

©Borgis

Danuta Dzierżanowska¹, Lidia Gil², Beata Jakubas³, Sławomira Kyrzcz-Krzemień⁴, *Jan Styczyński⁵

Epidemiologia i diagnostyka mikrobiologiczna inwazyjnej choroby grzybiczej

Epidemiology and microbiologic diagnostics of invasive fungal disease

¹Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. med. Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat

²Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny, Poznań

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Mieczysław Komarnicki

³Katedra i Klinika Hematologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Aleksander Skotnicki

⁴Katedra i Klinika Hematologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Sławomira Kyrzcz-Krzemień

⁵Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum, Szpital Uniwersytecki nr 1,

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Mariusz Wysocki

Słowa kluczowe

inwazyjna choroba grzybicza,
kandydoza, aspergiloza, mukormykoza,
fusarioza, scedosporioza

Key words

invasive fungal disease, candidiasis,
aspergillosis, mucormycosis, fusariosis,
scedosporiosis

Streszczenie

Inwazyjna choroba grzybicza (ang. *invasive fungal disease* – IFD) jest zakażeniem narządowym o etiologii grzybiczej rozwijającym się zazwyczaj u pacjentów w stanie immunosupresji. Najczęstszymi postaciami mikrobiologicznymi powodującymi IFD są kandydozy/kandydemie, aspergilozy oraz inne zakażenia grzybami pleśniowymi (ang. *non-Aspergillus mycelial fungi* – NAMF), w tym mukormykozy, fusariozy i scedosporiozy.

W pracy omówiono etiologię i epidemiologię IFD u pacjentów z chorobami hematologicznymi i poddawanych przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Uznanyymi czynnikami ryzyka rozwoju IFD są: neutropenia, stosowanie steroidów, choroba przeszczep-przeciwko-gospodarzowi (GVHD), centralna tunelowa linia naczyniowa, zakażenia bakteryjne, stosowanie antybiotyków przeciwbakteryjnych, niewłaściwa profilaktyka, zakażenie CMV, kolonizacja śluzówkowa, a także prowadzone prace remontowe. Ocenia się, że w ostatnich latach u pacjentów dorosłych po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych częstość występowania IFD wynosi 22-28%, w tym aspergilozy około 60%. Najczęstsze czynniki etiologiczne to *Aspergillus fumigatus* i *Candida glabrata*, jednakże stwierdza się istotny wzrost częstości występowania mukormykoz. IFD jest częstą przyczyną śmiertelności u pacjentów z chorobami hematologicznymi: aspergiloza (w 19% przypadków), kandydoza (9%), mukormykozy i fusariozy (5%). W artykule przedstawiono również aktualne zasady w zakresie diagnostyki najczęstszych czynników etiologicznych IFD, z uwzględnieniem diagnostyki: mikrobiologicznej, serologicznej (w tym wykrywanie antygenów i przeciwciał mannan/antymannan (*Candida*), galaktomannan (*Aspergillus*), glukan (*Candida/Aspergillus*), enolazy (różnicujących kolonizację od inwazji)), obecności metabolitów, badań obrazowych, histopatologicznych, molekularnych, sond molekularnych i spektrofotometrii masowej. Omówiono rekomendacje dotyczące diagnostyki najczęstszych inwazyjnych zakażeń grzybiczych: aspergilozy, kandydozy i mukormykozy.

Summary

Invasive fungal disease (IFD) is the organ deep infection of fungal etiology, developing usually in patients with immunosuppression. The most frequent microbiological types of IFD are candidiasis, aspergillosis and non-*Aspergillus mycelial fungi* (NAMF) including mucormycosis, fusariosis and scedosporiosis.

The etiology and epidemiology of IFD in patients with hemato-oncology diseases and undergoing stem cell transplantation are shown in this review. The common risk factor of IFD are: neutropenia, therapy with steroids, graft versus host disease, central venous catheter, bacterial infections, use of antibiotics, inadequate prophylaxis, CMV infection, mucosal colonisation, or construction works. Recent data indicate that incidence of IFD among adults patients after hematopoietic stem cell transplantation is 22-28%, including 60% of aspergillosis. The most frequent etiologic factors are *Aspergillus fumigatus* and *Candida glabrata*, however significant increase in mucormycoses incidence is being

Adres/address:

*Jan Styczyński

Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera UMK
ul. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
tel. +48 (52) 585-48-60
fax +48 (52) 585-48-67
jstyczynski@cm.umk.pl

observed. IFD is very important cause of mortality in patients with hematological malignancy: aspergillosis (in 19% of cases), candidiasis (9%), mucormycosis and fusariosis (5%). Current principles of diagnostics of the most frequent etiological factors in IFD are also shown in this review, based on: microbiological and serological (including antigen and antibodies testing for mannan and antymannan (*Candida*), galactomannan (*Aspergillus*), 1,3-beta-D-glucan (*Candida/Aspergillus*), enolase (differentiating colonization from invasion)) diagnostics, testing of presence of metabolites, imaging, histopathology examination, molecular assays, and mass spectrography. Recommendations for diagnostic process in the most frequent microbiological types of IFD including candidiasis, aspergillosis and mucormycosis are presented.

