

Κλασικές και νεότερες τεχνικές στη διάγνωση των μυκητιάσεων

Αναπλ. Καθ. Γεωργία Βρυώνη
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Η συχνότητα των διεισδυτικών μυκητικών λοιμώξεων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, με αποτέλεσμα η έγκαιρη διάγνωση να είναι κρίσιμη στην πρόληψη ή στην κατάλληλη αντιμετώπιση της κατάλληλης αντιμυκητικής αγωγής και, κατ' επέκταση, στην τελική έκβαση της νόσου. Δυστυχώς, μεγάλο εμπόδιο στην επιτυχή θεραπεία των λοιμώξεων αυτών αποτελεί η έλλειψη ευαίσθητων και ειδικών διαγνωστικών μεθόδων, γεγονός που έχει ως συνέπεια η ορθή διάγνωση των διεισδυτικών μυκητικών λοιμώξεων να τίθεται συχνά «μετά θάνατον». Οι παραδοσιακές - κλασικές μικροβιολογικές (μικροσκοπία και καλλιέργεια), ιστολογικές και απεικονιστικές μέθοδοι, αν και αποτελούν το “gold standard” στη διάγνωση, δεν είναι επαρκώς ευαίσθητες και ειδικές, με αποτέλεσμα η συμβολή τους στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς να είναι περιορισμένης αξίας. Οι μη καλλιεργητικές, μικροβιολογικές τεχνικές ανίχνευσης είτε κυκλοφορούντων μυκητικών αντιγόνων (ορολογικές τεχνικές), είτε γενετικού υλικού του μύκητα (DNA – μοριακές τεχνικές) προσφέρουν επιπλέον πληροφόρηση και ενίοτε αποτελούν τα μοναδικά μέσα διάγνωσης.

1. Αντιγόνο γαλακτομαννάνης (GM)

Η ανίχνευση του αντιγόνου της γαλακτομαννάνης (GM), συστατικό του τοιχώματος του γένους *Aspergillus*, έχει αποδειχτεί χρήσιμη τεχνική στην έγκαιρη διάγνωση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης. Η μέτρηση GM γίνεται με ανοσοενζυμική μέθοδο, όπως Platelia *Aspergillus* (Bio-Rad Laboratories, UK) και Dynamiker *Aspergillus* Galactomannan Assay [Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd.] Ως δείγματα μπορεί να αποσταλούν δείγματα ορού ή πλάσματος, τουλάχιστον δύο την εβδομάδα και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL). Θετικό αποτέλεσμα ανήκει στα μυκητολογικά κριτήρια σύμφωνα με τον European Organization for the Research and Treatment of Cancer and Mycosis Study Group (EORTC/MSG) (κριτήρια παλαιά – 2002 και αναθεωρημένα-2008). Έτσι, μαζί με παράγοντες κινδύνου του ξενιστή και την ύπαρξη κλινικών κριτηρίων, θέτει τη διάγνωση της πιθανής (probable) ασπεργίλλωσης. Μέτρηση μπορεί να γίνει και σε άλλα φυσιολογικά στείρα υλικά,

ανάλογα με την υποψία εντοπισμού της λοίμωξης, όπως ENY και πλευριτικό υγρό.

Όρια υπάρχουν για ορό, πλάσμα, BAL και ENY. Έτσι, θετικό είναι το δείγμα

- ορού αν έχει GM Index ≥ 0.5 (αν έχουν σταλεί δύο διαδοχικά δείγματα) ή ≥ 0.7 (αν ένα έχει σταλεί ένα δείγμα),
- BAL αν έχει GM Index ≥ 1 και
- ENY αν έχει GM Index ≥ 0.5 .

Η αξία της GM φαίνεται να σχετίζεται με την ομάδα ασθενών που εφαρμόζεται. Η ευαισθησία της είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με αιματολογική κακοήθεια, ιδιαίτερα σε λήπτες αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Γενικά η τεχνική ανίχνευσης GM έχει καλή προγνωστική αξία όταν εφαρμόζεται σε ασθενείς με υψηλή υποψία ασπεργίλλωσης, όπου μπορεί να διαγνώσει την ασπεργίλλωση αρκετές ημέρες νωρίτερα. Η μέτρηση GM σε άλλα κλινικά δείγματα, πλην του ορού, όπως BAL και ENY, μπορεί να είναι χρήσιμη σε ουδετεροπενικούς και μη ασθενείς. Είναι μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί και στον παιδιατρικό πληθυσμό, ιδίως σε ουδετεροπενικά παιδιά με υποψία διεισδυτικής ασπεργίλλωσης.

Η μέθοδος *Platelia Aspergillus* έχει ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ~5% σε ενήλικες και ~83% σε νεογέννητα. Η φύση αυτών των επίμονων ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων παραμένει αδιευκρίνιστη. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η θερμοανθεκτική GM των τροφών δεν εξαφανίζεται, με αποτέλεσμα να μπορεί να φτάσει στην κυκλοφορία μέσω του ανώριμου ή κατεστραμμένου εντερικού βλεννογόνου. Αυτό όμως δε φαίνεται να ισχύει σε ασθενείς με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων και ολική παρεντερική διατροφή. Επίσης ψευδώς θετικό αποτέλεσμα μπορεί να δώσει το λιποτειχοϊκό οξύ του *Bifidobacterium bifidum* subsp *pennsylvanicum*, μικρόβιο της φυσιολογικής χλωρίδας των ενηλίκων (~3%) και των βρεφών που τρέφονται με μητρικό (~91%) ή ξένο γάλα (~75%). Τέλος η ενδοφλέβια χορήγηση αντιβιοτικών η παρασκευή των οποίων γίνεται από μύκητες, όπως τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, μπορεί να είναι επίσης αίτιο ψευδώς θετικού αποτελέσματος ανίχνευσης GM. Μέχρι πολύ πρόσφατα αυτό ίσχυε για την piperacillin-tazobactam (Tazocin), γεγονός όμως που φαίνεται να μη συμβαίνει πια,

χωρίς όμως να γνωρίζουμε τι γίνεται με τη χορήγηση των αντίστοιχων γενόσημων σκευασμάτων.

Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που δεν υπερβαίνουν το 5%, τα οποία μπορεί οφείλονται σε: α) παρουσία αντισωμάτων έναντι ασπεργίλλου, β) περιορισμένη αγγειακή διείσδυση, γ) χαμηλό μυκητικό φορτίο, δ) χαμηλή απελευθέρωση GM από το τοίχωμα του μύκητα και ε) χρήση προφυλακτικής αντιμυκητικής αγωγής με δράση έναντι των υφομυκήτων (μείωση ανάπτυξης μυκητυλλίων). Στην τελευταία περίπτωση αντενδείκνυται να ζητηθεί μέτρηση GM και προτιμώνται άλλες διαγνωστικές μέθοδοι (μέτρηση β-D-γλυκάνης ή μοριακές τεχνικές). Στον **πίνακα 1** φαίνονται συνοπτικά οι διάφοροι παράγοντες, βιολογικοί και επιδημιολογικοί, που επηρεάζουν το αποτέλεσμα της μεθόδου *Platelia Aspergillus*.

Πίνακας 1. Βιολογικοί και επιδημιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα μέτρησης γαλακτομαννάνης με τη μέθοδο *Platelia Aspergillus*.

