

Diagnostyka zakażeń grzybiczych

Ewa Romanowska

Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”

Zakażenia grzybicze dotyczą głównie pacjentów z obniżoną funkcją układu odpornościowego. Mimo rozwoju nowoczesnej i zaawansowanej opieki medycznej (w tym stosowanie inwazyjnych metod leczenia), pozwalającej na przedłużenie i polepszenie jakości życia pacjentów, paradoksalnie powiększają liczbę czynników predysponujących do rozwoju zakażeń grzybiczych.

Diagnostowanie grzybic pozostaje problemem, w szczególności wśród pacjentów obciążonych największym ryzykiem zakażenia. Objawy w większości przypadków są mało charakterystyczne, a kolonizacja trudna do odróżnienia od zakażenia inwazyjnego.

Wstępna diagnoza zakażenia grzybiczego ma swoje miejsce w gabinecie lekarskim, gdzie na podstawie dokładnie przeprowadzonego wywiadu klinicznego klinicysta stwierdza prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia grzybiczego, powierzchniowego bądź inwazyjnego.

Powierzchniowe zakażenia grzybicze dotyczą głównie skóry i jej przydatków tj. paznokci i włosów. Grzyby niszczą białka gospodarza jednak nie wnikają poza warstwę tkanek.

Inwazyjne zakażenia grzybicze, to takie, w których patogeny grzybicze penetrują do tkanek i wnikają do naczyń krwionośnych. Następstwem może być zakażenie rozsiane, gdy komórki grzyba przylegają do komórek śródbłonki naczyniowego, dróg krwi zakażając inne tkanki i narządy. W efekcie dochodzi do aktywacji układu odpornościowego i kaskady procesów krzepnięcia powodujących tworzenie zatorów.

Podejrzenie zakażenia grzybiczego jest wyzwaniem dla lekarza prowadzącego pacjenta do wyboru odpowiednich metod diagnostycznych celem potwierdzenia rozpoznania zakażenia.

Diagnostyka powierzchniowych zakażeń grzybiczych opiera się głównie na badaniach mikrobiologicznych. Przepływ informacji zawarty w wywiadzie klinicznym, pomiędzy lekarzem a mikrobiologiem jest niezmiernie ważny. Informacje dotyczące wyglądu powstałych zmian, choroby podstawowej pacjenta, rodzaju leków jakie przyjmuje, prowadzonego trybu życia (kontakt ze zwierzętami, sporty, podróże) mogą pomóc w ustaleniu prawdopodobnego pochodzenia źródła zakażenia, szybszej i pewnej identyfikacji, która pomoże mikrobiologowi dobrać odpowiednie techniki posiewu do adekwatnego rodzaju patogenu.

Etapem wstępnym mikrobiologicznej diagnostyki mikologicznej od którego niewątpliwie zależy osiągnięcie sukcesu diagnostycznego jest pobranie materiału do badania. Materiał w postaci łusek skórnych pobieramy

z otoczenia ogniska zapalnego zmiany, gdy w tym miejscu możemy spodziewać się wyjących strzępek grzybni. Jeśli na skórze obecnych jest więcej niż jedno ognisko zapalnych, materiał powinien być pobrany ze wszystkich zmian (w tym ze zmiany pierwotnej). Jeśli zmiany dotyczą skóry owłosionej, materiałem do badania powinny być łuski skórne oraz w całości depilowany włos. W przypadku podejrzenia łupieżu pstrego, należy pobrać łuski z miejsc zmienionych chorobowo na tułowiu oraz łuski skórne i włosy z głowy. Zaleca się również w celach diagnostycznych łupieżu pstrego oświetlenie miejsc zmienionych w świetle lampy Wooda (fluorescencja grzybów). W grzybicy paznokci pobieramy opłatki z granicy płytki paznokciowej zdrowej i zmienionej chorobowo, a w przypadku podejrzenia zakażenia wałków paznokciowych, również rop.

Diagnostyka mikrobiologiczna grzybic powierzchniowych opiera się na badaniu mikroskopowym odpowiednio wykonanego preparatu z materiału klinicznego, posiewu i zakładania hodowli (im więcej danych uzyskanych z wywiadu klinicznego, tym większe możliwości zastosowania odpowiednich technik posiewu w kierunku określonych patogenów) oraz na identyfikacji makroskopowej i biochemicznej wyhodowanych grzybów.

Wyizolowanie grzybów z materiału klinicznego zmusza do stwierdzenia, czy jest to kolonizacja, czy też już zakażenie. Wiadomo bowiem, że grzyby występują powszechnie w środowisku oraz stanowią zjologiczny składnik mikroflory człowieka. Zawsze należy porównać wynik badania ze stanem klinicznym pacjenta ze względu na fakt, że nawet wyhodowanie grzybów w małej liczbie od pacjentów bądź tych w gabinecie immunosupresji może wskazywać na zakażenie.

Wiskaz warto diagnostycznie badać ilość ciętych materiałów pobranych z kilku miejsc jednocześnie. Pozwala to ustalić tzw. indeks kolonizacji stanowiący o ryzyku rozwoju inwazyjnego zakażenia grzybiczego.

