

Mikrobiološka diagnostika invazivne aspergiloze

Microbiological diagnosis of invasive aspergillosis

Saša Simčič, Tadeja Matos

*Inštitut za mikrobiologijo
in imunologijo,
Medicinska fakulteta
Univerze v Ljubljani*

Korespondenca/ Correspondence:

Znanst. sod. asist.
dr. Saša Simčič, univ.
dipl. kem., Inštitut
za mikrobiologijo in
imunologijo, Medicinska
fakulteta Univerze v
Ljubljani, Zaloška 4, 1000
Ljubljana, tel.: 01-543-
74-91, e-mail: sasa.
simcic@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

invazivna aspergiloza,
mikroskopski preparat,
kultura, fenotipska
identifikacija,
galaktomanan, β -D-
glukan, molekularna
diagnostika

Key words:

invasive aspergillosis,
wet mount, culture,
phenotypical
identification,
galactomannan, β -D-
glucan, molecular
diagnosis

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010;
79: 716-25

Prispelo: 22. feb. 2010,
Sprejeto: 28. maj 2010

Izvleček

Izhodišča: Invazivna aspergiloza je pomembna oportunistična glivična okužba pri skrajno imunsko oslabljenih bolnikih. Klinična diagnoza invazivne aspergiloze je težavna, ker znaki in simptomi bolezni niso specifični. Radiološke ugotovitve niso patognomonične, vendar lahko napeljujejo na bolezen. Pogost problem je majhna občutljivost osamitev aspergilusa iz navadno sterilnih mest. Hemokulture niso uporabne za dokazovanje aspergilusa, ker je osamitev aspergilusa vedno rezultat onesnaženja. Za čim prejšnje zdravljenje pa je nujno potrebna zgodnja diagnoza bolezni, ki je težavna tudi zato, ker je na voljo malo diagnostičnih orodij. Testa na galaktomanan in β -D-glukan lahko pomagata pri diagnozi in izboljšata izid bolezni. Obetajoče so nove tehnike verižne reakcije s polimerazo (PCR).

Zaključki: Za dokazovanje aspergiloze sta potrebna osamitev aspergilusa in mikroskopska analiza sterilno odvzetega vzorca, ki kaže na prisotnost glive. Na verjetno invazivno aspergilozo lahko napeljujeta pozitivna antigenska testa na galaktomanan aspergilusa in β -D-glukan v bolnikovem serumu in na galaktomanan v bronho-alveolnem izpirku ali likvorju. Vsi lahko upamo, da bo izboljšanje testa PCR obšlo omejitve sedanjih metod in omogočilo boljšo diagnostično izbiro za to bolezen.

Abstract

Background: Invasive aspergillosis is an important opportunistic fungal infection in highly immunocompromised patients. Clinical diagnosis of invasive aspergillosis remains difficult in that clinical signs and symptoms are nonspecific. Radiologic findings are not pathognomonic but can be suggestive. The isolation of aspergilli from a normally sterile environment, which lacks sensitivity, usually represents a problem. Blood cultures are of limited utility, because the recovery of *Aspergillus* species from blood cultures invariably represents contamination. Early diagnosis is critical to a medical treatment, but is difficult to achieve with current methods. Measurement of galactomannan and β -D-glucan can be used as an aid in the diagnosis of invasive aspergillosis and it might promote a favourable outcome. The use of polymerase-chain-reaction assay (PCR), although promising, is currently investigational.

Conclusions: The verification of aspergillosis requires isolation and microscopic analysis of sterile material showing the fungal structures. Non-culture-based mycological tests, especially assays for the detection of *Aspergillus* galactomannan and β -D-glucan in serum, or *Aspergillus* galactomannan in BAL and cerebrospinal fluid specimens are fit to convey useful information and may enable a diagnosis of probable invasive aspergillosis. We may hope that PCR will be improved enough to overcome the limitations of current methods and be developed into a better diagnostic modality for this disease.

1. Uvod

Aspergillus spp. so saprofitne ubikvitarne plesni, ki so postale pomemben povzročitelj življenjsko nevarnih okužb. Plesen lahko občasno kolonizira dihala zdravih ljudi, pogosteje kadilcev, pogosto pa je prisotna na površini dihalnih poti bolnikov s cistično fibrozo in kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB). Ni jasno, ali kolonizacija pomeni večje tveganje za nastanek invazivne aspergiloze (IA), če se imunski status bolnika spremeni. Plesni *Aspergillus* spp. povzročajo širok spekter kliničnih slik. Klinični pojavi in resnost bolezni so odvisni predvsem od bolnikovega imunskega stanja.¹ Dobro so znane in opredeljene skupine bolnikov, ki imajo veliko tveganje za nastanek IA. To so bolniki z daljšimi obdobji nevtropenije, bolniki z napredovalo okužbo z virusom HIV, bolniki s prirojeno imunsko pomanjkljivostjo, kot je kronična granulomatozna bolezen, in bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC) ali čvrstih organov.^{2,3} Smrtnost zaradi IA je pri teh bolnikih med 40 % in 90 % in je odvisna od prizadetosti imunskega sistema, od mesta okužbe in uporabljenega načina zdravljenja. Invazivne okužbe s plesnimi *Aspergillus* spp. naraščajo in v največjem deležu (14–18 %) prizadenejo bolnike po presaditvi srca in pljuč. Najbolj pogost povzročitelj bolezni je vrsta *A. fumigatus*, sledijo mu vrste *A. flavus*, *A. terreus* in *A. niger*.^{4–6} Vrsta *A. nidulans* je redek povzročitelj bolezni in je značilen za bolnike s kronično granulomatozno boleznijo.⁷ Težave povzroča tudi odpornost nekaterih plesni rodu *Aspergillus* spp. na antimikotike; vrsta *A. terreus* je odporna na amfotericin B, kar lahko opazimo tudi pri nekaterih drugih vrstah aspergilusa, kot so *A. flavus*, *A. lentulus*, *A. nidulans*, *A. ustus* in *A. glaucus*.⁵ Epidemiologija IA se spreminja; bolezen se pri bolnikih po PKMC vse pogosteje pojavlja v obdobju, ko nevtropenija ni izražena ali pa se pojavlja pri bolnikih v kritičnem stanju, ki se zdravijo v intenzivnih enotah (EIT) in niso težje imunsko oslabljeni.^{3,8} Zaradi naraščajoče incidence jo nekateri opredeljujejo kot porajajočo se bolezen pri tej skupini bolnikov.^{2,9,10} Epidemioloških podatkov o incidenci invazivne pljučne aspergiloze pri