Βιολογικοί παράγοντες	Επιδημιολογικοί παράγοντες
Περιοχή λοίμωξης	Πληθυσμός ασθενών
Είδος <i>Aspergillus</i>	Στρατηγική λήψης δειγμάτων
Μικροπεριβάλλον περιοχής λοίμωξης: οξύγονο, pH, θρεπτικά στοιχεία	Καθορισμός θετικού αποτελέσματος
Έκθεση σε αντιμυκητικά	Καθορισμός σίγουρης, πιθανής ή σχεδόν πιθανής λοίμωξης
Μοριακή δομή ελευθερούμενης GM	Επίπτωση λοίμωξης
Υποκείμενη νόσος /βαθμός ανοσοκαταστολής	Τιμή cut-off
Νεφρική και ηπατική λειτουργία	Εμπειρία εργαστηρίου
Παρουσία αντισωμάτων έναντι GM	
Φύλαξη δείγματος	
Πρόδρομοι χειρισμοί	

Συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου φαίνονται στον

Πίνακα 2

Πίνακας 2. Χρησιμοποίηση της τεχνικής ανίχνευσης γαλακτομαννάνης (GM)

Μέθοδος	Ενδείξεις	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Γαλακτομαννάνη (Galactomannan, GM)	<p>Πρώιμη ανίχνευση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης (IA)</p> <p>2 δείγματα ορού/εβδομάδα</p> <ul style="list-style-type: none"> cut-off index >0.5 <p>1 δείγμα ορού</p> <ul style="list-style-type: none"> cut-off index >0.7 	<p>Screening test σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές μεθόδους σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για IA</p> <p>Σε ουδετεροπενικούς ενήλικες & σε ουδετεροπενικά παιδιά</p> <p>Τιμές GM >1 είναι ένδειξη θεραπευτικής αποτυχίας</p> <p>Μέτρηση στο BAL (βέλτιστο cut-off μεταξύ 0.5 -1) ENY (cut-off>0.5 – μη καθορισμένο επαρκώς): χρήσιμη σε ουδετεροπενικούς και μη ασθενείς</p>	<p>Σε μη ουδετεροπενικούς ασθενείς: όχι η ίδια διαγνωστική και προγνωστική αξία</p> <p>Θεραπεία με αντιμυκητικά έναντι υφομυκήτων (mold-active) επηρεάζει την ανίχνευση GM</p> <p>Εμμένουσα GM αντιγοναιμία είναι κακός προγνωστικός δείκτης και χρειάζεται επανεκτίμηση του περιστατικού</p>

Σύμφωνα με τις νέες οδηγίες (2018) των ESCMID-ECMM-ERS, η μέτρηση GM στο BAL σε οποιοδήποτε ομάδα ασθενών για διάγνωση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης αποτελεί μια πολύ καλή πρακτική (**Εικόνα 1**), με βέλτιστο cut-off της μεθόδου για καθορισμό θετικού αποτελέσματος μεταξύ 0.5 – 1.0 (ένδειξη AII)

Εικόνα 1: Εφαρμογή γαλακτομαννάνης (GM) σε άλλα δείγματα, εκτός ορού.

Galactomannan testing in samples other than blood			Strength of recommendation A, B, C, D (against use) Quality of evidence: level I, II, III		
Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Any	To diagnose pulmonary IA	To apply GM test on BAL fluid	A	II	GM in BAL is a good tool to diagnose, optimal cut-off to positivity 0.5 to 1.0
Any	To diagnose cerebral IA	To apply GM test on cerebrospinal fluid	B	II	No validated cut-off
Any	To detect GM in tissue	To apply GM test on lung biopsies	B	II	Using a cut-off 0.5 resulted in a sensitivity of 90 % and a specificity of 95%; specimens need to be sliced, precondition for doing so is that sufficient material is available; dilution in isotonic saline

A.J. Ullmann et al. / Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) e1–e38

Μεγάλη σημασία στη διάγνωση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης έχει η εφαρμογή συνδυασμού μεθοδολογιών. Σύμφωνα πάντα με τις νέες οδηγίες των ESCMID-ECMM-ERS, σε ασθενείς με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, η εφαρμογή GM και μοριακής τεχνικής (PCR) στο BAL προσφέρει αύξηση της ακρίβειας (PPV 50-80%, NPV 80-90%) (**Εικόνα 2**)

Εικόνα 2: Εφαρμογή γαλακτομαννάνης (GM) και μοριακής τεχνικής (PCR)

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Patients with haematological malignancies	To diagnose IA	PCR on blood samples	B	II	Meta-analysis: 16 studies PCR single positive test: Sensitivity: 88%, specificity: 75%; PCR two consecutive positive tests: Sensitivity: 75%, specificity: 87% 97% of protocols detected threshold of 10 genomes/mL serum volume >0.5 mL, elution volume <100 μL, sensitivity: 86%; specificity: 94% First blood PCR assay to be compatible with EAPCRI recommendations, fever driven: Sensitivity: 92%, specificity: 95% negative PCR result to be used to rule out IA
	To diagnose IA	PCR on serum samples			
	To diagnose IA	PCR on whole blood samples			
Haematopoietic stem cell transplantation	To diagnose IA	Prospective screening PCR on whole blood samples	B	II	Addition of GM and PCR monitoring provides greater accuracy, PPV 50-80%, NPV 80-90%
	To diagnose IA	Prospective screening PCR on blood samples	B	II	
	To diagnose IA	PCR and GM in BAL	A	II	

Εκτός της ανοσοενζυμικής τεχνικής, καλά αποτελέσματα έχει δώσει και η ανοσοχρωματογραφία. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί ειδικό *Aspergillus*-MAb (JF5) (hybridoma technology) και εφαρμόζεται ως point-of-care (POC) διαγνωστικό test σε υποψία διεισδυτικής ασπεργίλλωσης. Τα πλεονεκτήματά της είναι: (1) ανίχνευση εξωκυττάριας γλυκοπρωτεΐνης παραγόμενης μόνο κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του μύκητα, (2) ταχύτητα (αποτέλεσμα σε 15 min), (3) απλή διαδικασία με τη μορφή mono-test και (4) εφαρμογή σε ορό και BAL (Εικόνα 3).

Εικόνα 3: Ανοσοχρωματογραφία (Lateral flow device antigen test) για τη διάγνωση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης (A.J. Ullmann, Clin Microbiol Infect 2018;24:1)

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Haematological malignancy and solid organ transplant	To diagnose IA	LFD applied on BAL samples	B	II	Retrospective study. Sensitivity and specificity of BAL LFD tests for probable IPA were 100% and 81% (PPV 71%, NPV 100%), five patients with possible IPA had positive LFD, no proven IA
Haematopoietic stem cell transplantation	To diagnose IA	LFD applied on serum samples	B	II	Prospective screening in 101 patients undergoing allogeneic HSCT
Immunocompromised patients	To diagnose IA	LFD applied on BAL samples	B	II	Retrospective study. Sensitivities for LFD, GM, BDG and PCR were between 70% and 88%. Combined GM (cut-off >1.0 OD) with LFD increased the sensitivity to 94%, while combined GM (cut-off >1.0 OD) with PCR resulted in 100% sensitivity (specificity for probable/proven IPA 95%–98%).

