

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Laura KRESE

**VREDNOTENJE MIKROSKOPSKIH PREPARATOV
IN OSAMITEV PLESNI IZ KUŽNIN SPODNJIH DIHAL
PRI BOLNIKI S KRONIČNIMI BOLEZNIMI PLJUČ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Laura KRESE

**VREDNOTENJE MIKROSKOPSKIH PREPARATOV IN OSAMITEV
PLESNI IZ KUŽNIN SPODNJIH DIHAL PRI BOLNIKI S
KRONIČNIMI BOLEZNIMI PLJUČ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EVALUATION OF MICROSCOPIC PREPARATIONS AND
ISOLATION OF MOLDS FROM LOWER RESPIRATORY SPECIMENS
FROM PATIENTS WITH CHRONIC PULMONARY DISEASES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, in sicer v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji, dne 6. septembra 2010, odobrila temo diplomske naloge in za mentorja imenovala doc. dr. Miroslava Petrovca, dr. med., za somentorico asist. dr. Tadejo Matos in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Somentorica: asist. dr. Tadeja Matos, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: asist. dr. Tadeja MATOS, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Laura Krese

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
 DK UDK 579.61:582.28:616.2-078(043)=163.6
 KG medicinska mikrobiologija/kužnine dihal/plesni/*Aspergillus* spp./*Scedosporium* spp./diagnostične metode/homogenizacija kužnin/ditiotreitol/mikroskopiranje/mikroskopski preparati/kalkofluor belo/selektivna gojišča/ScSel+/cistična fibroza
 AV KRESE, Laura
 SA PETROVEC, Miroslav (mentor)/MATOS, Tadeja (somentorica)/SEME, Katja (recenzentka)
 KZ SI - 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
 LI 2011
 IN VREDNOTENJE MIKROSKOPSKIH PREPARATOV IN OSAMITEV PLESNI IZ KUŽNIN SPODNJIH DIHAL PRI BOLNIKI S KRONIČNIMI BOLEZNIMI PLJUČ
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XI, 56 str., 11 pregl., 11 sl., 41 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Plesni so ubikvitarni mikroorganizmi, ki jih najpogosteje najdemo v zemlji in ob inhalaciji konidijev vstopijo v dihalne poti, kjer povzročijo življenje ogrožajoče okužbe. *Aspergillus fumigatus* je najpogostejša oportunistična plesen, ki je odgovorna za približno 90 % okužb pri človeku. V zadnjem desetletju je število imunsko oslabljenih bolnikov naraslo, zato je opisanih tudi več primerov okužb z ostalimi oportunističnimi plesnimi, ki redkeje povzročajo okužbe (npr. *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Trichoderma* spp., neseptirane zigomicete, *Penicillium marneffei*). V diplomskem delu smo želeli ugotoviti kakšen vpliv ima homogenizacija na kvaliteto mikroskopskih preparatov, obarvanih s kalkofluor belim, in osamitev plesni iz kužnin iz spodnjih dihal. Poleg tega smo hoteli ovrednotiti mikroskopski pregled kužnin pri diagnostiki glivičnih okužb. Prvih 100 kužnin iz spodnjih dihal smo najprej obdelali po standardnem mikološkem postopku in jih nato homogenizirali z ditioteritol. Na podlagi primerjave rezultatov homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin smo ugotovili, da homogenizacija ne vpliva na učinkovitost osamitve gliv in kvaliteto mikroskopskega preparata. Pri mikroskopskem pregledu 304 razmazov kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih s kalkofluor belim, smo hife videli le v 3 razmazih. Na podlagi dobljenih rezultatov smo zaključili, da je mikroskopski pregled kužnin, obarvanih s kalkofluor belim, smiseln pri bolnikih s sumom na invazivno glivično okužbo. V drugem delu diplomske naloge smo poskušali ugotoviti pomen selektivnega gojišča ScSel+ pri osamitvi plesni *Scedosporium* spp. iz kužnin iz spodnjih dihal. Iz nobenega izmed 204 vzorcev nismo osamili *Scedosporium* spp., kar je verjetno posledica premalo raznolike populacije bolnikov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
 DC UDC 579.61:582.28:616.2-078(043)=163.6
 CX medical microbiology/respiratory specimens/molds/*Aspergillus* spp./*Scedosporium* spp./diagnostics/homogenization of samples/dithiothreitol/microscopic examination/microscopic preparations/calcofluor white/selective media/ScSel+/cystic fibrosis
 AU KRESE, Laura
 AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/MATOS, Tadeja (co-advisor)/SEME, Katja (reviewer)
 PP SI – Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2011
 TI EVALUATION OF MICROSCOPIC PREPARATIONS AND ISOLATION OF MOLDS FROM LOWER RESPIRATORY SPECIMENS FROM PATIENTS WITH CHRONIC PULMONARY DISEASES
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XI, 56 p., 11 tab., 11 fig., 41 vir.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Molds are ubiquitous microorganisms, that are most commonly found in soil and whose conidia are inhaled into the respiratory tract, where they may cause life-threatening infections. *Aspergillus fumigatus* is the most common opportunistic mold, that is responsible for approximately 90 % of human infections. In the last decade the number of immunosuppressed patients has increased, therefore more cases of infection with other opportunistic molds have been reported, that rarely cause infections (eg. *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Trichoderma* spp., nonseptate Zygomycetes, *Penicillium marneffeii*). The aim of our study was to find out whether the homogenization with dithiothreitol (DDT) of samples from lower respiratory tract improves recovery of fungi and quality of smears for Calcofluor White (CFW) Staining. In addition we wanted to evaluate the microscopic examination of samples in diagnosis of fungal infections. First 100 lower respiratory tract samples were first processed according to the established mycological protocol and then homogenized with DDT. Based on a comparison of the results of homogenized and non-homogenized samples, we concluded, that homogenization with DDT did not affect the efficiency of isolation of fungi and the quality of smears for CFW staining. By the microscopic observation of 304 smears prepared from non-homogenized samples, hyphae were seen only in 3 smears. According to our results we concluded, that microscopic examination is significant in case of patients with suspected invasive fungal infection. In the second part of our study we tried to determine the importance of semi-selective medium ScSel+ for recovery of *Scedosporium* spp. from lower respiratory tract samples. We could not isolate any *Scedosporium* spp. among all 204 samples, which is probably consequence of to small diversity of patient population.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
SIMBOLI IN OKRAJŠAVE	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 <i>Aspergillus</i> spp.	3
2.1.1 Značilnosti kulture in morfološke značilnosti	3
2.1.2 Klinični simptomi	3
2.1.2.1 Alergijska bronhopulmonarna aspergiloza	3
2.1.2.3 Invazivna aspergiloza	5
2.1.3 Laboratorijska diagnostika invazivne aspergiloze	7
2.1.3.1 Odvzem kužnine	7
2.1.3.2 Neposredne tehnike	7
2.1.3.3 Barvanja	8
2.1.3.4 Fluorescentne tehnike	8
2.1.3.6 Serološke tehnike	10
2.1.3.6.1 Galaktomananski test	10
2.1.3.6.2 Beta-D-glukanski test	11
2.1.3.6.3 Protitelesa usmerjena proti plesnim iz rodu <i>Aspergillus</i>	12
2.1.3.7 Metaboliti	13
2.1.3.8 Molekularna diagnostika	13
2.1.4 Zdravljenje invazivne aspergiloze	14
2.2 <i>Scedosporium</i> spp.	15
2.2.1 Rast in mikrobiologija	15
2.2.1.1 Makroskopske in mikroskopske značilnosti <i>Pseudallescheria boydii</i> oz. <i>Scedosporium apiospermum</i>	15
2.2.1.2 Makroskopske in mikroskopske značilnosti <i>Scedoporum prolificans</i>	16
2.2.2 Klinične manifestacije	17