kritično bolnih v EIT je malo. Ta je v veliki meri odvisna od strukture bolnikov, ki se zdravijo v EIT. Podatki so zelo različni, in se gibljejo med 0,3 % in 5,8 %.¹¹ IA so potrdili v avtopsitski raziskavi bolnikov EIT pri 2,7 % bolnikov.¹²

Osamitev plesni *Aspergillus* spp. iz dihal kritično bolnih je lahko prvi znak IA in nikakor ne sme biti rutinsko opredeljena kot kolonizacija dihalnih poti tudi pri sicer imunsko neoslabljenih bolnikih. Klinični znaki in simptomi IA ter slikovne diagnostične metode so pogosto nespecifični. Znano je, da je nevtropenija glavni dejavnik tveganja za nastanek IA. Pri bolnikih s sepo opisujejo dvofazni imunski odziv: zgodnji prekomerni vnetni fazi sledi protivnetni odziv, ki se kaže kot imunoparaliza (*angl.* compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS). To pa pomeni pravzaprav začasno obliko pridobljene imunske pomanjkljivosti, ki je lahko povezana z razvojem IA in drugih oportunističnih okužb pri kritično bolnih.^{13,14}

Kritično bolni v EIT so pogosto zdravljeni s kortikosteroidi, ki so se izkazali kot uspešni pri zdravljenju vztrajajočega septičnega šoka.¹⁵ Kortikosteroidi zmanjšujejo učinkovitost delovanja makrofagov in mononuklearnih celic pri odstranjevanju spor in hif plesni *Aspergillus* spp., kar predstavlja prvo obrambno črto proti plesni *Aspergillus* spp.¹⁶ Tudi pri bolnikih z akutnim poslabšanjem KOPB, ki potrebujejo sistemsko zdravljenje s kortikosteroidi, je večje tveganje za nastanek IA, celo kadar se zdravijo z zmernimi odmerki in jih ne prejemajo dlje od enega tedna.^{10,16–18} Priporočajo, da je pri teh bolnikih ob prisotnih kliničnih znakih pljučnice in osamitvi plesni *Aspergillus* spp. iz spodnjih dihal smiselno začeti antimikotično zdravljenje. To zdravljenje pa ni smiselno pri tistih bolnikih, ki imajo osamljeno plesen *Aspergillus* spp. in hkrati nimajo drugih dejavnikov tveganja, klinične slike ter radioloških znakov pljučnice. V teh primerih je potrebno izolat razložiti kot posledico kolonizacije dihalnih poti.

Osamitev povzročitelja iz spodnjih dihal je mnogokrat prvi kazalec, ki nakazuje, da bi pri bolniku lahko šlo tudi za okužbo. Glede na to, da je občutljivost kulture iz dihal niz-

ka in se giblje od 15–70 %, pa je IA verjetno še precej podcenjena.¹⁹ Občutljivost kulture *Aspergillus* iz bronhoalveolarnega izpirka (BAL) pri IA je 77 %.²⁰

Ne glede na to, da uspešnost osamitve plesni *Aspergillus* spp. iz vzorcev spodnjih dihal ni visoka, prav tako ne visoko specifična, je velikokrat prva opora pri diagnostiki kritično bolnega.^{10,11} Napovedna vrednost pozitivnega izvida osamitve plesni *Aspergillus* spp. iz dihal je v veliki meri odvisna od osnovne bolezni oziroma stanja bolnika.² Najvišja (50–74 %) je pri bolnikih po alogeni PKMC, pri bolnikih z nevtropenijo in bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi, kar ustreza skupini z najvišjim tveganjem za nastanek IA.^{2,20} Pomen osamitve plesni *Aspergillus* spp. iz nesterilnih mest je najtežje vrednotiti pri bolnikih s srednjim tveganjem za nastanek IA. Napovedna vrednost pri tej skupini bolnikov se giblje med 10 in 30 %. V to skupino sodijo bolniki po avtologni PKMC, bolniki, ki se zdravijo s kortikosteroidi, podhranjeni, okuženi z virusom HIV, bolniki z rakavo boleznijo, bolniki po presaditvi čvrstih organov, bolniki s sladkorno boleznijo in bolniki s KOPB. Nizko stopnjo tveganja za nastanek IA imajo bolniki s cistično fibrozo in sistemskimi vezivnotkivnimi boleznimi.^{2,11}

