

РЕЗИСТЕНЦИЈА ГЉИВА НА АНТИМИКОТИКЕ: МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА, УЧЕСТАЛОСТ, ПРЕВЕНЦИЈА И КОНТРОЛА РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Сања М. МИТРОВИЋ, Александар М. ЏАМИЋ, Валентина С. АРСИЋ-АРСЕНИЈЕВИЋ,
Ивана В. РАДОЊИЋ, Ивана Ф. КРАЊЧИЋ-ЗЕЦ

Одељење за паразитологију и микологију, Институт за микробиологију и имунологију,
Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Гљиве изазивају инфекције код људи, од којих су посебно важне системске микозе. Патогене гљиве имају разноврсне и сложене механизме резистенције на антимикотике. У раду су дати подаци о ћелијским, генетским и клиничким факторима који учествују у настанку резистенције, као и дијагностичке и епидемиолошке одлике отпорности гљива на антимикотике. Разумевање механизма настанка резистенције гљива на антимикотике требало би да омогући развој бољих метода за откривање резистенције, као и мера за спречавање њеног настанка. Све чешћа појава стечене резистенције гљива, посебно сојева изолованих од особа с поремећајем имунитета, довела је до потребе да се тестови за испитивање осетљивости гљива на антимикотике изводе и рутински. Диск-дифузиони тест би могао да се изводи као почетни скрининг-тест, а потврда резистенције би се вршила бујон-дилуционим тестом. Такође, разматране су и могућности превазилажења проблема отпорности гљива на антимикотике које се односе на примену већих доза антимикотика, имуномодулацију, комбиновану антигљивичну терапију, као и примену нових антимикотских лекова.

Кључне речи: патогене гљиве; *Candida spp.*; антимикотици; резистенција; студије *in vitro*

УВОД

Антимикотик амфотерицин В је уведен у лечење системских микоза крајем педесетих година 20. века, али и данас представља златни стандард у лечењу најтежих гљивичних инфекција због израженог фунгицидног дејства и могућности парентералне примене [1, 2]. Резистенција гљива на амфотерицин В први пут је утврђена 1979. године код клиничких изолата *Candida (C.) tropicalis* [3]. Међутим, већ следеће године доказана је резистенција на амфотерицин В и других врста из рода *Candida* изолованих од болесника с леукемијом [4]. Утврђено је да се отпорност гљива на антимикотике може јавити приликом примене недовољних, тј. субинхибиторних, доза антимикотика, као и код болесника лечених цитостатикима. Цитостатици, осим дејства на ћелије домаћина, показују мутагено дејство и на ћелије гљива, а као резултат ових мутација и примене субинхибиторних доза антимикотика може да настане смањена осетљивост гљива на ове лекове [5]. Резистенција гљива на деривате азола је у почетку била ретка, али је од примене флуконазола добила веће размере, тако да се данас јавља на све антимикотике који се користе у лечењу [1, 2]. Проблем резистенције гљива није достигао значај који има резистенција бактерија на антибиотике, али постаје све значајнији последњих година.

Системске гљивичне инфекције (кандидоза, криптококоза, аспергилоза, зигомикоза) су значајан дијагностички и терапијски проблем, а прецизна лабораторијска дијагноза подразумева изолацију узрочника и одређивање осетљивости изолованих сојева гљива на антимикотике *in vitro* [6-8]. Епидемиолошки подаци

указују на све већу учесталост гљивичних инфекција унутрашњих ткива и органа, посебно код особа с поремећајем имуности [6, 9, 10].

Данас се све чешће примењују новосинтетисани антимикотици, а за старе, добро познате групе антимикотика откривају се додатни, доскора непознати механизми дејства (Табела 1) [1, 13]. Међутим, и поред чињенице да постоји релативно велики избор антимикотика с различитим механизмима дејства, системске микозе и даље имају озбиљан и често лош клинички ток и прогнозу [11, 12]. С друге стране, током парентералне примене антимикотика могу се јавити нежељена и токсична дејства, што ограничава њихову примену. Имајући у виду ове чињенице, дошло је до промене концепта лечења гљивичних инфекција и потребе да се о антимикотикима више сазна [11]. Став да су гљиве генерално осетљиве на антимикотике је промењен, а све је више података о резистенцији клиничких изолата гљива на ове лекове [2]. Проучавањем ове појаве дошло се до нових сазнања о механизмима настанка отпорности гљива и могућностима њиховог превазилажења.

Резистенција гљива на антимикотике доводи до неуспешног лечења гљивичне инфекције, а може да буде примарна (генетска) и секундарна (стечена). Под примарном резистенцијом се подразумева отпорност која је постојала и пре излагања гљиве дејству одређеног антимикотика, генетски је предодређена, а најчешће је последица спонтаних мутација. Секундарна резистенција гљива се развија током или после примене антимикотика, а резултат је генотипских и фенотипских промена састојака гљива под дејством ових лекова [13, 14].

ТАБЕЛА 1. Подела антимикотика према структури и механизму дејства.
TABLE 1. Antifungal drugs by structure and mechanism of action.