2. (1,3) β-D-γλυκάνης (BG)

Η ανίχνευση της (1,3) β-D-γλυκάνης (BG) (Fungitell, Associates of Cape Cod Inc, USA ή Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glucan Assay, Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd.), συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος πολλών μυκήτων, όπως *Candida*, *Aspergillus* και *Fusarium*, αλλά **όχι μπουκορμυκήτων και *Cryptococcus neoformans***, το 2008 συμπεριλήφθηκε από τον EORTC/MSG στα διαγνωστικά κριτήρια πιθανής συστηματικής μυκητικής λοίμωξης, άλλης εκτός κρυπτοκόκκωσης και

μουκορμύκωσης (πρώην ζυγομύκωση). Τα μέχρι σήμερα δεδομένα από την εφαρμογή της είναι περιορισμένα στους αιματολογικούς ασθενείς, με εξαίρεση τους ασθενείς της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας με διεισδυτική καντιντιασική λοίμωξη. Στα παιδιά δεν υπάρχει μεγάλη εμπειρία. Η μέτρηση γίνεται σε δείγματα ορού, τουλάχιστον δύο την εβδομάδα.

Γενικά, η εξέταση της BG βοηθάει στον αποκλεισμό λοίμωξης από *Candida* ή *Aspergillus*, καθώς η αρνητική προγνωστική της αξία υπολογίζεται σε >90%, δεν αποτελεί όμως δείκτη ειδικό για συγκεκριμένη μυκητική λοίμωξη. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα ανευρίσκονται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση ή εμφανίζουν βακτηριαιμία, καθώς και σε δείγματα που έρχονται σε επαφή με υλικά που έχουν γλυκάνη, όπως γάζες χειρουργείου. Έχει χρησιμοποιηθεί με καλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση πνευμονίας από *Pneumocystis jirovecii* (πρώην *P. carinii*) σε HIV-θετικούς ασθενείς. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού (Fungitell):

- αρνητικό για συστηματική μυκητική λοίμωξη είναι το αποτέλεσμα < 60 pg/mL,
- αμφίβολο 60-79 pg/mL και
- θετικό \geq 80 pg/mL γλυκάνης (τιμές 10-40 pg/mL ανιχνεύονται και στα φυσιολογικά άτομα λόγω αποικισμού του εντέρου).

Η παρουσία θετικού αποτελέσματος δεν καθορίζει την οικογένεια του υπεύθυνου μύκητα, γεγονός που δεν αποτελεί μεγάλο πρακτικό πρόβλημα εάν πρόκειται να χορηγηθεί ευρέος φάσματος αντιμυκητικό φάρμακο. Αντίθετα, κάτι τέτοιο είναι μειονέκτημα εάν πρόκειται να δοθούν κάποια αντιμυκητικά (flucanazole, caspofungin) που είναι αποτελεσματικά έναντι ορισμένων μόνο μυκήτων. Ειδικά για τη διάγνωση μουκορμύκωσης, αν και η BG ΔΕ συστήνεται για τη διάγνωση, απαιτείται προσοχή γιατί στελέχη *Rhizopus* spp. μπορεί να περιέχουν BG σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του ορίου ανίχνευση. Στον **Πίνακα 3** φαίνονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου

Πρόσφατα στο εμπόριο υπάρχει διαθέσιμη τεχνική μέτρησης BG μεγαλύτερης ευελιξίας της Fungitell, η Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glucan Assay [Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd.]. Η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει (1) καλή ειδικότητα και ευαισθησία (81.4% και 78.1%, αντίστοιχα), (2) συμφωνία αποτελεσμάτων με την μεθοδολογία Fungitell, και το κυριότερο (3) τεχνική ευελιξία λόγω της δυνατότητας διαχωρισμού των strips και επομένως εφαρμογής της σε εργαστήρια με μικρό αριθμό δειγμάτων.

Πίνακας 3. Χρησιμοποίηση της τεχνικής ανίχνευσης (1,3) β-D-γλυκάνης (BG)

Μέθοδος	Ενδείξεις	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
(1,3) β-D-γλυκάνη (BD)	Διάγνωση διεισδυτικής μυκητίασης 2 δείγματα/εβδ. (minimum)	<p>Παν-μυκητιακός δείκτης για</p> <ul style="list-style-type: none"> • ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση και • σε πνευμονία από <i>P. jiroveci</i> • σε λοίμωξη από δίμορφους μύκητες • σε ENY για διάγνωση μηνιγγίτιδας από <i>Exserohilum rostratum</i> <p>Δεν ανιχνεύει μουκορμύκητες και <i>C. neoformans</i></p> <p>Συχνότητα 2 δείγματα/εβδομάδα επαρκής ως screening</p> <ul style="list-style-type: none"> • 37% ΨΘ 1 X 80 pg/ml • 23% ΨΘ 2 X 80 pg/ml <p>Αύξηση ειδικότητας, αλλά μείωση ευαισθησίας</p> <p>Θέση λοίμωξης σημαντική: ασθενείς με ιστικές λοιμώξεις δεν καταφέρνουν να μειώσουν τα επίπεδα BD παρά την επιτυχή έκβαση</p> <p>Η λήψη αντιμυκητικής αγωγής δεν παρεμβαίνει στο αποτέλεσμα</p>	<p>ΨΘ σε βακτηριαμία</p> <p>Περιορισμένη εμπειρία σε σχέση με GM</p> <p>Όριο θετικού αποτελέσματος ανάλογα χρησιμοποιούμενης μεθοδολογίας Fungitell >=80 pg/ml Wako > 11 pg/ml</p> <p>Βραδεία μείωση σε ασθενείς με διεισδυτική ασπεργίλλωση, διεισδυτική καντιντίαση και πνευμονία από <i>P. jirovecii</i> , παρά την επιτυχή θεραπεία.</p> <p>Παραμένει θετική για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την επιτυχή θεραπεία</p> <p>Λιγότερο ακριβής σε αιματολογικούς ασθενείς</p>

3. Μαννάνη – αντι-μαννάνη (mannan & anti-mannan)

Για τη διάγνωση της λοίμωξης από *Candida* έχει χρησιμοποιηθεί η ανίχνευση του αντιγόνου μαννάνης (Platelia *Candida* Ag, Bio-Rad Laboratories, ή Dynamiker

Candida Mannan Assay, Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd.), σε συνδυασμό με την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αυτής (αντι-μαννάνη) (Platelia Candida Ab, Bio-Rad Laboratories ή Dynamiker *Candida albicans* IgM Assay & Dynamiker *Candida albicans* IgG Assay, Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd.). Ο συνδυασμός (μαννάνη και αντισώματα έναντι αυτής) μπορεί να συμβάλει στη διάγνωση της καντινταιμίας ακόμη και 6 ημέρες νωρίτερα από τη θετικοποίηση της καλλιέργειας αίματος. Παρόλα αυτά οι δοκιμασίες ανίχνευσης μαννάνης / αντι-μαννάνης παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία λόγω: α) απουσίας αντισωματικής απάντησης στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, β) αδυναμίας διάκρισης μεταξύ αποικισμού / λοίμωξης, γ) παρουσίας εξουδετερωτικών αντισωμάτων, δ) απομάκρυνσης του αντισώματος από το αντιγόνο με τη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων και ε) γρήγορης κάθαρσης της μαννάνης από ήπαρ και σπλήνα. Ο συνδυασμός μαννάνης / αντι-μαννάνης, προτείνεται στη διάγνωση καντινταιμίας και χρόνιας διάσπαρτης καντιντίασης, ενώ δεν προτείνεται στη διάγνωση της διεισδυτικής καντιντίασης, λόγω απουσίας επαρκών δεδομένων. Στον **Πίνακα 4** φαίνονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανίχνευσης μαννάνης / αντι-μαννάνης.