2. Laboratorijska diagnostika invazivne aspergiloze

Za čim prejšnje zdravljenje IA je nujno potrebna zgodnja diagnoza bolezni, ki je težavna tudi zato, ker je na voljo malo diagnostičnih orodij.^{3–5} Člani Skupine za invazivne glivične okužbe pri Evropski organizaciji za raziskave in zdravljenje rakavih obolenj in člani Skupine za raziskave mikoz Nacionalnega inštituta za alergologijo in infekcijske bolezni (skupina za soglasje EORTC/MSG) so leta 2002 oblikovali, leta 2008 pa obnovili merila za razvrščanje invazivnih glivičnih bolezni pri imunsko oslabljenih bolnikih z rakom in pri bolnikih po PKMC, v dokazano, verjetno ali možno invazivno glivično bolezen.²¹ Merila, ki temeljijo na dejavniki gostitelja, kliničnih znakih bolezni in mikrobiološki diagnozi, so v pomoč pri izvajanju kliničnih in epidemioloških raziskav. Z

dvema izjemama potrditev dokazane in verjetne IA zahteva osamitev aspergilusa v kulturi. Prva izjema je primer, ko uspemo pri bolniku v prizadetem tkivu histopatološko dokazati hife, značilne za plesen *Aspergillus* spp., v kulturi pa nam aspergilusa ne uspe osamiti. Druga izjema predstavlja izpolnjevanje meril za verjetno IA s pozitivnimi testi, ki ne temeljijo na osamitvi aspergilusa v kulturi, to je s testoma na galaktomanan (GM) v serumu, plazmi, BAL ali likvorju in s testom na β -D-glukan (BG) v serumu in s skladnimi radiološkimi ugotovitvami z računalniško tomografijo (CT). Molekularne metode dokazovanja plesni *Aspergillus* spp. v kliničnih vzorcih v merila niso vključene, ker nobena od molekularnih tehnik še ni bila standardizirana in ovrednotena. Obnovljena merila lahko skupaj z leta 2005 objavljenim dokumentom Hope WW in sod., s podrobnimi opisi kliničnih, radioloških in patoloških značilnosti IA in z leta 2008 objavljenimi smernicami Ameriškega združenja za infekcijske bolezni pomagajo pri vsakodnevni klinični praksi.^{3,21,22}

Prisotnost invazivnih hif v pregledanem bioptičnem vzorcu tkiva ali osamitev aspergilusa iz navadno sterilnih mest v telesu predstavlja nesporen dokaz IA.^{3–6,23} Te diagnostične metode pri kritično bolnih mnogokrat ni mogoče napraviti zaradi njihove splošne prizadetosti, ker bolniki dobivajo inotropna sredstva in so umetno predihavani. Ob pozitivni osamitvi je pomemben tudi izvid razmaza kliničnega vzorca, barvanega specifično na glivne strukture. V eni od raziskav so ugotovili, da je bila prisotnost septiranih hif v vzorcih iz dihal nenevtropeničnih bolnikov bistveno večja pri bolnikih z IA, kot pri bolnikih, ki so bili le kolonizirani.²⁴ Kvantitativne opredelitve števila kolonij v vzorcu kot dejavnik, ki bi lahko ločeval med kolonizacijo in okužbo, še niso raziskovali. Zdi pa se smiselna semikvantitativna ocena števila kolonij, saj veliko število kolonij v odsotnosti bakterijskih povzročiteljev v vzorcih iz dihal poveča verjetnost, da se pri bolniku razvija IA. Za potrditev diagnoze je potrebo upoštevati še druge dejavnike bolnika (na primer število limfocitov CD4) in diagnostična merila, kot so slikovne diagnostične metode in določanje GM.² Pri bolni-

ku, ki z veliko verjetnostjo lahko zbolijo zaradi IA in ima radiološko potrjene zgodnje spremembe tkiva, kot sta vozeli ali infiltrati,²⁵ se s pozitivnim testom na GM v serumu ali z izolatoma *Aspergillus* v izločkih dihalnih poti velikokrat lahko izognemo invazivnemu vzorčenju tkiva. Test na GM v serumu se uporablja za sledenje antigenemije, ki je zgodnji pokazatelj bolezni pri bolnikih z visokim tveganjem za nastanek IA. Rezultati metaanalize, ki so jo objavili Pfeiffer CD in sod., kažejo, da ima test 71-odstotno skupno občutljivost in 89-odstotno skupno specifičnost za dokazane primere IA. Diagnostična točnost testa je dokaj različna za različne skupine bolnikov.²⁶ Raziskave kažejo, da je določanje GM v BAL življenjsko ogroženih bolnikov z znaki pljučnice, ki se zdravijo v EIT, celo bolj občutljivo (88 %) od določanja GM v serumu (42 %),^{27,28} zato testiranje BAL poveča občutljivost testa za verjetno pljučno IA.²¹ Če je test na GM dokaj specifičen za IA, pozitiven test na BG lahko napove tudi druge invazivne glivične bolezni, kot je kandidoza, ali okužbe z drugimi plesnimi ali okužbo z bakterijo *Pneumocystis jiroveci*. Diagnostiko IA z novimi tehnikami verižne reakcije s polimerazo (PCR) še raziskujejo, vendar pa obeta zaradi hitrosti, zaradi možnosti določitve vrste *Aspergillus* in določitve genov, ki so vzrok za odpornost vrste na antimikotična zdravila.³⁻⁶