Група Group	Механизам дејства Mechanism of action	Врсте антимикотика Antifungal agents
Полиени Polyenes	Оштећење цитоплазматске мембране Membrane disrupting agents	Амфотерицин В Amphotericin B Нистатин Nystatin
Азоли (имидазоли и триазоли) Azoles (imidazoles and triazoles)	Инхибиција синтезе ергостерола Ergosterol synthesis inhibitors	Кетоконазол Ketoconazole Флуконазол Fluconazole Итраконазол Itraconazole Вориконазол Voriconazole Посаконазол Posaconazole Равуконазол Ravuconazole
Алиламини Allylamines	Инхибиција синтезе ергостерола Ergosterol synthesis inhibitors	Тербинафин Terbinafine Бутенафин Butenafine
Морфолени Morpholine	Инхибиција синтезе ергостерола Ergosterol synthesis inhibitors	Аморолфин Amorolphine
Флуоропиримидини Fluorinated pyrimidine	Инхибиција синтезе нуклеинских киселина Nucleic acid inhibitor	Флуцитозин Flucytosine
Ехинокандини Echinocandins	Инхибиција синтезе глукана Glucan synthesis inhibitors	Каспофунгин Caspofungin Анидулафунгин Anidulafungin Микафунгин Micafungin
Пептид-нуклеозиди Peptide-nucleoside	Инхибиција синтезе хитина Chitin synthesis inhibitors	Никомидин Nikomycin
Деривати тетраhydroфурана Tetrahydrofuran derivatives	Инхибиција синтезе протеина Protein synthesis inhibitors	Сордарини Sordarins Азасордарини Azasordarins
Остали Others	Везивање за протеине микротубула гљива; инхибиција синтезе нуклеинских киселина гљива Binds to microtubular proteins; nucleic acid inhibitor	Гризеофулвин Griseofulvin

Резултати испитивања осетљивости гљива на антимикотике *in vitro* (антимикограм) најчешће су у корелацији с резултатима који се постижу током лечења оболелих при примени одговарајућих доза антимикотика. Изостанак повољног терапијског дејства антимикотика могло би се предвидети претходним испитивањем изолованог соја гљива *in vitro*. Резултати испитивања гљива на антимикотике *in vitro* квантитативно се изражавају као вредности минималних инхибиторних концентрација (МИК) и минималних фунгицидних концентрација (МФК) [15]. МИК је вредност која означава најниже концентрације активне испитане супстанце која спречава раст и размножавање испитиваног соја гљива који се одређује у стандардним контролисаним условима. Опсег вредности МИК за сваки антимикотик је већ утврђен на основу осетљивости појединих сојева гљива, при чему се као основни критеријум користи концентрација лека чијом се применом постижу оптимална терапијска, а минимална нежељена дејства. МФК је вредност која означава најниже концентрације активне испитане супстанце која убија испитивани сој гљива, који се такође одређује у стандардним контролисаним условима.

Резистенција гљива на антимикотике, као апсолутни појам, представља изостанак антагонистичког дејства при изузетно високим концентрацијама антимикотика и најчешће је резултат лабораторијски изазване резистенције гљива под дејством различитих мутагена. Уопштено говорећи, резистенција микроорганизама, с клиничког аспекта, јесте отпорност одређеног микроорганизама на концентрације хемиотерапеутика које се постижу при оптималним, односно максимално дозвољеним терапијским дозама, имајући у виду нежељена дејства и токсичност супстанце [15, 16]. Проблем резистенције гљива је утолико сложенији јер може доћи и до изостанка корелације између клиничких и резултата осетљивости гљива на антимикотике *in vitro* [15, 17, 19]. Најзначајнији фактори који могу утицати на ову појаву су: примена неодговарајућих хранљивих подлога, пуфера и растварача за антимикотике, неодговарајуће температуре и трајање инкубације и неадекватна величина инокулама тестираног соја [17, 18]. Када је утврђена смањена осетљивост гљива на одређени антимикотик *in vitro*, а клинички се постиже повољно дејство применом истог антимикотика, могуће објашњење је пози-

тивно дејство антимикотика на имуни систем домаћина [14].

Током лечења антимикотицима могућа је клиничка резистенција, која представља прогресију или настанак рецидива инфекције изазване гљивом која је била осетљива на испитани антимикотик *in vitro* [14]. Клиничка резистенција је уобичајена код болесника са сталним имуним оштећењима (на пример, неутропенија, сида), као и код анатомских локализација инфекције (на пример, менинге, валвуле, око, кост, простата), када лек теже достиже жељену концентрацију. На настанак клиничке резистенције најчешће утичу: фармакодинамска својства антимикотика, вируленција соја гљива, фаза раста ћелија гљива (експоненцијална фаза је значајно осетљивија на дејство антимикотика од стационарне), развојни стадијуми гљива (на пример, герминативне тубе *C. albicans* су значајно осетљивије на дејство азола од бластоспора) и интеракција са другим лековима [15, 18].

ИСПИТИВАЊЕ ОСЕТЉИВОСТИ ГЉИВА НА АНТИМИКОТИКЕ *IN VITRO* И КОРЕЛАЦИЈА С КЛИНИЧКИМ РЕЗУЛТАТИМА *IN VIVO*

Оптимални методи за испитивање осетљивости гљива на антимикотике *in vitro* су стандардизовани, брзи, једноставни за извођење и јефтине. Ови методи омогућавају одговарајући избор антимикотика и доза које су у складу с прихваћеним протоколима за лечење гљивичних инфекција [14, 19]. Методи за испитивање осетљивости гљива на антимикотике *in vitro* које се најчешће користе су: бујон-дилуциони (макродилуциони и микродилуциони) методи, агар-дилуциони тест, агар-дифузиони тест (диск-дифузиони тест) и Е-тест [15]. Стандардизација ових метода је услов за њихову примену, као и бележење корелације између клиничких и резултата добијених током испитивања осетљивости гљива на антимикотике *in vitro* [14]. Амерички национални комитет за клиничке и лабораторијске стандарде (NCCLS) стандардизовао је методе за испитивање осетљивости квасница рода *Candida* и плесни, а Европски комитет за испитивање осетљивости на антимикробна средства (AFST-EUCAST) дилуциони метод за кваснице [20-22]. Имајући у виду чињеницу да су дилуциони методи скупи, компликовани за извођење и да се резултати добијају релативно касно да би били корисни за клиничаре, уведен је Е-тест. То је тест који је стандардизован као дифузиони метод, што омогућава његово брзо извођење, а предност овог метода је у томе што се добијају и вредности МИК, што је кључно за клиничку примену лека [23-25]. Е-тест се користи за континуирани надзор резистенције на антимикотике код ризичних болесника, а за резистентне сојеве гљива даље се врше додатна, прецизнија испитивања применом дилуционих тестова.

