni, G., et al., *Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast Candida tropicalis*. FEBS Lett, 1991. **286**(1-2): p. 181-5.
59. Zaugg, C., et al., *Secreted aspartic proteinase family of Candida tropicalis*. Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 405-12.
60. Chakrabarti, A., N. Nayak, and P. Talwar, *In vitro proteinase production by Candida species*. Mycopathologia, 1991. **114**(3): p. 163-8.
61. Williams, D.W., et al., *Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention*. Periodontol 2000, 2011. **55**(1): p. 250-65.
62. Samaranyake, Y.H., et al., *Differential phospholipase gene expression by Candida albicans in artificial media and cultured human oral epithelium*. Apmis, 2006. **114**(12): p. 857-66.
63. Ghannoum, M.A., *Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(1): p. 122-43, table of contents.
64. Stehr, F., et al., *Expression analysis of the Candida albicans lipase gene family during experimental infections and in patient samples*. FEMS Yeast Res, 2004. **4**(4-5): p. 401-8.
65. Luo, G., et al., *Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in Candida glabrata and its possible role in in vitro haemolysin production*. Apmis, 2004. **112**(4-5): p. 283-90.
66. Mroczyńska, M. and A. Brillowska-Dąbrowska, *Virulence of Clinical Candida Isolates*. Pathogens, 2021. **10**(4).
67. Iliev, I.D. and D.M. Underhill, *Striking a balance: fungal commensalism versus pathogenesis*. Current opinion in microbiology, 2013. **16**(3): p. 366-373.

68. Kumamoto, C.A. and M.D. Vences, *Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to Candida albicans virulence*. Cell Microbiol, 2005. **7**(11): p. 1546-54.
69. Jayatilake, J., et al., *Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of Candida albicans, and non-albicans Candida species in reconstituted human oral epithelium*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2006. **35**(8): p. 484-491.
70. Hostetter, M.K., *Adhesins and ligands involved in the interaction of Candida spp. with epithelial and endothelial surfaces*. Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(1): p. 29-42.
71. Hube, B., et al., *Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of Candida albicans attenuates virulence*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3529-38.
72. Mayer, F.L., D. Wilson, and B. Hube, *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence, 2013. **4**(2): p. 119-128.
73. Biswas, S., P. Van Dijck, and A. Datta, *Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of Candida albicans*. Microbiology and molecular biology reviews, 2007. **71**(2): p. 348-376.
74. Sosinska, G.J., et al., *Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of Candida albicans grown under vagina-simulative conditions*. Microbiology, 2008. **154**(2): p. 510-520.
75. Ene, I.V., et al., *Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen*. Cellular microbiology, 2012. **14**(9): p. 1319-1335.
76. Spear, G.T., et al., *Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus*. The Journal of infectious diseases, 2014. **210**(7): p. 1019-1028.
77. Boris, S. and C. Barbés, *Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens*. Microbes and infection, 2000. **2**(5): p. 543-546.
78. Noverr, M.C. and G.B. Huffnagle, *Regulation of Candida albicans morphogenesis by fatty acid metabolites*. Infection and immunity, 2004. **72**(11): p. 6206-6210.
79. Niu, X.-X., et al., *Lactobacillus crispatus modulates vaginal epithelial cell innate response to Candida albicans*. Chinese Medical Journal, 2017. **130**(03): p. 273-279.
80. Park, S.J., et al., *Influence of bacterial presence on biofilm formation of Candida albicans*. Yonsei medical journal, 2014. **55**(2): p. 449-458.

81. Peters, B.M., et al., *Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during Candida albicans vaginitis*. Infection and immunity, 2014. **82**(2): p. 532-543.
82. Vazquez, J.A., et al., *Karyotyping of Candida albicans isolates obtained longitudinally in women with recurrent vulvovaginal candidiasis*. Journal of Infectious Diseases, 1994. **170**(6): p. 1566-1569.
83. Hirakawa, M.P., et al., *Genetic and phenotypic intra-species variation in Candida albicans*. Genome Res, 2015. **25**(3): p. 413-25.
84. Bradford, L.L., et al., *Vaginal Candida spp. genomes from women with vulvovaginal candidiasis*. Pathog Dis, 2017. **75**(6).
85. Bartie, K.L., et al., *Differential invasion of Candida albicans isolates in an in vitro model of oral candidosis*. Oral Microbiol Immunol, 2004. **19**(5): p. 293-6.
86. Priest, S.J. and M.C. Lorenz, *Characterization of Virulence-Related Phenotypes in Candida Species of the CUG Clade*. Eukaryot Cell, 2015. **14**(9): p. 931-40.
87. Moreira, D., et al., *Difference Between the Profiles Presented by Yeasts that Colonize the Vaginal Mucosa or Cause Primary or Recurrent Candidiasis*. Mycopathologia, 2021. **186**(3): p. 411-421.
88. Vermitsky, J.P., et al., *Survey of vaginal-flora Candida species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4): p. 1501-3.
89. Nwokolo, N.C. and F.C. Boag, *Chronic vaginal candidiasis. Management in the postmenopausal patient*. Drugs Aging, 2000. **16**(5): p. 335-9.
90. Lema, V., *Recurrent Vulvo-Vaginal Candidiasis: Diagnostic and Management Challenges in a Developing Country Context*. Obstetrics & Gynecology International Journal, 2017. **7**.
91. Makanjuola, O., F. Bongomin, and S.A. Fayemiwo, *An update on the roles of non-albicans Candida species in vulvovaginitis*. Journal of Fungi, 2018. **4**(4): p. 121.
92. Banerjee, M., et al., *Filamentation Is Associated with Reduced Pathogenicity of Multiple Non-albicans Candida Species*. mSphere, 2019. **4**(5).
93. Tóth, R., et al., *Investigation of Candida parapsilosis virulence regulatory factors during host-pathogen interaction*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1346.
94. Gaziano, R., et al., *Saccharomyces cerevisiae-Based Probiotics as Novel Antimicrobial Agents to Prevent and Treat Vaginal Infections*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 718.

95. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 167-93.
96. Gulati, M. and C.J. Nobile, *Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms*. Microbes Infect, 2016. **18**(5): p. 310-21.
97. Nobile, C.J. and A.D. Johnson, *Candida albicans Biofilms and Human Disease*. Annu Rev Microbiol, 2015. **69**: p. 71-92.
98. Andes, D., et al., *Development and characterization of an in vivo central venous catheter Candida albicans biofilm model*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 6023-31.
99. Johnson, C.C., et al., *Development of a contemporary animal model of Candida albicans-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system*. Infect Immun, 2012. **80**(5): p. 1736-43.
100. Nett, J.E., et al., *Rat indwelling urinary catheter model of Candida albicans biofilm infection*. Infect Immun, 2014. **82**(12): p. 4931-40.
101. Harriott, M.M., et al., *Candida albicans forms biofilms on the vaginal mucosa*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 12): p. 3635.
102. Dongari-Bagtzoglou, A., et al., *Characterization of mucosal Candida albicans biofilms*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7967.
103. Řičicová, M., et al., *Candida albicans biofilm formation in a new in vivo rat model*. Microbiology (Reading), 2010. **156**(Pt 3): p. 909-919.
104. Schinabeck, M.K., et al., *Rabbit model of Candida albicans biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(5): p. 1727-32.
105. Shuford, J.A., et al., *Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against Candida albicans biofilms in an experimental intravascular catheter infection model*. J Infect Dis, 2006. **194**(5): p. 710-3.
106. Ramage, G., et al., *Denture stomatitis: a role for Candida biofilms*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **98**(1): p. 53-9.
107. Lazzell, A.L., et al., *Treatment and prevention of Candida albicans biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis*. J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(3): p. 567-70.
108. Lohse, M.B., et al., *Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(1): p. 19-31.

109. Swidsinski, A., et al., *Vulvovaginal candidiasis: histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms*. American journal of obstetrics and gynecology, 2019. **220**(1): p. 91. e1-91. e8.
110. Paiva, L.C., et al., *Assessment of in vitro biofilm formation by Candida species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics*. Micron, 2012. **43**(2-3): p. 497-502.
111. Finkel, J.S. and A.P. Mitchell, *Genetic control of Candida albicans biofilm development*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(2): p. 109-18.
112. Nobile, C.J., et al., *Complementary adhesin function in C. albicans biofilm formation*. Curr Biol, 2008. **18**(14): p. 1017-24.
113. Nobile, C.J., et al., *A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 126-38.
114. Fidel, P.L., Jr., *Immunity in vaginal candidiasis*. Curr Opin Infect Dis, 2005. **18**(2): p. 107-11.
115. Muzny, C.A. and J.R. Schwebke, *Biofilms: an underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections*. Clinical Infectious Diseases, 2015. **61**(4): p. 601-606.
116. Uppuluri, P., et al., *Dispersion as an important step in the Candida albicans biofilm developmental cycle*. PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000828.
117. Murray, M.P., R. Zinchuk, and D.H. Larone, *CHROMagar Candida as the sole primary medium for isolation of yeasts and as a source medium for the rapid-assimilation-of-trehalose test*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(3): p. 1210-2.
118. Marinho, S.A., et al., *Identification of Candida spp. by phenotypic tests and PCR*. Braz J Microbiol, 2010. **41**(2): p. 286-94.
119. Bicmen, C., et al., *Species level identification and antifungal susceptibility of yeasts isolated from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts Plus*. New Microbiol, 2012. **35**(3): p. 327-34.
120. Chokoeva, A., et al., *Investigation on antifungal susceptibility of candida yeasts in pregnant patients with confirmed vulvovaginal candidiasis and their newborns*. Akush Ginekol (Sofiiia), 2016. **55**(4): p. 20-29.
121. Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules*. Analytical Chemistry, 1985. **57**(14): p. 2935-2939.

122. Singhal, N., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 791.
123. Li, X., et al., *MALDI-TOF-MS analysis of small molecules using modified mesoporous material SBA-15 as assisted matrix*. J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(11): p. 2167-73.
124. Hou, T.Y., C. Chiang-Ni, and S.H. Teng, *Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology*. J Food Drug Anal, 2019. **27**(2): p. 404-414.
125. Marklein, G., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(9): p. 2912-7.
126. Foessleitner, P., et al., *Validation of the SavvyCheck™ Vaginal Yeast Test for Screening Pregnant Women for Vulvovaginal Candidosis: A Prospective, Cross-Sectional Study*. J Fungi (Basel), 2021. **7**(3).
127. Pfaller, M.A., et al., *Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against Candida spp.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2014. **79**(2): p. 198-204.
128. Marr, K.A., et al., *Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(1): p. 52-9.
129. Melhem, M.S., et al., *Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species*. Braz J Microbiol, 2013. **44**(4): p. 1257-66.
130. Nyirjesy, P. and J.D. Sobel, *Vulvovaginal candidiasis*. Obstetrics and Gynecology Clinics, 2003. **30**(4): p. 671-684.
131. Workowski, K.A. and G.A. Bolan, *Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015*. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports, 2015. **64**(RR-03): p. 1.
132. Denison, H.J., et al., *Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2020(8).
133. Mendling, W., *Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis)*. Mycoses, 2015. **58**: p. 1-15.
134. Nyirjesy, P., et al., *Vulvovaginal candidiasis: a review of the evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections*