2.1. Neposredne tehnike

Prednosti neposrednega mikroskopskega pregleda kliničnega vzorca pred osamitvijo sta višja občutljivost in krajši čas do prve informacije o vpletenosti gliv v patogenezo bolezni bolnika. Zavedati se moramo, da zaradi nespecifičnosti mikroskopsko morfološke slike ne moremo razlikovati med različnimi plesnimi, kot so *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Penicillium* in drugimi. Prisotnost razvejanih hif v tkivu kaže na invazivno rast glive v tkivo, kar je lahko pomoč pri razlikovanju s kolonizacijo dihalnih poti, kjer osamimo plesen iz konidijev, ki naključno kolonizirajo dihalne poti.^{1,24} Napovedna vrednost pozitivnega mikroskopskega izvida je v veliki meri odvisna od kakovosti poslanega vzorca. Razumljivo je,

da so kvalitetnejši vzorci odvzeti z invazivnimi postopki, kot so radiološko ali ultrazvočno vodene perkutane igelne biopsije in vzorci odvzeti ob bronhoskopiji, kot pa aspirat traheje in sputum, kar pa je mnogokrat težko izvedljivo prav pri bolnikih, ki imajo največje tveganje za nastanek IA.

Vzorci bolnikov, pri katerih obstaja klinični sum na glivično okužbo, so rutinsko podvrženi neposrednim postopkom obdelave, ki se razlikujejo glede na vrsto vzorca, stopnjo klinične nujnosti in laboratorij. Vzorce lahko pripravimo kot razmaz z dodatkom 10- do 20-odstotnega KOH ali brez njega, ki delno razgradi proteinski material v tkivu in zbistri preparat tako, da se lepše prikažejo morebitne hife gliv, ki jih ta postopek ne prizadene. Razmaz se lahko fiksira in barva z različnimi barvili, kot so barvila za barvanje po Gramu ali fluorescentna barvila (*angl.* Calcoufluor white – CFW); barvamo citološke preparate (*angl.* Papnicolaou stain) in tkivne rezine (hematoksilin in eozin – H&E, *angl.* Gomori's methenamin silver stain – GMS, periodic acid Schiff – PAS).

Viabilne glivne strukture *Aspergillus* spp. se v patohistološko pripravljenih tkivnih rezinah, barvanih s H&E, obarvajo bazofilno, medtem ko so v maceriranih in nekrotičnih delih tkiv pogosto eozinofilne. S tem načinom hife včasih težko prikažemo, posebno v primerih, če jih je malo, so fragmentirane ali se nahajajo na področjih tkivne nekroze.

Barvanji, specifično na glivične strukture GMS in PAS, se lahko uporabljata tako za tkivne rezine kot za tkivne razmaze. Oba načina se med seboj dopolnjujeta. Prvi zabriše ozadje tkivnih struktur in celic v preparatu, vendar omogoča večjo občutljivost za odkritje glivnih struktur, prikaže pa tudi zelo drobne fragmente glivnih sten, ki bi jih sicer okolno tkivo prekrilo. PAS ohranja celično strukturo in arhitekturo tkiva ter omogoča natančnejši vpogled v odnos glivnih struktur z drugimi elementi v tkivu. V tkivnih rezinah se hife *Aspergillus* spp. dihotomno cepijo pod kotom 45°. Morfološka slika v histološko pripravljenih rezinah tkiv je nespecifična, zato je za dokončno potrditev povzročitelja potrebna osamitev in identifikacija.⁸

V standardnih bakterioloških preparatih, barvanih po Gramu, se glive obarvajo modrovijolično, vendar je to barvanje nespecifično in slabo občutljivo, zato v mikoloških laboratorijih uporabljamo specifična barvanja, med katerimi najpogosteje uporabljamo fluorescentno barvilo CFW. CFW je vodo-topno brezbarvno barvilo, ki se selektivno veže na beta-glikozilirane polisaharide v glivni celični steni, ki se pod ultravijolično svetlobo prikažejo v obliki modrozelenih struktur. V preparatih s plesnijo *Aspergillus* spp. najpogosteje opazujemo regularno septirane hife, premera 3–6 µm. Hife se dihoto-mno razvejujejo, stene hif so vzporedne in imajo na mestih sept rahle zažemke. Podobno sliko lahko opazimo tudi pri glivah rodov *Penicillium*, *Scedosporium* in *Fusarium*. Od teh se razlikujejo glive iz debla *Zygomycota*, kamor sodijo klinično pomembni rodovi *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* in *Absidia*. Njihove hife so v neposrednih mikroskopskih preparatih širše, premera 10–15 µm, včasih kolabirane in redko, neenakomerno septirane. Da je mikroskopski preparat lahko visoko občutljiva metoda pri sumu na IA, je pokazala raziskava Lass-Flörl C. in sod., ki je na skupini 61 bolnikov, ki so imeli s CT dokazano sumljivo spremembo za IA v vzorcih, odvzetih s perkutano igelno punkcijo, vodeno s CT, dokazala prisotnost glivnih elementov kar v 80 %. Med njimi je pravilno ločila med tistimi, ki so imeli okužbo s plesnijo *Aspergillus* spp. in tistimi, ki so imeli okužbo z vrstami iz debla *Zygomycota*, kar ima velik pomen tudi pri odločitvi za pravilno izbiro zdravljenja.^{8,29}