Граничне референтне вредности МИК за процену осетљивости гљива на амфотерицин В, флуконазол, итраконазол и флуцитозин (5-флуороцитозин – 5-FC) утврђене су на основу корелације између концентрација антимикотика у крви и повољног клиничког исхода инфекције [1, 14]. За остале антимикотике постоје препоруке, али не и општеприхваћени критеријуми.

Вредности МИК за амфотерицин В утврђене су испитивањем сојева гљива *in vitro*, узročника фунгемија са смртним исходом болесника са пресађеном костном сржи и болесника с хематолошким малигним обољењима. С обзиром на то да су сви изолати гљива код ових болесника имали вредност МИК већу од 0,8 $\mu\text{g/ml}$, ова вредност је утврђена као критеријум за резистенцију [1, 4, 5]. Толеранција гљива на амфотерицин В, као прелазна појава од осетљивости ка резистенцији, одређује се на основу односа МФК и МИК. Код осетљивих сојева вредност МФК је од два до четири пута већа од вредности МИК, док је код резистентних сојева МФК 16 или више пута већи од МИК [26]. Код особа с очуваном имуношћу вредности МИК за амфотерицин В су значајно ниже.

Флуцитозин је антимикотик код којег се најчешће јавља смањена осетљивост, како *in vivo*, тако и *in vitro*. Граничне вредности МИК за овај лек нису општеприхваћене, али се уобичајено сматрају осетљивим сојевима гљива чије су вредности МИК до 4 $\mu\text{g/ml}$. Резистентни су сојеви са вредностима МИК већим од 12,5 $\mu\text{g/ml}$, односно вредностима МИК већим од 16 $\mu\text{g/ml}$, а интермедијарно осетљиви сојеви са вредностима МИК 4-12,5 $\mu\text{g/ml}$, односно 16 $\mu\text{g/ml}$ [14, 27].

За деривате азола граничне вредности МИК добијене су на основу корелације с резултатима лечења орофаринксне кандидозе код особа које болују од сиде. Поред категорија осетљивости и резистентности, за азоле је уместо категорије интермедијарне осетљивости уведена категорија „осетљив у зависности од дозе” (енгл. *susceptible dose dependence – S-DD*). Уколико је за испитивани сој добијена вредност која је у опсегу *S-DD*, то значи да је потребно применити веће дозе азола од уобичајених, али које и даље нису отровне за болесника [1, 14]. Осетљивим на флуконазол сматрају се сојеви гљива са вредностима МИК до 8 $\mu\text{g/ml}$, *S-DD* сојеви имају вредности МИК 16-32 $\mu\text{g/ml}$, док су резистентни сојеви са вредностима МИК већим од 32 $\mu\text{g/ml}$. За итраконазол гранична вредност МИК за осетљиве сојеве је до 0,125 $\mu\text{g/ml}$, за *S-DD* сојева 0,25-0,5 $\mu\text{g/ml}$, док вредност МИК од 1 $\mu\text{g/ml}$ и већа означава резистентне сојеве.

ЕПИДЕМИОЛОШКЕ ОДЛИКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ ГЉИВА НА АНТИМИКОТИКЕ

Примарна резистенција на амфотерицин В је ретка, а описана је код квасница *C. lusitanae*, *C. guilliermondi*,

Trichosporon (T.) beigelii, као и код условно патогених плесни *Pseudoallesheria boydii*, *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus (A.) terreus* и *A. flavus* [1, 14, 16, 28]. Известан степен резистенције на овај полиен могу да имају и друге врсте кандида које нису *albicans*, од којих најчешће *C. glabrata* и *C. krusei*, док је неуобичајена код сојева *Cryptococcus (Cr.) neoformans* [1, 14]. Узроци настанка примарне резистенције су углавном непознати. Секундарна резистенција на амфотерицин B је такође ретка, јавља се код болесника с тешком имуносупресијом, као и код претходно наведених врста квасница. Код сојева који изазивају фунгемију учесталост резистенције је 2,5-16,3% [29]. Фактори који утичу на настанак секундарне резистенције на амфотерицин B нису у потпуности познати, али се сматра да значајну улогу могу имати цитотоксична и дуготрајна имуносупресивна терапија [14].

Резистенција на флуцитозин утврђена је за сојеви *Candida spp.* и *Cr. neoformans*, док на плесни овај антимиотик не делује. Постоји и примарна и секундарна отпорност, с тим што је секундарна значајно чешћа и јавља се углавном као последица монотерапије флуцитозином [1, 14]. Преваљенција ове резистенције је различита, а зависи од географског подручја; њен опсег је од 5% до 11,5-35% [1, 27, 30]. Резистенција на флуцитозин се најчешће јавља у Сједињеним Америчким Државама, где се овај антимиотик и највише примењује у терапији и профилакси. Такође, у САД *C. albicans* серотип B је чешћи него у другим срединама, а утврђено је и да је отпорнији на флуцитозин [27].

Резистенција на азоле је најчешћа, а јавља се код хроничних, упорних и понављаних кандидоза слузнице болесника са сидом, као и код акутних и субакутних дисеминованих инфекција. Резистенција на миконазол и кетоконазол је раније била ретка, док је с појавом HIV инфекције резистенција на азоле постала релативно чест проблем [31-33]. Увођењем флуконазола у профилаксу раних деведесетих година код трећине болесника са сидом дошло је до инфекција кандидатом резистентних на флуконазол [13, 14]. Примарна отпорност на флуконазол јавља се код врста које нису *albicans*, најчешће *C. krusei* и *C. glabrata*, док секундарна отпорност настаје како код *C. albicans*, тако и код врста које нису *albicans* [1, 13, 14, 34, 35]. Примена флуконазола профилактички, односно терапијски доводи до одабира резистентних сојева гљива [36]. Фактори који могу утицати на настанак резистенције на азоле код орофаринксне кандидозе код болесника са сидом јесу смањен број лимфоцита CD4, продужено, комбиновано или повремено лечење и мале дневне дозе азола (мање од 100 mg на дан). Стандардне терапијске дозе за кетоконазол и флуконазол су 400 mg на дан, за итраконазол, вориконазол, посаконазол и равуконазол 200 mg на дан, а максималне и до 800 mg на дан. Применом високоактивне антиретровирусне терапије (HAART) у САД дошло је до смањења учесталости кандидозе орофа-

ринксне регије. Међутим, у мање развијеним земљама, где се HAART ређе користи, проблем резистенције на азоле код орофаринксне кандидозе је и даље велики. Примарна резистенција сојева *Cr. neoformans* на азоле је изузетно ретка и јавља се код болесника са сидом који примају флуконазол као терапију одржавања [14].