ETIOLOGIA INWAZYJNEJ CHOROBY GRZYBICZEJ

Inwazyjna choroba grzybicza (ang. *invasive fungal disease* – IFD) jest zakażeniem narządowym o etiologii grzybiczej rozwijającym się u pacjentów z zaburzeniami odporności. Aktualnie, w oparciu o etiologię, wyodrębnia się siedem typów inwazyjnych zakażeń grzybiczych:

- kandydozy/kandydemie, powodowane przez: *Candida* sp. i inne gatunki drożdżaków,
- aspergilozy o etiologii *Aspergillus* sp., najczęściej jednak *A. fumigatus*,
- kryptokokozę: *Cryptococcus neoformans*,
- mukormykozy (zygomycyzy): *Rhizopus* sp., *Absidia* sp., *Mucor* sp.,
- inne hialohyfomycyzy: *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp.,
- inne zakażenia drożdżakowe: *Malassezia* sp., *Trichosporon* sp.,
- zakażenia grzybami ciemnostrzępkowymi: *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Cladophiala* sp., *Wangiella* sp., *Dactylaria* sp.

Do najczęstszych zakażeń grzybiczych obserwowanych u pacjentów z chorobami onkologicznymi i hematologicznymi należą kandydoza/kandydemia oraz aspergiloza. Znacznie rzadziej występują mukormykozy i hialohyfomycyzy (fusariozy i scedosporiozy), natomiast kryptokokoza najrzadziej.

Grzyby drożdżopodobne są jednokomórkowcami, zaś pleśniowe z rodzaju *Aspergillus* czy też *Mucormycetes* drobnoustrojami wielokomórkowymi. Drożdżaki rozmnażają się przez pączkowanie, zaś grzyby pleśniowe przez kiełkowanie zarodników w strzępkę, niektóre też dodatkowo drogą płciową (*sporangium*).

MECHANIZM ROZWOJU I CZYNNIKI RYZYKA IFD

Drożdżaki i grzyby pleśniowe różnią się mechanizmami inwazji tkankowej. W przypadku drożdżaków są to zazwyczaj zakażenia endogenne, rzadziej egzogenne, najczęściej szpitalne, przeniesione przez ręce personelu. W tym ostatnim przypadku są to zazwyczaj zakażenia wywoływane przez *Candida parapsilosis* oraz *Candida albicans*. Zakażenie endogenne rozwija się w wyniku inwazji drożdżaków tworzących mikrobiom śluzówek przewodu pokarmowego lub skóry pacjenta. Zarodniki grzybów pleśniowych są natomiast obecne w środowisku zewnętrznym człowieka, ich stężenie zależy między innymi od pory roku i wilgotności, a do zaka-

żenia dochodzi przez inhalację, rzadziej przez zanieczyszczenie rany czy też uszkodzenie śluzówek. Podobnie jak w przypadku grzybów pleśniowych do zakażenia drożdżakami z rodzaju *Cryptococcus* sp. dochodzi przez inhalację unoszących się w powietrzu wysuszonych wydzielin ptaków (gołębie). W tabeli 1 przedstawiono główne czynniki ryzyka zakażenia grzybami drożdżopodobnymi oraz pleśniowymi, zwłaszcza z rodzaju *Aspergillus*.

Tabela 1. Czynniki ryzyka zakażeń grzybiczych u pacjentów onkohematologicznych.

Czynniki ryzyka	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>
Neutropenia	+	+
Steroidy	+	+
GVHD	+	++
Centralna linia naczyniowa (tunelowa)	++	-
Zakażenia bakteryjne	+	+
Antybiotyki przeciwbakteryjne	++	-
Zła profilaktyka	+	+
Zakażenie CMV	-	++
Kolonizacja śluzówkowa	+	+
Prace remontowe	-	++

GVHD – choroba przeszczep-przeciwno-gospodarzowi; CMV – cytomegalowirus

Najważniejszymi objawami klinicznymi sugerującymi inwazyjną chorobę grzybiczą u pacjentów onkohematologicznych, które powinny być punktem wyjściowym do poszerzonej diagnostyki, są przede wszystkim: epizody nawrotowej gorączki podczas długotrwałej neutropenii; nowe objawy ze strony dolnych dróg oddechowych: ból opłucnowy, wysięk w opłucnej; postępujące objawy zakażenia górnych dróg oddechowych; obrzęk okołoczolowy; obrzęk okolicy zatok; martwicze zmiany na podniebieniu (mukormykoza); ogniskowe zmiany oponowe z gorączką; niewytłumaczalne zmiany zachowania z gorączką (infekcja ośrodkowego układu nerwowego, OUN); grudkowo-pęcherzykowe zmiany na skórze, a także objawy wewnątrzgałkowe, w tym zaburzenie ostrości wzroku.

POZIOMY ROZPOZNANIE INWAZYJNEJ CHOROBY GRZYBICZEJ

Definicje IFD według EORTC/MSG obejmują trzy poziomy rozpoznania: pewne (potwierdzone), prawdopodobne i możliwe (1). Pewne lub potwierdzone (*proven*) zakażenie opiera się na dodatnim wyniku hodowli

z miejsc fizjologicznie jałowych i precyzyjnej identyfikacji patogenu, potwierdzone badaniem histopatologicznym. Prawdopodobne (*probable*) zakażenie ma miejsce wówczas, gdy obok czynników ryzyka i objawów klinicznych stwierdza się charakterystyczne odchylenia w badaniach obrazowych i obecność biomarkerów grzybiczych. Możliwe (*possible*) zakażenie rozpoznawane jest w przypadku obecności czynników ryzyka oraz objawów klinicznych (obrazowych).

