

Pregledni prispevek/Review article

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA INVAZIVNE KANDIDOZE

MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF INVASIVE CANDIDIASIS

Eva Sodja, Tadeja Matos, Saša Simčič

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta v Ljubljani

Izvleček

Izhodišča *Vrste iz rodu Candida so pomembne povzročiteljice oportunističnih glivnih okužb pri bolnikih z znanimi nevarnostnimi dejavniki. Klinična diagnoza invazivne kandidoze je pogosto težavna, saj so znaki in simptomi bolezni nespecifični. Problem pogosto predstavlja tudi nizka občutljivost osamitve gliv iz sterilnih mest.*

Zaključki *Za postavitev diagnoze invazivne kandidoze je potrebna osamitev in identifikacija patogene glive iz normalno sterilnih mest. Identifikacija vrste gliv kvasovk iz rodu Candida je pomembna iz več razlogov; posamezne vrste se lahko zelo razlikujejo v občutljivosti za različna antimikotična sredstva, opredelitev vrste je pomembna za epidemiološke raziskave in nenazadnje tudi za klinični potek bolezni, saj se le-ta razlikuje. Pri diagnostiki nam pomagajo tudi serološki testi, med katerimi so najpomembnejši testi, ki dokazujejo glivične antigene. Obetajoče so nove tehnike molekularne biologije, za katere se pričakuje visoka občutljivost in specifičnost, vendar še niso bile standardizirane in klinično validirane.*

Ključne besede *invazivna kandidoza; hemokulture; fenotipska identifikacija; serološka diagnostika; molekularna diagnostika*

Abstract

Background *Candida spp. are responsible for opportunistic fungal infections in patients with known risk factors. Clinical diagnosis of invasive candidiasis is difficult because clinical features and symptoms are usually non-specific. The problem also represents isolation of pathogenic yeasts from sterile site which lacks desired level of sensitivity.*

Conclusions *Confirming diagnosis of invasive candidiasis requires isolation and identification of pathogenic fungi from a normally sterile site. Identification of Candida spp. is increasingly important for several reasons: Candida spp. differ in their susceptibility to antifungal agents, species-specific identification is relevant for epidemiological purposes and the severity of clinical manifestations differs depending on the infecting species. Serological tests can also be helpful for diagnosis of invasive candidiasis, among which direct detection of antigens is of most value. Newer techniques of molecular biology hold promise because of their high sensitivity and specificity, but are not yet standardized and clinically validated.*

Key words *invasive candidiasis; blood cultures; phenotypical identification; serological diagnosis; molecular diagnosis*

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Tadeja Matos, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, tel.: 01-543-74-22, e-mail: tadeja.matos@mf.uni-lj.si

Uvod

Od začetka 80. let prejšnjega stoletja postajajo glive vedno pomembnejši povzročitelji invazivne bolezni pri človeku, zlasti pri imunsko oslabljenih bolnikih in pri hospitaliziranih bolnikih z resno osnovno boleznijo. Za povečanje števila glivnih okužb so odgovorni predvsem naslednji dejavniki: vse večja populacija imunsko oslabljenih bolnikov, povečana uporaba široko spektralnih antibiotikov in citotoksičnih kemoterapij ter povečano število bolnikov, ki se zdravijo s presaditvijo krvotvornih matičnih celic in čvrstih organov. Kljub številnim oportunističnim glivam ostajajo vrste iz rodu *Candida* še vedno najpomembnejši povzročitelji oportunističnih glivnih okužb. V Ameriki so tako četrti najpogostejši povzročitelj bolnišnično pridobljenih glivičnih seps in predstavljajo kar 8 do 10 % vseh tovrstnih okužb.¹ Leta 2006 je Evropska konfederacija za medicinsko mikologijo (**ECMM** - European Confederation of Medical Mycology) objavila rezultate epidemiološke raziskave, v katero je bilo vključenih sedem evropskih držav (Francija, Nemčija, Avstrija, Italija, Španija, Švedska in Velika Britanija). Stopnja kandidemije (prisotnost gliv iz rodu *Candida* v krvi) se glede na omenjene evropske države giba med 0,31-0,44 na 10.000 bolnišničnih dni, kar je nižje od stopnje kandidemije v ZDA, ki znaša približno 1,5 na 10.000 bolnišničnih dni. Zaključili so tudi, da je kandidemija pogosto povezana s kirurškimi posegi (48 % vseh epizod), z zdravljenjem v intenzivnih enotah (40 %) in pri bolnikih s solidnimi tumorji ali hematološkimi malignostmi (35 %).² V Sloveniji se je stopnja kandidemije za Univerzitetni klinični center v letih 2004 do 2008 gibal med 0,47-0,76 na 10.000 bolnišničnih dni, najvišja je bila leta 2006, ko je znašala 0,76 na 10.000 bolnišničnih dni.