Πίνακας 4. Χρησιμοποίηση των μεθολογιών ανίχνευσης μαννάνης / αντι-μαννάνης.

Μέθοδος	Ενδείξεις	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Mannan + Anti-mannan	Καντινταιμία Διεισδυτική καντιντίαση	Καλή ευαισθησία και ειδικότητα σε συνδυασμό για ασθενείς της ΜΕΘ Νωρίτερα θετικοποίηση από κ/α αίματος Προτείνεται στις οδηγίες του ESCMID ο συνδυασμός με υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (NPV)	Περιορισμένη εμπειρία Δεν είναι μυκητολογικό κριτήριο Ευαισθησία και ειδικότητα: 89.3% & 63% για Mn + anti-Mn <i>C. parapsilosis</i> & <i>C. guilliermondii</i> καντινταιμίες δεν ανιχνεύονται με την Platelia Candida Ag Plus τεχνική Καλύτερα αποτελέσματα αν λοίμωξη από <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> ή <i>C. glabrata</i>

4. Γλυκουρονοξυλομαννάνη – Αντιγόνο κρυπτοκόκκου

Η γλυκουρονοξυλομαννάνη είναι συστατικό του ελύτρου του *Cryptococcus neoformans*. Η ανίχνευσή του σε διάφορα κλινικά δείγματα αποτελεί μια από τις πολυτιμότερες ορολογικές μεθόδους για την ταχεία διάγνωση της κρυπτοκόκκωσης στην καθημερινή πράξη.

Υπάρχουν διάφορες ταχείες τεχνικές. Μία τέτοια είναι η μέθοδος Pastorex CryptoPlus (Bio-Rad), η οποία χρησιμοποιεί σωματίδια latex ενδεδυμένα με πολυκλωνικό IgG αντίσωμα ποντικού έναντι του κρυπτοκοκκικού αντιγόνου του ελύτρου. Είναι μέθοδος εύκολη που εφαρμόζεται σε ορό, ENY, BAL και ούρα και χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με παλαιότερες διαγνωστικές μεθόδους. Ωστόσο έχουν παρατηρηθεί ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με διάσπαρτη τριχοσπορόνωση, σηψαιμία από *Carnocytophaga canimorsus* και κακοήθειες, όπως και από την παρεμβολή ουσιών, όπως ο ρευματοειδής παράγοντας. Ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις εμφανίζονται σποραδικά εξαιτίας του φαινομένου προζώνης, μικρού φορτίου του μύκητα, καθώς και της έλλειψης ελύτρου του. Αυτά μπορεί να διορθωθούν με αραιώση του δείγματος ή κατεργασία με προνάση.

Άλλη μέθοδος είναι η Murex *Cryptococcus* (Murex Diagnostics) στην οποία τα σωματίδια latex είναι ενδεδυμένα με μονοκλωνικό IgM αντίσωμα ποντικού. Με την τεχνική αυτή ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ψευδώς θετικών αντιδράσεων από την παρεμβολή του ρευματοειδή παράγοντα. Βέβαια η συγκεκριμένη τεχνική υπολείπεται σε ευαισθησία της Pastorex Crypto Plus.

Μια άλλη διαγνωστική δοκιμασία ανίχνευσης του κρυπτοκοκκικού αντιγόνου είναι η ανοσοενζυμική Premier *Cryptococcal Ag* (Meridian). Αυτή χρησιμοποιεί πολυκλωνικό σύστημα δέσμευσης και μονοκλωνικό ανίχνευσης και εφαρμόζεται σε ορό και ENY με παρόμοια ευαισθησία με τη Pastorex Crypto Plus. Η μέθοδος αυτή έχει σαν πλεονεκτήματα, συγκριτικά με τις δοκιμασίες latex, ότι δεν επηρεάζεται από τον ρευματοειδή παράγοντα, μπορούν να εξεταστούν ταυτόχρονα σχετικά μεγάλος αριθμός δειγμάτων και δίνει λιγότερες ψευδώς θετικές αντιδράσεις.

Τέλος υπάρχει και ταχεία τεχνική ανίχνευσης αντιγόνου κρυπτοκόκκου με τη μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας (Cryptococcal antigen lateral flow assay, IMMY). Πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι: 1) η ευκολία, 2) η ταχύτητα (10min για το αποτέλεσμα), 3) το μικρό κόστος (\$2 - \$4 / test), 4) δεν υπάρχει ανάγκη επεξεργασίας του δείγματος με προνάλυση, 5) είναι ποιοτική ή ημι-ποσοτική και 6) ανιχνεύει *C. neoformans* και *C. gattii*. Η μέθοδος είναι FDA cleared (2011) για ορό και ENY, ένα έχει λάβει CE marked για ορό, πλάσμα και ENY, ενώ τα ούρα είναι υπό μελέτη.

Το κρυπτοκοκκικό αντιγόνο ανήκει στα μυκητολογικά κριτήρια διάγνωσης κρυπτοκόκκωσης της EORTC/MSG. Θετικό αποτέλεσμα ανίχνευσης αντιγόνου κρυπτοκόκκου στο ENY (όπως και θετικό αποτέλεσμα μικροσκόπησης του ENY με σινική μελάνη) θέτουν τη διάγνωση βέβαιης κρυπτοκόκκωσης. Σύμφωνα με τα κριτήρια ECIL για τους λευχαιμικούς ασθενείς: 1) ανίχνευση αντιγόνου στον ορό σημαίνει διάσπαρτη κρυπτοκόκκωση (ευαισθησία μεγαλύτερη σε HIV ασθενείς από μη HIV ασθενείς) (ισχύ ένδειξης AII) ή πνευμονική κρυπτοκόκκωση (ισχύ ένδειξης BIII) και ανίχνευση στο ENY κρυπτοκοκκική μηνιγγίτιδα (ισχύ ένδειξης AII), 2) ο αρχικός τίτλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης (ισχύ ένδειξης BIII) και 3) η κινητική των τιμών του αντιγόνου στον ορό και στο ENY μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ένδειξη απάντησης ή όχι στη θεραπεία (ισχύ ένδειξης CIII)

5. Μοριακές μέθοδοι

Οι περισσότερες από τις μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση και τυποποίηση των μυκήτων αφορούν κυρίως είδη *Aspergillus* και *Candida*, και λιγότερο *Cryptococcus*, μουκορμύκητες και ενδημικούς μύκητες. Αυτές βασίζονται σε τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και αφορούν τόσο στην άμεση ανίχνευση του μύκητα σε ιστούς (φρέσκα/κατεψυγμένα ή μονιμοποιημένα δείγματα βιοψίας) και αίμα (ολικό αίμα σε φιαλίδιο γενικής αίματος, ορός), όσο και στην ταυτοποίηση του ανεπτυγμένου σε καλλιέργεια στελέχους. Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιούνται σε αυτές είναι τόσο πολλαπλών αντιγράφων όσο και μονού αντιγράφου. Αυτές οι PCR μπορεί να είναι είτε in house, είτε εμπορικές.