- Treatment Guidelines*. Clinical Infectious Diseases, 2022. **74**(Supplement_2): p. S162-S168.
135. Pappas, P.G., et al., *Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America*. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2009. **48**(5): p. 503.
136. Seidman, L.S. and C.K. Skokos, *An evaluation of Butoconazole nitrate 2% Site Release® vaginal cream (Gynazole-1®) compared to fluconazole 150 mg tablets (Diflucan®) in the time to relief of symptoms in patients with vulvovaginal candidiasis*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 2005. **13**: p. 197-206.
137. Young, G., et al., *Topical treatment for vaginal candidiasis (thrush) in pregnancy*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 1996. **2013**(2).
138. Matsubara, V.H., et al., *Probiotic lactobacilli inhibit early stages of Candida albicans biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation*. Applied microbiology and biotechnology, 2016. **100**: p. 6415-6426.
139. Stabile, G., et al. *A new therapy for uncomplicated vulvovaginal candidiasis and its impact on vaginal flora*. in *Healthcare*. 2021. MDPI.
140. Satora, M., et al., *Treatment of Vulvovaginal Candidiasis-An Overview of Guidelines and the Latest Treatment Methods*. J Clin Med, 2023. **12**(16).
141. Mirzaeei, S., et al., *Chlorhexidine, clotrimazole, metronidazole and combination therapy in the treatment of vaginal infections*. J Med Life, 2021. **14**(2): p. 250-256.
142. Cacaci, M., et al., *New Data on the In Vitro Activity of Fenticonazole against Fluconazole-Resistant Candida Species*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(12).
143. Bauters, T.G., et al., *Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women*. American journal of obstetrics and gynecology, 2002. **187**(3): p. 569-574.
144. Richter, S.S., et al., *Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(5): p. 2155-2162.
145. Farr, A., et al., *Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k)*. Mycoses, 2021. **64**(6): p. 583-602.
146. Sobel, J.D., et al., *Treatment of vaginitis caused by Candida glabrata: use of topical boric acid and flucytosine*. American journal of obstetrics and gynecology, 2003. **189**(5): p. 1297-1300.

147. Shann, S. and J. Wilson, *Treatment of Candida glabrata using topical amphotericin B and flucytosine*. Sexually transmitted infections, 2003. **79**(3): p. 265.
148. Moran, G.P., et al., *Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in Candida dubliniensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998. **42**(7): p. 1819-1830.
149. Singh, S., et al., *Vaginitis due to Candida krusei: epidemiology, clinical aspects, and therapy*. Clinical infectious diseases, 2002. **35**(9): p. 1066-1070.
150. Donders, G., et al., *Management of recurrent vulvovaginal candidosis: Narrative review of the literature and European expert panel opinion*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022: p. 1257.
151. Lirio, J., et al., *Antifungal (oral and vaginal) therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review protocol*. BMJ open, 2019. **9**(5).
152. Sobel, J.D., et al., *Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(9): p. 876-883.
153. Cooke, G., et al., *Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2022(1).
154. Philips, N., et al., *Identification of benzene metabolites in dermal fibroblasts as nonphenolic: regulation of cell viability, apoptosis, lipid peroxidation and expression of matrix metalloproteinase 1 and elastin by benzene metabolites*. Skin pharmacology and physiology, 2004. **17**(3): p. 147-152.
155. Brand, S.R., et al., *A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study to evaluate the efficacy and safety of orally administered VT-1161 in the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis*. Am J Obstet Gynecol, 2018. **218**(6): p. 624.e1-624.e9.
156. Gamal, A., et al., *Ibrexafungerp, a Novel Oral Triterpenoid Antifungal in Development: Overview of Antifungal Activity Against Candida glabrata*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 642358.
157. Azie, N., et al., *Oral Ibrexafungerp: an investigational agent for the treatment of vulvovaginal candidiasis*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2020. **29**(9): p. 893-900.
158. Sobel, J.D., *New Antifungals for Vulvovaginal Candidiasis: What Is Their Role?* Clinical Infectious Diseases, 2023. **76**(5): p. 783-785.
159. Süntar, I., *Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants*. Phytochemistry Reviews, 2020. **19**.

160. Bonifácio, B.V., et al., *Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1-15.
161. Wang, W., et al., *Advances and challenges in medicinal plant breeding*. Plant Sci, 2020. **298**: p. 110573.
162. Koşar, M., et al., *Effect of Maturation on the Composition and Biological Activity of the Essential Oil of a Commercially Important Satureja Species from Turkey: Satureja cuneifolia Ten. (Lamiaceae)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(6): p. 2260-2265.
163. Petrisor, G., et al., *Melissa officinalis: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems-A Review*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(7).
164. Bakkali, F., et al., *Biological effects of essential oils--a review*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(2): p. 446-75.
165. Shakeri, A., A. Sahebkar, and B. Javadi, *Melissa officinalis L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*. J Ethnopharmacol, 2016. **188**: p. 204-28.
166. Moradkhani, H., et al., *Melissa officinalis L., a valuable medicine plant*. J. Med. Plants Res, 2010. **4**: p. 2753-2759.
167. Sofowora, A., E. Ogunbodede, and A. Onayade, *The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention*. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013. **10**(5): p. 210-29.
168. Oliveira, S.G.D., et al., *An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System*. Journal of ethnopharmacology, 2012. **140**(2): p. 428-437.
169. Budzyńska, A., et al., *Activity of Selected Essential Oils against Candida spp. strains. Evaluation of New Aspects of their Specific Pharmacological Properties, with Special Reference to Lemon Balm*. Advances in Microbiology, 2013. **03**: p. 317-325.
170. Ehsani, A., et al. *Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of Melissa officinalis and Dracocephalum moldavica essential oils*. in *Veterinary Research Forum*. 2017. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
171. Serra, E., et al., *Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against Candida albicans*. Pathogens, 2018. **7**(1): p. 15.
172. Pourghanbari, G., et al., *Antiviral activity of the oseltamivir and Melissa officinalis L. essential oil against avian influenza A virus (H9N2)*. Virusdisease, 2016. **27**(2): p. 170-8.