Wstępne podejrzenie inwazyjnego zakażenia grzybiczego na podstawie dokładnie przeprowadzonego wywiadu lekarskiego wymaga zastosowania odpowiedniego schematu postępowania diagnostycznego nie ograniczającego się jedynie do badań mikrobiologicznych. Badaniem niezbędnym w takich przypadkach jest określenie markerów stanu zapalnego (czynniki nieswoiste u pacjentów z nieprawidłową funkcją układu odpornościowego), a także przeprowadzenie dodatkowych badań biochemicznych (również w zależności od podejrzenia infekcji poszczególnych narządów) pozwalających na diagnostykę różnicową z innymi jednostkami chorobowymi. Pomocne i bardziej

złotym standardem w diagnostyce inwazyjnych grzybic są badania histopatologiczne biopłatów, wycinków oraz materiałów pobranych podczas bronchoskopii. Poważnym problemem są ograniczenia możliwości wykonania tego typu badań u pacjentów z małopłytkowością, czyli te błądych w głębię immunosupresji.

Diagnoza inwazyjnego zakażenia grzybiczego powinna być również poparta badaniami obrazowymi tj. wysoko rozdzielczości tomografią komputerową lub ultrasonografią. Często wyniki tych badań również nie są typowe dla zakażenia grzybiczego i mogą przypominać obrazem inne jednostki chorobowe.

Postawienie pewnej diagnozy inwazyjnego zakażenia grzybiczego opiera się na uzyskaniu dodatniego wyniku badania mikrobiologicznego z miejsca jałowego. Jednak należy pamiętać, że uzyskanie wyniku ujemnego nie zawsze oznacza brak zakażenia. Może mieć na to wpływ wiele czynników, między innymi wcześniejsze stosowanie antymikotyków, uszkodzenie komórek grzyba, niewielka liczba krążących komórek grzyba w ustroju trudna do aspiracji np. podczas pobrania krwi. Stąd też wyniki posiewów krwi są w 40% kandydemii są ujemne.

Metody mikrobiologiczne stosowane w diagnostyce mikologicznej, to:

1. Badanie mikroskopowe
 - mikroskopia bezpośrednia osadu uzyskanego z materiału klinicznego z dodatkiem soli fizjologicznej lub 10% KOH,
 - wykonanie preparatu barwionego metodą Grama, pozytywno-negatywną (podejrzanie kryptokokozy), niektóre barwienia histopatologiczne – Gomori-Grocott,
 - ocena mikroskopowa wyhodowanych patogenów – identyfikacja grzybów pleśniowych (konidiów, pseudostrzępek, owocników, zarodników) w oparciu o monografię i atlasy.
2. Posiew i hodowla
 - posiew materiału na odpowiednie podłoże namnażające i różnicujące i późniejsza ocena morfologii wyhodowanych grzybów, identyfikacja w oparciu o szybkość wzrostu, rodzaj i kształt wytworzonych kolonii, kolor i zapach.
3. Identyfikacja i mikrogram
 - Grzyby pleśniowe są identyfikowane w oparciu o cechy morfologiczne tj. wygląd kolonii, szybkość wzrostu a także budowę i wygląd owocników i zarodników grzybów. Natomiast drożdżaki identyfikowane są przede wszystkim na podstawie cech morfologicznych, głównie kształtu blastospor zaobserwowanych w preparacie mikroskopowym z hodowli, wyglądu i barwy kolonii oraz testów wykorzystujących właściwości biochemiczne, głównie zdolność do asymilacji cukrów (np. Api ID 32 C BioMérieux; system automatyczny z kartami testów biochemicznych Vitek).
 - Ocena wrażliwości *in vitro* grzybów na antymikotyki jest trudna ze względu na brak wystandardyzowanych metod oraz słabą korelację uzyskiwanych wyników z efektami klinicznymi

terapii. Metodą referencyjną (zalecana przez laboratoria referencyjne CSLI) oceny wrażliwości grzybów jest metoda rozcieńczenia leku w podłożu płynnym RPMI. W codziennej pracy stosowane są metody zbliżone do referencyjnej tzw. metody półkoloniowe i koloniowe. Powszechnie dostępne są komercyjne zestawy do oznaczania wrażliwości na antymikotyki diagnostyczne dla grzybów drożdżopodobnych takie jak ATB Fungus 2 (bioMérieux), Fungitest (BioRad), systemy zautomatyzowane Vitek, E-testy (AB Biodisk) dla grzybów pleśniowych E-testy (AB Biodisk), które umożliwiają oznaczenie wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration – najmniejsza stężenie leku hamujące wzrost grzybów).