Сојеви *Candida spp.* резистентни на азоле изолују се из хемокултура с учесталошћу од 1 до 5% [1, 14, 34]. Ови сојеви углавном потичу од ендogene микрофлоре, а њихов одабир је вероватно последица примене антимиотика и цитостатске терапије. Истовремено са све већом применом флуконазола, *C. albicans* и не-*albicans* врсте су све чешће почеле да испољавају резистенцију, посебно *C. glabrata* и *C. krusei*, које су иначе најчешћи изазивачи фунгемија. Сматра се да су главни фактори ризика за настанак кандидемije изазване врстама које нису *albicans* дуготрајна изложеност азолима, локални епидемиолошки фактори и тешка имуносупресија. Проблем је и унакрсна резистенција флуконазола са другим азолима, посебно итраконазолом, док се изолована резистенција на итраконазол ретко јавља [14]. Такође, јавља се клиничка отпорност на азоле, која се најчешће објашњава лошом оралном ресорпцијом (кетоконазол) и интеракцијом лекова (на пример, кетоконазол и антациди) (Табела 2). Механизми одговорни за смањење концентрације азола у организму су: смањена растворљивост и апсорпција високолипофилних азола (кетоконазол) услед смањеног гастричног ацидитета и дејство лекова који повећавају активност цитохром-пермеазе 450 (P-450) у хепатоцитима на метаболизам азола.

Клиничке последице резистенције на азоле зависе од сложених односа између узрочника инфекције и имуног система домаћина. Показано је да су сојеви кандиде резистентни на азоле вирулентнији и да испољавају већу способност да изазову системску инфекцију него сојеви осетљиви на ове лекове. Примена антимиотика уклања осетљиве популације гљива, док се резистентни сојеви понашају као прави опортунисти. Међутим, резистентна популација гљива је у условима продубљене имуносупресије и даље под утицајем антимиотика, што ствара услове за даљи одабир резистентних сојева. Оваква претпоставка је потврђена резултатима који су добијени испитивањем сојева узрочника орофаринксне кандидозе код болесника са сидом, код којих је уочено да су сојеви резистентни на азоле много успешнији у колонизацији слузнице од осетљивих сојева [14].

Плесни су све значајнији узрочници инвазивних микоза, а примарно су резистентне на флуконазол. Аспергилоза представља један од значајних узрока смрти особа с хематолошким малигним болестима и особа с пресађеним органима. Итраконазол показује инхибиторну активност на сојеви из рода *Aspergillus* и неке друге плесни, али не делује на *Fusarium spp.* и зигомиците. Секундарна резистенција на итраконазол код болесника с аспергилозом је ретка. Утврђено

ТАБЕЛА 2. Интеракција кетоконазола, флуконазола и итраконазола с неким лековима.
TABLE 2. Drug interactions involving ketoconazole, fluconazole and itraconazole.

Ефекат интеракције Effect of interaction	Кетоконазол Ketoconazole	Флуконазол Fluconazole	Итраконазол Itraconazole
Смањење апсорпције азола Decreased absorption of azoles	Антациди Antacids		Антациди* Antacids*
	Антагонисти H_2 рецептора H_2 receptor antagonists		Антагонисти H_2 рецептора* H_2 receptor antagonists*
	Инхибитори протонске пумпе Proton pump inhibitors		Инхибитори протонске пумпе* Proton pump inhibitors*
Смањење концентрације азола у плазми Decreased plasma concentration of azoles	Рифампин Rifampin		Рифампин Rifampin
	Рифабутин Rifabutin		Рифабутин Rifabutin
	Изониазид? Isoniazid?	Рифампин Rifampin	Фенитоин Fenitoin
	Карбамазепин Carbamazepine		Изониазид Isoniazid Карбамазепин Carbamazepine
Повећање концентрације лека у плазми који се истовремено примењује с антимикотиком Increased plasma concentration of coadministered drug	Циклоспорин Cyclosporine	Циклоспорин Cyclosporine	Циклоспорин Cyclosporine
	Кортикостероиди? Corticosteroids?	Рифабутин Rifabutin	Дигоксин Digoxin
	Дигоксин? Digoxin?	Диазепам Diazepam	Антагонисти калцијумских канала Calcium channel antagonists
	Антагонисти калцијумских канала Calcium channel antagonists	Зидовудин Zidovudine	Квинидин Quinidine
			Верапамил Verapamil
			Статини Statins

* Односи се на примену итраконазола у капсулама / * Applies only to itraconazole capsule formulation

Табела преузета и модификована према / Table adapted and modified from:
Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. *Clinical Mycology*. Oxford: Oxford University Press; 2003.

је да велики број фактора доприноси клиничкој резистенцији на овај антимикотик, а најчешће се наводе дуготрајна изложеност итраконазолу, каверне плућа и имunosупресија. Шири примена итраконазола у профилакси и лечењу аспергилозе може за последицу имати чешћу резистенцију, појединачну или унакрсну, између итраконазола и новије генерације триазола, што може представљати велики терапијски проблем у будућности [14]. Поједини клинички изолати врсте *Penicillium marneffeii*, недавно откривеног узročника тешких инфекција код особа с поремећајем имуности, јесу резистентни на флуконазол, а интермедијарно осетљиви на амфотерицин В.