Candida albicans je bila dolgo časa glavni povzročitelj glivične seapse, pridobljene v bolnišnici, vendar je njen delež v 90. letih prejšnjega stoletja začel upadati. V istem obdobju lahko opazimo porast vrste *Candida glabrata* in drugih vrst iz rodu *Candida*. V Evropi je tako *C. albicans* prisotna v skoraj 60 % primerih glivične seapse, medtem ko je delež vrste *C. glabrata* približno 15 %. Sorazmerno pogosto se kot povzročitelji invazivnih okužb pojavljajo tudi druge vrste *Candida*, kot sta na primer *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis*.² V Ljubljani je prav tako najpogostejša povzročiteljica glivične seapse *C. albicans*, prisotna je v 58,5 % primerih. Vrsta *C. glabrata* se pojavlja v nekoliko višjem odstotku (21,5 %) kot drugod po Evropi, sledi ji vrsta *C. parapsilosis* (8,3 %) (podatki so povprečne vrednosti za obdobje od 2000-2008).

Osamitev in identifikacija vrste sta zato postali pomembni iz več razlogov. Različne vrste *Candida* se močno razlikujejo v občutljivosti za antimikotična zdravila. Vrsta *Candida krusei* je naravno odporna proti flukonazolu, medtem ko *C. glabrata* lahko pridobi odpornost *in vitro* in *in vivo* proti spektru antimikotikov in ima običajno višje vrednosti minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) za azole. Izolati *Candida dubliniensis* lahko hitro pridobijo odpornost proti flukonazolu, *Candida lusitanae* je lahko odporna proti amfotericinu B, vrsti *C. parapsilosis* in *Candida*

guilliermondii pa imata običajno višje vrednosti MIK za ehinokandine. Identifikacija do vrstne ravni je pomembna tudi za epidemiološke raziskave; pojavljanje določene vrste *Candida* v bolnišnici, zlasti če se le-ta pojavlja pogosteje kot ponavadi, lahko nakazuje na specifičen vir okužbe. Informacija o vrsti je pomembna tudi za klinično sliko bolezni, saj določene vrste povzročajo resnejšo obliko bolezni. Vrsta *C. tropicalis* je ponavadi bolj invazivna pri nevtropeničnih bolnikih, ne pa tudi pri bolnikih po presaditvi jeter.³

Pri postavitvi diagnoze invazivne kandidoze so nam v pomoč smernice, ki sta jih leta 2002 prvič oblikovali Skupina za glivične okužbe (**IFICG** - Invasive Fungal Infection Cooperative Group) pri Evropski organizaciji za raziskave in zdravljenje rakavih obolenj (**EORTC** - European Organization for Research and Treatment of Cancer) in Skupina za raziskave mikoz (**MSG** - Mycoses Study Group) Nacionalnega inštituta za alergologijo in infekcijske bolezni, in so bile leta 2008 obnovljene. Skupina EORTC/MSG je oblikovala merila, ki temeljijo na dejavnih gostitelja, kliničnih znakih in mikrobiološki diagnozi, in na podlagi katerih lahko opišemo invazivno kandidozo kot *dokazano*, *verjetno* ali *možno invazivno glivično bolezen*. Mikrobiološka merila za dokazano invazivno kandidozo vključujejo neposredne metode dokazovanja kandidid v humanih vzorcih, kot sta mikroskopska analiza vzorcev pridobljenih iz sterilnih mest, ki pokaže prisotnost psevdohif ali pravih hif in osamitev kandidid v kulturi. Od posrednih metod je v merilih omenjeno le dokazovanje sestavine celične stene gliv - polisaharida (1-3)- β -D-glukana, katerega klinična uporaba je omenjena v nadaljevanju. Molekularne metode dokazovanja gliv v kliničnih vzorcih kljub napredku na tem področju še niso bile vključene v smernice, saj nobena od molekularnih tehnik še ni bila standardizirana in validirana.⁴

Diagnostika invazivne kandidoze

Za nedvoumen dokaz invazivne glivne bolezni, ki jo povzročajo vrste iz rodu *Candida*, je zlati standard še vedno osamitev glive iz normalno sterilnih mest telesa, kot so kri, peritonealna tekočina, cerebrospinalna tekočina, biopti tkiva in različni punktati. Za mikrobiološko dokazovanje invazivne kandidoze se največkrat uporabljajo *hemokulture in vzorci drugih sterilnih kužnin*, pomemben je tudi *histopatološki pregled* bioptičnih vzorcev tkiv, za hitro diagnostiko pa so nam lahko v pomoč tudi *serološki testi*, med katerimi so najpomembnejši testi za dokazovanje glivičnih antigenov in nove *molekularne metode* (zlasti verižna reakcija s polimerazo - PCR).³

