

Tomasz Dzieciatkowski^{1, 2*}, Agata Sulowska², Maciej Przybylski^{1, 2}¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny²Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny

Wpłynęło w maju 2014 r.

1. Wstęp. 2. Diagnostyka serologiczna zakażeń *Candida* spp. 3. Diagnostyka serologiczna aspergillozy 4. Diagnostyka serologiczna kryptokokozy 5. Metody molekularne stosowane w diagnostyce grzybic inwazyjnych 6. Podsumowanie

Serological and molecular diagnostic methods for invasive fungal infections

Abstract: Various species of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. remain the most common cause of invasive fungal infections, but other yeasts and filamentous fungi are emerging as significant pathogens. Invasive mycoses continue to be a significant cause of morbidity, especially in transplant recipients and/or in patients undergoing long-time antibiotic therapy. A reliable and early diagnostic method of fungal infections by detecting fungal DNA or invasiveness factors, such as (1→3)-β-D-glucan or antimycelial antibodies, have proven very useful in reducing associated mortality in affected patients. This article is a review of the literature on current serological and molecular methods used in invasive fungemia diagnostics.

1. Introduction. 2. Serological diagnostics of *Candida* spp. infections. 3. Serological methods in diagnostics of invasive aspergillosis. 4. Serological diagnostics of *Cryptococcus neoformans* infections. 5. Molecular methods used in the diagnosis of invasive fungaemia. 8. Summary

Słowa kluczowe: grzybice inwazyjne, ELISA, PCR, immunosupresja

Keywords: invasive fungemia, ELISA, PCR, immunosuppression

1. Wstęp

Ze względu na znaczące w ostatnich latach zwiększenie liczby zabiegów transplantacji narządów uczynionych oraz komórek krwiotwórczych, konieczne stało się opracowanie i wdrożenie nowych, czułych metod wykrywania grzybic układowych. Powinny być one wykorzystywane w rutynowej praktyce klinicznej, zwłaszcza u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka wystąpienia zakażeń grzybiczych [12, 27]. Według wprowadzonych w 2008 przez EORTC/IFI (European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections) zrewidowanych zaleceń dotyczących definicji grzybic inwazyjnych, dodatni wynik badania wykonanego metodami biologii molekularnej lub serologicznymi jest jednym z kryteriów umożliwiających zdiagnozowanie prawdopodobnej (*probable*) grzybicy inwazyjnej. Metody niehodowlane stanowią istotny element laboratoryjnej diagnostyki inwazyjnych zakażeń grzybiczych, należy jednak podkreślić, że izolacja i hodowla pozostaje metodą najbardziej miarodajną – zgodnie z ustaleniami EORTC/IFI, wyizolowanie czynnika etiologicznego z materiału w warunkach fizjologicznych jałowego jest jedynym

kryterium mikrobiologicznym umożliwiającym zdefiniowanie pewnej (*proven*) grzybicy inwazyjnej [10].

Współczesna diagnostyka serologiczna grzybic inwazyjnych obejmuje wykrywanie w surowicy i/lub innych płynach ustrojowych:

- antygenów rozpuszczalnych,
- swoistych przeciwciał przeciwgrzybiczych oraz określanie ich miana.

Standardowe techniki serologiczne, takie jak immunodufuzja, testy precypitacyjne czy odczyn wiązania dopełniacza okazały się niewystarczająco czułe i swoiste, aby mogły być stosowane we współczesnej diagnostyce grzybic narządowych. Do metod wykorzystywanych obecnie w komercyjnych testach laboratoryjnych zalicza się:

- aglutynację lateksową (LA),
- metody immunofluorescencyjne: bezpośrednie (DIF) oraz pośrednie (IIF),
- metody immunoenzymatyczne: jakościowe (EIA) oraz ilościowe (ELISA).

Testy ilościowe, poprzez podanie miana antygeny czy przeciwciał, mogą służyć do obserwacji i monitorowania toczącego się zakażenia. Pozwala to na śledzenie samego procesu rozwoju grzybicy inwazyjnej,

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel: 022 599 17 74; e-mail: dzieciatkowski@wp.pl

jak i skuteczności zastosowanego leczenia. Należy jednak pamiętać, że badanie miana przeciwciał przeciwgrzybiczych (zwłaszcza w klasie IgM) jest utrudnione u pacjentów z niedoborami odporności, a uzyskane wyniki w tej grupie chorych mogą być fałszywie ujemne [27]. Podobnie na uwagę zasługuje fakt, iż obecnie używane metody traktują rozpuszczalne oligosacharydy ściany komórkowej konkretnych gatunków grzybów jak markery antygenowe zakażenia: podczas inwazyjnej formy infekcji utrzymują się one w krwiobiegu tylko przez pewien czas (od 8 do 96 godz.), ulegając nieustannej eliminacji w wyniku wiązania w kompleksach immunologicznych [27]. W związku z tym, niezwykle istotne jest regularne monitorowanie ich obecności w płynach ustrojowych chorych (surowicy krwi lub osoczu) – Rys. 1.