173. Budzyńska, A., et al., *Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components*. Pol J Microbiol, 2011. **60**(1): p. 35-41.
174. Cosa, S., et al., *Exploring Common Culinary Herbs and Spices as Potential Anti-Quorum Sensing Agents*. Nutrients, 2019. **11**(4).
175. Tulasidas, S., et al., *A study on biofilm production and antifungal drug resistance among Candida species from vulvovaginal and bloodstream infections*. Infection and Drug Resistance, 2018: p. 2443-2448.
176. Sherry, L., et al., *Biofilms formed by isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2017. **61**(9): p. 10.1128/aac. 01065-17.
177. Shanmughapriya, S., et al., *Synergistic effect of amphotericin B and tyrosol on biofilm formed by Candida krusei and Candida tropicalis from intrauterine device users*. Medical mycology, 2014. **52**(8): p. 853-861.
178. Khan, M.S.A. and I. Ahmad, *Antibiofilm activity of certain phytocompounds and their synergy with fluconazole against Candida albicans biofilms*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. **67**(3): p. 618-621.
179. Gao, M., H. Wang, and L. Zhu, *Quercetin assists fluconazole to inhibit biofilm formations of fluconazole-resistant Candida albicans in in vitro and in vivo antifungal managements of vulvovaginal candidiasis*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2016. **40**(3-4): p. 727-742.
180. Tran, H.N., et al., *Recent advances in the application of essential oils as potential therapeutic candidates for candida-related infections*. Applied Microbiology, 2022. **2**(2): p. 397-413.
181. Mimica-Dukic, N., et al., *Antimicrobial and antioxidant activities of Melissa officinalis L.(Lamiaceae) essential oil*. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. **52**(9): p. 2485-2489.
182. Carvalho, F., A.P. Duarte, and S. Ferreira, *Antimicrobial activity of Melissa officinalis and its potential use in food preservation*. Food Bioscience, 2021. **44**: p. 101437.
183. Stepanović, S., et al., *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*. Apmis, 2007. **115**(8): p. 891-899.
184. Karpiński, T.M., et al., *Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils*. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2023. **28**(2): p. 28.

185. Malinovská, Z., *Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the Lamiaceae family against Candida albicans clinical isolates*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2021. **28**(2): p. 260-266.
186. Rinanda, T., R.P. Isnanda, and Zulfitri, *Chemical analysis of red ginger (Zingiber officinale Roscoe var rubrum) essential oil and its anti-biofilm activity against Candida albicans*. Natural Product Communications, 2018. **13**(12): p. 1934578X1801301206.
187. Stojanović-Radić, Z., et al., *Anticandidal activity of Inula helenium root essential oil: Synergistic potential, anti-virulence efficacy and mechanism of action*. Industrial crops and products, 2020. **149**: p. 112373.
188. PA, W., *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA: 2008*. CLSI document M27.
189. Adams, R.P., *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4 online ed.* Carol Stream Illinois, USA: Allured Publishing Co, 2007.
190. Nelson, M., W. Wanjiru, and M. Margaret, *Identification and susceptibility profile of vaginal Candida species to antifungal agents among pregnant women attending the antenatal clinic of Thika District Hospital, Kenya*. Open Journal of Medical Microbiology, 2013. **2013**.
191. Fidel, P.L., Jr., J.A. Vazquez, and J.D. Sobel, *Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(1): p. 80-96.
192. Kennedy, M.A. and J.D. Sobel, *Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-albicans Candida Species: New Insights*. Curr Infect Dis Rep, 2010. **12**(6): p. 465-70.
193. Shi, Y., et al., *Molecular identification and antifungal susceptibility profile of yeast from vulvovaginal candidiasis*. BMC infectious diseases, 2020. **20**: p. 1-10.
194. Deorukhkar, S.C., S. Saini, and S. Mathew, *Non-albicans Candida Infection: An Emerging Threat*. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2014. **2014**: p. 615958.
195. Babic, M. and M. Hukic, *Candida albicans and non-albicans species as etiological agent of vaginitis in pregnant and non-pregnant women*. Bosn J Basic Med Sci, 2010. **10**(1): p. 89-97.
196. Dan, M., F. Poch, and D. Levin, *High rate of vaginal infections caused by non-C. albicans Candida species among asymptomatic women*. Med Mycol, 2002. **40**(4): p. 383-6.