KANDYDOZA

W ostatnich latach obserwuje się zmianę trendu w etiologii zakażeń drożdżakowych z przesunięciem częstości zakażeń o etiologii *C. albicans* na tzw. gatunki *non-albicans* oraz pojawienie się rzadszych drożdżaków, takich jak: *Saccharomyces* sp., *Geotrichum* sp., *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp., *Pichia* sp., *Hansenula anomala* oraz *Blastoschizomyces* sp. Zakażenie *Cryptococcus* sp. rzadko rozwija się u pacjentów onkohematologicznych, jednak powoduje wyższą śmiertelność niż kandydoza. Niektóre drożdżaki wytwarzają pseudostrzępki (*Rhodotorula* sp.) lub strzępki (*Geotrichum*, *Trichosporon*), czyli blastokonidia i arthrokonidia. *Trichosporon* sp. jest wrażliwy na azole (worykonazol), natomiast oporny na amfoterycynę B i echinokandyny. Pozostałe wymienione drożdżaki są wrażliwe na amfoterycynę B.

Drogami inwazji drożdżaków są przewód pokarmowy oraz skóra, stąd też najczęstsze obserwowane kliniczne postacie inwazyjnej kandydozy to: izolowana kandydemia (u pacjentów z cewnikiem naczyniowym lub bez niego), kandydoza przełyku, ostra rozsiana kandydoza z fungemią lub bez niej, z zajęciem narządów z objawami sepsy, zaburzeniami hemodynamicznymi i zmianami na skórze, inwazyjna kandydoza ograniczona do określonego narządu (*endocarditis*, *meningoencephalitis*, *peritonitis*, *endophthalmitis*), przewlekła kandydemia oraz przewlekła kandydoza wątrobowo-śledzionowa. W izolowanej kandydemii śmiertelność sięga 25-38%, a w ostrej rozsianej kandydozie 40-75%.

INWAZYJNA ASPERGILOZA

Najczęstszym miejscem inwazji pleśni z rodzaju *Aspergillus* są płuca. Charakterystyczną cechą zakażenia jest inwazja naczyniowa z pojawieniem się zakrzepów, zawałem i martwicą otaczających tkanek. W postaci płucnej, w zależności od wielkości dawki zakażającej w okresie neutropenii, może wystąpić mały naciek otoczony dużymi zmianami martwiczymi, natomiast podczas współistniejącej GVHD zazwyczaj obserwowany jest duży naciek zapalny z mniejszą martwicą. Częstym powikłaniem jest zajęcie OUN w formie zmian ogniskowych. Innymi postaciami klinicznymi zakażenia aspergilozy są: aspergiloza zatok, gałki ocznej, kości i szpiku, a także wsierdzia, nerek oraz skóry. Najczęstszymi gatunkami odpowiedzialnymi za zakażenia są: *A. fumigatus* (ok. 90%), *A. flavus*, *A. lentulus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*. Narastającym problemem staje się oporność nabyta szczepów *Aspergillus* na antymikotyki, tj. opor-

ność *A. fumigatus* na azole (zwłaszcza w sekcji *fumigati*) oraz oporność *A. nidulans*, czy też naturalna *A. terreus* na amfoterycynę B.

INNE ZAKAŻENIA GRZYBAMI PLEŚNIOWYMI (NAMF)

Do grupy zakażeń NAMF (*non-Aspergillus mycelial fungi*) zalicza się: mukormykozy, fusariozę, scedosporiozę (*S. apiospermum*, *S. prolificans*), inne hialohyfomikozy (pecilomykoza, scopulariopsoza, acromonioza), rzadziej zakażenia grzybami ciemnostrzępkowymi (*Alternaria*, *Glaucosporium*). NAMF stanowią około 27% wszystkich zakażeń grzybami pleśniowymi, a w obrazie klinicznym często naśladują aspergilozę.

MUKORMYKOZY (ZYGOMYKOZY)

Grzyby należące do *Mucormycetes* są wszechobecne. Ich zarodniki występują w ziemi, psującej się materii organicznej, tkankach martwiczych, a także w środowisku szpitalnym. Charakterystyczną cechą morfologiczną grzybów pleśniowych *Mucormycetes* jest gruba strzępka pozbawiona przegród, rozgałęziająca się pod kątem prostym. Do zakażenia najczęściej dochodzi drogą inhalacyjną lub poprzez bezpośrednią inokulację skóry. Mukormykozy są poważnym zagrożeniem życia u pacjentów po HSCT, zwłaszcza w okresie neutropenii po kondycjonowaniu, a także podczas GVHD i głębokiej immunosupresji. Grzyby należące do *Mucormycetes* są odporne na azole (z wyjątkiem pozakonazolu) i echinokandyny.

Za zakażenia najczęściej odpowiedzialne są grzyby z rodzaju *Rhizopus* sp. (73%), *Mucor* sp. (13%), *Cunninghamella bertholletiae* (6%), *Absidia* (4%), *Rhizomucor* (3%) i *Apophysomyces elegans* (1%) (2). Najwyższą śmiertelność notuje się u osób zakażonych *Cunninghamella bertholletiae*.