СТУДИЈЕ ОСЕТЉИВОСТИ ГЉИВА НА АНТИМИКОТИКЕ *IN VITRO* РАЂЕНЕ КОД НАС

Испитивања осетљивости гљива на антимикотике *in vitro* вршена су током истраживања осетљивости квасница изолованих код болесника с различитим болестима, као и код здравих особа [38-42]. Студија која је прва изведена бавила се испитивањем осетљивости сојева *Candida spp.* изолованих код болесника с хематолошким малигним обољењима, солидним туморима и дијабетесом, као и сојева изолованих код

здравих особа. Код сојева изолованих из крви болесника с хематолошким малигним обољењима макродилуционим методом је показана смањена осетљивост на амфотерицин В за одређене изолате *C. parapsilosis* и *C. krusei*, чије су вредности МИК биле 0,858 $\mu\text{g/ml}$, као и за изолат *C. kefyr*, где је вредност МИК била 1,717 $\mu\text{g/ml}$. Међу испитиваним квасницама било је 18% сојева осетљивих на миконазол у зависности од дозе [38].

Диск-дифузионим методом антимикограма рађена су истраживања осетљивости сојева квасница, узročника фунгемија, *in vitro*. Резистенција на амфотерицин В утврђена је код изолате *C. kefyr* и *T. beigelii*, а отпорност на миконазол забележена је код појединих сојева *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*. Резистенција на кетоконазол је уочена код *C. albicans*, *C. parapsilosis* и *C. glabrata*, док су на флуцитозин били отпорни сојеви *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* и *T. beigelii* [39].

Испитивањем диск-дифузионим методом осетљивости сојева *Candida spp.* изолованих из усне дупље особа позитивних на *HIV* утврђено је често јављање резистенције на кетоконазол, флуконазол и итраконазол, појединачно или као унакрсна резистенција. Резистенција је забележена код болесника са бројем лимфоцита *CD4* мањим од $200/\text{mm}^3$ који су профилактички, односно терапијски примали ове леко-

ве [40]. Висока учесталост резистентних сојева у овој студији може се објаснити примењеним методом за испитивање осетљивости, као и критеријумима за процену осетљивости који су важили у то време.

Испитивање осетљивости сојева *Cr. neoformans* изолованих из цереброспиналне течности особа с поремећајем имуности (сида, нехочкички лимфом, трансплантација бубрега) до 1993. године извршено је агар-дилуционим и агар-дифузионим методом. Испитивана је осетљивост на амфотерицин В, миконазол, еконазол, кетоназол, флуцитозин и нистатин. Испитивани сојеви су били осетљиви на полиене и имидазоле, док је један сој био интермедијарно осетљив на флуцитозин (МИК=16 $\mu\text{g/ml}$), а два соја су била резистентна на флуцитозин (МИК=128 $\mu\text{g/ml}$) [41]. Тестирањем осетљивости сојева *Cr. neoformans* изолованих до 2002. године Е-тестом откривени су сојеви отпорни на флуцитозин, флуконазол и итраконазол [42].

Током ових студија показано је да је резистенција била типична за сојеве који су узрочници инфекција код особа с поремећајем имуности. Резистенција на амфотерицин В *in vitro* била је у корелацији с резистенцијом *in vivo*, јер је код ових болесника фунгемија изазвала смрт [38].

МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА СЕКУНДАРНЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ ГЉИВА НА АНТИМИКОТИКЕ

Резистенција гљива на антимикотике настала је као фенотипска експресија промена на нивоу гено-типа и представља резултат спонтаних или индукованих мутација у геному гљива. Молекуларни механизми резистенције гљива на антимикотике проучавани су *in vivo* и *in vitro*. *In vivo* су испитивани сојеви *C. albicans* који су изоловани од болесника са сидом који су имали понављању, хроничну орофарингску кандидозу резистентну на флуконазол. Код ових сојева је уочена различита осетљивост на антимикотике, као и различита експресија гена који су условили резистенцију [14]. Студије *in vitro* су се заснивале на лабораторијски изазваним мутацијама применом генетских манипулација.

Механизам резистенције гљива на амфотерицин В засад није детаљно проучен. Подаци се најчешће односе на сојеве квасница рода *Candida* и *Sacharomyces cerevisiae*, где се као главни механизам резистенције на амфотерицин В, али и на нистатин, наводи промена у саставу, односно количини мембранског ергостерола. Ове промене настају као секундарне последице мутација у путевима биосинтезе ергостерола у ћелијама гљива [13, 14, 28]. Такође, показано је да се отпорност и код *Cr. neoformans* на амфотерицин В јавља услед промена у путевима биосинтезе ергостерола (оштећена делта-8,7-изомераза) [13]. Осим тога, утврђено је да меланин у ћелијском зиду *Cr. neo-*

formans може да везује амфотерицин В и тако смањује његову активну концентрацију [43]. Код лабораторијски изазване резистенције сојева *A. flavus* показано је да промене у саставу стерола цитоплазматске мембране представљају механизам резистенције на полиене [13].

Резистенција на флуцитозин је знатно чешћа него на остале антимикотике. Примарна резистенција се најчешће јавља услед недовољног преузимања лека због промена у цитозин-пермеазама. Секундарна отпорност настаје као последица промена биохемијских путева у ћелијама гљива, што утиче на метаболизам флуцитозина [14, 27].