197. Bitew, A. and Y. Abebaw, *Vulvovaginal candidiasis: species distribution of Candida and their antifungal susceptibility pattern*. BMC women's health, 2018. **18**(1): p. 1-10.
198. Choukri, F., M. Benderdouche, and P. Sednaoui, *In vitro susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of Candida spp. to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents*. Journal de mycologie médicale, 2014. **24**(4): p. 303-307.
199. Spinillo, A., et al., *Frequency and significance of drug resistance in vulvovaginal candidiasis*. Gynecol Obstet Invest, 1994. **38**(2): p. 130-3.
200. Powell, A.M., E. Gracely, and P. Nyirjesy, *Non-albicans Candida Vulvovaginitis: Treatment Experience at a Tertiary Care Vaginitis Center*. J Low Genit Tract Dis, 2016. **20**(1): p. 85-9.
201. Ray, D., et al., *Prevalence of Candida glabrata and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 312-7.
202. Hamad, M., et al., *Prevalence and epidemiological characteristics of vaginal candidiasis in the UAE*. Mycoses, 2014. **57**(3): p. 184-90.
203. Spinillo, A., et al., *Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **176**(1 Pt 1): p. 138-41.
204. Moyes, D.L., et al., *Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to Candida albicans and Candida dubliniensis hyphae*. Med Microbiol Immunol, 2012. **201**(1): p. 93-101.
205. Willems, H.M.E., et al., *Comparative Analysis of the Capacity of the Candida Species To Elicit Vaginal Immunopathology*. Infect Immun, 2018. **86**(12).
206. Larsen, B. and G.R. Monif, *Understanding the bacterial flora of the female genital tract*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(4): p. e69-77.
207. Pericolini, E., et al., *Therapeutic activity of a Saccharomyces cerevisiae-based probiotic and inactivated whole yeast on vaginal candidiasis*. Virulence, 2017. **8**(1): p. 74-90.
208. Papaemmanouil, V., et al., *Prevalence and susceptibility of Saccharomyces cerevisiae causing vaginitis in Greek women*. Anaerobe, 2011. **17**(6): p. 298-299.
209. Echeverría-Irigoyen, M.J., et al., *Saccharomyces cerevisiae vaginitis: microbiology and in vitro antifungal susceptibility*. Mycopathologia, 2011. **172**(3): p. 201-5.
210. Gabaldón, T. and C. Fairhead, *Genomes shed light on the secret life of Candida glabrata: not so asexual, not so commensal*. Curr Genet, 2019. **65**(1): p. 93-98.

211. Borman, A.M., et al., *Fluconazole Resistance in Isolates of Uncommon Pathogenic Yeast Species from the United Kingdom*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(8).
212. Borman, A.M., et al., *MIC distributions for amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, flucytosine and anidulafungin and 35 uncommon pathogenic yeast species from the UK determined using the CLSI broth microdilution method*. J Antimicrob Chemother, 2020. **75**(5): p. 1194-1205.
213. Parazzini, F., et al., *Determinants of different Candida species infections of the genital tract in women*. Sporachrom Study Geoup. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000. **93**(2): p. 141-5.
214. Szweda, P., et al., *Evaluation of possibilities in identification and susceptibility testing for Candida glabrata clinical isolates with the Integral System Yeast Plus (ISYP)*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2014. **61**(2): p. 161-72.
215. Barati, M., et al., *Validation of integral system yeast plus for rapid identification and determination of antifungal susceptibility profile of clinically important Candida species*. 2018: p. 1-4.
216. Haleim, M., et al., *Prevalence of Candida Non albicans Species Associated with Vulvovaginal Candidiasis in Egyptian Women*. International journal of health sciences, 2015. **Vol 2**: p. 304-313.
217. van Riel, S.J., et al., *Treating (Recurrent) Vulvovaginal Candidiasis with Medical-Grade Honey—Concepts and Practical Considerations*. Journal of Fungi, 2021. **7**(8): p. 664.
218. Parahitiyawa, N., et al., *Interspecies variation in Candida biofilm formation studied using the Calgary biofilm device*. Apmis, 2006. **114**(4): p. 298-306.
219. Silva, S., et al., *Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition*. Med Mycol, 2009. **47**(7): p. 681-9.
220. Dabiri, S., M. Shams-Ghahfarokhi, and M. Razzaghi-Abyaneh, *Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in Candida species isolated from clinical specimens*. Journal de Mycologie MÚdicale, 2018. **28**(3): p. 437-442.
221. Bizerra, F.C., et al., *Characteristics of biofilm formation by Candida tropicalis and antifungal resistance*. FEMS Yeast Res, 2008. **8**(3): p. 442-50.
222. Kuhn, D.M., et al., *Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 878-88.

223. Pannanusorn, S., V. Fernandez, and U. Römling, *Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of Candida species causing bloodstream infection*. *Mycoses*, 2013. **56**(3): p. 264-272.
224. Tumbarello, M., et al., *Biofilm production by Candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia*. *Journal of clinical microbiology*, 2007. **45**(6): p. 1843-1850.
225. Kumar, C.P. and T. Menon, *Biofilm production by clinical isolates of Candida species*. *Med Mycol*, 2006. **44**(1): p. 99-101.
226. Shin, J.H., et al., *Biofilm production by isolates of Candida species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources*. *Journal of clinical microbiology*, 2002. **40**(4): p. 1244-1248.
227. Bruder-Nascimento, A., et al., *Candida species biofilm and Candida albicans ALS3 polymorphisms in clinical isolates*. *Brazilian journal of microbiology*, 2014. **45**: p. 1371-1377.
228. Hasan, F., et al., *Biofilm formation in clinical Candida isolates and its association with virulence*. *Microbes and infection*, 2009. **11**(8-9): p. 753-761.
229. Sobel, J.D., *Editorial commentary: vaginal biofilm: much ado about nothing, or a new therapeutic challenge?* 2015, Oxford University Press. p. 607-608.
230. Kean, R., et al., *Gaining insights from Candida biofilm heterogeneity: one size does not fit all*. *Journal of Fungi*, 2018. **4**(1): p. 12.
231. Rodríguez-Cerdeira, C., et al., *Pathogenesis and clinical relevance of Candida biofilms in vulvovaginal candidiasis*. *Frontiers in Microbiology*, 2020. **11**: p. 544480.
232. McKloud, E., et al., *Recurrent vulvovaginal candidiasis: a dynamic interkingdom biofilm disease of Candida and Lactobacillus*. *Msystems*, 2021. **6**(4): p. 10.1128/msystems.00622-21.
233. Wu, X., et al., *Biofilm formation of Candida albicans facilitates fungal infiltration and persister cell formation in vaginal candidiasis*. *Frontiers in microbiology*, 2020. **11**: p. 1117.
234. Taff, H.T., et al., *Mechanisms of Candida biofilm drug resistance*. *Future microbiology*, 2013. **8**(10): p. 1325-1337.
235. Sabbatini, S., et al., *Lactobacillus iners cell-free supernatant enhances biofilm formation and hyphal/pseudohyphal growth by Candida albicans vaginal isolates*. *Microorganisms*, 2021. **9**(12): p. 2577.