Kultivacija kliničnih vzorcev

Kljub napredku molekularnih tehnik so hemokulture še vedno praktična in sorazmerno zanesljiva metoda za diagnosticiranje okužb krvnega obtoka. Največji napredek na tem področju predstavljajo avtomatizirani sistemi, ki spremljajo rast mikroorganizmov v hemokulturnih stekleničkah. Razširjena sta predvsem dva sistema: sistem BacT/ALERT 3D (Organon Teknika

Corp., Durham, Nizozemska), ki spremlja rast mikroorganizmov kolorimetrično, in sistem BACTEC (Becton Dickinson, ZDA), ki spremlja rast fluorescentno. Kandidemijo lahko dokazemo v aerobnih in anaerobnih stekleničkah, vendar je občutljivost v takih primerih ocenjena na približno 50 %.^{3,6,7} Oba sistema zato ponujata posebna gojišča (Mycosis IC/F in Myco/F Lytic za sistem BACTEC in gojišče MB za sistem BacT/ALERT), ki so primernejša za rast gliv. Njihova uporaba se priporoča zlasti pri bolnikih z visokim tveganjem za razvoj invazivne kandidoze in v primerih, ko bi bakterije v krvi lahko zavirale rast gliv kvasovk. Številne raziskave so pokazale, da omenjena gojišča omogočajo občutljivejšo in hitrejšo diagnostiko kandidemije.^{5,7-9} Meyer in sod. so s pomočjo gojišča Mycosis IC/F dokazali prisotnost gliv kvasovk v krvi kar pri 92,5 % vseh bolnikov, vključenih v raziskavo, medtem ko je aerobno gojišče dokazalo glive kvasovke le pri 75,9 % vseh bolnikov. Gojišče Mycosis IC/F se je zlasti izkazalo za osamitev vrste *C. glabrata*, pri kateri je bilo kar 41,9 % vseh primerov kandidemije dokazanih samo s slednjim gojiščem. Povprečni čas rasti je bil za glivno gojišče bistveno krajši kot za aerobno gojišče (28,9 ± 22,2 h vs. 36,5 ± 24,6 h); razlika je bila zopet najbolj očitna za vrsto *C. glabrata* (17,8 ± 9,1 h vs. 61,5 ± 31,4 h).⁸ V podobni raziskavi so Horvath in sod. primerjali oba omenjena sistema za hemokulture, BacT/ALERT 3D in BACTEC; poleg standardnega aerobnega in anaerobnega gojišča so uporabili tudi ustrezno gojišče, ki podpira rast gliv (Myco/F Lytic za sistem BACTEC in MB za sistem BacT/ALERT). Vsako hemokulturno stekleničko z ustreznim gojiščem so napolnili s krvjo zdravih prostovoljcev in jih nato inokulirali s 1.000 celicami gliv na stekleničko. Oba sistema sta zaznala rast v vseh inokuliranih glivnih gojiščih, izkazala pa sta se tudi z aerobnim gojiščem; s sistemom BACTEC so zaznali rast gliv v 90 % aerobnih gojišč in s sistemom BacT/ALERT v 100 % aerobnih gojišč. Največja razlika med obema sistemoma je bila v anaerobnem gojišču; sistem BACTEC je zaznal rast gliv le v 10 % anaerobnih gojišč, medtem ko sistem BacT/ALERT v 70 %. Povprečni čas zaznave rasti gliv se je zelo razlikoval za posamezna gojišča kot tudi za posamezno vrsto glive kvasovke. Najhitrejšje je bilo gojišče Myco/F Lytic sistema BACTEC (21,12 ± 3,55 h). Rast večine *Candida* spp. so zaznali v roku 24 ur, z izjemo vrste *C. glabrata*, katere rast je bila v aerobnih gojiščih za oba sistema bistveno počasnejša kot v ustreznih anaerobnih in glivnih gojiščih (ustrezno aerobno, anaerobno in glivno gojišče za sistem BACTEC: 106,00 ± 18,99 h vs. 34,03 ± 10,59 h vs. 21,15 ± 3,55 h; ustrezno aerobno, anaerobno in glivno gojišče za sistem BacT/ALERT 3D: 51,82 ± 9,93 h vs. 25,73 ± 3,30 h vs. 26,78 ± 2,88 h).⁹

Fenotipska identifikacija vrst iz rodu *Candida*

Določene vrste iz rodu *Candida* lahko identificiramo neposredno na primarnih diferencialnih gojiščih. V ta namen se uporablja kromogena gojišče, ki je dostopno tudi na trgu. Najpogosteje se uporablja gojišče CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson, Heidelberg, Nemčija), s katerim lahko na podlagi barve in morfo-

logije kolonij identificiramo vrste *C. albicans*, *C. tropicalis* in *C. krusei*. Kolonije *C. glabrata* so podobne kolonijam številnih drugih vrst iz rodu *Candida*, zato je za identifikacijo potrebno narediti še dodatne biokemične teste. Številne študije so primerjale različna kromogena gojišča z referenčnim agarjem Sabouraud. V vseh primerih so bila kromogena gojišča boljša v odkrivanju različnih vrst gliv kvasovk, kar je zlasti pomembno v primerih mešanih glivnih kultur.¹⁰