2. Diagnostyka serologiczna zakażeń *Candida* spp.

Zakażenia wywoływane przez grzyby drożdżopodobne w przeważającej większości powodowane są przez gatunek *Candida albicans*. Podobnie jak pozostałe grzyby należące do tego rodzaju, posiada on w swojej ścianie komórkowej mannan, który jest wysoce immunogennym antygenem polisacharydowym, indukującym odpowiedź humoralną [18]. Zjawisko to wykorzystano do diagnostyki inwazyjnej kandydozy opartej na równoległym monitorowaniu w surowicy krwi miana krążącego mannanu i przeciwciał anty-mannanowych u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka [18, 28].

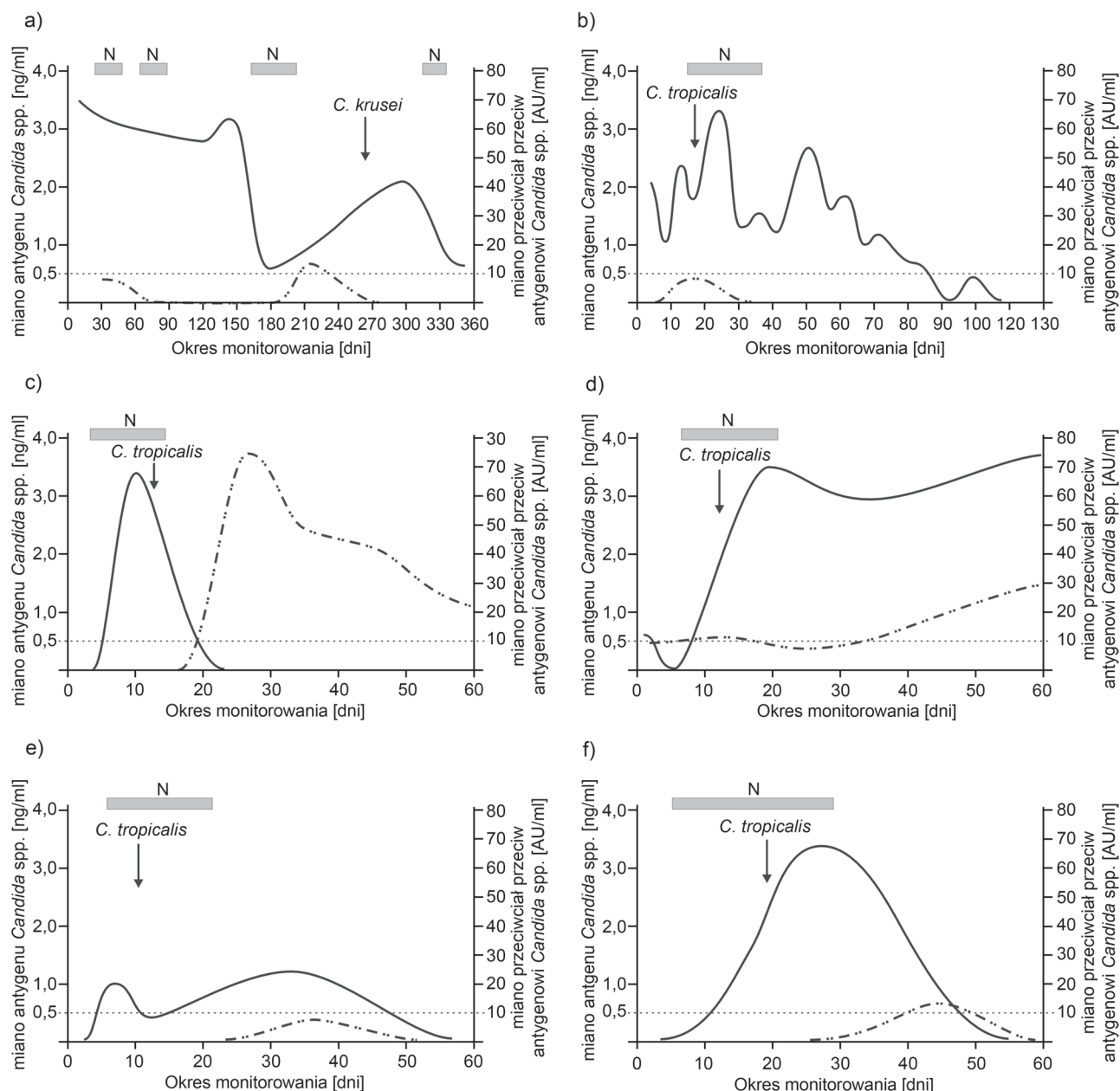
Ilościowy test immunoenzymatyczny Platelia® *Candida* Ag (Bio-Rad) może być stosowany do wykrywania szerokiego zakresu stężeń antygeny, a jego wysoka czułość analityczna (0,062 ng/ml) umożliwia monitorowanie zakażenia poczynając od wczesnych jego etapów. W metodzie tej wykorzystano monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko α -1,5 oligomannozydom *Candida* spp. Test powinien być stosowany w diagnostyce układowej kandydozy u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka, niezależnie od ich statusu immunologicznego i/lub stadium rozwoju fungemii [28]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wykrycie obecności antygeny mannanowego na wczesnym etapie zakażenia zależy w dużym stopniu od liczby i częstości oznaczeń wykonanych dla danego pacjenta. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, iż czułość diagnostyczna testu Platelia *Candida* przy jednorazowym oznaczeniu w pojedynczej próbce surowicy krwi wynosi 58% [9], a wskaźnik ten wzrasta jeżeli badanie zostanie powtórzone w kolejnych próbkach krwi, pobranych od tego samego chorego. Oznacza to, że pojedynczy ujemny wynik na obecność antygeny nie wyklucza inwazyjnej formy kandydozy, co może być powodowane zbyt niskim stężeniem antygeny, który w przebiegu zakaże-