2.2. Kulture

Osamitev plesni *Aspergillus* spp. v kliničnih vzorcih poleg diagnostične vrednosti, ki jo ta ponuja, omogoča testiranje občutljivosti osamljene glive in mnogokrat že preko končne identifikacije pomaga kliniku pri pravilni izbiri antimikotika. Tako na primer osamitev vrst *Aspergillus terreus* in *Aspergillus nidulans* izključujeta zdravljenje z amfotericinom B, saj sta obe vrsti odporni proti omenjenemu antimikotiku.⁸ Pomembna slabost osamitve je dolgotrajnost postopka, saj zahteva najmanj 48 ur do identifikacije,

včasih pa je ta doba lahko tudi precej daljša, zlasti, če je tkivo, iz katerega zraste plesen, slabše oksigenirano, ali če gliva raste počasi, slabo sporulira, kar vse onemogoča prepoznavo.

Plesni *Aspergillus* spp. rastejo na številnih običajnih bakterioloških gojiščih (krvni agar, čokoladni agar). Kot standardno mikološko gojišče se za primarno zasejanje kliničnih vzorcev uporablja gojišče po Sabouraudu. Skupaj z ostalimi patogenimi glivami so vrste *Aspergillus* spp. zmožne rasti pri 37 °C in ta lastnost jih ločuje od drugih nepatogenih okoljskih plesni. Temu gojišču so dodani antibiotiki, ki onemogočijo preraščanje gojišča z bakterijami, ki so prisotne v vzorcih.^{30,31}

Prepoznavanje gliv temelji na morfoloških značilnostih kolonije in mikroskopskih značilnostih konidiogeneze. Pri tem je potrebno omeniti še vsaj dve stvari. Prvič, mikroskopski izgled kolonij *Aspergillus* spp. je raznolik in v nekaterih primerih neznačilen. Plesni *Aspergillus* spp. so tudi veliki posnemovalci drugih vrst plesni, kar moramo pri prepoznavi upoštevati. Druga pomembna lastnost pa je, da nekateri sevi plesni *Aspergillus* spp. zelo slabo in počasi sporulirajo, ali do sporulacije sploh ne pride. V teh primerih je za prepoznavanje primerna uporaba molekularnih metod.⁸

2.3. Galaktomanan

Galaktomanan je na toploto neobčutljiv polisaharid, ki se sprošča večinoma iz celične stene hif med njihovo rastjo v tkivu. Sproščanje GM iz invazivnih hif ni značilno samo za plesen *Aspergillus* spp., temveč tudi za nekatere druge glive, kot so *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Trychophyton*, *Botrytis*, *Wallemia*, *Cladosporium*.^{32,33} Monoklonska protitelesa, ki se uporabljajo v testu PlateliaTM *Aspergillus*, Bio-Rad Francija, prepoznajo stranske verige (1→5)-β-D-galaktofuranoze, molekule GM iz naštetih gliv. Lažno pozitiven rezultat v serumu je najbolj verjeten pri okužbi z glivami *Penicillium* spp., ker je sproščanje GM pri drugih glivah znatno manjše kot pri vrstah *Aspergillus* spp. ali *Penicillium* spp.³³ Nekateri avtorji poročajo o lažno pozitivnih rezultatih tudi

pri bolnikih, okuženih z vrstami *Geotrichum*³⁴, *Neosartoria*³⁵ in *Histoplasma*³⁶.

Galaktomanan dokazujemo v serumu kot tudi v drugih telesnih tekočinah. Hope in sod. so v modelu IA z nevtropeničnimi kunci GM določili prej v BAL kot v endotelnem predelu.³⁷ Če upoštevamo, da se GM večinoma sprošča iz hif in v manjši meri iz konidijev plesni *Aspergillus* spp., je njegovo določanje v BAL lahko bolj smiselno za dokazovanje pljučne IA kot kultura ali dokazovanje s PCR. Pozitivni test s PCR ali osamitev aspergilusa v kulturi v BAL lahko pomenita prisotnost konidijev v bolnikovem okolju ali kolonizacijo bolnikovih dihalnih poti. Pozitivni test na GM v BAL tudi lahko dokazuje kolonizacijo s plesnijo *Aspergillus* spp., zato testiranje na GM v BAL dopolnimo s CT z visoko ločljivostjo.³⁸ Z upoštevanjem prazne vrednosti indeksa ELISA (1,0–1,5) ima test na GM v BAL občutljivost 85–100 %.^{38–40} Galaktomanan lahko določimo tudi v urinu, vendar preslabo poznamo njegove farmakokinetične lastnosti in izločanje skozi ledvice.⁴¹ Zaenkrat je na voljo premalo podatkov o povezavi GM v urinu z napredovanjem aspergiloze in o vzrokih za morebitne lažno pozitivne rezultate.^{42,43}