Podobnie jak w aspergiliozie, zakażenia grzybami *Mucormycetes* charakteryzują się inwazją naczyniową, gwałtowną progresją choroby i wysoką śmiertelnością. U pacjentów hematologicznych, bardzo ważnym czynnikiem ryzyka jest przedłużająca się neutropenia, która przyczynia się do wysokiej śmiertelności, przekraczającej 60%. Najczęściej klinicznie mukormykoza przebiega jako postać nosowo-mózgowa, płucna, skórna, jelitowa (rzadko diagnozowana przyżyciowo) oraz zakażenie rozsiane, z możliwym zajęciem każdego narządu. Ze względu na podobieństwo w obrazie KT, często błędnie jest diagnozowana jako aspergiloza, co wpływa niekorzystnie na strategię terapii.

FUSARIOZA

Fusarium solani, *Fusarium oxysporium* i inne gatunki są saprofitami oraz patogenami roślin, stale obecnymi w ziemi. Powodują zakażenia powierzchowne miejscowo inwazyjne lub rozsiane, z możliwym zajęciem praktycznie każdego narządu, zwłaszcza u pacjentów w neutropenii. Najczęstszą drogą inwazji grzybiczej jest inhalacja po skażeniu systemu wentylacji w szpitalu. Inhalacja drobnoustroju doprowadza do zajęcia zatok przynosowych i płuc. Zajęcie skóry w wyniku bezpo-

średniej inwazji *Fusarium* prowadzi do rozwoju zmian o charakterze grudkowo-pęcherzykowym z charakterystyczną nekrozą centralną. Zmiany skórne mogą być również manifestacją zakażenia uogólnionego.

Fusarioza charakteryzuje się trójmodalną dystrybucją zakażenia, zwłaszcza u pacjentów po przeszczepie szpiku: pierwszy szczyt zachorowań przypada na okres neutropenii, drugi szczyt po 2 miesiącach od zabiegu przeszczepienia szpiku, trzeci po roku.

Diagnostyka fusariozy polega przede wszystkim na badaniach mikrobiologicznych, tj. posiewie krwi, który w postaci rozsiaanej jest dodatni w 70%, a także hodowli innych materiałów biologicznych oraz wykrywania w moczu beta-D-glukanu (wynik nieswoisty) oraz KT (obraz podobny do aspergilozy). Fusarioza jest najczęstszą inwazyjną grzybicą u pacjentów onkohematologicznych w Brazylii, o śmiertelności sięgającej nawet 50-70%.

SCEDOSPORIOZA

Scedosporium sp. jest grzybem saprofitycznym, strzępkowym, szeroko rozpowszechnionym w świecie; występuje w ziemi, a także wodzie zanieczyszczonej ściekami. Częstość zakażeń wśród grzybów pleśniowych wynosi zaledwie 1-2%, a wśród nich dominują takie gatunki jak: *Scedosporium prolificans* (53,3%), *Scedosporium apiospermum*/*Pseudallescheria boydii* (46,8%), *Scedosporium aurantiacum* (15,8%). Zakażenia są stosunkowo częste w USA: 25-29% zakażeń grzybami pleśniowymi *non-Aspergillus* (3). Czynnikiem ryzyka rozwoju zakażenia jest ostra białaczka. Scedosporioza często występuje u pacjentów po przeszczepieniu płuc. Klinicznie zakażenie może przebiegać w postaci skórnej, charakteryzującej się zmianami ogniskowymi – krostami bez tendencji do tworzenia ropni, rozsiaanej (najczęstsza, występuje w 31% przypadków, w tym w 75% z zajęciem płuc), zatokowej lub ocznej (zaburzenia widzenia), fungemii (40%) oraz ośrodkowej z zajęciem OUN.

Wszystkie gatunki *Scedosporium* sp. wykazują znaczną oporność na amfoterycynę B i echinokandyny oraz różnicowaną wrażliwość na azole. Badania wrażliwości *Scedosporium* sp. na leki przeciwgrzybicze w grupie 84 pacjentów (3) wykazały dobrą aktywność worykonazolu i słabszą pozakonazolu wobec *Scedosporium apiospermum* i *Scedosporium aurantiacum*, natomiast gatunek *Scedosporium prolificans* okazał się odporny na prawie wszystkie leki przeciwgrzybicze (najmniej na terbinafinę z wartością MIC₅₀ = 2 µg/ml).

Analiza 52 przypadków scedosporiozy w latach 1977-2006 u pacjentów z ostrą białaczką wykazała większą częstość występowania *S. prolificans* (71%), w tym większość w Hiszpanii, oraz *S. apiospermum* (29%). Izolacja patogenu z krwi była możliwa w 56% przypadkach. U 11 chorych rozpoznano postać *post mortem*. Choroba występowała w postaci rozsiaanej (77%), płucnej (27%), skórnej (23%), ośrodkowej (13%), ocznej (8%). Śmiertelność wyniosła 77%, w tym 5 pacjentów przed rozpoczęciem terapii (4).