nia podlega szybkiej eliminacji z krwiobiegu. Test jest przydatny w rozpoznawaniu zakażeń o etiologii *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*, wykazuje natomiast znacznie mniejszą czułość w przypadku diagnozowania zakażeń wywołanych przez *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. guillierimondi* [9, 18, 28].

Drugim istotnym elementem diagnostyki serologicznej w przebiegu zakażenia grzybami z rodzaju *Candida* spp jest ocena poziomu przeciwciał anty-mannanowych. Wykrycie przeciwciał w klasach IgM i/lub IgG odzwierciedla aktualne oraz przebyte zakażenie; wskazuje też na możliwość zakażenia układowego u pacjentów z grup wysokiego ryzyka. Należy wyraźnie podkreślić, że wynik pojedynczego oznaczenia przeciwciał, interpretowany w oderwaniu od wyników pozostałych badań mikologicznych (hodowla, wykrywanie antygenów), diagnostyki obrazowej oraz oceny stanu klinicznego pacjenta nie umożliwia rozróżnienia pomiędzy kolonizacją, miejscowymi postaciami kandydozy a formą inwazyjną zakażenia [18, 28]. Nagły wzrost poziomu przeciwciał, zwłaszcza w klasie IgM, świadczyć może o rozwoju aktywnego zakażenia, natomiast wynik ujemny nie wyklucza inwazyjnej postaci zakażenia *Candida* spp. Uzyskane w trakcie monitorowania serologicznego ujemne wyniki oznaczeń przeciwciał przy jednoczesnej długotrwałej antygenemii mannanowej mogą być związane z niepomysłnym rokowaniem [9, 22]. Przy zlecaniu badania poziomu swoistych przeciwciał przeciwgrzybiczych należy pamiętać, iż powinny być one wykonywane kilkakrotnie w odstępach 10–21 dni. O toczącym się zakażeniu grzybiczym świadczy zmiana poziomu przeciwciał o 25–30% początkowej wartości w tym odstępie czasowym [21, 22].

Dodatkowo na podkreślenie zasługuje fakt, iż pojedyncze oznaczenie przeciwciał IgG anty-*Candida* ma niską wartość diagnostyczną. Dodatni wynik badania jest niesłychanie częsty – przeciwciała w tej klasie na wysokim poziomie (powyżej 70 IU/ml) występują w surowicy około 90% pacjentów bez historii inwazyjnej kandydozy [1, 18].