Leta 1995 so opisali novo vrsto *Candida dubliniensis*, ki jo pogosto povezujemo z oralno kandidozo pri bolnikih z aidsom. Vrsta ima številne fenotipske lastnosti, podobne *C. albicans*, in tudi na kromogenem gojišču tvorita obe vrsti zelo podobne kolonije. Ker je *C. dubliniensis* bolj odporna na azole, je zelo pomembno, da obe vrsti ločimo z biokemičnimi testi ali z imunološkimi in molekularnimi metodami.¹⁰

Za večino vrst iz rodu *Candida* se v identifikacijske namene uporabljajo asimilacija ogljikovodikov, fermentacijski testi, dokazovanje encimov in opazovanje morfologije s pomočjo koruznega agarja. Razvite so tudi hitrejšje in laboratorijsko manj zahtevne metode identifikacije, ki vključujejo različne komercialno dostopne teste. V Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, UL, Ljubljana) uporabljamo za identifikacijo gliv kvasovk dva takšna testa: API *Candida* in ID 32C (bio Merieux, Marcy-l'Etoile, Francija). S testom API *Candida* dobimo že po 24 urah tako dobre rezultate, kot je opisano v literaturi,¹² za glive, ki so najpogosteje osamljene iz kliničnih vzorcev, medtem ko je identifikacija redkejših gliv kvasovk pogosto težavnejša in manj zanesljiva. V literaturi zasledimo za omenjeni test različne odstotke pravilne identifikacije, ki se gibljejo od 68 do 92 %.¹¹⁻¹⁴ Ta odstotek je lahko višji, če v identifikacijo vključimo tudi dodatne teste, kot je na primer opazovanje morfologije na koruznem agarju. Na koruznem agarju opazujemo prisotnost micelija oziroma psevdomicelija, tvorbo klamidospor in drugih struktur, ki so specifične za posamezno glivično vrsto. Fricker-Hidalgo in sod. so tako s testom API *Candida* pravilno identificirali le 75,2 % vseh testiranih gliv kvasovk, ob uporabi dodatnih biokemičnih testov in koruznega agarja z opazovanjem morfologije pa jim je uspelo identificirati kar 97,4 % vseh vključenih glivičnih sevov.¹²

ID 32C je avtomatiziran sistem, ki v primerjavi s testom API *Candida* vključuje večji nabor biokemičnih testov. Uporabljajo ga v številnih laboratorijih zaradi njegove zanesljivosti in obsežnejše baze gliv kvasovk, ki jih je sposoben identificirati. Test ID 32C je zanesljiv v identifikaciji sorazmerno pogosto osamljenih gliv iz kliničnih vzorcev; v literaturi se giblje odstotek pravilne identifikacije od 88–98 %.^{10, 14, 15} Test je nekoliko manj zanesljiv pri identifikaciji redkeje osamljenih gliv kvasovk, kar so z raziskavo pokazali Ramani in sod.¹⁵ Med avtomatiziranimi sistemi za identifikacijo gliv kvasovk ima velik potencial tudi sistem VITEK 2 (bio Merieux, Marcy-l'Etoile, Francija). V primerjavi s sistemom ID 32C ima VITEK 2 še večji nabor biokemičnih testov, medtem ko je baza gliv kvasovk nekoliko manjša.¹⁰ Sanguinetti in sod. so s pomočjo sistema VITEK 2 pravilno identificirali kar 98,2 % vseh testiranih gliv.¹⁶ V

novejši raziskavi so Valenza in sod. pravilno identificirali večino običajnih glivnih izolatov (npr.: *C. albicans*, *C. glabrata* in *C. krusei*), medtem ko se je odstotek pravilne identifikacije za nekatere druge vrste (npr.: *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* in *C. tropicalis*) gibal med 30–80 %. S pomočjo dodatnih testov so tudi slednje vrste identificirali v več kot 85 % primerov.¹⁷

Molekularno dokazovanje gliv kvasovk

Razvoj molekularne biologije ponuja številna orodja za taksonomijo in identifikacijo gliv kvasovk. Sekveniranje specifičnih genov in verižna reakcija s polimerazo (PCR) tako predstavljata hitro in natančno možnost identificiranja glivnih patogenov.¹⁴ Ker nobena od molekularnih metod za dokazovanje gliv v kliničnih vzorcih še ni bila standardizirana in validirana v kliničnem laboratoriju, jih skupina EORTC/MSG ni vključila v svoje smernice za diagnostiko invazivne glivične bolezni.⁴