EPIDEMIOLOGIA IFD U PACJENTÓW ONKOHEMATOLOGICZNYCH I BIORCÓW KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH

Badania nad epidemiologią i udziałem poszczególnych gatunków grzybów w zakażeniach inwazyjnych u pacjentów onkohematologicznych są fragmentarycznie publikowane w postaci doniesień z poszczególnych ośrodków, brak jest natomiast opracowań globalnych. Niewiele informacji na ten temat znaleźć można w piśmiennictwie polskim. Istniejącą lukę wypełnią zapewne dane z badań wieloośrodkowych z jednostek onkohematologicznych w Polsce przeprowadzone w ośrodkach pediatrycznych przez Polskie Towarzystwo Onkologii i Hematologii Dziecięcej.

Z danych prezentowanych przez Uniwersytet Medyczny w Teksasie w roku 2013 na podstawie badań wieloośrodkowych wynika, że u pacjentów onkohematologicznych fungemię o etiologii *Candida* stwierdzono w 8-24%, zaś dominującym gatunkiem była ciągle *C. albicans*, a w dalszej kolejności: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. parapsilosis*. W badaniach wieloośrodkowych przeprowadzonych w Grecji potwierdzono zapadalność na kandydozę w 1,4/1000 przyjęć do oddziałów hematologicznych. Wśród drożdżaków wiodącą pozycję w kolejności częstości izolacji zajmowały: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. candida* oraz *C. glabrata* i *C. guilliermondii* (5).

Badania wieloośrodkowe przeprowadzone w południowych Włoszech (Aurora Project) w grupie 475 pacjentów onkohematologicznych wykazały kandydozę w 2,7% wszystkich przypadków, zaś zakażenia grzybami pleśniowymi u 2,3% chorych (6). Odsetki te były nieco wyższe u pacjentów po przeszczepieniu szpiku allogenicznego. Także i w tych przypadkach dominowały zakażenia *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* oraz *C. glabrata*, zaś wśród grzybów pleśniowych zakażenia *Aspergillus* sp. Aspergilozę w większości przypadków rozpoznano na podstawie dodatnich wyników testów galaktomannan (GM) oraz 1,3-β-D-glukan (BDG). Ta niska częstość zakażeń grzybiczych zdaniem autorów jest efektem szeroko stosowanej terapii empirycznej, bo aż u 68% wszystkich pacjentów hospitalizowanych.

W badaniach zaprezentowanych przez Gedika i wsp. (7) przeprowadzonych w grupie 126 chorych z ostrą białaczką mieloblastyczną, fungemię o etiologii *Candida* sp. stwierdzono w 8%, zaś głównymi czynnikami ryzyka zakażenia były neutropenia i obecność naczyniowych cewników centralnych. W tych badaniach także najczęściej izolowano *C. parapsilosis* i *C. albicans*. Należy jednak zwrócić uwagę na pojedyncze przypadki fungemii o rzadszej etiologii, tj. *Geotrichum capitatum* i *Trichosporon asahii* (3). Warto jeszcze raz podkreślić, że wszystkie szczepy *Trichosporon* sp. były odporne na amfoterycynę, a leczenie tym antybiotykiem zakończyło się niepowodzeniem.

W badaniach autopsyjnych przeprowadzonych u 1017 pacjentów onkohematologicznych w latach 1989-2003 IFD występowała z częstością 31% (tab. 2) (8).

Tabela 2. IFD w badaniach autopsyjnych u pacjentów onkologicznych (8).

Czynnik etiologiczny	1989-1993	1994-1998	1999-2003
Kandydoza	13%	10%	9%
Inwazyjne zakażenia grzybami pleśniowymi	19%	24%	25%
Aspergiloza	16%	19%	19%
<i>Non-fumigatus Aspergillus</i>	3%	3%	5%
Inne grzyby strzępkowe	2%	5%	5%
<i>Hyalohyphomycetes</i> (hodowla(-))	13%	14%	12%

Rozpoznanie przyżyciowe postawiono tylko w 30% zakażeń rozpoznanych w badaniach autopsyjnych. Wykazano zmienne trendy w profilu inwazyjnych zakażeń grzybiczych: zwiększanie się odsetka zakażeń grzybami pleśniowymi, zwłaszcza *A. non-fumigatus* i *Mucormyces*, oraz wzrost odsetka zakażeń *Candida non-albicans* w porównaniu do *C. albicans*. W latach 90. ubiegłego wieku stwierdzano spadek odsetka kandydoz i wzrost występowania aspergiloz. Na początku XXI wieku zanotowano wzrost liczby przypadków mukormykozy, fusariozy, scedosporiozy, drożdżaków z rodzaju *Trichosporon* sp., opornych na amfoterycynę B i echinokandyny, a także wzrost zakażeń *Aspergillus* sp. o zmniejszonej wrażliwości na azole oraz *Candida* sp. opornych na azole.

W badaniu prospektywnym PATH (Prospective Antifungal Therapy) dotyczącym częstości występowania inwazyjnych grzybic u pacjentów po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych w latach 2004-2007 przeprowadzonym w 23 ośrodkach w USA, stwierdzono, że częstość zakażeń *Candida* wahała się w granicach od 22 do 28% w zależności od rodzaju przeszczepu, zaś gatunkiem najczęściej odpowiedzialnym za zakażenia była *Candida glabrata* (9). Częstość zakażeń grzybami pleśniowymi z rodzaju *Aspergillus* sp. była wysoka (50-60%) niezależnie od rodzaju przeszczepu, zaś dominującym zidentyfikowanym gatunkiem był *A. fumigatus*. Warto jednak podkreślić, że w bardzo wysokim odsetku nie rozpoznano gatunku grzyba z rodzaju *Aspergillus* sp. (42-67%), a rozpoznanie oparte było tylko na dodatnich wynikach testu na galaktomannan. Mukormykozy rozpoznano w 18 przypadkach na 250 pacjentów po przeszczepieniu szpiku. Śmiertelność w tej grupie była bardzo wysoka, zawarta w przedziale 64-80%.