Na osnovi rezultatov nedavnih kliničnih raziskav aspergiloze osrednjega živčevja se za potrjevanje verjetne IA osrednjega živčevja po diagnostičnih merilih skupine EORTC/MSG ob odgovarjajoči klinični sliki priporoča še testiranje krvi ali likvorja na GM. Prazna vrednost indeksa ELISA za likvor je 0,5.^{21,22,44–46}

Na točnost testa lahko vplivajo antibiotiki, ki povzročajo lažno pozitivne rezultate zaradi onesnaženja z GM. Največ težav je bilo do sedaj pri bolnikih, ki so prejeli antibiotike piperacilin-tazobaktam, amoksicilin ali amoksicilin-klavulanat, ki so vsi produkt fermentacije plesni *Penicillium*. Večji delež lažno pozitivnih rezultatov pri majhnih otrocih doprinese kolonizacija prebavil z bakterijo *Bifidobacterium*. Težave lahko povzročata raztopina elektrolitov Plasmalyte® (Na-glukonat) ali intravenska hranilna raztopina s sojinim proteinom.^{28,47} Poglavitni vzrok za lažno negativne rezultate je zaščitno zdravljenje z antimikotiki, ki učinkujejo proti plesnim *Aspergillus* in ob-

čutno zmanjšujejo občutljivost testiranja v krvi. To je pokazala raziskava Marr KA in sod., kjer se je občutljivost testa ob jemanju antimikotikov zmanjšala z 89 % na 52 %.⁴⁸ Raziskava, ki so jo opravili Hachem RY in sod., pa kaže, da je občutljivost testa pri bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi veliko manjša, če je povzročitelj aspergiloze vrsta *A. fumigatus* v primerjavi z drugimi vrstami aspergilusa, to je 13 % v primerjavi z 49 %.⁴⁹ Negativni rezultat testiranja na GM torej ne izključuje bolezni. Tudi diagnoze bolezni ne moremo osnovati samo na antigenemiji. Upoštevati moramo vse klinične, radiološke in laboratorijske ugotovitve.

Raziskave kažejo, da antigenemija med zdravljenjem izzveni. Če se antigenemija ne zmanjšuje, to zelo verjetno kaže na slab izid bolezni.⁵⁰ Vztrajanje antigenemije pa lahko kaže tudi na neobvladano okužbo, ki terja spremembo zdravljenja.^{28,47,50}

2.4. (1→3)-β-D-glukan

Dokazovanje (1→3)-β-D-glukana (BG), polisaharida celične stene številnih medicinsko pomembnih gliv, s testom Fungitell®, Cape Cod, ZDA se uporablja kot podpora za diagnozo verjetne invazivne glivične bolezni, kot sta kandidoza in aspergiloza. Vrednost testa za različne skupine bolnikov z visokim tveganjem za nastanek invazivne glivične bolezni še ni povsem opredeljena. Diagnostična točnost testa je precej visoka za bolnike z akutno mieloidno levkemijo in mielodisplastičnim sindromom.⁵¹ Odabasi Z. in sod. so v svoji raziskavi z vsaj enim pozitivnim rezultatom na BG v serumu bolnikov z akutno mieloidno levkemijo in mielodisplastičnim sindromom z mediano 10 dni pred klinično diagnozo (verjetna ali dokazana invazivna glivična bolezen) v 100 % potrdili invazivno glivično bolezen (kandidoza, fusarioza, trihosporonozo ali aspergiloza). Avtorji navajajo, da ima test 100-odstotno negativno napovedno vrednost in več kot 96-odstotno specifičnost pri vsaj dveh zaporednih pozitivnih testih. V literaturi so podatki za diagnostično točnost testa v primeru invazivne pljučne aspergiloze zelo različni, za občutljivost testa 55–100 % in za specifičnost 52–100 %.⁵² V diagnostiki IA

primerjava dokazovanja antigenemij morda kaže v prid GM, ker test na BG ni specifičen za IA. Nekatere klinične raziskave kažejo, da ima test na BG manjšo občutljivost kot test na GM, ali pa se BG v razvoju IA v bolnikovem serumu pojavi kasneje kot GM.^{52,53} Rezultati drugih avtorjev nasprotujejo tej trditvi.^{49,54,55} Nedavna obsežna retrospektivna raziskava Koo S. in sod., v katero so avtorji po diagnostičnih merilih EORTC-MSG vključili bolnike z dokazano in verjetno IA, je pokazala, da je občutljivost BG večja od GM (75 % v primerjavi s 44 %). V nasprotju z GM, za katerega je znano, da so lažno negativni rezultati na GM v veliki meri posledica predhodnega antimikotičnega zdravljenja, se kazalci diagnostične točnosti testa na BG ne spremenijo niti po več kot enotedenskem izkustvenem zdravljenju z antimikotiki.⁵⁵ Občutljivost testa na BG ni odvisna od vrste aspergilusa, kar je prednost v primerjavi s testom na GM.⁴⁹ Kaže, da uporaba obeh antigenih testov skupaj ne doprinese veliko k občutljivosti testiranja (71 % v primerjavi s 67 %, ko so avtorji raziskave uporabili samo test na BG).⁴⁹