W diagnostyce serologicznej inwazyjnej kandydozy zalecane jest równoległe badanie antygenów i przeciwciał, co pozwala na znaczne zwiększenie czułości oraz swoistości wykrywania inwazyjnych postaci zakażeń *Candida* spp. Część chorych wykazuje dodatni wynik dla obydwu markerów na różnych etapach tego samego epizodu zakażenia, co jest najlepszym potwierdzeniem rozwoju infekcji. U pacjentów z upośledzonym układem odpornościowym, u których mogą wystąpić zaburzenia w tworzeniu przeciwciał sugerowane jest stałe monitorowanie ich poziomu, a także wykonywanie testu wykrywającego antygen mannanowy. Przydatność takiego toku postępowania diagnostycznego wykazano także u chorych w okresie neutropenii [18], przy czym badanie antygenów powinno być wtedy wykonywane



Rys. 1. Przykładowe wyniki monitorowania antygenu mannanowego *Candida* spp. i przeciwciał skierowanych przeciwko mannanowi w przebiegu inwazyjnej kandydozy.

— poziom antygenu mannanowego *Candida* spp., - · - · - · poziom przeciwciał przeciw mannanowi, ↓ – pierwsze wyhodowanie *Candida* spp. z próbki krwi obwodowej, N – okresy neutropenii; a – pacjent z ostrą białaczką limfoblastyczną, zakażenie *Candida krusei* [22]; b – f: zakażenie *Candida tropicalis* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (b, c) lub ostrą białaczką limfoblastyczną (d, e, f) [19].

odpowiednio często (co 73–96 h), a monitorowanie poziomu swoistych przeciwciał nabiera większego znaczenia u pacjentów z krótkimi epizodami neutropenii [22], w okresie odbudowy liczby neutrofilii [9] oraz przy nawrotach kandydozy inwazyjnej [18]. Z uwagi na częstotliwość współistnienia „szczytu” antygenemii z dodatnimi wynikami hodowli krwi, wydaje się być celowe równoczesne pobieranie próbek krwi do badań hodowlanych i serologicznych [28].

Kolejnymi wartościowymi parametrami służącymi do oceny aktywnego zakażenia *Candida* spp. są:

- wykrycie 1,3-β-D-glukanu w surowicy krwi,

- wykrycie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom pseudostrzępek (*Candida albicans* germ tube antibody, CAGTA).

(1→3)-β-D-glukan (BDG) jest β-D-glukopiranozylowym polisacharydem ściany komórkowej występującym u większości saprofitycznych i patogennych gatunków grzybów, z wyjątkiem *Mucorales* i *Cryptococcus* spp. Podobnie jak w przypadku innych sacharydów ściany komórkowej grzybów, BDG występuje w zarówno jako wielkocząsteczkowe polimery, jak i w formie rozpuszczalnej. Związek ten nie występuje w komórkach prokariotycznych ani eukariotycznych, zatem jego

Tabela I
Wyniki badań laboratoryjnych w zakażeniach wywoływanych przez *Candida* spp.

Rodzaj zakażenia	Wynik miana przeciwciał antymannanowych <i>Candida</i> spp.		Wynik miana przeciwciał anty-„germ tubes”	Wynik oznaczenia antygenemii <i>Candida</i> spp.
	IgM	IgG		
Przejściowe zakażenie błon śluzowych	+	-	-	-
Ostra kandydoza błon śluzowych	++	+	-	-
Przewlekła kandydoza błon śluzowych	+	+	-	-
Inwazyjna kandydoza	+	++	+	+(+/-)

pojawienie się we krwi oraz innych materiałach, jałowych w warunkach fizjologicznych, jest dobrym markerem grzybiczego zakażenia inwazyjnego, w tym kandydozy [11]. Dostępne na rynku testy służące do wykrywania BDG opierają się na zasadzie aktywacji kaskady koagulacyjnej amebocytów skrzypłocza *Limulus polyphemus*.

Sacharydy ściany komórkowej pseudostrzępek (filamenty, *pseudomycelium*) *Candida* spp. różnią się strukturą antygenową od ściany komórkowej blastokonidiów. Forma pseudomycelialna jest wytwarzana w reakcji na kontakt komórek drożdżaka ze składnikami surowicy, i co za tym idzie, świadczy o przenikaniu grzyba do łożyska naczyniowego, zatem synteza przeciwciał przeciwko antygenom filamentów *Candida* spp. implikuje wystąpienie inwazyjnej postaci zakażenia. [12, 13].