Badania autopsyjne przeprowadzone w latach 1989-2008 zaprezentowane przez Lewisa i wsp. (10) wykazały, że częstość zakażeń grzybami pleśniowymi z rodzaju *Aspergillus* sp. obniżyła się dwukrotnie w ciągu 15 lat, przy jednoczesnym ponad trzykrotnym wzroście zakażeń *Mucorales*. Po roku 2003 odnotowano częściej lokalizację narządową grzybów pleśniowych w takich narządach jak: śledziona, nerki, serce i przewód pokarmowy. Częstość inwazyjnych kandydoz wykazywała tendencję spadkową do roku 2004, po czym zaobserwowano wzrost zakażeń w stosunku do wcześniejszego okresu (10).

Należy jednak podkreślić, że profil drobnoustrojów odpowiedzialnych za zakażenia grzybicze jest charak-

teryistyczny, zwłaszcza w przypadku grzybów pleśniowych, dla określonego regionu klimatycznego, skażenia środowiska, a także ma związek ze stosowaną strategią zarówno profilaktyki, jak i leczenia przeciwgrzybiczego.

DIAGNOSTYKA INWAZYJNEJ CHOROBY GRZYBICZEJ

Rozpoznanie IFD jest trudne ze względu na brak charakterystycznych objawów zakażenia. Diagnostyka IFD rozpoczyna się od oceny stanu klinicznego pacjenta, przede wszystkim próby wyjaśnienia gorączki u pacjentów z neutropenią, starannej inspekcji skóry i błon śluzowych, kontroli cewników naczyniowych, badania okulistycznego dna oka i diagnostyki obrazowej (KT, MRI, USG).

Diagnostyka zakażeń grzybiczych obejmuje następujące rodzaje analiz:

- mikrobiologiczna: hodowla, bakterioskopia bezpośrednia,
- serologiczna: wykrywanie antygenów i przeciwciał mannan/antymannan (*Candida*), galaktomannan (*Aspergillus*), glukan (*Candida/Aspergillus*), enolazy (różnicujących kolonizację od inwazji),
- obecność metabolitów: D-arabinitol (*Candida*), D-mannitol (*Aspergillus*),
- obrazowa,
- histopatologiczna,
- molekularna: wykrywanie DNA i RNA metodą PCR/RT-PCR, hybrydyzacja z użyciem sond molekularnych,
- spektrografia masowa – MALDI-TOF.

W diagnostyce zawsze należy rozważyć wykonanie posiewów materiałów klinicznych takich jak: krew, płwocina, BAL, materiał szczoteczkowy, mocz (3 kolejne próbki, także przy podejrzeniu zakażenia układu moczowego), płyny ustrojowe takie jak płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z opłucnej i inne. Najważniejsze jest jednak badanie preparatu bezpośredniego materiału klinicznego z bioptatów tkankowych („tissue is the issue”) oraz wymazów i zeszkrobów z błon śluzowych, materiału ze zmian na skórze i tkance podskórnej.

DIAGNOSTYKA KANDYDOZY

Rekomendacje diagnostyki kandydozy w zależności od postaci klinicznej wg ESCMID (11) przedstawiono w tabeli 3. W diagnostyce serologicznej zakażeń *Candida* wykorzystuje się oznaczanie antygenu mannan i przeciwciał antymannan testem ELISA. Test ten wykazuje czułość 73%, swoistość 80%, PPV 36% i NPV 95%. Pierwszy pozytywny wynik testu na obecność mannanu uzyskuje się na 2-23 dni przed rozpoznaniem inwazyjnej kandydozy, co wykazano zarówno u chorych ze schorzeniami hematologicznymi, jak i leczonych na oddziałach intensywnej terapii (12). Przydatność diagnostyki opartej o oznaczenie antygenu mannan i przeciwciał antymannan wydaje się szczególnie wysoka w przypadku kandydozy wątrobowo-śledzionowej. Innym antygenem przydatnym w diagnostyce kandydozy jest 1,3-β-D-glukan (BDG). Warto

jednak podkreślić, że ten element strukturalny ściany komórkowej obecny jest także w grzybach pleśniowych jak *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, z wyjątkiem *Mucor* sp. Test może dawać wyniki fałszywie dodatnie w zakażeniach bakteriami Gram-dodatnimi, w przypadku obecności biofilmu w cewnikach naczyniowych, u pacjentów hemodializowanych oraz otrzymujących IVIG. Podwyższone stężenie BDG w surowicy wyprzedza o około 7 dni wykrycie *Candida* we krwi.

Tabela 3. Rekomendacje diagnostyki kandydozy w zależności od postaci klinicznej.