Μεταξύ των εμπορικά διαθέσιμων μοριακών τεχνικών θα πρέπει να αναφερθούν οι κυκλοφορούσες στη χώρα μας η SeptiFast μεθοδολογία (Roche Molecular Diagnostics) και η T2Candida (T2 Biosystems, USA). Η SeptiFast μεθοδολογία (πολυπλεκτική real-time PCR) ανιχνεύει απευθείας από γενική αίματος DNA περισσότερων από 25 μικροβιακών παθογόνων (>90% αυτών που προκαλούν σήψη), μεταξύ των οποίων 5 είδη *Candida* και *Aspergillus fumigatus*. Η T2Candida, μεθοδολογία μαγνητικού συντονισμού (FDA approved), ανιχνεύει από γενική αίματος σε ~4 ώρες *C. albicans/C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei/C. glabrata*, με πολύ υψηλές ευαισθησία και ειδικότητα, θετική και αρνητική προγνωστική αξία, σε σχέση με την καλλιέργεια αίματος (**Εικόνες 4α** και **4β**)

Εικόνα 4α: Σύγκριση T2Candida μεθοδολογίας με καλλιέργεια αίματος για τη διάγνωση καντινταιμίας.

	BLOOD CULTURE	T2CANDIDA
Species identification	No	Yes
Minimum specimen volume	10 mL	2-3 mL
Turnaround time	2-5 days	3-5 hours
Sensitivity	38-50%	91.1%
Specificity	97%	99.4%
PPV	21%	81.8%
NPV	99.2%	99.7%
Interference from antifungal therapy	Yes	No

Εικόνα 4β. Συνολική ευαισθησία και ειδικότητα του panel T2Candida

Parameter	Number correct/total number	%	95% CI
Sensitivity overall per patient[†]	233/256	91.0	86.8–94.2
Overall per assay [†]	234/257	91.1	86.9–94.2
Per <i>Candida</i> species [‡] :			
– A/T	96/104	92.3	85.4–96.6
– P	49/52	94.2	84.1–98.8
– K/G	89/101	88.1	80.2–93.7
Specificity overall per patient[†]	1516/1545	98.1	97.3–98.7
Overall per assay [†]	5114 / 5146	99.4	99.1–99.6
Per <i>Candida</i> species [‡] :			
– A/T	1679 /1697	98.9	98.3–99.4
– P	1736 /1749	99.3	98.7–99.6
– K/G	1699 / 1700	99.9	99.7–100.0

Data taken from Mylonakis *et al.* [28].

[†]Based on the prospective and contrived arms of the study.

A/T: *C. albicans/C. tropicalis*; P: *C. parapsilosis*; K/G: *C. krusei/C. glabrata*.

Στον **Πίνακα 5** φαίνονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μοριακών τεχνικών διάγνωση διεισδυτικών μυκητιάσεων.

Πίνακας 5. Χρησιμοποίηση των μεθοδολογιών ανίχνευσης διεισδυτικών μυκητιάσεων.

Μέθοδος	Ενδείξεις	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μέθοδοι PCR	Ανίχνευση DNA κυρίως <i>Aspergillus</i>	Πρώιμη διάγνωση (ταχείες τεχνικές), υψηλή NPV	Επιπρόσθετες τεχνικές ΔΕΝ είναι μυκητολογικό κριτήριο
Μεγαλύτερη εμπειρία με τις in-house τεχνικές.	Μικρότερη εμπειρία για <i>Candida</i>	Υψηλή ευαισθησία (αν γονίδια σε πολλά αντίγραφα) Δυνατότητα: τυποποίησης σε επίπεδο είδους ποσοτικοποίησης Ανίχνευση μικρού φορτίου σε καντιναιμίες: <10 CFU/mL (σε 25% <1 CFU/mL) (περιπτώσεις περιοδικής ελευθέρωσης από φλεγμένων όργανο στην κυκλοφορία ή λόγω κάθαρσης στο ήπαρ)	Σε εργαστήρια αναφοράς (μη ευρέως διαδεδομένες τεχνικές) Υψηλό κόστος, εξειδικευμένο προσωπικό, εξοπλισμός Δυσκολίες στην απομόνωση επαρκούς ποσότητας DNA από διάφορα δύσκολα δείγματα Ασαφής η επίδραση των αντιμυκητικών στην ευαισθησία Λίγα δεδομένα από ασθενείς αποικισμένους με <i>Candida</i> , αλλά τάση μείωσης ειδικότητας

Η PCR για *Aspergillus*, σύμφωνα με τις οδηγίες 2017 των ESCMID-ECMM-ERS, εφαρμόζεται κυρίως σε αίμα και BAL, όπου ο συνδυασμός με άλλους βιοδείκτες αυξάνει την πιθανότητα διάγνωσης διεισδυτικής ασπεργίλλωσης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ορός ή ολικό αίμα και, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι πολύ σημαντικός ο συνδυασμός με GM. Ισχυρά συστήνεται η εφαρμογή της σε βιοπτικό υλικό με θετική για υφές μικροσκοπική (AII), αντίθετα η διαγνωστική της ικανότητα είναι μικρή αν η μικροσκοπική είναι αρνητική (**Εικόνες 5 και 6**).

Αναμφίβολα, αν και οι μοριακές τεχνικές είναι ταχείες μέθοδοι που παρέχουν τη δυνατότητα της πρώιμης διάγνωσης, είναι μέθοδοι μη προτυποποιημένες, γεγονός που περιορίζει την ευρεία χρήση τους στην κλινική πράξη.

Εικόνα 5. PCR σε BAL και ENY

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Patients undergoing allogeneic stem cell transplantation recipients not on mould-active prophylaxis	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	
Patients with pulmonary infiltrates and haematological malignancies and prolonged neutropenia	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	Methodically different in-house assays, better performance in patients without antifungal treatment, PCR and galactomannan: increases specificity
ICU patients, mixed populations	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	Commercially available <i>Aspergillus</i> PCR assays with good performance data
Patients with haematological malignancies	To diagnose CNS aspergillosis or meningitis	CSF PCR	B	II	113 CSF samples from 55 immunocompromised patients sensitivity 100%, specificity 93% (retrospective)

Εικόνα 6. Μοριακή διάγνωση σε βιοπτικό υλικό

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Biopsy with visible hyphae	To detect and specify a fungus	Broad-range PCR	A	II	High sensitivity (>90%) and high specificity (99%); various molecular-based techniques available
Biopsy with no visible hyphae	To detect and specify a fungus	Broad-range PCR	C	II	Sensitivity (57%) and specificity (96%); ability to distinguish other fungi; performance only in addition to other tests
Biopsy with visible hyphae	To detect and specify a fungus	Broad-range PCR on wax-embedded specimens	A	II	TaKaRa DEXPAT kit and QIAamp DNA mini kit detected fewer than 10 conidia/sample
Any	To detect and specify a fungus	Fresh tissue samples	B	II	<i>Aspergillus</i> PCR performance analysis yielded sensitivity/specificity rates of 86%/100% (79 patients, retrospective study)

Τα πέντε σημαντικά στάδια-σημεία της μεθόδου PCR που πρέπει να προτυποποιηθούν, ώστε να συμπεριληφθεί στα διαγνωστικά κριτήρια του EORTC/MSG, είναι: α) το είδος του δείγματος (ορός ή ολικό αίμα) και η μέθοδος απομόνωσης DNA, β) η επιλογή του κατάλληλου γονιδίου-στόχου που πρόκειται να ενισχυθεί, γ) οι μέθοδοι ανίχνευσης και τυποποίησης του προϊόντος πολλαπλασιασμού, δ) η μορφή της PCR που θα χρησιμοποιηθεί [απλή, εμφωλεασμένη (nested PCR), πολυπλεκτική (multiplex PCR), πραγματικού χρόνου ανάγνωσης (real-time PCR)] και ε) οι προφυλάξεις για την ελαχιστοποίηση των ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Τέλος, επειδή η θεραπεία είναι ανάλογη του είδους, η PCR πρέπει να δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης τουλάχιστον των ανθεκτικών στελεχών (*C. glabrata*, *C. krusei* και *A. terreus*).