2.2.2.1 Saprofitna kolonizacija dihalnih poti.....	17
2.2.2.2 Lokalizirane okužbe	18
2.2.3 Laboratorijska diagnostika	19
2.2.3.2 Osamitev	19
2.2.3.3 Serološke preiskave	19
2.2.3.4 Molekularna diagnostika	20
2.2.4 Zdravljenje okužb s <i>Scedosporium</i> spp.	20
2.2.4.1 Amfotericin B	20
2.2.4.2 Inhibitorji biosinteze sterolov	21
2.2.4.3 Ehinokandini.....	21
2.2.4.4 Kombinirano zdravljenje	22
2.3 HOMOGENIZACIJA IN MUKOLITIKI.....	22
2.3.1 Homogenizacija	22
2.3.2 Mukolitiki.....	23
3 METODE IN MATERIALI	25
3.1 ŠTEVILO PREISKOVANCEV	25
3.2 MATERIALI	26
3.3 METODE.....	28
3.3.1 Postopek obdelave kužnin iz spodnjih dihal.....	29
3.3.1.1 Priprava razmazov nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih s kalkofluor belim (CFW)	29
3.3.1.2 Nacepitev nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča	29
3.3.1.3 Priprava delovne raztopine ditiotreitolu	30
3.3.1.4 Homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom (DDT).....	30
3.3.1.5 Priprava razmazov homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih s kalkofluor belim (CFW)	30
3.3.1.6 Nacepitev homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča	31
3.3.1.8 Vrednotenje rezultatov	33
4 REZULTATI.....	34
4.1 REZULTATI MIKOLOŠKIH PREISKAV.....	34
4.1.1 Osamitev plesni.....	34
4.1.1.1 Vpliv homogenizacije z ditiotreitolom na osamitev plesni iz kužnin iz spodnjih dihal	34
4.1.1.2 Osamitev <i>Scedosporium</i> spp. iz kužnin iz spodnjih dihal	38
4.1.2 Mikroskopski pregled razmazov kužnin iz spodnjih dihal, pobarvanih s kalkofluor belim	40
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44

5.1 RAZPRAVA	44
5.2 SKLEPI	48
6 POVZETEK.....	49
7 VIRI	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrsta, število in delež vzorcev, vključenih v raziskavo	25
Preglednica 2: Število in delež kužnin iz spodnjih dihal glede na vrsto in makroskopski izgled, vključenih v raziskavo	25
Preglednica 3: Sestava selektivnega agarja SceSel+	28
Preglednica 4: Vrsta, število in delež plesni, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo (n=100)	35
Preglednica 5: Število in delež gliv kvasovk, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo (n=100)	35
Preglednica 6: Število, delež in vrsta plesni, osamljenih iz 104 vzorcev*, vključenih v raziskavo	36
Preglednica 7: Klinične značilnosti oseb, pri katerih smo osamili <i>Aspergillus fumigatus</i> ..	37
Preglednica 8: Število in delež plesni osamljenih na gojišču SceSel+ (n=204).....	38
Preglednica 9: Prisotnost hif v razmazih homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, pobarvanih s kalkofluorbelim (n=100).....	40
Preglednica 10: Prisotnost gliv kvasovk v razmazih homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, pobarvanih s kalkofluor belim (n=100)	40
Preglednica 11: Prisotnost hif v razmazih nehomogeniziranih kužnin (izjema so bolniki s CF), ki so bile odvzete 104 bolnikom	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Število in opis kužnin iz spodnjih dihal (n=204)	26
Slika 2: Shematski prikaz obdelave kužnin iz spodnjih dihal	32
Slika 3: Število in vrsta osamljenih plesni iz 104 nehomogeniziranih vzorcev (izjema so vzorci bolnikov s CF), vključenih v raziskavo	37
Slika 4: Kultura <i>Aspergillus fumigatus</i> osamljena iz izmečka bolnice št. 175	38
Slika 5: Kultura <i>Scopulariopsis</i> spp., osamljena iz izmečka bolnika št. 137	39
Slika 6: Makroskopski izgled tipskega seva CBS 101, 22 <i>Pseudallescheria boydii</i> (levo-na Sabouradovem agarju; desno-na selektivnem gojišču SceSel+)	39
Slika 7: Makroskopski izgled tipskega seva CBS 467,74 <i>Scedosporium prolificans</i> (levo-na Sabouradovem agarju; desno-na selektivnem gojišču SceSel+)	39
Slika 8: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 63 pod 400-kratno povečavo (levo-nehomogeniziran trahealni aspirat in fluorescirajoče glive kvasovke; desno-homogeniziran trahealni aspirat in fluorescirajoče glive kvasovke)	41
Slika 9: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 103 pod 400-kratno povečavo (nehomogeniziran izmeček in vidne hife)	42
Slika 10: Mikroskopski pregled kužnine bolnice št. 175 pod 400-kratno povečavo (nehomogeniziran trahealni aspirat in viden hife)	42
Slika 11: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 104 pod 1000-kratno povečavo (nehomogeniziran izmeček in viden odsek hife)	43