Najpogostejša tarča molekularnih metod za identifikacijo gliv kvasovk je rDNK (geni, ki nosijo zapis za ribosomne podenote). Podenote rDNK vključujejo visoko ohranjene domene, ki jih ločujejo variabilne regije in so pogosto vrstno specifične. Prav zaradi te lastnosti omogoča zaporedje rDNK veliko možnosti za oblikovanje tako univerzalnih kot tudi vrstno ali rodovno specifičnih oligonukleotidov. rDNK je v genomu gliv kvasovk prisotna v več kopijah (50 do 100 kopij na genom glive kvasovke), kar poveča občutljivost molekularne tehnike. Pomembno je tudi dejstvo, da so zaporedja rDNK različnih glivnih vrst dostopna v javnih bazah, kar omogoča lažje iskanje homologije.¹⁴

V preteklosti so za dokazovanje patogenih gliv kvasovk ovrednotili različne molekularne tehnike, ki dokazujejo glive kvasovke neposredno iz kliničnih vzorcev ali po njihovi osamitvi. Med njimi se najpogosteje pojavljajo različice PCR (predvsem PCR v realnem času) in sekveniranje različnih regij v genomu patogenih gliv.^{3, 18–28} PCR se pogosto uporablja za dokazovanje gliv neposredno v samem kliničnem vzorcu, medtem ko je za identifikacijo gliv s sekveniranjem potrebna predhodna osamitev glive v čisti kulturi. Novost na področju sekveniranja je t.i. pirosekveniranje (Biotage, Uppsala, Švedska), s katerim lahko identificiramo glive kvasovke že na podlagi kratke sekvence znotraj rDNK in je v primerjavi s klasičnim sekveniranjem hitreje in preprostejše za uporabo.^{18, 22–24}

Pred kratkim je podjetje Roche (Mannheim, Nemčija) postavilo na trg molekularni test LightCycler SeptiFast, ki je v osnovi PCR v realnem času. Test odkriva in prepozna kar 25 bakterijskih in glivnih povzročiteljev okužb krvnega obtoka v samo nekaj urah. Od glivnih vrst tako odkrije *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* in *A. fumigatus*. Ker je test SeptiFast novost na trgu, je njegova vrednost še vedno neopredeljena; test zaznava tudi DNK odmrlih glivnih celic v krvnem obtoku, zato bi bilo smiselno ovrednotiti njegov prispevek k zdravljenju bolnikov s sepsom. To pa pravzaprav velja za vse podobne molekularne teste.¹⁴

V literaturi so opisani primeri, ko so uporabili PCR za dokazovanje gliv v hemokulturnih stekleničkah, pozitivnih za glive.^{26–28} Metwally in sod. so razvili PCR v realnem času, ki v pozitivnih hemokulturnih stekleničkah loči med vrstami, ki so občutljive na flukonazol (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* in *C. dubliniensis*), in vrstami, ki so na flukonazol običajno odporne (*C. glabrata* in *C. krusei*). Metoda se je izkazala kot visoko občutljiva in specifična ter v primerjavi s klasično osamitvijo in identifikacijo gliv bistveno hitrejša.²⁶ Glavni problem je zavora reakcije PCR zaradi prisotnosti inhibitorjev v hemokulturnih stekleničkah, saj komercialno dostopni kiti za osamitev DNK iz vzorcev humane krvi preslabo odstranijo omenjene inhibitorje.^{26–28} Verjetno bolj perspektivna je metoda in situ fluorescentne hibridizacije s peptidnukleotidnimi sondami PNA FISH (angl.: Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization), ki omogoča dokazovanje različnih vrst gliv iz rodu *Candida* v pozitivnih hemokulturnih stekleničkah. Trenutno so na trgu dostopni trije takšni testi, ki jih je razvilo podjetje AdvanDx (Vedbaek, Danska).^{29–32} Najnovejši med njimi, test Yeast Traffic Light PNA FISH (AdvanDx, Vedbaek, Danska), dokazuje v pozitivnih hemokulturnih stekleničkah pet vrst iz rodu *Candida*, in sicer *C. albicans*/*C. parapsilosis*, *C. tropicalis* in *C. glabrata*/*C. krusei*. Test se je izkazal za visoko občutljivostjo in specifičnostjo. Pomembna prednost testa je tudi njegova hitrost, saj je čas do končnega rezultata krajši od 3 ur.³²