Dotychczasowe badania wykazały, że wieloczynnikowa diagnostyka obejmująca równoczesne monitorowanie antygenemii oraz poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko mannanowi pozwoliła na zwiększenie swoistości diagnostycznej w rozpoznawaniu inwazyjnej kandydozy do poziomu 83% [9]; dodatkowe oznaczenie poziomu 1,3- β -D-glukanu zwiększa ten wskaźnik do 88% [1]; równoczesne badanie przeciwciał CAGTA – do 96% [12]. Wprowadzenie kompleksowej diagnostyki serologicznej umożliwia także zwiększenie dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej inwazyjnej kandydozy u pacjentów z zaburzeniami odpowiedzi humoralnej, w tym pacjentów neutropenicznych.

3. Diagnostyka serologiczna aspergillozy

Podobnie jak przy zakażeniach *Candida* spp., w diagnostyce serologicznej chorób powodowanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, stosuje się oznaczenia antygenów rozpuszczalnych oraz swoistych przeciwciał. Podstawowym badaniem w diagnostyce inwazyjnej aspergillozy jest wykrywanie krążącego w surowicy krwi antygeny galaktomannanowego [16]. Jest to oligosacharyd ściany komórkowej o masie 25–50 kDa. Jego obecność wykazano u *Aspergillus fumigatus*, a także innych gatunków (*A. flavus*, *A. niger*) patogennych dla

człowieka. Galaktomannan jest wysoce immunogennym antygenem, dlatego też został uznany za dobry marker aspergillozy [8, 20]. W formie rozpuszczalnej może on krążyć w płynach ustrojowych w stężeniach 1–500 ng/ml. Uzupełnienie klasycznych metod hodowlanych o oznaczenie obecności galaktomannanu stało się możliwe dzięki wprowadzeniu na rynek dwóch testów: immunoenzymatycznego Platelia® *Aspergillus* Ag (Bio-Rad) oraz aglutynacji lateksowej Pastorex® *Aspergillus* (Bio-Rad). Wykazano, że w rozpoznawaniu inwazyjnej formy aspergillozy zdecydowanie bardziej przydatny jest pierwszy z nich, który umożliwia wykrycie ponad 10-krotnie mniejszej ilości antygenów w 1 ml surowicy w porównaniu z testem aglutynacji lateksowej, o czułości zaledwie 15 ng/ml [23].

Czułość wykrywania antygeny galaktomannanowego zależy także od miejsca toczącego się zakażenia. W przypadkach aspergillusowego zapalenia płuc, poziom detekcji krążącego antygeny w surowicy krwi jest wyraźnie niższy w porównaniu do postaci uogólnionej [7]. Ponadto we wczesnych fazach zakażenia antygen *Aspergillus* może występować w bardzo niskim stężeniu. W badaniach wykazano, że antygenemia w surowicy koreluje z klinicznie potwierdzoną aspergillozą oraz z odpowiedzią na terapię przeciwgrzybiczą [11]. Inne obserwacje wskazują, że potwierdzony dodatni wynik na obecność krążącego antygeny w klinicznie udokumentowanych przypadkach inwazyjnej aspergillozy może być podstawą do wdrożenia lub zmiany terapii przeciwgrzybiczej, nawet przy braku pozostałych kryteriów diagnostycznych [7]. Monitorowanie próbek surowic po wdrożeniu leczenia przeciwgrzybiczego daje możliwość oceny prawdopodobieństwa odpowiedzi na terapię i/lub konieczności włączenia leczenia alternatywnego [7, 14]. Obniżanie się poziomu wykrywanego galaktomannanu wydaje się mieć związek z pomyślnym rokowaniem; z drugiej jednak strony brak antygenemii nie wyklucza samej aspergillozy oraz zakażenia spowodowanego przez inne grzyby pleśniowe (*Fusarium* spp., *Mucor* spp.) [16]. Możliwe są też wyniki fałszywie dodatnie u chorych przyjmujących antybiotyki z grupy β -laktamów (amoksycylina, piperacylina) lub też z uszkodzoną śluzówką jelit [29].