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

ABPA	alergijska bronhopulmonarna aspergiloza
ABPM	alergijska bronhopulmonarna mikoza
AFLP	polimorfizem dolžine pomnoženih fragmentov (<i>angl. amplified fragment-length polymorphism analysis</i>)
AmB-D	amfotericin B deoksiholat
BAL	bronhoalveolarna lavaža
BHI	<i>angl. brain heart infusion angl. brain heart infusion</i>
CF	cistična fibroza
CFW	kalkofluor belo (<i>angl. calcofluor white</i>)
CIE	<i>angl. counter immunoelectrophoresis</i>
CT	računalniška tomografija (<i>angl. computer tomography</i>)
DDT	ditiotreitol
DNA	deoksiribonukleiska kislina (<i>angl. deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	encimsko-immunski test (<i>angl. enzyme immunoassay</i>)
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in hrano
GMS	<i>angl. Grocott Gomori Methenamine Silver</i>
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti
HSCT	presaditev krvotvornih matičnih celic (<i>angl. hematopoietic stem cell transplant</i>)
IA	invazivna aspergiloza
ISSR PCR	med-mikrosatelitskih PCR (<i>angl. inter-simple-sequence-repeat</i>)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MLEE	multilokusna encimska elektroforeza
MLST	tipizacija zaporedij multiplih lokusov (<i>angl. multilocus sequence typing</i>)
NAC	N-acetilcistein
NALC	N-acetil-L-cistein
PAS	<i>angl. periodic acid-Schiff</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. polymerase chain reaction</i>)

RAPD	tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA (<i>angl. random amplification polymorphism determination</i>)
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (<i>angl. restriction fragment length polymorphism</i>)
RIA	radioimunski test
SABA	Sabouraudov agar
ScSel+	<i>Scedosporium</i> selektivni agar

1 UVOD

Filamentozne glive oz. plesni so ubikvitani mikroorganizmi, ki jih najpogosteje najdemo v zemlji (Segal in Walsh, 2006). Pogostost okužb z njimi je sorazmerno majhna, saj je človek pred njimi dobro zavarovan s humoralnim in celičnim imunskim odzivom. Oportunistične glivične okužbe se najpogosteje pojavljajo pri imunsko oslabljenih ljudeh (Matos, 2002a).

Med najpogostejše oportunistične plesni sodijo *Aspergillus* spp., ki povzročajo okužbe tako pri imunsko oslabljenih kot tudi pri imunsko odpornih osebah (Oren in Goldstein, 2002). Pri imunsko oslabljenih osebah povzročajo smrtno nevarno invazivno pljučno aspergilozo, ki je najpogostejša oblika invazivne aspergiloze (IA). Najpogostejši dejavniki tveganja za razvoj invazivne pljučne aspergiloze so: dalj časa trajajoča nevtropenija, presaditev krvotvornih matičnih celic, presaditev čvrstih organov, aids in kronična granumaltozna bolezen (Oren in Goldstein, 2002).

Ostale oportunistične plesni, kot so *Fusarium* spp., redko septirane zigomicete, *Penicillium marneffei*, le redko povzročajo okužbe pri ljudeh (Walsh in sod., 2004). Pred približno 10 leti so začeli prepoznavati pomen plesni iz rodu *Scedosporium* spp. in to zlasti pri bolnikih s cistično fibrozo (Horré in Marklein, 2009). Rod predstavljata dve medicinsko pomembni vrsti, in sicer *Scedosporium apiospermum* in *Scedosporium prolificans* (Cortez in sod., 2008). Omenjeni vrsti povzroča širok spekter bolezni od invazivne bolezni do saprofitske kolonizacije respiratornega trakta (Cooley in sod., 2007). Diagnostika okužb, ki jih povzročajo *Scedosporium* spp., temelji na osamitvi in identifikaciji gliv iz kužnine (Horré in sod., 2009).

1.1 NAMEN DELA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti vpliv homogenizacije kužnin iz spodnjih dihal na kvaliteto mikroskopskih preparatov in učinkovitost osamitve plesni. Poleg tega smo želeli ugotoviti pomen mikroskopskih preparatov, obarvanih s fluorescenčnim barvilom kalkofluor belo (CFW), pri diagnostiki okužb s filamentoznimi glivami.

V drugemu delu diplomske naloge smo želeli ugotoviti pomen selektivnega gojišča SceSel+ pri primarni osamitvi plesni iz rodu *Scedosporium*. Opredeliti smo želeli tudi bolnike, pri katerih je uporaba gojišča smiselna.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakovali smo, da bomo s homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal omogočili enostavno izdelavo enakomernih razmazov za barvanje s kalkofluor belim in povečali učinkovitost mikroskopskega pregleda in osamitve gliv ter da bomo z uvedenim gojiščem SceSel+ osamili večji delež plesni *Scedosporium* kot s standardnimi mikološkimi gojišči.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Aspergillus* spp.

2.1.1 Značilnosti kulture in morfološke značilnosti

Aspergillus spp. so plesni, ki jih po načinu razmnoževanja uvrščamo v deblo *Ascomycota*. Zračni micelij kolonij se razlikuje po vrsti, starosti kolonije, sestavi medija in temperaturi rasti. Površina kolonij je lahko ploščata, prašnata ali puhasta. Vrste se razlikujejo tudi po različnem pigmentu konidijev, ki kolonije značilno obarvajo. Za vse vrste aspergilusov so mikroskopsko značilne konidiofore, ki so lahko gladke ali hrapave (Matos, 2002a).