236. Alikhani, T., et al., *Drug Resistance and Biofilm Formation in Candida Species of Vaginal Origin*. Iran J Public Health, 2022. **51**(4): p. 913-918.
237. Delaney, C., et al., *An integrated transcriptomic and metabolomic approach to investigate the heterogeneous Candida albicans biofilm phenotype*. Biofilm, 2023. **5**: p. 100112.
238. Baillie, G.S. and L.J. Douglas, *Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **46**(3): p. 397-403.
239. Araújo, D., M. Henriques, and S. Silva, *Portrait of Candida species biofilm regulatory network genes*. Trends in microbiology, 2017. **25**(1): p. 62-75.
240. Denning, D.W., et al., *Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review*. Lancet Infect Dis, 2018. **18**(11): p. e339-e347.
241. Sobel, J.D. and J.A. Vazquez, *Symptomatic vulvovaginitis due to fluconazole-resistant Candida albicans in a female who was not infected with human immunodeficiency virus*. Clinical infectious diseases, 1996. **22**(4): p. 726-727.
242. Mathema, B., et al., *Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant Candida species in college-age women with previous exposure to over-the-counter azole antifungals*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **33**(5): p. e23-e27.
243. Sobel, J., et al., *Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated Candida vaginitis: clinical implications*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2003. **47**(1): p. 34-38.
244. Morace, G., et al., *Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the national committee for clinical laboratory standards m27-a broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of Candida species*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 2953-8.
245. Hösükoğlu, F.G., et al., *An Epidemiologic Analysis of Vulvovaginal Candidiasis and Antifungal Susceptibilities*. Infectious Microbes & Diseases, 2022. **4**(3): p. 131-136.
246. El-Din, S., et al., *An investigation into the pathogenesis of vulvo-vaginal candidosis*. Sexually transmitted infections, 2001. **77**(3): p. 179-183.
247. Lynch, M. and J. Sobel, *Comparative in vitro activity of antimycotic agents against pathogenic vaginal yeast isolates*. Journal of medical and veterinary mycology, 1994. **32**(4): p. 267-274.
248. Ribeiro, M., et al., *Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil*. Mycopathologia, 2001. **151**: p. 5-10.

249. Veronese, M., D. Barzaghi, and A. Bertoncini, *Antifungal activity of fenticonazole in experimental dermatomycosis and candidiasis*. *Arzneimittelforschung*, 1981. **31**(12): p. 2137-9.
250. Jones, B.M., et al., *Comparison of the in vitro activities of fenticonazole, other imidazoles, metronidazole, and tetracycline against organisms associated with bacterial vaginosis and skin infections*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. **33**(6): p. 970-2.
251. Fernández-Alba, J., et al., *Fenticonazole nitrate for treatment of vulvovaginitis: efficacy, safety, and tolerability of 1-gram ovules, administered as ultra-short 2-day regimen*. *J Chemother*, 2004. **16**(2): p. 179-86.
252. Manth, S.M., et al., *Fenticonazole in the treatment of vaginal trichomonas infections*. *Current Therapeutic Research-clinical and Experimental*, 1989. **45**: p. 1060-1066.
253. Bukovsky, I., et al., *Fenticonazole in the treatment of vaginal trichomoniasis and vaginal mixed infections*. *Advances in Therapy*, 1991. **8**(4): p. 166-171.
254. Fontana, C., et al., *In vitro activity of fenticonazole on Trichomonas vaginalis and Gardnerella vaginalis*. *Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental*, 1990. **48**(1): p. 44-51.
255. Sanguinetti, M., et al., *In Vitro Activity of Fenticonazole against Candida and Bacterial Vaginitis Isolates Determined by Mono- or Dual-Species Testing Assays*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019. **63**(7).
256. Antonopoulou, S., et al., *Fenticonazole activity measured by the methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and CLSI against 260 Candida vulvovaginitis isolates from two European regions and annotations on the prevalent genotypes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(5): p. 2181-4.
257. Murina, F., et al., *[Short-course treatment of vulvovaginal candidiasis: comparative study of fluconazole and intra-vaginal fenticonazole]*. *Minerva Ginecol*, 2012. **64**(2): p. 89-94.
258. Brewster, E., et al., *Effect of fenticonazole in vaginal candidiasis: a double-blind clinical trial versus clotrimazole*. *J Int Med Res*, 1986. **14**(6): p. 306-10.
259. Studd, J.W., et al., *Comparative clinical trial of fenticonazole ovule (600 mg) versus clotrimazole vaginal tablet (500 mg) in the treatment of symptomatic vaginal candidiasis*. *Curr Med Res Opin*, 1989. **11**(8): p. 477-84.