Συμπερασματικά, η διάγνωση των διεσδυτικών μυκητιάσεων παραμένει πρόκληση, κυρίως γιατί οι λοιμώξεις αυτές σχετίζονται με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Οι μη καλλιεργητικές τεχνικές αποτελούν ισχυρό εργαλείο διάγνωσης, συναξιολογούμενες πάντα με τα υπόλοιπα κλινικά, ακτινολογικά και μικροβιολογικά ευρήματα.

Εικόνα 7. Συνθήκες φύλαξης δειγμάτων και στελεχών

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Any	To prevent loss of viability of <i>Aspergillus</i> in clinical samples, and to reflect the original fungal content	Clinical samples for culture—short-term storage: 4°C to prevent loss of viability and to reflect the original fungal content	A	III	
	To prevent degradation of biomarkers, e.g. GM in serum or BALs or bronchial washes	Complete assay soon after delivery to laboratory. Avoid short-term or long-term storage of serum at 4°C	A	I	GM in serum degrades with short-term and long-term storage at 4°C; BAL fluid GM ODI remain stable; testing of pos./neg. serum and BAL fluid pools showed no decline in GM index over 11 months at -20°C
	Short-term maintenance of <i>Aspergillus</i> isolates	Repeated sub-culture	A	I	Viability maintained for several years by frequent sub-culture; transfer once a month; maintain at average ambient room temperature
	Long-term preservation of <i>Aspergillus</i> isolates	Water storage/storage under mineral oil/silica gel storage/ freeze-drying freezing (-80°C/ ceramic beads/liquid nitrogen)	A	I	Long-term storage means storage periods of 5 years or longer; no further transfers required during this period

Συνοπτικά, η διάγνωση ΔΜ μπορεί να είναι «Μικροβιολογική» και «μη Μικροβιολογική». Οι αντίστοιχες μεθοδολογίες που έχουμε στη διάθεσή μας είναι:



Σημαντικά σημεία για τη διάγνωση αποτελούν:

- A.**
 1. Ασθενής **υψηλού κινδύνου για ΔΜ**
 2. Αποστολή **κατάλληλου** δείγματος
 3. **Επιλογή** εξέτασης ανάλογα
 - ιστορικού και κλινικής εικόνας
 - τοπικής επιδημιολογίας
- B.**
 1. Μικροσκοπική
 2. Καλλιέργεια
- Γ.** **Ορολογικές / μοριακές τεχνικές**
 1. ποικιλία μεθοδολογιών
 2. γνώση ενδείξεων εφαρμογής τους
 3. γνώση πλεονεκτημάτων / μειονεκτημάτων
 4. **δεν ανιχνεύουν ΟΛΟΥΣ** τους μύκητες

Άμεση μικροσκοπική εξέταση

Η άμεση μικροσκοπική εξέταση των κλινικών δειγμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στην μικροβιολογική διάγνωση των μυκητικών λοιμώξεων. Με αυτή είναι δυνατόν πολύ γρήγορα να υπάρξει μία πρώτη ένδειξη της αιτίας της λοίμωξης, συμβάλλοντας στην έγκαιρη έναρξη αντιμυκητικής αγωγής. Παράλληλα είναι πολύ σημαντική γιατί καταδεικνύει την ύπαρξη του μύκητα πριν την καλλιέργεια, μια και μερικοί μύκητες μπορεί να αναπτυχθούν στα καλλιεργητικά υλικά λόγω εργαστηριακής επιμόλυνσης. Τέλος τα στοιχεία της μικροσκοπικής εξέτασης μπορεί να βοηθήσουν στην επιλογή του κατάλληλου καλλιεργητικού υλικού². Αν η ποσότητα του δείγματος είναι πολύ μικρή, τότε προηγείται η καλλιέργεια της μικροσκοπικής εξέτασης. Εξαιρεση αποτελούν τα δείγματα νυχιών, γιατί η καλλιέργεια αποτυγχάνει σε μεγάλο ποσοστό (περίπου 30%), καθώς και σε υποψία ποικιλόχρου πιτυρίασης, όπου η μικροσκοπική εξέταση ξεσμάτων δέρματος είναι πρωταρχικής σημασίας.

Τα δείγματα εξετάζονται ως έχουν ή μετά από επεξεργασία με αντιδραστήρια ή/και χρώσεις, για την καλύτερη διάκριση και αναγνώριση των μυκητιακών στοιχείων στο μικροσκόπιο. Συνήθεις τεχνικές είναι:

- **Επεξεργασία με καυστικό κάλιο (ΚΟΗ) 10-20% (wt/vol).** Αυτό διαλύει τα κυτταρικά υπολείμματα των ιστών και των βλεννογόνων και την κερατίνη, τόσο πιο γρήγορα όσο πυκνότερο είναι το διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό οι μύκητες, το κυτταρικό τοίχωμα των οποίων δεν καταστρέφεται, γίνονται καλύτερα ορατοί, λόγω διαύγασης του υλικού. Είναι κύρια πρακτική προκειμένου για εξέταση δέρματος, τριχών, νυχιών και ιστών, ενώ μπορεί να βοηθήσει στην εξέταση δειγμάτων πύου και εκκρίσεων. Σε βιοπτικό υλικό εγκεφάλου δεν γίνεται επεξεργασία με ΚΟΗ λόγω δημιουργίας artifacts, αλλά μόνο χρώση Gram. Γίνεται θέρμανση του παρασκευάσματος (προσοχή όχι βρασμός) ή επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 - 30 min, αν πρόκειται για δείγμα με πολύ κερατίνη.
- **Επεξεργασία με ΚΟΗ-calcofluorwhite.** Η μικροσκόπηση γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού.

- **Σινική μελάνη (India ink).** Πρόκειται για αρνητική χρώση που χρησιμεύει στην ανίχνευση του ελυτροφόρου ζυμομύκητα *Cryptococcus neoformans* σε ENY, ούρα και άλλα βιολογικά υγρά. Η σινική μελάνη δεν χρωματίζει το πολυσακχαριδικό έλυτρο με αποτέλεσμα σε σκοτεινό φόντο να φαίνονται τα ελυτροφόρα βλαστοκονίδια του μύκητα.