Aspergillus fumigatus je najpogostejši povzročitelj okužb pri človeku. Okužbe pri ljudeh lahko povzročajo tudi *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* in drugi. Identifikacija *A. fumigatus* temelji na morfologiji konidijev in konidiofor. Za glivo so značilni bodičasti zeleni konidiji, ki merijo v 2,5-3 μm v premeru in se tvorijo bazipetalno v verigah iz zelenih fialid (6-8 $\mu\text{m} \times$ 2-3 μm). Nekaj izolatov *A. fumigatus* je nepigmentiranih in tvorijo bele konidije. Konidiji so nanizani v verigah, ki so nameščene na veziklu (20-30 μm v premeru). Za *A. fumigatus* je značilna hitra rast. Na agarju Czapek-Dox lahko v enem tednu pri 25 °C zrastejo do 4 \pm 1 cm velike kolonije. *A. fumigatus* je termofilna vrsta, ki lahko raste pri 55 °C in lahko preživi pri temperaturah do 70 °C (Latgé, 1999).

2.1.2 Klinični simptomi

2.1.2.1 Alergijska bronhopulmonarna aspergiloza

Alergijska bronhopulmonarna aspergiloza (ABPA) je najbolj resna oblika alergijske pljučne mikoze, ki jo povzročajo vrste iz rodu *Aspergillus*. ABPA se pogosto pojavlja pri bolnikih, ki imajo atopijsko astmo ali cistično fibrozo (CF). ABPA se pojavi pri približno 1-2 % astmatikov (15 % bolnikov z astmo je občutljivih na *A. fumigatus*) in 7-35 % bolnikov s CF. Potek ABPA je podoben kot pri »klasični« astmi, le da je za ABPA značilen unikaten celični imunski odgovor in delovanje T-celičnih produktov. Slednje lahko povzroči od astme do usodne poškodbe pljuč z določenimi kliničnimi, serološkimi, radiološkimi in patološkimi značilnostmi (Latgé, 1999).

Za ABPA so značilni pljučni infiltrati, ki lahko vodijo do nastanka bronhiektazij in pljučne fibroze. Diagnozo ABPA je zelo težko potrditi. Kriteriji za postavitev diagnoze so: astma, eozinofilija v periferni krvi ($> 1000 \text{ mm}^{-3}$), neposredna kožna reakcija na antigenske ekstrakte *A. fumigatus* v 15 ± 5 minutah, precipitacija (imunoglobulinov G [IgG] in [IgM]) in protitelesa IgE proti *A. fumigatus*, povečanje celokupne koncentracije IgE v serumu ($>1 \mu\text{m/ml}$), infiltrati v pljučih in centralne bronhiektazije. Manj pomembni za postavitev diagnoze so izolacija *A. fumigatus* iz izmečka, izkašljevanje rjavih koščkov, ki vsebujejo eozinofilce in kristale Charcot-Leyden ter kožna reakcija 6 ± 2 ur po izpostavitvi antigenu (Latgé, 1999).

Vsi zgoraj naštetih kriteriji so redko prisotni pri vsakemu bolniku z ABPA. Večina simptomov, ki so pomembni za postavitev diagnoze, niso ves čas prisotni in niso specifični. Zgoraj omenjeni kriteriji (npr. precipitacija, eozinofilija) so lahko odvisni od populacije (bolniki s CF, astmatiki, bolniki brez astme in CF) in od starosti bolnikov, ki so vključeni v študijo. Diagnozo ABPA bi bilo lažje potrditi z uporabo standardiziranih antigenov. Raziskave v tej smeri že potekajo (Latgé, 1999).

2.1.2.2 Aspergilom

Aspergilom je t.i. »glivni klobčič«, ki nastane v predhodno nastalih pljučnih votlinah, ki so posledica tuberkuloze, sarkoidoze ali drugih pljučnih okvar, ter v kronično zamašenih obnosnih sinusih. V zgodnjih 50. letih 20. stoletja so aspergilom opredeljevali za klasično obliko aspergiloze. V današnjem času za aspergilomom zbolijo od 10 do 15 % bolnikov s pljučnimi boleznimi. Aspergilom sestoji iz sferično oblikovane mase hif, ki je vdolana v proteinski matriks s sporulirajočimi strukturami na periferiji, ki se nahajajo na zunanji strani pljučne votline. Bolniki so običajno asimptomatični. Pri tistih bolnikih, ki imajo simptome, so najznačilnejše hemoptize, to so izmečki pomešani s krvjo. Na rentgenskih slikah prsnega koša so aspergilomi vidni kot krožne spremembe. Pri bolnikih z aspergilomom zaznamo visoke titre protiteles (precipitini). Aspergilomi so običajno odkriti ob radiografski preiskavi prsnega koša običajno ob sumu na drugo pljučno bolezen ali alergijo (Latgé, 1999).

2.1.2.3 Invazivna aspergiloza

Invazivna aspergiloza (IA) je eden izmed najpogostejših vzrokov smrti pri hematoloških bolnikih. Povprečna incidenca IA naj bi znašala 5-25 % pri bolnikih z akutno levkemijo, 5-10 % pri bolnikih z alogeno presajenimi krvotvornimi matičnimi celicami in 0,5-5 % po citotoksičnem zdravljenju bolezni krvi ali avtologni presaditvi krvotvornih matičnih celic in presaditvi čvrstih organov. IA, ki sledi presaditvi čvrstega organa, je najpogostejša pri bolnikih s presajenimi pljuči in srcem (19 do 26 %), manj pogosta pa pri bolnikih s presajenimi jetri, srcem, pljuči in ledvicami (1-10 %). Čeprav je IA danes poznana kot ena izmed glavnih glivičnih okužb pri bolnikih z rakavimi obolenji, je verjetno njena incidenca podcenjena zaradi nizke občutljivosti diagnostičnih testov. Za IA lahko zbolijo tudi ne-hematološki bolniki, npr. bolniki z aidsom (1-12 %) in bolniki s kronično granulozno boleznijo. Za IA redko zbolijo imunsko odporni gostitelji (Latgé, 1999).

Opisane so štiri oblike IA, in sicer:

- akutna ali kronična pjučna aspergiloza (najpogostejša oblika);
- traheobronhitis in obstruktivna bronhialna bolezen z različno stopnjo invazije sluznice ali hrustanca;
- akutni invazivni rinosinuzitis;
- desiminirana oblika bolezni, ki običajno prizadene možgane in druge organe (npr. kožo, ledvice, srce in oči) (Latgé, 1999).