Dyskusyjna jest także zmiana przyjętego przez producenta indeksu wartości „cut-off” testu. Dotychczas za próbki ujemne uznawano materiał o wartości indeksu poniżej 1, za dodatnie próbki o indeksie $>1,5$, natomiast wartości indeksu w zakresie 1–1,5 interpretowano jako wynik wątpliwy („grey zone”). Obecnie, zgodnie z informacjami załączanymi przez firmę, za dodatnie uznawane są surowice o wartości indeksu $>0,5$, zaś próbki o wartości $<0,5$ uważane są za ujemne. Zalecane jest także, by wszystkie próbki o indeksie $\geq 0,5$ były oznaczane ponownie z użyciem tej samej surowicy. Taka ocena oraz badanie wartości indeksu w kolejnych próbkach surowic pobranych od tego samego pacjenta ma na celu wyeliminowanie wyników fałszywie dodatnich spowodowanych zanieczyszczeniem materiału. Dwa kolejne badania z dodatnim wynikiem miałyby świadczyć o inwazyjnej aspergilozie. Dodatni wynik należy jednak zawsze interpretować w świetle danych klinicznych oraz w połączeniu z wynikami badań radiologicznych i innych testów laboratoryjnych [28].

Do badań przeciwciał anty-*Aspergillus* stosuje się obecnie podobnie jak w przypadku grzybów z rodzaju *Candida* testy immunoenzymatyczne, które umożliwiają ilościowe określenie miana przeciwciał. U osób zdrowych w zasadzie nie stwierdza się w surowicy przeciwciał anty-*Aspergillus*; występują one tylko u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka. Wartość diagnostyczna testów ELISA wykrywających swoiste przeciwciała jest wysoka zwłaszcza w przypadkach grzybnia płuc (*aspergilloma*) oraz aspergillozy płucnej, zwłaszcza u pacjentów immunokompetentnych. Ostrożna interpretacja wyników jest niezbędna natomiast wśród pacjentów z obniżoną odpornością ze względu na zbyt niskie tempo syntezy immunoglobulin.

4. Diagnostyka serologiczna kryptokokozy

Zakażenia wywoływane przez *Cryptococcus neoformans*, pomimo swego stosunkowo rzadkiego rozpowszechnienia, niosą dla chorych poważne ryzyko infekcji układowej. Przez wiele lat diagnostyka inwazyjnej kryptokokozy opierała się na hodowli grzyba oraz barwieniu negatywnym preparatów mikroskopowych tuszem chińskim w celu wykrywania form otoczkowych. Ze względu na trudności w badaniu tego patogenu w materiale klinicznym metodami tradycyjnymi, konieczne stało się wprowadzenia testów serologicznych, stwierdzających obecność antygenów *Cryptococcus* w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym [15].

Najbardziej rozpowszechnione testy, takie jak Pastrox® *Cryptococcus* (BioRad), opierają się na zasadzie aglutynacji lateksowej i wykrywają krążące antygeny polisacharydowe zawarte w ścianie komórkowej grzyba. Czulość analityczna tej metody nie należy do wysokich,

bowiem została określona na poziomie 30 ng/ml, zaś swoistość wynosi 93%. Ponadto niektóre partie testów dawały wysoki odsetek wyników fałszywie dodatnich i wątpliwych, ze względu na zanieczyszczenia pronazy stosowanej do wstępnej obróbki materiału klinicznego oraz reakcje krzyżowe z czynnikiem reumatoidalnym występującym w surowicy [5]. Do zalet metody należy natomiast niski koszt badania oraz prosta procedura wykonania oznaczenia. W obecnej chwili na rynku dostępny jest również jakościowy test immunoenzymatyczny Premier® *Cryptococcus* Ag, którego czulość wynosi 0,6 ng/ml. Jest on produkowany przez amerykańską firmę Meridian i przy użyciu seryjnych rozcieńczeń kontroli dodatniej umożliwia także analizę półilościową, która może pełnić rolę prognostyczną w przebiegu zakażenia [5, 15].

Ze względu na szerokie rozpowszechnienie *Cryptococcus neoformans* w środowisku nie prowadzi się obecnie badania swoistych przeciwciał w klasach IgM i IgG testami serologicznymi. Pojawiają się one wprawdzie w płynach ustrojowych w początkowym okresie zakażenia, lecz ich występowanie może być również skutkiem kontaktu z antygenami *Cryptococcus* obecnymi we wdychanym powietrzu.