Η μορφολογία των μυκητικών δομών μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση του μύκητα. Οι υαλοϋφομύκητες, όπως τα γένη *Aspergillus*, *Fusarium* παρουσιάζουν υφές διαμέτρου 4-6μm, με παράλληλα και χωρίς περισφίξεις τοιχώματα, ομοιόμορφα κατανεμημένα διαφραγμάτια και διχοτόμηση υπό γωνία 45⁰. Αντίθετα, οι μουκορμύκητες, όπως τα γένη *Mucor*, *Rhizopus*, παρουσιάζουν υφές ευρείες και ακανόνιστες, χωρίς διαφραγμάτια, με βολβοειδείς πλάγιες διογκώσεις και διχοτόμηση υπό γωνία 90⁰.

Στα δείγματα του αναπνευστικού, η παρουσία υφών με τα χαρακτηριστικά των υαλοϋφομυκήτων, θέτει την υποψία πνευμονικής λοίμωξης από *Aspergillus* spp. ή άλλο μύκητα της ίδιας ομάδας, ιδίως αν πρόκειται για ανοσοκατεσταλμένο ασθενή (π.χ. ασθενή με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων), ενώ η ύπαρξη βλαστοκονιδίων και ψευδοϋφών σημαίνει μάλλον καντιντίαση του φάρυγγα / οισοφάγου, μια και η πνευμονική λοίμωξη από *Candida* spp. είναι ιδιαίτερα σπάνια.

Η παρουσία μυκητικών στοιχείων σε φυσιολογικά στείρα κλινικά δείγματα, όπως αίμα, ENY, υλικά βιοψίας, πρέπει να γίνεται άμεσα γνωστή στους κλινικούς γιατρούς, μια και αποτελεί ισχυρό στοιχείο μυκητικής λοίμωξης. Εξάλλου, η άμεση μικροσκοπική εξέταση μπορεί να είναι η μοναδική, θετική, μικροβιολογική εξέταση αν ο ασθενής έχει πάρει αντιμυκητιακά. Στην περίπτωση αυτή η καλλιέργεια μπορεί να αποβεί αρνητική και η διάγνωση μυκητικής λοίμωξης να τεθεί μόνο από την άμεση μικροσκοπική εξέταση του δείγματος, στοιχείο σημαντικό δεδομένου ότι συχνά πρόκειται για υψηλού κινδύνου ασθενείς.

Καλλιέργεια - Ταυτοποίηση

Η καλλιέργεια είναι πιο ευαίσθητη από την άμεση μικροσκοπική εξέταση και απαραίτητη, τόσο για την απομόνωση του παθογόνου και την ταυτοποίησή του σε επίπεδο γένους και είδους, όσο και για ενδεχόμενο έλεγχο ευαισθησίας στα

αντιμυκητικά. Μόνο η ανάπτυξη του υπεύθυνου μύκητα στην καλλιέργεια θέτει την οριστική διάγνωση μυκητικής λοίμωξης (χρυσό πρότυπο, gold standard).

Ο ενοφθαλμισμός των δειγμάτων γίνεται σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά, είτε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 100mm, είτε σε σωληνάκια (25 x 150mm) με κεκλιμένο άγαρ και βιδωτό καπάκι. Τα πρώτα έχουν μεγάλη επιφάνεια και διευκολύνουν την απομόνωση των αποικιών, αλλά έχουν το μειονέκτημα της αερογενούς διασποράς και πιθανής μόλυνσης του προσωπικού, ιδίως αν πρόκειται για δίμορφους μύκητες. Τα δεύτερα προτιμώνται γιατί αποφεύγεται η αφυδάτωση του υλικού λόγω της παρατεταμένης επώασης, μειώνεται ο κίνδυνος επιμόλυνσεων, αλλά και διασποράς κάποιου ιδιαίτερα παθογόνου μύκητα. Σε τύπο σωληναρίων με βιδωτό πώμα πρέπει να γίνεται υποχρεωτικά η καλλιέργεια σε υποψία δίμορφων μυκήτων και ιδιαίτερα *Coccidioides immitis*.

Τα καλλιεργητικά υλικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, αυτά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του υπεύθυνου μύκητα και αυτά που χρησιμοποιούνται για την ανακαλλιέργεια των αναπτυχθέντων στελεχών με σκοπό την ταυτοποίησή τους.

Για την αρχική απομόνωση των μυκήτων από τα κλινικά δείγματα επιλέγονται:

- **Εκλεκτικά θρεπτικά υλικά:** Sabouraud dextrose agar (SDA) με ή χωρίς αντιβιοτικά, συγκεκριμένα πενικιλίνη 20U/mL, στρεπτομυκίνη 40U/mL, γενταμικίνη 5μg/mL, χλωραμφαινικόλη 16μg/mL, για την αναστολή βακτηρίων, καθώς και με ή χωρίς κυκλοεξαμίδη ή ακτιδιόνη 0.5μg/mL, για την αναστολή σαπροφυτικών μυκήτων (προσοχή γιατί μπορεί να ανασταλλούν και ευκαιριακά παθογόνοι μύκητες, όπως *C. neoformans*, *Trichosporon asahii*, μερικά είδη *Candida*, μερικά είδη *Aspergillus* και πολλοί μουκορμύκητες)
- **Μη-εκλεκτικά εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά:** BHI και SABHI άγαρ με προσθήκη αίματος προβάτου 5-20% και αντιβακτηριακών, για την ανάπτυξη απαιτητικών μυκήτων [δίμορφοι (*Histoplasma*)].

Για την ανακαλλιέργεια και **ταυτοποίηση** των αναπτυχθέντων μυκήτων απαιτούνται υλικά, όπως το Czapek-Dox agar για την ταυτοποίηση των *Aspergillus* spp., το Potato flake agar που ευνοεί τον σπορισμό διαφόρων υφομυκήτων, και το Cornmeal agar για την παραγωγή χλαμυδοσπορίων της *C. albicans* και παραγωγή χρωστικής από το *Trichophyton rubrum*. Χρωμογόνα υλικά, όπως το *Candida* ID (bioMerieux) και BD CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson BBL), είναι χρήσιμα για την ταυτοποίηση των συχνότερων ειδών *Candida* spp., οι αποικίες των οποίων παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα, ανάλογα του είδους.

Η **επώαση** γίνεται σε θερμοκρασία ≤ 30 °C (± 1 °C) ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η **διάρκεια** είναι γενικά 4 εβδομάδες. Τρεις εβδομάδες είναι αρκετές για δέρμα, νύχια, τρίχες και ανάπτυξη δίμορφων μυκήτων, ενώ 7 ημέρες αρκούν για την ανάπτυξη ζυμομυκήτων από φάρυγγα και γεννητικό σύστημα. Η **ανάγνωση** των καλλιεργειών γίνεται κάθε 2-3 ημέρες για τις 2 πρώτες εβδομάδες και στη συνέχεια μία φορά την εβδομάδα μέχρι τέλους της επώασης.

Για την περαιτέρω ταυτοποίηση του απομονούμενου στελέχους συνιστάται λεπτομερής καταγραφή του αποτελέσματος της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα ο αριθμός των ημερών που χρειάστηκαν για την πρώτη ορατή ανάπτυξη του μύκητα, το θρεπτικό υλικό που αναπτύχθηκε, η θερμοκρασία ανάπτυξης και η μορφολογία των αποικιών.