Klinične značilnosti različnih oblik IA so odvisne od prizadetega organa in od osnovne bolezni bolnika. Diagnozo IA je težko potrditi v zgodnjih fazah bolezni. Za dokaz IA je potreben histopatološki dokaz rasti micelija v tkivu. Običajno je to mogoče samo ob avtopsiji. Ker so hife ostalih filamentoznih gliv (npr. *Fusarium* spp. ali *Pseudallescheria* spp.) podobne hifam *Aspergillus* spp., je potrebno za zagotovo identifikacijo izvesti še imunohistološko barvanje, in situ hibridizacijske tehnike ali osamiti plesen iz vzorcev in jo identificirati (Latgé, 1999).

Pri postavitvi diagnoze IA upoštevamo pozitivne slikovne ugotovitve računalniške tomografije (CT), osamitev plesni iz kužnine, prisotnost plesni v mikroskopskem preparatu in prisotnost antigena oz. antigenov *Aspergillus* spp. v serumu. Klinični simptomi so

običajno preveč nespecifični in zato nimajo velikega pomena pri postavitvi diagnoze (Latgé, 1999).

Glavni simptomi IA so vročina, bolečina v prsih, kašelj, slabo počutje, izguba telesne teže in otežno dihanje. Našteti simptomi so spreminjajoči in nespecifični. Telesna temperatura višja od 38,5 °C, ki je ni mogoče znižati z antibiotiki, ni pomemben podatek za začetek zdravljenja, saj bolniki z IA, ki prejemajo kortikosteroide, nimajo povišane telesne temperature (Latgé, 1999).

Pozitivni izvid CT je lahko prvi pomemben kazalec IA. CT slikanje je bolj občutljiva tehnika kot radiografija in omogoča prikaz razširjenih, večjih lezij. V primeru izven pljučnih oblik invazivne aspergiloze (npr. rinosinuzitis ali aspergiloza centralnega živčevja) lahko s pomočjo CT določimo »obseg« bolezni in ugotovimo, ali se je bolezen razširila na kosti. Pri bolnikih z aspergilozo centralnega živčevja si lahko pri postavitvi diagnoze pomagamo z CT in magnetno resonanco možganov (Latgé, 1999).

Pri razvoju IA moramo upoštevati dejavnike tveganja. Zaradi težavne diagnostike IA, hitrega napredovanja bolezni (smrt v 1-2 tednih po pojavu simptomov bolezni) in resnosti bolezni zdravniki bolniku predpišejo empirično zdravljenje in ne čakajo na potrditev diagnoze. V primeru da bi čakali na dokončno potrditev diagnoze, bi se s tem zmanjšala možnost ozdravitve bolnika, saj protiglivična zdravila ne bi bila več dovolj učinkovita. Znana je dobra povezava med časom trajanja nevtropenije in tveganjem za razvoj IA. Huda (polimorfonuklearni levkociti [PML] = 500 mm⁻³ in še posebno 100 mm⁻³) ali dalj časa trajajoča (> 12 do 15 dni) nevtropenija je povezana z najvišjim tveganjem za razvoj pljučne IA. Okužba s citomegalovirusom je tudi eden izmed dejavnikov tveganja pri bolnikih s presajenimi pljuči ne pa tudi pri bolnikih s presajenimi krvotvornimi matičnimi celicami. Glavni dejavnik tveganja za razvoj IA pri bolnikih s presajenimi organi je zdravljenje s kortikosteroidi, ki ga običajno povezujejo z reakcijo presadka proti gostitelju in/ali zavrnitvijo presadka. Ribaud in sodelavci (1999) so dokazali, da sta reakcija gostitelja proti presadku in > 1 mg/kg/dan koncentracija prednisolona, ki ga bolnik prejema več kot 4 tedne pred postavitvijo diagnoze IA, slaba indikatorja prognoze. Ugotovili so tudi, da je 1 mg/kg/dan koncentracija prednisolona povezana z razvojem IA pri bolnikih s presajenimi ledvicami. Bolniki, pri katerih obstaja največje tveganje, da zbolijo za IA, so:

- bolniki z alogeno presajenimi krvotvornimi matičnimi celicami, ki trpijo za dalj časa trajajočo nevtropenijo ali so bili zdravljeni z kortikosteroidi zaradi reakcije gostitelja proti presadku;
- bolniki z avtologno presajenimi krvotvornimi matičnimi celicami ali bolniki s presajenimi črvstimi organi, ki so nevtropenični > 2 tedna;
- bolniki z akutno levkemijo in limfomi, ki prejemajo intenzivno kemoterapijo;
- bolniki z aplastičnimi anemijami in dalj časa trajajočo nevtropenijo;
- bolniki, ki so že v preteklosti zboleli za aspergilozo in so bili zdravljeni z novimi kemoterapevtiki ali bolniki s presajenim krvotvornimi matičnimi celicami;
- bolniki z boleznimi, ki so posledica nevtropenije (reakcija gostitelja proti presadku);
- bolniki z napredovalo obliko HIV (Latgé, 1999).

2.1.3 Laboratorijska diagnostika invazivne aspergiloze

2.1.3.1 Odvzem kužnine

Za dokazovanje IA sta potrebna osamitev plesni in mikroskopski pregled sterilno odvzetega vzorca (Simčič in Matos, 2010). Poleg iz sterilno odvzetih vzorcev, ki potrebujejo invaziven poseg, lahko *Aspergillus* spp. osamimo tudi iz drugih kužnin, kot so npr. izmeček, vzorci pridobljeni z perkutano biopsijo pljuč, aspirati in bronhoalveolarno lavažo (BAL) (Latgé, 1999). Vzorce transportiramo v sterilnih posodah in jih obdelamo v dveh urah po odvzemu (Matos, 2002b).

2.1.3.2 Neposredne tehnike

V primeru kliničnih vzorcev, kjer obstaja sum, da gre za glivično okužbo je potrebno izvesti direktne diagnostične postopke. Ti postopki se razlikujejo glede na vrsto kužnine, stopnjo nujnosti in med posameznimi laboratoriji. Iz vzorca je potrebno pripraviti pokrito kapljico brez ali z dodatkom 10 % kalijevega hidroksida, ki omogoča prikaz hif. Kasneje

naresničimo iz kužnine še razmaz, ki ga fiksiramo in pobarvamo z različnimi barvili. Barvanje po Gramu je rutinski postopek, vendar lahko citološka in fluorescenčna barvanja izboljšajo občutljivost (Hope in sod., 2005).