4. Metody serologiczne.
 - Polegają głównie na wykrywaniu antygenów grzybiczych oraz swoistych przeciwciał w surowicy.
 - Stosowane techniki to głównie odczyny aglutynacji lateksowej oraz immuno-enzymatyczne (ELISA).
 - Wykrywane są wolno krążące antygeny grzybicze takie jak:
 - mangan *Candida* w surowicy,
 - galaktomannan *Aspergillus* w surowicy,
 - 1,3-β-glukanu *Aspergillus*, *Candida* w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym, płucznym i płynie oskrzelowym i innych płynach z jam ciała,
 - glikuronoksylomannan *Cryptococcus* w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym.
 - Ocena poziomu swoistych przeciwciał. Szczególnie warto określić swoiste przeciwciała anty *Candida* formy inwazyjnej (strzępka) oraz przeciwciała anty *Aspergillus*.
5. Metody chromatografii gazowej i chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.
 - Wykrywanie metabolitów grzybów w płynach ustrojowych:
 - D-arabinitolu *Candida*
 - mannitolu *Aspergillus*
6. Techniki biologii molekularnej.
 - Wykrywanie materiału genetycznego grzyba. Do tego celu stosowane są:
 - reakcja łańcuchowa polimerazy
 - uorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Według zaleceń The European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) EORTC/MSG z 2008 roku, metodami mikrobiologicznymi akceptowanymi w świetle rutynowej diagnostyki inwazyjnych zakażeń grzybiczych są: mikroskopia, hodowla i testy serologiczne, przy czym brak dodatniej hodowli a pozytywne wyniki badań serologicznych są rozważane jako potwierdzenie zakażenia tylko w grupie pacjentów z immunosupresją. Metody biologii molekularnej po raz kolejny nie zostały wprowadzone jako narzędzie rutynowej diagnostyki. Pomimo wielu zalet nie są komercyjnie do-

st pnie i ujednolicone dla wszystkich laboratoriów co wi e si z brakiem standaryzacji.

Ostateczna i szybka diagnostyka zaka e grzybiczych jest trudna ze wzgl du na brak czułych metod. Pełna odpowied mo e by przybli ona dzi ki zastosowaniu wszystkich dost pnych technik diagnostycznych, zarówno mikrobiologicznych, histopatologicznych, biochemicznych, badaniu markerów stanu zapalnego, immunologicznych oraz technik obrazowych. Wa nym jest zwrócenie uwagi na stan kliniczny pacjenta, rodzaj choroby podstawowej, diety, stosowanego leczenia przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego. Wszystkie te czynniki maj okre lony wpływ na wyniki bada mikrobiologicznych. Grzyby jako patogeny powszechnie wyst puj ce w otoczeniu mog by przyczyn kontaminacji i uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich. Dlatego du uwag nale y po wi ci sterylnemu sposobowi pobrania materiału oraz póniejszemu opracowaniu w laboratorium. Hodowla, metody serologiczne oraz uzupełniaj co techniki PCR zawsze powinny by wykonywane jednocze nie i wielokrotnie powtarzane w przypadku podejrzenia inwazyjnego zaka enia grzybiczego. W wielu niezale nych badaniach udowodniono u yteczno metod biologii molekularnej w diagnostyce mikrobiologicznej inwazyjnych zaka e grzybiczych. Według zalece EORTC/MSG techniki molekularne nie mog słu y jako narz dzie do rutynowej diagnostyki mikologicznej. Mog by wykorzystywane jedynie jako metoda dodatkowa po dokładnym opracowaniu i dostosowaniu do potrzeb bada zwłascza u pacjentów z niedoborami układu odporno ci

PI MIENNICTWO:

7. Beifu B., Borelli C., Korting H.C. *Mykologisches Labor. Hautartz* 2006, 57: 487-492.
8. Denning D.W., Kibbler Ch.C., Barnes R.A., British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *The Lancet Infectious Diseases* 2003, vol 3, 230-481.
9. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from European Organisation 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. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46, 1813-1821.
10. Dzier anowska D. Diagnostyka mikrobiologiczna zaka e grzybiczych. *Polskie Archiwum Medycyny Wewn trznej*, vol.119 (2009) Suppl., 35-39.
11. Macura A.B. Grzybice powierzchniowe – etiologia, klinika i diagnostyka. W: Dzier anowska D., eds. *Zaka enia grzybicze- wybrane zagadnienia*. Bielsko- Biała, -medica Press, 2006: 21-40.
12. Migdał M., Romanowska E., Garczewska B., Dzier anowska D., wietli ski J. Zalecenia w zakresie diagnostyki i terapii inwazyjnych zaka e grzybiczych w intensywnej terapii dzieci. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 2008, 12 (4 cz.1): 893-896.
13. Ochman E. Diagnostyka mikrobiologiczna i serologiczna układowych zaka e grzybiczych. W: Dzier anowska D, eds. *Zaka enia grzybicze- wybrane zagadnienia*. Bielsko- Biała, -medica Press, 2006:56-71
14. Skotnicki A.B. Diagnostyka kliniczna inwazyjnych zaka e grzybiczych. *Polskie Archiwum Medycyny Wewn trznej*, vol.119 (2009) Suppl., 5-8.
15. Willinger B., Trends und neue Entwicklungen in der Diagnostik von Pilzinfektionen. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2007, 157/19: 476-481.