Postać kliniczna	Rodzaj materiału	Testy	Uwagi
Kandydemia	krew	hodowla	badanie podstawowe
		mannan/antymannan	rekomendowany
	surowica	D-glukan	rekomendowany
		PCR	nierekomendowany
Kandydoza	krew	hodowla	badanie podstawowe
		mannan/antymannan	rekomendowany
	surowica	D-glukan	rekomendowany
		PCR	nierekomendowany
	tkanki/płyny jałowe	bezpośrednia mikroskopia, badanie histopatologiczne	badanie podstawowe
		hodowla	badanie podstawowe
		PCR	nierekomendowane
Przewlekła rozsiana kandydoza	krew	hodowla	badanie podstawowe
		mannan/antymannan	rekomendowany
	surowica	D-glukan	rekomendowany
		PCR	nierekomendowany
	tkanki/płyny tkankowe	mikroskopia bezpośrednia	badanie podstawowe
		hodowla	badanie podstawowe
		PCR	nierekomendowany
Kandydoza jamy ustnej i przełyku	wymaz	hodowla	badanie podstawowe
	biopsja	mikroskopia/histopatologia	badanie podstawowe
		hodowla	badanie podstawowe

DIAGNOSTYKA INWAZYJNYCH ZAKAŻEŃ GRZYBAMI PLEŚNIOWYMI

Diagnostyka inwazyjnych zakażeń grzybami pleśniowymi (ang. *invasive mould disease* – IMD) u pacjentów z niedoborami odporności obejmuje klasyczne metody mikrobiologiczne, tj. hodowlę i mikroskopię, serologiczne, molekularne i spektrografię masową, badanie histopatologiczne z biopsji tkankowej oraz badania obrazowe. Wadą metod hodowlanych jest niska czułość. Posiewy krwi są ujemne w ponad 90% przypadków aspergilozy, natomiast dodatnie w 60-70% zakażeń *Fusarium* i *Scedosporium*. W przypadku późnego rozpoznania zakażenia grzybiczego, zazwyczaj odpowiedź na leczenie jest niekorzystna. Metody sero-

logiczne w diagnostyce IFD polegają na wykrywaniu obecności GM i BDG. W tabeli 4 przedstawiono przydatność testów wykrywających antygen w zależności od rodzaju zakażenia. Aktualnie nie ma jeszcze badań klinicznych nad przydatnością β -D-glukanu w diagnostyce IFD u dzieci.

Tabela 4. Rola biomarkerów w diagnostyce IFD.

IFD	β -D-glukan	Galaktomannan
Aspergiloza	+	+
Fusarioza	+	-
Mukormykoza	-	-
Kandydoza	+	-

DIAGNOSTYKA ASPERGILOZY

Mikrobiologiczna diagnostyka aspergilozy obejmuje: hodowlę aspiratu lub materiału biopsyjnego z miejsca pierwotnie jałowego, wykrywanie obecności typowej strzępki w preparacie histopatologicznym, dodatnią hodowlę z BAL, hodowlę lub dodatni wynik bezpośredniej mikroskopii preparatu z płwociny, oznaczenie ilościowe galaktomannanu w surowicy, oznaczanie poziomu β -D-glukanu (nie występuje w ścianie komórkowej *Mucorales*, *Cryptococcus*), PCR/RT-PCR.

Galaktomannan jest składnikiem ściany komórkowej grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp. Podstawą oznaczania GM jest ocena antygenu w płynach ustrojowych w badaniu ilościowym. Test jest dostępny handlowo – ELISA-PlateLIA Aspergillus. Dodatni wynik testu GM to mykologiczne kryterium prawdopodobnej inwazyjnej aspergilozy. Seryjne badanie GM w połączeniu z HRCT umożliwia wczesną diagnozę IA u pacjentów z neutropenią po chemioterapii z powodu ostrych białaczek lub po przeszczepieniu allogenicznym komórek krwiotwórczych. Dużą wartość diagnostyczną ma oznaczanie GM w BAL (13). Rekomenduje się oznaczanie GM w surowicy co 3-4 dni. Za diagnostyczny przyjmuje się pojedynczy wynik $> 0,7$ lub $> 0,5$ w dwóch kolejnych badaniach; w BAL $> 1,0$, w CSF $> 0,5$. Poziom GM w surowicy $> 1,0$ u pacjenta leczonego wskazuje na niepowodzenie terapeutyczne i wymaga weryfikacji leczenia (14).

Porównanie przydatności testów BDG i GM w diagnostyce aspergilozy u pacjentów onkohematologicznych pokazuje, że test BDG charakteryzuje się czułością 81% i swoistością 82%, natomiast test GM czułością 49% i swoistością 97% (15). Test BDG może więc mieć szerokie zastosowanie w diagnostyce inwazyjnej aspergilozy ze względu na wyższą czułość niż GM. Ograniczenia testu BDG to niewystarczająca swoistość oraz cena badania.

Molekularna (PCR) diagnostyka IA ma coraz większe znaczenie, jednak nadal nie jest uznawana za metodę wystandaryzowaną.

W badaniach wieloośrodkowych wykazano, że przeżycie chorych na ostre białaczki w okresie terapii

indukcyjnej było większe, gdy w diagnostyce inwazyjnej grzybicy zastosowano algorytm polegający na równoczesnym monitorowaniu DNA-emii i oznaczeniu poziomu galaktomannanu w surowicy. DNA-emia wyprzedzała obecność galaktomannanu w surowicy (tab. 5) (16).