Številni avtorji poročajo tudi o lažno pozitivnih rezultatih testa, ki se pojavijo pri bolnikih s sočasno okužbo s po Gramu pozitivnimi bakterijami, s cirozo, po hemodializi s celuloznimi membranami, intravenskem prejetju plazemskih proteinov, npr. albuminov, imunoglobulinov ali faktorjev v kaskadi strjevanja krvi, velikih odmerkov nekaterih antibiotikov, zaradi bombažnih povojev, vročinske kapi in še drugih nepoznanih razlogov.^{28,52}

2.5. Verižna reakcija s polimرازo

V literaturi je opisanih mnogo protokolov za dokazovanje IA s PCR. Razlike med protokoli so vezane na vrsto uporabljenega vzorca (celotna kri, serum ali plazma), količino vzorca, način osamitve DNA, izbiro tarčnega gena, zaznavanje produktov PCR in na uporabo primernih kontrolnih vzorcev. Vsi ti dejavniki so vzrok za heterogenost metode, ki preprečuje njeno širšo uporabo v diagnostiki IA.⁵⁶ Pod okriljem Mednarodnega društva za humano in živalsko mikologijo ISHAM je bila ustanovljena delovna

skupina EAPCRI (European *Aspergillus* PCR Initiative), ki vključuje raziskovalce iz 24 evropskih centrov, ki naj bi oblikovali evropski standard za *Aspergillus*-PCR, zlasti na področju osamitve DNA in izbire tarčnega gena za pomnoževanje. Pri vrednotenju PCR za aspergilus bo verjetno potrebno ločiti med testom za presejanje bolnikov z visokim tveganjem za nastanek IA in še brez znakov bolezni ter testom za potrditev ali izključitev bolezni, ko je ta očitna. Sistematični pregled in metaanaliza, ki so jo opravili Mengoli C. in sod.⁵⁷ na podlagi 16 kliničnih raziskav s PCR v diagnostiki IA, kažeta, da je test PCR s pomnoževanjem dveh tarčnih genov, kot sta gen za alkalno proteinazo in gen mtDNA, boljši za potrjevanje bolezni (100-odstotna specifičnost in 100-odstotna pozitivna napovedna vrednost)⁵⁸ v primerjavi s testom PCR s pomnoževanjem enega tarčnega gena 18S rRNA, ki je boljši za presejanje (velika negativna napovedna vrednost).⁵⁹ S kazalci diagnostične točnosti metod PCR so ugotovili, da za izključevanje verjetne in dokazane IA zadostuje en sam negativen rezultat, medtem ko sta za potrjevanje diagnoze potrebna dva zaporedna pozitivna rezultata PCR. Metoda PCR ima v tem primeru 75-odstotno skupno občutljivost in 87-odstotno skupno specifičnost.⁵⁷

PCR uvaja v vsakodnevno prakso vse več laboratorijev, ker je metoda vse bolj avtomatizirana. Na tržišču so na voljo kompleti za osamitev DNA in tarčni geni za pomnoževanje. Podjetje Roche (Mannheim, Nemčija) je nedavno poslalo na trg PCR v realnem času, test LightCycler SeptiFast, ki zazna 25 povzročiteljev okužb krvnega obtoka, med njimi tudi vrsto *A. fumigatus*. Zaradi novosti testa njegova vrednost v diagnostiki IA še ni povsem opredeljena.

Posebej obetajoče je tudi delo skupine raziskovalcev iz različnih držav, ki želijo izdelati standardni presejalni test za plesen *Aspergillus* sp-PCR. S potrjenim presejalnim testom bo mogoče testirati bolnike z visokim tveganjem za nastanek bolezni in določiti njegovo diagnostično vrednost pri obvladovanju IA.⁵⁷

3. Zaključki

Za dokazovanje aspergiloze sta potrebna osamitev plesni *aspergillus* in mikroskopska analiza sterilno odvzetega vzorca, ki kaže na prisotnost glive. Na verjetno IA lahko kažeta pozitivna antigenska testa na GM *aspergillus* in BG v bolnikovem serumu ter na GM v BAL ali likvorju. Kljub njuni koristnosti v klinični praksi pa vsi upamo, da bo izboljšanje testa PCR obšlo omejitve sedanjih metod in omogočilo boljšo diagnostično izbiro in natančnejši diagnostični algoritem za to bolezni.