Prednosti direktnih tehnik v primerjavi s kultivacijo sta hitrost in visoka občutljivost. Slabosti pa so nesposobnost razlikovanja med *Aspergillus* spp. in drugimi filamentoznimi glivami (npr. *Penicillium* spp. in *Scedosporium* spp.) in napačna postavitve diagnoze (npr. *Aspergillus* spoznan za povzročitelja bolezni, ko je zelo majhna verjetnost okužbe s to glivo). Te pomanjkljivosti zmanjšajo natančnost diagnoze in posledica tega je različna učinkovitost zdravljenja, če je bila diagnoza postavljena samo na podlagi prisotnosti hif vrst iz rodu *Aspergillus*. *Aspergillus* spp. so v kužninah vidne kot tanke enakomerno septirane hife, ki so značilno razvejane (Hope in sod., 2005).

2.1.3.3 Barvanja

Za glive specifična barvanja je potrebno izvesti v primeru suma na IA. Hife, pobarvane s hematoksilinom in eozinom, so slabo vidne, kadar so le-te raztresene, fragmentirane ali prisotne v nekrotičnem tkivu. Histološke rezine in razmaze lahko pobarvamo s specifičnimi barvili, kot sta GMS (*angl. Grocott Gomori Methenamine Silver*) in PAS (*angl. periodic acid-Schiff*). Robert Gomori je dokazal, da barvanje GMS, ki je bilo prvotno namenjeno za barvanje glikogena in mucina, obarva tudi glivne elemente. Barvanje GMS je občutljiv postopek barvanja za prikaz manjših fragmentov celične stene, ki jih običajno zakrivajo elementi tkiva. Za detekcijo hifnih elementov je bolj občutljivo barvanje GMS kot PAS, ki omogoča razlikovanje gliv in tkiva. Slednje je lahko pomembno pri določanju posameznih z *Aspergillus* povezanih sindromov, ki se razlikujejo glede na imunološki status gostitelja, zato je priporočljiva sočasna uporaba barvanja GMS in PAS (Hope in sod., 2005).

2.1.3.4 Fluorescentne tehnike

Fluorescentna barvila, kot so kalkoflor belo, Uvitek 2B in Blankophor, so v vodi topna, brezbarvna barvila, ki se selektivno vežejo s polisaharidi in so povezani z beta glikozidi v celični steni gliv. Njihove prednosti so: visoka občutljivost, hitra izvedba in širok spekter

uporabe (Hope in sod., 2005). Poleg tega lahko z njimi pobarvamo parafinske rezine tkiva, zamrznjene rezine in druge »sveže« kužnine (npr. BAL). Za enkrat še ne poznamo za *Aspergillus* spp. specifičnega fluorescentnega barvila. (Hope in sod., 2005).

2.1.3.5 Kultivacija

Glavna pomanjkljivost kultivacije je časovna omejitev postopka, saj zahteva 48 ur do kultivacije. Metoda je tudi relativno neobčutljiva in za določitev vrste je potrebno usposobljeno osebje (Hope in sod., 2005).

Aspergillus spp. se od ostalih nepatogenih plesni ločijo po sposobnosti rasti pri 37 °C. Vrste iz rodu *Aspergillus* je mogoče osamiti iz standardnih mikrobioloških gojiščih (npr. krvni agar, čokoladni agar, BHI, gojišče po Sabouraudu (SABA)). Specifična mikološka gojišča uporabimo le v primeru suma na okužbo z vrstami iz rodu *Aspergillus* ali z drugimi plesnimi. Dodatek antibiotikov k gojišču (npr. kloramfenikol in gentamicin) je potreben, kadar želimo *Aspergillus* spp. izolirati iz nesterilnih vzorcev, da preprečimo rast bakterij. Cikloheksamid zavira sintezo proteinov pri evkariontih in ga pogosto dodajamo k gojišču, saj prepreči drugim nepatogenim, okoljskim glivam, da bi prerastle kulturo. Občasno lahko cikloheksamid zavira rast *Aspergillus* spp. (Hope in sod., 2005).

Izolat identificiramo na podlagi makroskopskih in mikroskopskih značilnosti kolonije (Hope in sod., 2005).

Omeniti je potrebno še nekatere druge probleme, ki se nanašajo na osamitev in identifikacijo plesni. Rastne in morfološke značilnosti *Aspergillus* spp. so spremenljive in v nekaterih primerih celo netipične. Nekateri plesni so podobne *Aspergillus* spp., zato moramo pri diagnostiki vedno upoštevati možnost okužbe oz. kolonizacije s drugimi plesnimi. Občasno je težko ali celo nemogoče inducirati sporulacijo in zato je za identifikacijo potrebna uporaba drugih postopkov. V tem primeru najboljšo rešitev predstavljajo molekularne tehnike, ki omogočajo natančno in hitro identifikacijo (Hope in sod., 2005).

2.1.3.6 Serološke tehnike

2.1.3.6.1 Galaktomananski test

Galaktomanan je toplotno stabilen heteropolisaharid, ki se nahaja v celični steni pri skoraj vseh plesnih iz rodu *Aspergillus* in *Penicillium*. Molekula vsebuje jedro iz manana z različno dolgimi imunoreaktivnimi stranskimi verigami, ki vsebujejo galaktofuranozilne enote. Sestava galaktomanana se razlikuje med različnimi rodovi in sevi, razlikujejo se tudi sevi in pogoji, ki so potrebni za njegovo nastajanje, ekstrakcijo in čiščenje. Na voljo sta dva komercialno dostopna testa za detekcijo galaktomanana, in sicer Pastotex kit (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes La-Coquette, Francija) in Platelia ELISA (BioRad, Marnes La-Coquette, Francija). Test Pastotex je danes redko v uporabi, medtem ko je Platelia dostopen in v uporabi že več kot 10 let (Hope in sod., 2005).