Значајни механизми секундарне резистенције на азоле су: 1) измењена места везивања антимикотика (азоле се везују за ензим 14 α -стерол-деметилазу – 14 α -DM, који је производ експресије гена *ERG11*) или њихова претерана експресија, услед чега остаје довољно ензима и за потпуну синтезу ергостерола; 2) мутације које доводе до прекида синтезе ергостерола (оштећена делта-5,6-десатураза, експресија гена *ERG3*), што има за последицу накупљање мање токсичних прекурсора стерола у присуству азола; и 3) смањено задржавање азола у ћелији гљива услед активног избацивања лека [13, 14]. Ови механизми су углавном проучавани на сојевима *C. albicans* код којих су описана три гена одговорна за избацивање азола из ћелије. Претерана експресија гена *CDR1* и *CDR2* одговорна је за настајак фенотипова отпорних на велики број антимикотика, а претерана експресија гена *MDR1* доводи до смањеног накупљања флуконазола у ћелији гљива [13, 14]. Описани су и други механизми резистенције на азоле који су последица структурних и нумеричких хромозомских аберација код *C. albicans*, које су изазване селективним дејством антимикотика. Слични механизми су описани и код сојева *Cr. neoformans* резистентних на азоле. Резистенција је последица вишеструких мутација с претераном експресијом 14 α -DM зависне од цитохрома P-450, што доводи до појачане активности пумпе за избацивање лека и смањене концентрације азола у ћелији *Cr. neoformans*.

Код унакрсне отпорности квасница на азоле делује неколико различитих механизма резистенције који су последица вишеструких мутација у геному ћелија гљива [34]. Унакрсна резистенција између азола и амфотерицина В објашњава се губитком функције гена који је одговоран за синтезу ергостерола (*ERG3*), услед чега настаје оштећена делта-5,6-десатураза [36].

Способност гљива да стварају биофилм може да утиче на ефикасност антимикотика *in vivo*. Гљиве рода *Candida*, као и бактерије које колонизују слузнице домаћина могу образовати биофилм, структуру која се састоји од густе мреже ћелија, бластоспора, хифа и псеудохифа гљива које су утопљене у ванћелијски матрикс. Могући разлози резистенције гљива у биофилму су недовољно доспевање антимикотика до основе биофилма и спорији раст гљива, који се јавља као

последица смањеног доспевања хранљивих материја до матрикса гљива [44].

О механизмима отпорности плесни на антимицотике има мало података. Засад су описани претерана експресија ензима *14 α -DM* зависне од цитохрома *P-450* и смањено накупљање азола услед претеране активности пумпи за избацавање лека [13, 14].

НАЧИНИ ПРЕВАЗИЛАЖЕЊА РЕЗИСТЕНЦИЈЕ ГЉИВА НА АНТИМИКОТИКЕ

Проблем резистенције гљива на антимицотике могуће је превазићи: увођењем већих доза, новим начинима њихове примене, комбиновањем различитих антимицотика, имуномодулацијом и откривањем антимицотика с новим механизмима дејства. Позитивно дејство ових мера је тешко предвидети будући да се оне најчешће примењују код особа с поремећајем имуности и тешким облицима микоза.

Претклинички подаци указују на то да би ефикасност амфотерицина *B* могла да се повећа применом већих доза лека од оних које се користе у клиничкој пракси, али примену тих доза ограничава токсичност овог препарата. Због тога је направљена липидна формулација амфотерицина *B* која омогућава примену већих доза са мањим токсичним ефектом на болесника [1, 45]. Међутим, показано је да када су ткива засићена липидном формулацијом амфотерицина *B* долази до његовог смањеног преузимања и повећане елиминације из организма [14]. Код примене већих доза флуконазола (више од 12 mg/kg на дан) не долази до сличних појава, а примена ових доза нема штетних дејстава, те се могу постићи задовољавајући резултати код инфекција изазваних *S-DD* сојеви кандидида [14].

Данас се у лечењу тешких облика микоза примењују и цитокини. Код особа с оштећеном функцијом хелијске имуности примена *GM-CSF* (фактор раста гранулоцита и моноцита) или интерферона γ доприноси бољој контроли гљивичне инфекције [14]. Нејасно је да ли примена цитокина може допринети превазилажењу примарне или секундарне резистенције на антимицотике.

Проналажење и увођење нових антимицотика је такође један од начина превазилажења проблема резистенције гљива. Постоји неколико нових лекова из групе триазола (вориконазол, посаконазол, равуконазол) који се налазе у завршној фази клиничких испитивања. Они имају добро дејство *in vivo* и *in vitro* на сојеве гљива резистентне на флуконазол и итраконазол и могу се применити перорално, што је значајно када је у питању дуготрајно лечење [1, 14]. Међутим, како нови триазоли имају исто циљно место као и досадашњи, могуће је јављање унакрсне резистенције.

Ехинокандини су група антимицотика који инхибирају синтезу хелијског зида гљива тако што делу-

ју на гљивичну глукан 1,3- β -синтетазу. Због своје нетоксичности, ехинокандини (каспофунгин, микофунгин, *V*-ехинокандин) би могли да имају велики значај у лечењу гљивичних инфекција, јер имају фунгицидно дејство на *Candida spp.*, кваснице резистентне на азоле, *Cr. neoformans* и *Aspergillus spp.* [1, 14, 46].

Никомицини се, према механизму дејства, разликују од свих претходних антимицотика. Инхибирају синтезу хитина који улази у састав хелијског зида гљива, који не постоји у ћелијама човека [1, 14].

КОМБИНОВАНА АНТИГЉИВИЧНА ТЕРАПИЈА

Комбиновање антимицотика с различитим механизмима дејства један је од могућих начина делотворнијег лечења гљивичних инфекција, јер се применом мањих доза неколико различитих антимицотика повећава ефикасност терапије, а смањују нежељена дејства. Проспективне клиничке студије које су вршене ради праћења терапијских дејстава комбинације различитих антимицотика омогућили су математички модели који су развијени да би прецизно бележили удружено дејство антимицотика [1, 14, 47].