4. Literatura

1. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310–50.
2. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Rentigny L, Chapman SW, Morrison VA, idr. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33: 1824–33.
3. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, idr. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Society of America. Clin Infect Dis 2008; 46: 327–60.
4. Segal BH. Aspergillosis. N Engl J Med 2009; 360: 1870–84.
5. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 447–65.
6. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. J Med Microbiol 2006; 55: 809–18.
7. Segal BH, Romani LR. Invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease. Med Mycol 2009; 47: S282–90.
8. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2005; 5: 609–22.
9. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170: 621–5.
10. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ortiz-Leyba C, León C, Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, idr. Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. Crit Care 2005; 9: 191–9.
11. Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmerman W, Colardyn F, idr. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. Crit Care 2006; 10: R31.
12. Dimopoulos G, Piagnerelli M, Berré J, Eddafali B, Salmon I, Vincent JL. Disseminated aspergillosis in intensive care unit patients: an autopsy study. J Chemother 2003; 15: 71–5.
13. Hartemink KJ, Paul MA, Spijkstra JJ, Girbes AR, Polderman KH. Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? Intensive Care Med 2003; 29: 2068–71.
14. Englich G, Wright DG, Hartshorn KL. Acquired disorders of phagocyte function complicating medical and surgical illnesses. Clin Infect Dis 2001; 33: 2040–8.
15. Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM, idr. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. JAMA 2002; 288: 862–71.
16. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. Lancet 2003; 362: 1828–38.
17. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 161–72.
18. Bulpa PA, Dive AM, Garrino MG, Delos MA, Gonzalez MR, Evrard PA, idr. Chronic obstructive pulmonary disease patients with invasive pulmonary aspergillosis: benefits of intensive care? Intensive Care Med 2001; 27: 59–67.
19. Latgé JP. The Pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol 2001; 9: 382–9.
20. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med 1996; 100: 171–8.
21. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, idr. 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.
22. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndrome due to *Aspergillus* spp. Med Mycol 2005; 43: S207–S238.
23. Matos T. Laboratorijska diagnostika aspergiloze. V: Kržišnik C, Battelino T, ur. Izbrana poglavja iz pediatrije 16. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo; 2004. Str. 230–6.
24. Uffredi ML, Mangiapan G, Cadranel J, Kac G. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 457–62.
25. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, idr. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. Clin Infect Dis 2007; 44: 373–9.
26. Pfeiffer CD, Jason PF, Safdar N. Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using a Galactomannan Assay: A Meta-Analysis. Clin Infect Dis 2006; 42: 1417–27.
27. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, idr. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. Am J Respir Crit Care Med 2008; 177: 27–34.
28. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection

- using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 245–51.
29. Lass-Floerl C, Resch G, Nachbaur D, Mayr A, Gastl G, Auberger J, idr. The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2007; 45: e101–4.
30. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection Diagnosis and Management*. 2. izd. Oxford: Blackwell Science; 1997.
31. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. 1. izd. Philadelphia: London: Lea&Febiger; 1992.
32. Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, idr. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. *Infect Immun* 1992; 60: 2237–45.
33. Swanink CMA, Meis JFGM, Rijs AJMM, Donnelly JP, Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 257–60.
34. Giacchino M, Chiapello N, Bezzio S, Fagioli F, Saracco P, Alfarano A, idr. *Aspergillus Galactomannan ELISA Cross-Reactivity Caused by Invasive Geotrichum capitatum*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3432–4.
35. Jarv H, Lehtmaa J, Summerbell RC, Hoekstra ES, Samson RS, Naaber P. Isolation of *Neosartoria pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary *Aspergillosis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 925–8.
36. Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, Walsh TJ. Histoplasmosis-Associated Cross-Reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* Enzyme Immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 638–40.
37. Hope WW, Kruhlak MJ, Lyman CA, Petraitiene R, Petraitis V, Francesconi A, idr. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implication for antifungal therapy. *J Infect Dis* 2007; 195: 455–66.
38. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, van der Schee C, Hoogsteden HC, de Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based bronchoalveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003; 121: 448–57.
39. Verweij PE, Latge JP, Rijs AJ, Melchers WJ, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, idr. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3150–3.
40. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Gianchi L, Mele L, idr. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by ELISA using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3922–5.
41. Bennett JE, Friedman MM, Dupont B. Receptor-mediated clearance of *Aspergillus galactomannan*. *J Infect Dis* 1987; 155: 1005–10.
42. Dupont B, Huber M, Kim SJ, Bennett JE. Galactomannan antigenemia and antigenuria in aspergillosis: studies in patients and experimentally infected rabbits. *J Infect Dis* 1987; 155: 1–11.
43. Haynes KA, Latge JP, Rogers TR. Detection of *Aspergillus* antigens associated with invasive infection. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2040–4.
44. Machetti M, Zotti M, Veroni L, Mordini N, van Lint MT, Bacigalupo A, idr. Antigen detection in the diagnosis and management of a patient with probable cerebral aspergillosis treated with voriconazole. *Transpl Infect Dis* 2000; 2: 140–4.
45. Verweij PE, Brinkman K, Kremer HP, Kullberg BJ, Meis JF. *Aspergillus meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1186–9.
46. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, De Maria A, Paola D, Van Lint MT, idr. *Aspergillus galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1496–9.
47. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 2007; 163: 191–202.
48. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus galactomannan* enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1762–9.
49. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of Galactomannan Enzyme Immunoassay and (1,3) β -D-Glucan in Diagnosis of Invasive Fungal Infections: Low Sensitivity for *Aspergillus fumigatus* Infection in Hematologic Malignancy Patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 129–33.
50. Woods G, Miceli MH, Graziutti ML, Zhao W, Barlogie B, Anaissie E. Serum *Aspergillus galactomannan* antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer. *Cancer* 2007; 110: 830–4.
51. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, idr. β -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.
52. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2006; 44: S163–S172.
53. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich ELISA for galactomannan, and a (1–3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2733–41.
54. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1–3)-beta-D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1009–13.
55. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic Performance of the (1–3)-beta-D-Glucan Assay for Invasive Fungal Disease. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1650–9.

56. Klingspor L, Loeffler J. Aspergillus PCR formidable challenges and progress. *Med Mycol* 2009; 47: 241–7.
57. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly P. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 89–96.
58. Raad I, Hanna H, Sumoza D, Albitar M. Polymerase chain reaction on blood for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients. *Cancer* 2002; 94: 1032–6.
59. Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, idr. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 132: 478–86.