260. Wiest, W., E. Azzollini, and R. Ruffmann, *Comparison of single administration with an ovule of 600 mg fenticonazole versus a 500 mg clotrimazole vaginal pessary in the treatment of vaginal candidiasis*. J Int Med Res, 1989. **17**(4): p. 369-72.
261. Lawrence, A.G., et al., *Single dose therapy of vaginal candidiasis: a comparative trial of fenticonazole vaginal ovules versus clotrimazole vaginal tablets*. Curr Med Res Opin, 1990. **12**(2): p. 114-20.
262. Karpiński, T.M., *Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals*. Biomolecules, 2020. **10**(1).
263. Hăncianu, M., et al., *Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of essential oil of Melissa officinalis L. from Romania*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2008. **112**(3): p. 843-7.
264. Raut, J.S., et al., *Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by Candida albicans*. Biofouling, 2013. **29**(1): p. 87-96.
265. Powers, C.N., et al., *Antifungal and cytotoxic activities of sixty commercially-available essential oils*. Molecules, 2018. **23**(7): p. 1549.
266. Jordán, M.J., et al., *Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of Rosmarinus officinalis L essential oil and its polyphenolic extract*. Industrial crops and products, 2013. **48**: p. 144-152.
267. Mkaddem Mounira, G., et al., *Essential Oil Composition and Antioxidant and Antifungal Activities of Two Varieties of Ocimum basilicum L. (Lamiaceae) at Two Phenological Stages*. Agronomy, 2022. **12**(4): p. 825.
268. Mumivand, H., et al., *Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oil from Thymus daenensis and Thymus fedtschenkoi During Phenological Stages*. J. Essent. Oil Bear. Plants, 2021. **24**: p. 469-479.
269. Boukhris, M., et al., *Chemical composition, biological activities and DNA damage protective effect of Pelargonium graveolens L'Hér. essential oils at different phenological stages*. Industrial Crops and Products, 2015. **74**: p. 600-606.
270. Hawser, S.P. and L.J. Douglas, *Resistance of Candida albicans biofilms to antifungal agents in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(9): p. 2128-31.
271. Chandra, J., et al., *Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance*. J Bacteriol, 2001. **183**(18): p. 5385-94.
272. Lewis, K., *Persister cells, dormancy and infectious disease*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 48-56.

273. Ramage, G., et al., *Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in Candida albicans biofilms*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(6): p. 973-80.
274. LaFleur, M.D., C.A. Kumamoto, and K. Lewis, *Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(11): p. 3839-46.
275. Seneviratne, C.J., L. Jin, and L.P. Samaranayake, *Biofilm lifestyle of Candida: a mini review*. Oral Dis, 2008. **14**(7): p. 582-90.
276. Nett, J., et al., *Putative role of beta-1,3 glucans in Candida albicans biofilm resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(2): p. 510-20.
277. Mitchell, K.F., et al., *Community participation in biofilm matrix assembly and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(13): p. 4092-7.
278. Song, J.W., et al., *Expression of CgCDR1, CgCDR2, and CgERG11 in Candida glabrata biofilms formed by bloodstream isolates*. Med Mycol, 2009. **47**(5): p. 545-8.
279. Santos, R., et al., *The multidrug resistance transporters CgTpo1_1 and CgTpo1_2 play a role in virulence and biofilm formation in the human pathogen Candida glabrata*. Cell Microbiol, 2017. **19**(5).
280. Seneviratne, C.J., et al., *Proteomics of drug resistance in Candida glabrata biofilms*. Proteomics, 2010. **10**(7): p. 1444-54.
281. Vedyappan, G., T. Rossignol, and C. d'Enfert, *Interaction of Candida albicans biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(5): p. 2096-111.
282. Ajetunmobi, O.H., et al., *Antifungal therapy of Candida biofilms: Past, present and future*. Biofilm, 2023. **5**: p. 100126.
283. Chen, X., et al., *Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilm removal in vitro*. BMC microbiology, 2020. **20**(1): p. 1-11.
284. Pourakbari, B., et al., *Expression of major efflux pumps in fluconazole-resistant Candida albicans*. Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders), 2017. **17**(3): p. 178-184.
285. Bozó, A., et al., *The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against Candida albicans isolates using a murine vulvovaginitis model*. Journal of Microbiology, 2016. **54**: p. 753-760.

286. Liu, Y., et al., *The synergistic antifungal effects of gypenosides combined with fluconazole against resistant Candida albicans via inhibiting the drug efflux and biofilm formation*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020. **130**: p. 110580.
287. Li, Y., et al., *The effect of Ginkgolide B combined with fluconazole against drug-resistant Candida albicans based on common resistance mechanisms*. International journal of antimicrobial agents, 2020. **56**(2): p. 106030.
288. Gong, Y., et al., *Antifungal activity and potential mechanism of N-butylphthalide alone and in combination with fluconazole against Candida albicans*. Frontiers in microbiology, 2019. **10**: p. 1461.
289. Pan, M., et al., *Paeonol assists fluconazole and amphotericin B to inhibit virulence factors and pathogenicity of Candida albicans*. Biofouling, 2021. **37**(8): p. 922-937.
290. Francisconi, R.S., et al., *Terpinen-4-ol and nystatin co-loaded precursor of liquid crystalline system for topical treatment of oral candidiasis*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 12984.
291. Keymaram, M., et al., *Anti-biofilm properties of eucalyptol in combination with antifungals against Candida albicans isolates in patients with hematological malignancy*. Archives of Microbiology, 2022. **204**(6): p. 295.
292. Zhu, B., et al., *Synergistic antibiofilm effects of pseudolaric acid A combined with fluconazole against Candida albicans via inhibition of adhesion and yeast-to-hypha transition*. Microbiology Spectrum, 2022. **10**(2): p. e01478-21.
293. Hervay, N.T., et al., *Catechin potentiates the antifungal effect of miconazole in Candida glabrata*. Folia Microbiologica, 2023: p. 1-8.
294. Raut, J.S., et al., *Activity of allyl isothiocyanate and its synergy with fluconazole against Candida albicans biofilms*. J. Microbiol. Biotechnol, 2017. **27**(4): p. 685-693.
295. Pemmaraju, S.C., et al., *Candida albicans biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole*. 2013.
296. Doke, S.K., et al., *Sensitization of Candida albicans biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin*. The Journal of general and applied microbiology, 2014. **60**(5): p. 163-168.
297. Guo, H., et al., *Synergistic mechanism for tetrandrine on fluconazole against Candida albicans through the mitochondrial aerobic respiratory metabolism pathway*. Journal of medical microbiology, 2014. **63**(7): p. 988-996.
298. Yan, Y., et al., *Effect of shikonin against Candida albicans biofilms*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**: p. 1085.