Tehnike molekularne diagnostike so obetajoče, saj so veliko bolj občutljive in specifične od tradicionalnih laboratorijskih metod. Vendar obstaja na tem področju še kar nekaj nerešenih problemov, ki omejujejo širšo klinično uporabo molekularnih tehnik. Dolgo časa so bile molekularne tehnike v ozadju zaradi prisotnosti PCR inhibitorjev v kulturi gliv in zaradi težav pri razbitju glivne celične stene. Čeprav večina današnjih protokolov za osamitev DNK iz glivnih celic že uspešno odstrani PCR inhibitorje, pa so le-ti zahtevni in dragi.¹⁸

Kljub temu številni laboratoriji po svetu razvijajo, validirajo in v vsakodnevni rutini izvajajo metode molekularnega dokazovanja gliv v humanih vzorcih. Zato smo v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij razvili preiskavo PCR – *Candida*, ki odkriva šest najpogostejših povzročiteljev invazivne kandidoze neposredno v vzorcih humane krvi: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* in *C. kefyr*. Test temelji na pomnoževanju regije ITS 2, ki je del rDNA regije in tako nudi dovolj variabilnosti za razlikovanje omenjenih gliv kvasovk. Prednost omenjenega testa je tudi hitrost. Klasična osamitev in identifikacija gliv v humanih vzorcih običajno zahteva povprečno najmanj 72 ur, medtem ko za izvedbo testa PCR – *Candida* potrebujemo manj kot 6 ur.

Serološko dokazovanje gliv kvasovk

Serološka diagnostika invazivne kandidoze predstavlja dve strategiji: dokaz antigenov patogene glive v humanih vzorcih in dokaz protiteles. Serološki testi so bili predmet številnih študij.^{33–38} Testi, ki teme-

ljijo na dokazu antigena v serumu, so na splošno dovolj specifični, vendar se večina antigenov zelo hitro odstrani iz krvnega obtoka, kar vpliva na občutljivost serološkega testa. D-arabinitol je metabolit določenih vrst rodu *Candida*, ki se kopiči v urinu bolnikov z invazivno kandidozo. Občutljivost testa na D-arabinitol je okoli 50 % in ne zazna vrst *C. krusei* in *C. glabrata*. Antigenemija z enolazo je po mnenju nekaterih avtorjev značilna za bolnike z invazivno kandidozo in se ne pojavi pri bolnikih s površinsko kolonizacijo s kvasovkami rodu *Candida*. Specifičnost imunskega testa na enolazo je 100 %, občutljivost testa pa se v študijah spreminja od 54 % do 75 %, odvisno od zaporednega vzorčenja seruma. Specifičnost in občutljivost testa na toplotno-občutljiv antigen z aglutinacijo lateksa Cand-Tec se v veliki meri spreminjata zaradi različne prazne vrednosti. Če upoštevamo za pozitivno vrednost testa titer 1:4 ali več, je specifičnost testa okoli 87 % in občutljivost 77 %. Imunski test Platelia® Candida Ag na manan je več kot v 95 % specifičen in ima povprečno občutljivost 51,5 %. Občutljivost testa so izračunali v retrospektivnih študijah, ki so vključevale bolnike iz različnih kliničnih oddelkov v treh francoskih bolnišnicah, pri katerih so iz krvi ali iz drugih normalno sterilnih mest telesa osamili kvasovke rodu *Candida*. Občutljivost testa se spreminja od vrste kandidate in je najnižja za vrsti *C. krusei* (20 %) in *C. parapsilosis* (37,5 %). Študije kažejo, da se občutljivost testa na manan poveča pri večkratnem zaporednem vzorčenju seruma in hkratnem testiranju bolnikovega seruma na protitelesa proti mananu, do 85 %.

Na drugi strani ima tudi dokazovanje specifičnih protiteles svoje omejitve. Protitelesa se namreč lahko pojavijo tudi pri zdravih posameznikih kot odziv na komezalno glivično floro, ki kolonizira sluznice. Drugi problem, ki omejuje klinično uporabo dokazovanja specifičnih protiteles, predstavljajo lažno negativni rezultati pri imunsko oslabiljenih bolnikih, pri katerih ne moremo dokazati specifičnih protiteles.³³

V Laboratoriju za humoralno imunost in serološko diagnostiko glivičnih bolezní Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo UL MF uporabljamo za dokazovanje invazivne kandidoze test na manan (Platelia® Candida Ag, BioRad, Francija), test na protitelesa proti mananu (Platelia® Candida Ab/Ac/Ak, BioRad, Francija) in test Cand-Tec (Ramco Laboratories, Stafford, ZDA). Manan je poglavitna sestavina celične stene gliv kvasovk iz rodu *Candida* in se tekom okužbe sprošča v krvni obtok. V literaturi najdemo številne objave, ki potrjujejo, da je prisotnost manana v krvi povezana z invazivno kandidozo.^{33-35, 38, 40} V preteklosti je bilo dokazovanje manana v humanih vzorcih omejeno, predvsem zaradi testov z nizko občutljivostjo. Tudi na tem področju je bil narejen velik napredek predvsem z uporabo bolj občutljivih testnih formatov in z uporabo monoklonskih protiteles, ki reagirajo s specifičnimi epitopi.^{33, 42} Za optimalno detekcijo mananskega antigena, je potrebna disociacija kompleksov antigen-protiteles, zato je potrebno vzorce serumov predhodno toplotno ali encimsko obdelati. Manan se tekom okužbe zelo hitro odstrani iz krvnega obtoka, zato je smiselno večkratno