Για την **ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων** εξετάζονται:

- τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά
- η δοκιμασία βλαστικού σωλήνα-germ tube (θετική για μερικά είδη *C. albicans* και *C. dubliniensis* και ψευδώς θετική για *C. tropicalis*)
- η δοκιμασία παραγωγής χλαμυδοσπορίων σε cornmeal agar
- οι βιοχημικές δοκιμασίες και οι δοκιμασίες ζύμωσης / αφομοίωσης σακχάρων

Για την **ταυτοποίηση των υφομυκήτων ή μυκηλιακών μυκήτων** εξετάζονται:

- τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά (μορφή ώριμης αποικίας)
 - το χρώμα πρόσθιας και οπίσθιας επιφάνειας της αποικίας,
 - η μορφή της αποικίας (λεία, χνοώδης, σαν βαμβάκι)

- τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά
 - η μορφολογία, η διάταξη, το χρώμα και το σχήμα υφών και σπορίων
 - η ύπαρξη και μορφολογία μικρο-, μακρο-κονιδίων
 - ο τρόπος σπορισμού (κονιδιογόνα κυττάρα).

Ανάλογα με την υποψία του είδους της ΔΜ υπάρχουν οι παρακάτω επιλογές

1. Καντινταιμία με καλλιέργεια αίματος **θετική**

- **Μυκητόγραμμα (AFS)**
- Ταχεία ταυτοποίηση με
 - Chromogenic agar
 - Yeast PNA-FISH (Peptide Nucleic Acids Fluorescent In Situ Hybridization)
 - < 2h μετά (+) κ/α αίματος
 - Στοχευμένη θεραπεία (σε 29% των ασθενών)
 - Μείωση κόστους αντιμυκητικής αγωγής (>370\$ / ημέρα)
 - **MALDI-TOF-MS**
- **Λοιμογονικότητα (biofilm formation)**

2. Διηθητική καντιντίαση με καλλιέργεια αίματος **αρνητική**

- **Μοριακές μέθοδοι**
 - Ευρέως φάσματος (από γενική αίματος)
 - **SeptiFast®** (Roche)
 - **Candida PCR (T2 Candida – τεχνική μαγνητικού συντονισμού)**
- **Ορολογικές μέθοδοι**
 - **β-Glucan** (Fungitell® Kit, Associates of Cape Cod, Inc, Dynamiker Fungus)
 - Μυκητολογικό κριτήριο (De Paux CID 2008)
 - Δεν ανιχνεύει *Cryptococcus* & Μουκορμύκητες
 - 2 δείγματα/εβδ.
 - **Μαννάνη + αντι-μαννάνη** (Platelia, BioRad)
 - Δεν ανιχνεύει *C. parapsilosis* & *C. guilliermondii* (λόγω μικρής ποσότητας μαννάνης στο τοίχωμά τους)
 - ΔΕΝ είναι μυκητολογικό κριτήριο
- **Συνδυασμός μεθοδολογιών**

3. Διεισδυτική ασπεργίλλωση (IA)

- **Μοριακές μέθοδοι**
 - Ευρέως φάσματος

- SeptiFast® (Roche)
 - *Aspergillus* PCR
- Ορολογικές μέθοδοι
 - Γαλακτομαννάνη (Platelia Aspergillus, BioRad)
 - Μυκητολογικό κριτήριο (De Pauw CID 2008)
 - Προσοχή σε anti-mold αγωγή (ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα)
 - Προσοχή σε αγωγή με β-λακταμικά αντιβιοτικά (ψευδώς θετικό αποτέλεσμα – ιδίως στα γενόσημα - δεν ισχύει για το Tazocin®)
 - 2 δείγματα/εβδ.
- Συνδυασμός μεθοδολογιών
 - GM και PCR
- Συνδυασμός 2 ειδών δειγμάτων
 - Πλάσμα + γενική αίματος καλύτερα από μόνο ένα είδος δείγματος
 - 1 αρνητικό αποτέλεσμα PCR: αποκλεισμός IA
 - 2 θετικά αποτελέσματα: επιβεβαίωση διάγνωσης IA (μεγαλύτερη ειδικότητα)

4. Διεισδυτική μουκορμύκωση - Ποιο είναι το κατάλληλο δείγμα;

- Ιστός ή ξέσμα από ρινική κοιλότητα / υπερώα
 - περιοχή νέκρωσης (στα όρια)
- Αναρρόφηση με λεπτή βελόνη (FNA)
- Βιοψία πνεύμονα / δέρματος
- ENY
- Στυλεός: αν δεν υπάρχει άλλο διαθέσιμο δείγμα (καλή λήψη)
 - Ψευδώς θετικά
 - Αξιολόγηση με την κλινική εικόνα
- Ορολογικές μέθοδοι ➔



Αιμοκαλλιέργεια ΔΕΝ έχει αξία στη διάγνωση μουκορμύκωσης

Το ιστικό τεμάχιο διατηρείται σε ΦΟ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

ΌΧΙ κατάψυξη

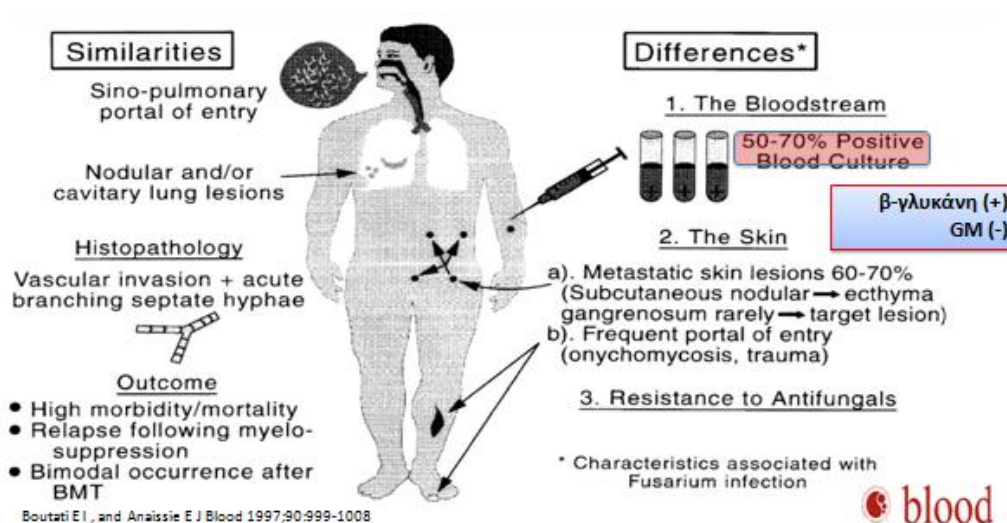
Όχι ομογενοποίηση



Biorad excisional

1. Γαλακτομαννάνη (μέτρια σύσταση) για
 - αποκλεισμό
 - μεικτή λοίμωξη
 2. β-D-Γλυκάνη ΔΕΝ συστήνεται για διάγνωση
- ΑΛΛΑ** στελέχη *Rhizopus spp.* μπορεί να περιέχουν BG σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του ορίου ανίχνευση

5. Διεισδυτική φουσαρίωση: ομοιότητες – διαφορές με διεισδυτική ασπεργίλλωση



Ενδεικτική βιβλιογραφία

1. Cuenca-Estrella M, Matteo B, Lass-Flörl C, et al. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 Suppl 1:i15-24.
2. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, 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; 46:1813-1821.
3. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, et al. β-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and metaanalysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis*. 2012;54:633–43.
4. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (Suppl. 7): 9–18.
5. A.J. Ullmann, J.M. Aguado, S. Arikan-Akdagli, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:1