299. Jafri, H. and I. Ahmad, *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de mycologie Medicale*, 2020. **30**(1): p. 100911.
300. Wang, Y., et al., *Antifungal activity and potential mechanism of Asiatic acid alone and in combination with fluconazole against Candida albicans*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021. **139**: p. 111568.
301. Bidaud, A.-L., et al., *Techniques for the assessment of in vitro and in vivo antifungal combinations*. *Journal of Fungi*, 2021. **7**(2): p. 113.

IZVORI ILUSTRACIJA

Slika 1. Faktori rizika za razvoj vulvovaginalne kandidoze i njihovi posledični efekti

Izvor: Autor

Slika 2. Morfologija gljiva roda *Candida*

Preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187052/>

Slika 3. Šematski prikaz patogeneze infekcija izazvanih gljivama roda *Candida*.

Modifikovana slika preuzeta sa: https://www.researchgate.net/figure/Molecular-pathogenesis-of-Candida-spp-1-and-2-Planktonic-Candida-spp-cells-express_fig1_359209490

Slika 4. Šematski prikaz formiranja biofilma *C. albicans*

Preuzeto sa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5726514/pdf/nihms923603.pdf>

Slika 5. Šematski prikaz mikološke dijagnostičke procedure vulvovaginalne kandidoze

Izvor: Autor

Slika 6. Princip rada MALDI TOF masenog spektrometra

Preuzeto sa: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>

Slika 7. Šematski prikaz pripreme uzorka za MALDI TOF masenu spektrometriju

Izvor: Autor

Slika 8. Mehanizam dejstva antimikotika

Preuzeto sa: <https://microbiologyinfo.com/mode-action-antifungal-drugs/>

Slika 9. Antimikrobni efekti ekstrakata i etarskog ulja biljke *Melissa officinalis*.

Preuzeto sa: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429221005629>

Slika 10. Šematski prikaz dizajna studije

Izvor: Autor

Slika 11. a) Kolonije (porast) gljiva roda *Candida* na Sabraud dekstroznom agaru

Preuzeto sa: <https://microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/Candida-albicans-photos/c-albicans.html>

Slika 11. b) *Candida* hromogenom agaru

Preuzeto sa: <https://www.condalab.com/int/en/culture-media-for-clinical-diagnosis/2613-15090-Candida-chromogenic-agar.html>

Slika 12. Procedura izvođenja MALDI-TOF masene spektrometrije

Izvor: Autor

Slika 13. Procedura ispitivanja sposobnosti produkcije biofilma kvasnica metodom po Stepanoviću

Izvor: Autor

Slika 14. Procedura izvođenja Integral system yeasts plus testa (modifikovana slika uputstva proizvođača

Preuzeta sa: <https://sivico.vn/en/product-36529-43126-102574/default.aspx>

Slika 15. Komercijalni Integral System Yeasts Plus test - identifikacija kvasnica. a) uputstvo proizvođača, b) primer identifikacije soja

Izvor: Autor

Slika 16. Komercijalni Integral System Yeasts Plus test - izvođenje antimikograma. a) uputstvo proizvođača, b) primer očitavanja osetljivosti ispitivanog izolata

Izvor: Autor

Slika 17. Mikrotitar ploče nakon izvođenja metode bujon mikrodilucije

Izvor: Autor

Slika 18. Princip MTT testa citotoksičnosti

Modifikovana slika preuzeta sa: https://tiesalesm.live/product_details/33499893.html

Slika 19. Procedura izvođenja MTT testa

Modifikovana slika preuzeta sa: <https://researchtweet.com/mtt-assay-protocol-for-cell-viability>

Slika 20. Mikrotitar ploče nakon izvedenog MTT testa

Izvor: Autor

Slika 21. Sposobnost produkcije biofilma ispitivanih sojeva

Izvor: Autor

Slika 22. Identifikovani glavni sastojci etarskog ulja

Izvor: Autor

Slika 23. Uporedne šeme formiranja biofilma *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*,

Preuzeto sa: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00028/full>

BIOGRAFIJA

Marina Ranđelović je rođena 25. aprila 1987. godine u Nišu. Osnovnu školu „Ćele kula“ i gimnaziju „Bora Stanković“ u Nišu završila je sa odličnim uspehom, kao nosilac Vukove diplome. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, studijski program Integrisane akademske studije medicine, upisala je 2006. godine, a diplomirala je 12.7.2012. godine sa prosečnom ocenom 10,0 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Tokom studija bila je demonstrator na predmetima Molekularna i humana genetika, Biohemija i Mikrobiologija.

Doktorske akademske studije, smer Molekularna medicina, upisala je 2012. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu i položila je sve ispite predviđene planom i programom.

Od 2013. godine volontirala je na Katedri za Mikrobiologiju i imunologiju na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, gde je radni odnos zasnovala 01.10.2017. godine kao saradnik u nastavi. U zvanje asistenta na istoj katedri izabrana je 29.3.2019. godine.

Od 21.11.2014. godine zaposlena je u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Niš, najpre na određeno vreme, dok je radni odnos na neodređeno vreme u istoj ustanovi zasnovala 12.2.2019. godine.

Specijalističke studije iz Medicinske mikrobiologije upisala je 2015. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, a nakon polaganja specijalističkog ispita sa odličnom ocenom, od 11.9.2020. godine radi kao lekar specijalista u IZJZ Niš.

Ima 69 naučnih publikacija, od kojih je 13 objavljeno u časopisima na SCI listi. Od 2022. godine je istraživač na projektu „*Fungal case finder*“, programa Ideje, Fonda za nauku Republike Srbije, a bila je istraživač na dva projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, realizovanih u periodu od 2011-2014. godine, kao i na Internom projektu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu 2020. godine.