zaporedno vzorčenje seruma.^{33, 35, 39} Pri bolnikih, pri katerih manana v serumu ne moremo dokazati, pričakujemo pa verjetno kandidozo, je priporočljivo izvesti tudi test na protitelesa proti mananu. Odsotnost tako protiteles kot antigena pa ne izključujeta invazivne kandidoze.⁴³ Občutljivost testiranja lahko povečamo tudi z določanjem dveh različnih antigenov, zato test na manan lahko dopolnimo še s testom na citoplazmatski toplotno občutljivi antigen *C. albicans* z aglutinacijo lateksa. Test je deležen kritik zaradi slabše občutljivosti in specifičnosti. Opisani so lažno pozitivni rezultati zaradi prisotnosti revmatoidnega faktorja in krioglobulinov, ali zaradi drugih nespecifičnih reakcij bolnikovega seruma z lateksom.³³ V laboratoriju nespecifične reakcije seruma z lateksom zato izključimo z dodatnim testom z »golim lateksom«.

(1→3)-β-D-glukan je sestavina celične stene večine medicinsko pomembnih gliv in ga lahko zaznamo v krvi bolnikov z invazivno glivično boleznijo.⁴⁴ Izjema so tiste glive, pri katerih je (1→3)-β-D-glukana v celični steni bodisi premalo, ali pa ga sploh ni, kot so primeri glive rodu *Cryptococcus*, zigomicete *Absidia*, *Mucor* in *Rhizopus* in *Blastomyces dermatitidis*. V literaturi zasledimo podatke o specifičnosti testa med 67 % in 100 % in občutljivosti testa med 84 % in 100 %.⁴³ Test je tehnično zahteven, reagenti so dragi, pozitiven rezultat pa nam ne da informacije o rodu glive, ki je povzročitelj okužbe. Dokazovanje (1→3)-β-D-glukana v krvi, BAL in likvorju je vključeno tudi v smernice EORTC/MSG kot podporni test med merili za verjetno invazivno glivično bolezen, katere povzročitelji so predvsem predstavniki rodov *Aspergillus* in *Candida*.

Na trgu lahko izbiramo med številnimi testi, ki imajo glede na specifičnost in občutljivost različni klinični pomen. Za pravilno diagnozo invazivne kandidoze je verjetno najbolj smiselno uporabiti kombinacijo dveh različnih seroloških testov. Zaradi prehodnega značaja antigenov v krvi je smiselno tudi večkratno zaporedno vzorčenje seruma, kar poveča občutljivost in zanesljivost serološkega testa.^{35, 39, 45}

Zaključki

Zaradi naraščajoče incidence sistemskih glivičnih okužb zadnjih nekaj let je ključnega pomena njihova hitra in natančna diagnoza. Potrditev invazivne kandidoze tradicionalno še vedno zahteva osamitev patogenih gliv kvasovk iz normalno sterilnih mest. Omejitvi klasične osamitve glivičnih patogenov sta še vedno nizka občutljivost in dejstvo, da postanejo hemokulture sorazmerno pozno pozitivne. Hitro diagnostiko invazivne kandidoze ponujajo serološke in molekularne metode. Od seroloških testov so zlasti pomembni testi, ki dokazujejo glivične antigene v humanih vzorcih. Ti testi so na splošno visoko specifični, njihova občutljivost pa je pogosto nizka, saj se antigeni med glivično okužbo hitro odstranijo iz krvnega obtoka. Obetajoče so tudi tehnike molekularne biologije, ki so visoko občutljive in specifične, vendar nobene od molekularnih tehnik še niso standardizirali in klinično validirali. Hkrati njihovo širšo klinično uporabo še vedno omejujejo pogosto zahtevni in dragi laboratorijski postopki.