Galaktomananski test se običajno uporablja za detekcijo galaktomanana v vzorcih seruma ali BAL. Galaktomanan lahko zaznamo tudi v tkivu in v drugih telesnih tekočinah, kot so likvor, peritonealna tekočina, urin, perikardialna tekočina (Hope in sod., 2005).

Klinična občutljivost testa Platelia ELISA (BioRad, Marnes La-Coquette, Francija) je različna in znaša 29-100 %, kar je lahko posledica različnih vzrokov. Izvedba testa se lahko razlikuje glede na patološki proces in med različnimi skupinami bolnikov. V študiji, ki je vključevala zelo imunsko oslABLJENE bolnike, je znašala občutljivost testa največ 90 %, medtem ko je bila občutljivost testa v primeru drugih bolnikov (npr. bolniki z kronično granumaltno boleznijo, bolniki s presajenimi organi) nekoliko nižja. Obstajajo dokazi, da istočasno protiglivično zdravljenje lahko zmanjša občutljivost galaktomanskega testa. Neprimerno zbiranje kliničnih vzorcev lahko zmanjša klinično občutljivost testa (npr. strategija zbiranja vzorcev ni bila natančno določena, kljub temu je bil dvakrat na teden izveden test za določanje antigena pri bolnikih, pri katerih je obstajalo tveganje, da zbolijo za invazivno aspergilozo) (Hope in sod., 2005).

Klinična specifičnost testa Platelia ELISA (BioRad, Marnes La-Coquette, Francija) je več kot 90 %. Specifičnost testa je manjša v primeru testiranja dojenčkov in otrok, kar je verjetno posledica zaužitja galaktomanana z vodo ali hrano in translokacije skozi poškodovano ali nerazvito črevesno steno (Hope in sod., 2005). Antibiotiki predstavljajo

dodaten vir galaktomanana, ki lahko zmanjša klinično specifičnost (Hope in sod., 2005). Ansorg in sod. (1997) so objavili pozitivne rezultate galaktomananskega testa pri bolnikih, ki so prejeli piperacilin-tazobaktam. Ta fenomen so nato *in vitro* in *in vivo* raziskali ter je verjetno povezan s prisotnostjo galaktomanana v zdravilu. To odkritje je prisililo nekatere ustanove, da so spremenili njihove protibakterijske protokole in zato je Ameriški vladni urad za zdravila in hrano (FDA) objavil opozorila za interpretacijo izvidov testiranja na galaktomanan (Hope in sod., 2005).

2.1.3.6.2 Beta-D-glukanski test

(1,3) beta-D-glukanske teste so razvila podjetja Wako Pure Chemical Industries (Tokio, Japonska), Seikagaku Kogyo Corporation (Tokio, Japonska) in Associates of Cape Code (Falmouth, ZDA). Test, ki so ga razvilo podjetje Associates of Cape Code (Falmouth, ZDA) t.i. Fungitell beta-glukanski test, je bil priznan s strani FDA za diagnostiko invazivnih glivičnih okužb. Beta-D-glukan je ubivitarjen in prisoten v celični steni večine gliv (izjema so vrste iz rodu *Cryptococcus* in zigomicete). Prisotnost beta-D-glukana pri vrstah različnih od *Aspergillus* spp. (npr. *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Acremonium* spp. in *Pneumocystis jiroveci*) pomeni, da njegova vloga pri specifični diagnostiki IA ni dobro poznana (Hope in sod., 2005).

Najprimernejši klinični vzorec za izvedbo beta-D-glukanskega testa je serum. Pogosta značilnost beta-glukanskih testov je sposobnost beta-1,3-glukana, da aktivira koagulacijsko kaskado znotraj amebocitov, pridobljenih iz hemolimfe ostvar (*Limulus polyphemus*). Pripravki iz lizata ostvar so bili prvič uporabljeni za detekcijo endotoksina s pomočjo limulusnega testa (poimenovan po vrsti ostvar *Limulus polyphemus*). Endotoksin sproži strjevanje krvi preko serin proteaze cimogena t.i. faktorja C. Kasneje so ugotovili, da 1,3-beta-glukan sproži strjevanje krvi preko sekundarnega serin proteaznega cimogena (faktor G) in neodvisno od faktorja C, kar je omogočilo razvoj testov, ki so danes v uporabi (Hope in sod., 2005).

Analitična občutljivost testa Fungitell znaša 1 pg/mL. Pri izvedbi testa je potrebno vedeti, da lahko na analitično občutljivostjo 1,3-beta-glukanskih testov vplivajo značilnosti seruma ljudi, saj vsebuje številne inhibitorje serinskih proteaz, ki jih je zato potrebno

predhodno odstraniti. Omenjene inhibitorje odstranimo z metodo alkalnega reagenta (test Fungitell) ali z dodatkom Triton X-100 in segrevanjem pri 70°C za 10 minut (test Wako). Ker tako endotoksin kakor tudi 1,3-beta glukon aktivirata koagulacijsko pot, je za razvoj specifičnega 1,3-beta glukanskega testa iz vzorca potrebno odstraniti endotoksin. Pri testu Wako inaktiviramo endotoksin z dodatkom polimiksina, medtem ko pri testu Fungitell v ta namen uporabljamo faktor C. Ta predhodni korak skupaj s odstranitvijo nespecifičnih aktivatorjev serinskih proteaz, ki so prisotne v serumu človeka, poveča analitično specifičnost testa (Hope in sod., 2005).

O klinični specifičnosti 1,3-beta glukanskega testa za detekcijo *Aspergillus* spp. ni podatkov. Pomen 1,3-beta glukanskega testa za protiglivično zdravljenje še ni dobro proučen. Lažno negativni rezultati 1,3-beta glukanskega testa so bili opisani v primeru hemodialize, kardio-pulmonarnega obvoda, zdravljenja z imunoglobulinskimi pripravki in stika z gazo, ki je vsebovala glukane (npr. po operaciji). Okoljska kontaminacija z 1,3-beta glukani lahko zmanjša specifičnost testa (Hope in sod., 2005).