5. Metody molekularne stosowane w diagnostyce grzybic inwazyjnych

Ze względu na różnorakie ograniczenia w badaniach serologicznych czy hodowli laboratoryjnej grzybów, konieczne stało się opracowanie nowych technik diagnostycznych, które umożliwiają wykrywanie tych patogenów w organizmie pacjenta już na początkowych etapach zakażenia oraz pozwalają uzyskać jednoznaczny wynik. Przełomem okazało się być wprowadzenie do rutynowej diagnostyki techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), odkrytej w 1983 roku przez Kary'ego Mullisa. Dodatkowy wzrost czułości i specyficzności osiągnięto dzięki zastosowaniu reakcji PCR połączonej z jednoczesną analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR, qPCR). Wyznacznikiem ilości matrycowego DNA jest w tej metodzie numer kolejnego cyklu, po którym kinetyka reakcji wchodzi w fazę logarytmicznego wzrostu ilości produktu. Technikę tą można także z powodzeniem stosować w przypadku dłuższej przechowywanego materiału biologicznego (próbek surowicy krwi), co stanowi poważne utrudnienie w przypadku badań serologicznych. Dodatkowo na korzyść real-time PCR przemawia możliwość zautomatyzowania badania i znacznego obniżenia kosztów analizy próbek.

Mimo tych innowacji obecnie brak jest rozpowszechnionych komercyjnych testów mikologicznych, które wykorzystywałyby metody biologii molekularnej

[4, 17]. Wynika to przede wszystkim z komplikacji w izolacji DNA grzybów, spowodowanymi trudnościami w rozbiciu ich ściany komórkowej oraz kłopotów ze znalezieniem specyficznych i konserwatywnych sekwencji docelowych w genomie grzybów patogennych [4]. Dodatkowe problemy związane są z walidacją metod, standaryzacją międzylaboratoryjną oraz określeniem parametrów kliniczno-diagnostycznych. Z tego też powodu oznaczenia z użyciem testów PCR i qPCR mają głównie charakter naukowo-badawczy [1, 30] lub dotyczą badania pokrewieństwa genetycznego izolatów na potrzeby dochodzenia epidemiologicznego [6, 26]. Wyjątek stanowią wprowadzone niedawno zestawy komercyjne oparte na technice real-time PCR: test MycAssay®, wykrywający w surowicy krwi DNA grzybów z rodzaju *Aspergillus*; test SeptiFast® dedykowany do próbek krwi pełnej i wykrywający *Aspergillus fumigatus* oraz grzyby z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*; a także test FilmArray® BC, wykrywający i różnicujący *C. albicans* z czterema innymi klinicznie istotnymi drożdżakami z rodzaju *Candida* [2, 3, 17, 24, 26, 27]. Niewielka liczba opublikowanych wyników prezentujących przydatność kliniczną testów molekularnych, wysoka cena oznaczeń oraz konieczność posiadania specjalistycznego wyposażenia pracowni biologii molekularnej nie sprzyjają na obecnym etapie ich rozpowszechnieniu w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej, co – jak mamy nadzieję – zmieni się w przyszłości na korzyść.

6. Podsumowanie

W związku z rozwojem współczesnej transplantologii zakażenia o etiologii grzybiczej należą obecnie do najpoważniejszych powikłań u osób poddawanych zabiegom przeszczepienia, zarówno narządów unaczynionych, jak i komórek hematopoetycznych. Choć wprowadzenie standaryzowanych strategii postępowania terapeutycznego oraz zalecanego toku badań laboratoryjnych wpłynęło na poprawę skuteczności leczenia zakażeń potransplantacyjnych, to jednak trudności w szybkiej i prawidłowej diagnostyce mykologicznej sprawiają że zakażenia grzybicze wciąż pozostają istotnym wyzwaniem u osób z zaburzeniami odporności i/lub poddanych długotrwałej antybiotykoterapii.