Literatura

- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
- Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 359-66.
- Ellepolá ANB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43: 65-84.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/Invasive fungal infections cooperative group and the National Institute of allergy and infectious diseases Mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813-21.
- Chiarini A, Palmeri A, Amato T, Immordino R, Distefano S, Giammanco A. Detection of bacteria and yeast species by the BACTEC 9120 automated system with the routine use of aerobic, anaerobic, and fungal media. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4029-33.
- Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 32-45.
- Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E. Comparison of mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 773-7.
- Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 115-8.
- Fricker-Hidalgo H. Use of the BACTEC 9240 system with Mycosis-IC/F blood culture bottles for detection of fungemia. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4.
- Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39: 9-33.
- Campbell CK, Davey KG, Holmes AD, Szekely A, Warnock DW. Comparison of the API candida system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 821-3.
- Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, Lebeau B, et al. Comparison of the new API candida system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1846-8.
- Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ, Meis JF. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol* 1999; 52: 271-3.
- Pincus DH, Orena S, Chatellier S. Yeast identification - past, present, and future methods. *Med Mycol* 2007; 45: 97-121.
- Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3396-8.
- Sanguinetti M, Porta R, Sali M, La Sorda M, Pecorini G, Fadda G, Posteraro B. Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1343-6.
- Valenza G, Strasen J, Schäfer F, Frosch M, Kurzai O, Abele-Horn M. Evaluation of new colorimetric Vitek 2 yeast identification card by use of different source media. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3784-7.
- Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 7-12.
- McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Patterson CC, Thompson G, Webb CH, Hay RJ. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 890-6.
- Baškova L, Landlinger C, Preuner S, Lion T. The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1167-73.
- Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Webb CH, McMullan R. Comparison of serum and whole-blood specimens for detection of candida DNA in critically ill, non-neutropenic patients. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1269-72.
- Gharizadeh B, Norberg E, Löffler J, Jalal S, Tollemar J, Einsele H, Klingspor L, Nyren P. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing™ technology. *Mycoses* 2004; 47: 29-33.
- Boyanton BL, Luna RA, Fasciano LR, Menne KG, Versalovic J. DNA pyrosequencing-based identification of pathogenic *Candida* species by using the internal transcribed spacer 2 region. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 667-74.
- Montero CI, Shea YR, Jones PA, Harrington SM, Tooke NE, Witebsky FG, Murray PR. Evaluation of pyrosequencing technology for the identification of clinically relevant non-dematiaceous yeast and related species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 821-30.
- Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. 2003. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 487-96.
- Metwally L, Hogg G, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Ong GM, Thompson G, Webb CH, McMullan R. Rapid differentiation between fluconazole-sensitive and -resistant species of *Candida* directly from positive blood-culture bottles by real-time PCR. *J Med Microbiol* 2007; 56: 964-70.
- Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5660-4.
- Maaroufi Y, De Bruyne JM, Duchateau V, Georgala A, Crokaert F. Early detection and identification of commonly encountered *Candida* species from stimulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. *J Mol Diagn* 2004; 6: 108-14.
- Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, Weekes E, Johnson JK, Lincalis DP, Venezia RA. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3381-3.
- Alexander BD, Ashley ED, Reller LB, Reed SD. Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 277-82.
- Shepard JR, Addison RM, Alexander BD, Della-Latta P, Gherna M, Haase G, Hall G. Multicenter evaluation of the *Candida albicans*/*Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 50-5.
- Reller ME, Mallonee AB, Kwiatkowski NP, Merz WG. Use of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for definitive, rapid identification of five common *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3802-3.
- Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 465-84.
- Rimek D, Singh J, Kappe R. Cross-reactivity of the PLATELIA CANDIDA antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3395-8.
- Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimanana antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1510-7.
- Lunel Verduyn FM, Voss A, Kuijper EJ, Gelinck LBS, Hoogerbrugge PM, Liem KL, Kullberg BJ, Verweij PE. Detection of the *Candida* antigen mannan in cerebrospinal fluid specimens from patients suspected of having candida meningitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 867-70.
- Lain A, Elguezabal N, Amutio E, Fernandez de Larrinoa I, Moragues MD, Ponton J. Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Dev Immunol* 2008; 2008: 1-7.

38. Persat F, Topenot R, Piens MA, Thiebaut A, Dannaoui E, Picot S. Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidosis. *Mycoses* 2002; 45: 455-60.
39. Year H., Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 864-70.
40. Fujita SI, Hashimoto T. Detection of serum *candida* antigens by enzyme-linked immunosorbent assays and a latex agglutination test with anti-*candida albicans* and anti-*candida krusei* antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3132-7.
41. Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kakeya H, Otsubo T, Kawamura S et al. Enolase antigen, mannann antigen, cand-tec antigen, and β -glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1918-21.
42. Masuoka J. Surface glycans of candida albicans and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 281-310.
43. Prella M, Bille J, Pugnale M, Duvoisin B, Cavassini M, Calandra T, Marchetti O. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 95-101.
44. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA et al. B-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
45. Pasqualotto DA, Denning DW. Diagnosis of invasive fungal infections-current limitations of classical and new diagnostic methods. *Eur Oncol Rev* 2005; Business Briefing 1-11.

Prispelo 2009-03-18, sprejeto 2009-06-10