Синергистичко дејство код комбиноване примене антимицотика може да настане због инхибиције различитих стадијума истог биохемијског пута (на пример, азоли и тербинафин који делују у различитим фазама синтезе ергостерола), повећаног улаза једног антимицотика који је омогућен оштећењем хелијског зида или цитоплазматске мембране гљивичне ћелије дејством другог антимицотика (на пример, оштећења цитоплазматске мембране настала применом амфотерицина *B* или азола омогућавају улаз флуцитозина, али и рифампицина у ћелију гљива) и истовремене инхибиције различитих циљних структура (на пример, ехинокандини делују на хелијски зид, а амфотерицин *B* или азоли делују на ергостерол у цитоплазматској мембрани гљива). Досадашњи резултати испитивања истовремене примене два антимицотика говоре у прилог корисном синергистичком дејству примене амфотерицина *B* и флуцитозина у лечењу криптококозе. Ова комбинација антимицотика је званично прихваћена, односно у терапијском протоколу за криптококни менингитис представља иницијалну терапију коју је прихватило Америчко друштво за инфективне болести [47]. У лечењу кандидозе ова комбинација антимицотика углавном нема дејство. Синергизам је доказан и код истовремене примене флуконазола и флуцитозина у лечењу криптококозе, па се у наведеном протоколу наводи као алтернативна терапија. Међутим, резултати комбиноване примене азола и флуцитозина у лечењу кандидозе су различити и збуњујући, односно крећу се од синергизма и изостанка међудејства (за неке сојеве *S. albicans*) и врсте које нису *albicans*), до антагонизма (за неке сојеве *S. parapsilosis*) [47]. Комбинована приме-

на флуконазола и амфотерицина *V* показала је повољан ефект у лечењу инфекција изазваних не-*albicans* врстама, које су иначе мање осетљиве на антимицотике. Комбинација амфотерицина *V* и деривата азола се предлаже као терапија одржавања код имуносупримираних болесника код којих постоји висок ризик од настанка системских микоза [1, 47]. Комбинована терапија антимицотика у лечењу инфекција изазваних плеснима најмање је проучена до сада. Синергистичко дејство на сојеве *Aspergillus spp.* се ретко уочава, мада су малобројне студије о истовременој примени каспофунгина и липидне формулације амфотерицина *V* или азола (итраконазол или вориконазол) показале позитиван ефекат у лечењу инвазивне аспергилозе [47].

Антагонистичко дејство између различитих антимицотика може се објаснити различитим механизмима [1, 47]. Први механизам се односи на директно дејство различитих антимицотика на исту циљну структуру гљива које може да доведе до смањеног ефекта сваког од примењених лекова. То је утврђено код истовремене примене азола и амфотерицина *V*, где је лечење било неуспешно због тога што су азоли спречили синтезу ергостерола и онемогућили везивање амфотерицина *V*. Други механизам је адсорпција антимицотика на површину ћелије гљива која инхибира везивање другог антимицотика, што се дешава при примени итраконазола и кетоконазола који могу да се адсорбују на површину ћелије и тако спрече везивање амфотерицина *V*. Трећи механизам настаје када један антимицотик доведе до измене циљних молекула у ћелијама гљива, услед чега гљива постаје мање осетљива на дејство другог антимицотика. Такав ефекат настаје код примене азола непосредно пре примене амфотерицина *V*, јер претходна изложеност гљива дејству азола доводи до замене мембранског ергостерола метилисаним дериватима стерола, за које се онда амфотерицин *V* знатно слабије везује. Описан је и антагонизам између полиена и флуцитозина, али за сад нема објашњења који је механизам одговоран за његов настанак.

ЗАКЉУЧАК

Данас је дошло до промене емпиријског концепта у лечењу гљивичних инфекција који се заснивао на претпоставци да су све гљиве генерално осетљиве на антимицотике. Узрочници системских микоза, као и микоза код особа с поремећајем имуности су све чешће резистентни на уобичајене врсте и дозе антимицотика, па је зато потребно лабораторијске дијагностичке поступке допунити антимицотограмом. С обзиром на то да су механизми настанка отпорности гљива углавном разјашњени, предузимају се мере за њихову превенцију и превазилажење, што подразумева сталан надзор осетљивости гљива на антимицотике *in vitro* и *in vivo*. Овај приступ је посебно значајан када

је реч о особама с поремећајем имуности, код којих се антимицотички примењују профилактички, што значајно повећава ризик од настанка резистенције.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anaissie EJ, McGinnis MR, Phaller MA. Antifungal therapy. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Phaller MA. Clinical Mycology. New York: Churchill Livingstone; 2003. p.57-92.
2. Odds FC. Antifungal agents and their use in Candida infections. In: Odds FC, editor. Candida and Candidosis. London: Balliere Tindall; 1988. p.279-314.
3. Merz WG, Sandford GR. Isolation and characterization of a polyene-resistant variant of *Candida tropicalis*. J Clin Microbiol 1979; 9:677-80.
4. Dick JD, Merz WG, Saral R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18:158-63.
5. Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, Medoff G. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. Am J Med 1988; 84:826-32.
6. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11:287-91.
7. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Arsić V, Džamić A. Systemic mycoses-current diagnostic and therapeutic problem. Mikrobiologija 1995; 32:111-21.
8. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Arsić V, Džamić A. Intrahospitalne infekcije izazvane gljivicama. Acta Infectologica Yugoslavica 1998; 3:209-20.
9. Groll Ah, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling GJ, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. J Infect 1996; 33:23-32.
10. Fridkin S, Jarvis W. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996; 9:499-511.
11. Bryce EA, Roberts FJ, Sekhon AS, Coldman AJ. Yeast in blood cultures. Evaluation of factors influencing outcome. Diagn Microbiol Infect Dis 1992; 15:233-7.
12. Sandven P. Epidemiology of candidemia. Rev Iberoam Micol 2000; 17:73-81.
13. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12:501-17.
14. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Lancet 2002; 359:1135-44.
15. Plempel M, Berg D, Buchel KH, Abink D. The methods for antifungal agents—a critical review. Mykosen 1987; 30:28-37.
16. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Arsić-Arsenijević V, Džamić A. Rezistencija gljiva na antimikotike. Acta Infectologica Yugoslavica 2001; 6:83-5.
17. Odds FC. Problems in the laboratory assessment of antifungal activity. Postgrad Med J 1979; 31:335-6.
18. Mitrović S, Kranjčić Zec I, Marović M, Šćepan Lj, Arsić V. Disk agar diffusion testing of yeasts-effect of culture media. J Chemoter 1991; 3(Suppl 4):474-6.
19. Rex J, Pfaller J, Galgiani M, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on antifungal susceptibility testing of the National committee for clinical laboratory standards. Clin Infect Dis 1997; 24:235-47.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of yeasts. Approved standard M-27A. National committee for clinical laboratory standards. Wayne, Pa; 1997.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of filamentous fungi; approved standard. National committee for clinical laboratory standards. Wayne, Pa; 2002.
22. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, et al. Multicenter evaluation of the proposed antifungal susceptibility testing for fermentative yeasts of the antifungal susceptibility testing subcommittee of European committee on antimicrobial susceptibility testing (AFST-EUCAST). Clin Microbiol Infect 2003; 9:3359-61.