Tabela 5. Strategia postępowania w inwazyjnej aspergilozie u pacjentów onkohematologicznych.

Strategia terapeutyczna	Kryteria diagnostyczne
Terapia empiryczna	Gorączka neutropeniczna nieodpowiadająca na leczenie przeciwbakteryjne, bez dowodów mykologicznych, histopatologicznych i objawów klinicznych IA
Wyprzedzająca (oparta na diagnostyce)	GM dodatni: GM(+), ujemne HRCT, bez nowych nacieków (nie spełnia kryteriów EORTC/MSG) GM ujemny: RT-PCR(+), z równoległe ujemnymi wynikami GM, niezależnie od wyniku HRCT
Terapia celowana	Udowodniona aspergiloza: pozytywna hodowla tkankowa lub płynów ustrojowych jałowych z kryteriami radiologicznymi lub bez nich. Rozpoznanie prawdopodobnej i możliwej IA (obraz radiologiczny spełniający kryteria EORTC/MSG z dowodami mykologicznymi lub bez nich)

DIAGNOSTYKA MUKORMYKOZY

Diagnostyka mukormykozy jest bardzo trudna z uwagi na kliniczne i obrazowe podobieństwo do aspergilozy i brak typowych biomarkerów dla tego zakażenia. Pośrednią informację dają ujemne wyniki badania na obecność galaktomannanu i β -D-glukanu, które wykluczają aspergilozę. W obrazie klinicznym stwierdza się występowanie zmian nieswoistych, czasami podobnych do występujących w aspergilozie. W diagnostyce radiologicznej

obraz jest mało charakterystyczny (guzki, obraz odwróconego „halo”, wysięk w opłucnej). Rozpoznanie może być postawione wyłącznie w badaniu histopatologicznym biopsji zajętej tkanki, po wybarwieniu metodą Gomori-Crocot i PAS. Dowodem zakażenia jest obecność grubej strzępki hialinowej, bez przegród z odgałęzieniem pod kątem prostym. Inne wykonywane badania to hodowla i ocena preparatu bezpośredniego z pobranego materiału, np. płwocina, wydzielina z nosa, BAL. Hodowla materiału z biopsji jest trudna i często daje wynik ujemny ze względu na uszkodzenie strzępki podczas pobierania materiału. Nowe możliwości diagnostyczne stwarza badanie limfocytów T, swoistych dla *Mucorales*, oraz identyfikacja gatunku metodą spektrofotografii masowej MALDI-TOF. Opracowanie technik molekularnych wykrywających fragmenty genów (18SrRNA, ITS1, gen b cytochromu) są pewną przyszłością w szybkiej diagnostyce mukormykozy.

Metody molekularne mogą mieć szczególne zastosowanie w diagnostyce zakażeń z przełamania podczas terapii przeciwgrzybiczej u pacjentów z grup ryzyka z chorobami hematologicznymi, np. w postaci płucnej nieodpowiadającej na leczenie worykonazolem, spowodowanego rzadkim patogenem, lub zakażenia szczepem opornym. Inwazyjne zakażenia grzybicze często wiążą się z istotnymi trudnościami diagnostycznymi, co wynika ze wzrastającej liczby nowych patogenów, wzrastającej liczby szczepów opornych na azole i rzadziej echinokandyny, co może wynikać z konieczności oznaczania wrażliwości bez identyfikacji gatunku, a jednocześnie trzeba pamiętać, że identyfikacja patogenu ma także wartość prognostyczną.

PIŚMIENNICTWO

- 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.
- Almyroudis NG, Sutton DA, Linden P et al.: Zygomycosis in solid organ transplant recipients in a tertiary transplant center and review of the literature. *Am J Transplant* 2006; 6: 2365-2374.
- Heath CH, Slavin MA, Sorrell TC et al.: Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 689-693.
- Caira M, Girmenia C, Valentini CG et al.: Scedosporiosis in patients with acute leukemia: a retrospective multicenter report. *Haematologica* 2008; 93: 104-110.
- Gamaletsou MN, Walsh TJ, Zaoutis T et al.: A prospective, cohort, multicenter study of candidemia in hospitalized adult patients with hematological malignancies. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: O50-O57.
- Montagna MT, De Giglio O, Napoli C et al.: Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies (Aurora project): lights and shadows during 18-months surveillance. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 774-787.
- Gedik H, Simsek F, Kanturk A et al.: Bloodstream infections in patients with hematological malignancies: which is more fatal – cancer or resistant pathogens? *Ther Clin Risk Manag* 2014; 10: 743-752.
- Chamilos G, Luna M, Lewis RE et al.: Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica* 2006; 91: 986-989.
- Neofytos D, Horn D, Anaissie E et al.: Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 265-273.
- Lewis RE, Cahyane-Zuniga L, Leventakos K et al.: Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a 20-year autopsy study. *Mycoses* 2013; 56: 638-645.
- 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.
- Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R et al.: Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. *J Med Microbiol* 2009; 58: 606-615.
- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J et al.: 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.
- Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C et al.: Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 (suppl. 1): i15-24.
- Sulhian A, Porcher R, Bergeron A et al.: Use and limits of (1-3)-beta-d-glucan assay (*Fungitell*), compared to galactomannan determination (*Platelia Aspergillus*), for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 2328-2333.
- Aguado JM, Vazquez L, Fernandez-Ruiz M et al.: Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 405-414.