Piśmiennictwo

1. Alam F.F., Mustafa A.S., Khan Z.U.: Comparative evaluation of (1,3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infect. Dis.* 7, 103 (2007)
2. Altun O., Almuhayawi M., Ullberg M., Ozenci V.: Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4130–4136 (2013)
3. Blaschke A.J., Heyrend C., Byington C.L., Fisher M.A., Barker E., Garrone N.F., Thatcher S.A., Pavia A.T., Barney T., Alger G.D., Daly J.A., Ririe K.M., Ota I., Poritz M.A.: Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 349–355 (2012)
4. Challier S., Boyer S., Abachin E., Berche P.: Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 844–846 (2004)
5. Gade W., Hinnefeld S.W., Babcock L.S., Gilligan P., Kelly W., Wait K., Greer D., Pinilla M., Kaplan R.L.: Comparison of the PREMIER cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigens. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1616–1619 (1991)
6. Hansen D., Healy M., Reece K., Smith C., Woods G.L.: Repetitive-sequence-based PCR using the DiversiLab system for identification of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1835–1839 (2008)
7. Kawazu M., Kanda Y., Nannya Y., Aoki K., Kurokawa M., Chiba S., Motokura T., Hirai H., Ogawa S.: Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2733–2741 (2004)
8. Mennink-Kersten M.A., Donnelly J.P., Verweij P.E.: Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect. Dis.* 4, 349–357 (2004)
9. Mikulska M., Calandra T., Sanguinetti M., Poulain D., Viscoli C.: The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit. Care*, 14, R222 (2010)
10. De Pauw B., Benoit J.E. i wsp.: 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.* 46, 1813–1821 (2008)
11. Pazos C., Pontón J., Del Palacio A.: Contribution of (1-3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J. Clin. Microbiol.* 43, 299–305 (2005)
12. Pemán J., Zaragoza R.: Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Mycoses*, 53, 424–433 (2010)
13. Pemán J., Zaragoza R., Quindós G., Alkorta M., Cuétara M.S., Camarena J.J., Ramírez P., Giménez M.J., Martín-Mazuelos E., Linares-Sicilia M.J., Pontón J.: Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in Intensive Care Unit patients. *BMC Infect. Dis.* 11, 60–66 (2011)
14. Pinel C., Fricker-Hidalgo H., Lebeau B., Garban F., Hamidfar R., Ambroise-Thomas P., Grillot R.: Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2184–2186 (2003)
15. Saha D.C., Xess I., Biswas A., Bhowmik D.M., Padma M.V.: Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. *J. Med. Microbiol.* 58, 1098–1105 (2009)
16. Salonen J., Lehtonen O.P., Teräsjarvi M.R., Nikoskelainen J.: *Aspergillus* antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage

- specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome. *Scand. J. Infect. Dis.* **32**, 485–490 (2000)
17. Schabereiter-Gurtner C., Selitsch B., Rotter M.L., Hirschl A.M., Willinger B.: Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 906–914 (2007)
 18. Sendid B., Poirot J.L., Tabouret M., Bonnin A., Caillot D., Camus D., Poulain D.: Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* **51**, 433–442 (2002)
 19. Sendid B., Caillot B., Baccouch-Humbert B., Klingspor L., Grandjean M., Bonnin A., Poulain D.: Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4551–4558 (2003)
 20. Siemann M., Koch-Dörfler M.: The Platelia *Aspergillus* ELISA in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). *Mycoses*, **44**, 266–272 (2001)
 21. Steinmann J., Buer J., Rath P.M., Paul A., Saner F.: Invasive aspergillosis in two liver transplant recipients: diagnosis by SeptiFast. *Transpl. Infect. Dis.* **11**, 175–178 (2009)
 22. Verduyn Lunel F.M., Mennink-Kersten A.S.H.M., Ruegebrinka D.: Value of *Candida* serum markers in patients with invasive candidiasis after myeloablative chemotherapy. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **64**, 408–415 (2009)
 23. Verweij P.E., Erjavec Z., Sluiter W., Goessens W., Rozenberg-Arska M., Debets-Ossenkopp Y.J., Guiot H.F., Meis J.F.: Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and interlaboratory reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1612–1616 (1998)
 24. von Lilienfeld-Toal M., Lehmann L.E., Raadts A.D., Hahn-Ast C., Orlopp K.S., Marklein G., Purr I., Cook G., Hoeft A., Glasmacher A., Stüber F.: Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2405–2410 (2009)
 25. White P.L., Perry M.D., Moody A., Follett S.A., Morgan G., Barnes R.A.: Evaluation of analytical and preliminary clinical performance of Myconostica MycAssay *Aspergillus* when testing serum specimens for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2169–2174 (2011)
 26. Wise M.G., Healy M., Reece K., Smith R., Walton D., Dutch W., Renwick A., Huong J., Young S., Tarrand J., Kontoyiannis D.P.: Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J. Med. Microbiol.* **56**, 778–787 (2007)
 27. Yeo S.F., Wong B.: Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 465–484 (2002)
 28. Yera 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.* **20**, 864–870 (2001)
 29. Zandijk E., Mewis A., Magerman K., Cartuyvels R.: False-positive results by the platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1132–1133 (2008)
 30. Zarrinfar H., Mirhendi H., Makimura K., Satoh K., Khodadadi H., Paknejad O.: Use of mycological, nested PCR, and real-time PCR methods on BAL fluids for detection of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* in solid organ transplant recipients. *Mycopathologia*, **176**, 377–385 (2013)