23. Lozano-Chin M, Paetznick VL, Ghannoum MA, et al. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National committee for clinical and laboratory standards M27-A methodologies. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2817-22.
24. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of E-test and reference microdilution method for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2000; 28:3359-61.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing yeasts: approved guideline M-44A. National committee for clinical laboratory standards. Wayne, Pa; 2004.
26. Seidenfeld SM, Cooper BH, Smith JW, Luby JP, Mackowiak PA. Amphotericin B tolerance: a characteristic of *Candida parapsilosis* non shared by other *Candida* species. *J Infect Dis* 1983; 147:116-9.
27. Stiller RI, Bennet JE, Scholer HJ, Wall M, Polak A, Stevens A. Susceptibility to 5-fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22:482-7.
28. Pappagianis D, Collins MS, Hector R, Remington J. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16:123-6.
29. Capoor MR, Nair D, Deb M, Verma PK, Srivastava L, Aggarwal P. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58:344-8.
30. Al-Abeid HM, Abu-Elteen KHA, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57:279-84.
31. Holt RJ, Azmi A. Micolazole-resistant *Candida*. *Lancet* 1978; 1:50-1.
32. Johnson EM, Richardson MD, Warnock DW. In vitro resistance of imidazole antifungals in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 1984; 13:547-58.
33. Ryley JF, Wilson RG, Barrett-Bee KJ. Azole resistance in *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1984; 22:53-63.
34. Graybill JR, Montalbo E, Kirkpatrick WR, Luther MF, Revankar SG, Patterson TF. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2938-42.
35. Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1518-29.
36. Barchiesi F, Morbiducci V, Ancrani F, Scalise G. Emergence of oropharyngeal candidiasis caused by non-*albicans* species of *Candida* in HIV-infected patients. *Eur J Epidemiol* 1993; 13:334-46.
37. Vasquez J, Arganoza M, Boikov D, Yoon S, Sobel J, Akins R. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2690-5.
38. Mitrović S. Procena značaja ispitivanja osetljivosti na antimikotike in vitro sojeva *Candida* sp. izolovanih od imunodeficijentnih i zdravih osoba [magistarski rad]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 1990. p.8-41.
39. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Arsić V, Berger-Jekić O, Džamić A. Susceptibility in vitro antifungal agents of strains of yeasts isolated from blood cultures of neutropenic patients with leukemia. *J Chemoter* 1993; 5(Suppl 1):428-30.
40. Tešić V, Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Pelešić M, Jevtović Dj. In vitro rezistencija *Candida* sp. na antibiotike kod HIV pozitivnih pacijenata sa orofaringealnom kandidozom i kolonizacijom. *Acta Infectologica Yugoslavica* 1999; 4:15-21.
41. Arsić V, Mitrović S, Kranjčić Zec I, Džamić A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A or D resistant to 5-fluorocytosine. *J Chemoter* 1995; 7(Suppl 4):90-2.
42. Trpković A. Klinički i epidemiološki značaj ispitivanja faktora virulencije i osetljivosti gljive *Cryptococcus neoformans* na antimikotike [magistarski rad]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2005. p.66-82.
43. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol* 2003; 47:271-7.
44. Baillie G, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1900-5.
45. Hiemeny JW, Walsh T. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin Infect Dis* 1996; 22(Suppl 2):133-44.
46. Graybill JR. The echinocandins, first novel class of antifungals in two decades: will they live up to their promise? *Int J Clin Pract* 2001; 55:633-8.
47. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Chemoter* 2004; 48:693-715.

ANTIFUNGAL DRUG RESISTANCE: MECHANISMS OF RESISTANCE, FREQUENCY, PREVENTION AND CONTROL OF RESISTANCE

Sanja M. MITROVIĆ, Aleksandar M. DŽAMIĆ, Valentina S. ARSIĆ-ARSENIJEVIĆ,
Ivana V. RADONJIĆ, Ivana F. KRANJČIĆ-ZEC

Department of Parasitology and Mycology, Institute of Microbiology and Immunology,
School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade

ABSTRACT

Fungi are important causes of human infections, especially systemic mycoses. Pathogenic fungi have many complex mechanisms of resistance to antifungal drugs. In this article, information about the cellular, genetic and clinical factors contributing to antifungal-drug resistance, and their diagnostic and epidemiologic characteristics are reviewed. Understanding the mechanisms of resistance should assist in developing better detection and preventive strategies. The emergence of acquired antifungal resistance, especially in immunocompromised hosts, has necessitated routine antifungal susceptibility testing. Initial antifungal screening of clinical isolates by the disk-diffusion method would be followed by confirmation of resistant strains by the broth dilution method. Also, strategies

to avoid and suppress the antifungal resistance are discussed. There are several strategies to overcome antifungal resistance, including increased antifungal-dose intensity, immunomodulation, combined antifungal therapy and new antifungals.

Key words: pathogenic fungi; *Candida* spp.; antifungal drugs; resistance; *in vitro* studies

Sanja MITROVIĆ
Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Tel.: 011 2685 584
E-mail: medparbg@eunet.yu