2.1.3.6.3 Protitelesa usmerjena proti plesnim iz rodu *Aspergillus*

Za potrditev diagnoze kronične IA je potreben dokaz specifičnih protiteles. Tradicionalno je detekcija protiteles veljala kot neprimerna za postavitev diagnoze IA, vendar je to temeljilo na rezultatih neuspešne študije. V kasnejših študijah so pri približno eni tretjini bolnikov z IA odkrili protitelesa. Detekcija protiteles je primerna neinvazivna tehnika za potrditev diagnoze podkožne IA pri ne-nevtropeničnih bolnikih z IA, kot je bilo prikazano v primeru bolnika s kronično granulomatozno boleznijo, ki je zbolel za invazivno pljučno aspergilozo (Hope in sod., 2005).

Uporabljenih je bilo veliko testov za detekcijo protiteles proti *Aspergillus* spp. vključno z imunodifuzijo, CIE elektroforezo, fiksacijo komplemента, hemaglutinacijo delcev, indirektno imunofluorescenco, radioimunskim testom (RIA) in imunskim testom ELISA. Veliko število epitopov v ekstraktih lahko zmanjša specifičnost testa. Z uporabo rekombinantnih antigenov (npr. dipeptidilpeptidaze, superoksid dismutaza, katalaza, metaloproteaza, mitogilin in galaktomano protein) se lahko izognemo omenjeni situaciji (Hope in sod., 2005).

2.1.3.7 Metaboliti

Vrste iz rodu *Aspergillus* proizvajajo različne ekstracelularne encime (npr. metaloproteaze, fosfolipaze) kot tudi primarne (npr. manitol) in sekundarne metabolite (npr. gliotoksin), katere lahko uporabimo kot diagnostične markerje IA. Detekcija metabolitov še ni dovolj dobro raziskano področje (Hope in sod., 2005).

2.1.3.8 Molekularna diagnostika

V molekularni diagnostiki gliv iz rodu *Aspergillus* je nedavno prišlo do večjega napredka. Z uvdebo t.i. »panfungal« PCR, ki omogoča pomnoževanje širokega spektra glivičnih patogenov za identifikacijo bolnikov z invazivno glivično okužbo pri bolnikih, pri katerih obstaja večje tveganje, da zbolijo za IA. Ugotovili so, da v primeru potrjene ali verjetne invazivne glivične okužbe občutljivost in specifičnost testa znašata 100 % in 73 %. Poleg tega so tudi ugotovili, da ta v povprečju omogoči za 5,75 dni hitrejšo postavitve diagnoze. Lass-Flörl in sodelavci (2001) so uporabili za *Aspergillus* specifičen test PCR, da so izvedli presajalno testiranje pri 121 bolnikih z rakom. Ugotovili so, da znašata občutljivost in specifičnost testa za postavitve diagnoze v primeru vsaj dveh pozitivnih rezultatov PCR 75 % in 96 %. Izkazalo se je tudi, da omenjeni test ni uporaben za spremljanje odziva na zdravljenje. Kami in sodelavci (2001) so razvili nov kvantitativni test PCR za diagnostiko invazivne pljučne aspergiloze. Testirali so 323 vzorcev, ki so bili odvzeti 122 bolnikom s hematološkimi rakavimi boleznimi, izmed katerih je 33 bolnikov zbolelo za invazivno pljučno aspergilozo. Vzorce krvi so testirali s 3 različnimi na antigen temelječimi diagnostičnimi metodami. Ugotovili so, da je izmed vseh uporabljenih diagnostičnih testov najbolj občutljiv in specifičen test PCR, katerega občutljivost in specifičnost znašata 79 % in 92 %. Test PCR za detekcijo DNA plesni iz rodu *Aspergillus* so testirali tudi na vzorcih BAL, ki so bili odvzeti bolnikom s hematološkimi rakavimi boleznimi in pljučnimi infiltrati. Buchheidt in sodelavci (2001) so testirali 67 takih vzorcev, pri čemer je bilo 17 bolnikov pozitivnih na prisotnost DNA plesni iz rodu *Aspergillus*. 13 izmed 17 bolnikov je imelo potrjeno diagnozo invazivne pljučne aspergiloze in ostali 4 niso imeli znakov invazivne pljučne aspergiloze. Noben bolnik, pri katerem niso zaznali DNA plesni, ni zbolel za invazivno pljučno aspergilozo. Ta študija je ocenila uporabnost detekcije DNA

plesni iz rodu *Aspergillus* za ugotavljanje pljučnih infiltratov v vzorcih BAL pri imunsko oslabljenih bolnikih, pri katerih je bila izvedena bronhoskopija (Oren in Goldstein, 2002).

2.1.4 Zdravljenje invazivne aspergiloze

Vorikonazol je postal zlati standard primarnega zdravljenja IA. Randomizirana študija je pokazala, da je začetno zdravljenje IA uspešnejše z vorikonazolom kot z amfotericin B deoksiholatom (AmB-D) in je povezano s povečanim deležem preživelih bolnikov (71 % proti 58 %). Število ozdravelih bolnikov, ki so bili zdravljeni z vorikonazolom, je znašalo 53 %, medtem ko je število bolnikov, ki so bili zdravljeni z AmB-D, znašal le 32 %. Najslabši izid zdravljenja je bil opažen pri bolnikih z zunajpljučno aspergilozo in pri bolnikih z alogeno presajenimi krvotvornimi matičnimi celicami (Sherif in Segal, 2010).

Manjše študije so pokazale zvezo med nizko koncentracijo vorikonazola v plazmi in neučinkovitostjo zdravljenja invazivnih glivičnih bolezni. Ugotovili so tudi povezavo med visokimi koncentracijami vorikonazola in toksičnostjo. V primeru težko ozdravljive glivične bolezni ali toksičnosti zdravila bi bilo potrebno spremljati potek zdravljenja z vorikonazolom. Vendar je potek zdravljenja težko spremljati, saj se referenčne serumske vrednosti razlikujejo (Sherif in Segal, 2010).

Proti plesnim delujoči azoli in ketokonazol so potencialni inhibitorji citokroma P450 3A4 (CYP3A4). Inhibicija CYP3A4 je odgovorna za večino interakcij med zdravili. Koncentracijo določenih zdravil, ki jih metabolizira CYP3A4, je potrebno zmanjšati, ko jih bolnik prejema skupaj z vorikonazolom (npr. inhibitorji kalcinevrina) (Sherif in Segal, 2010).

Odpornost vrst iz rodu *Aspergillus* na antimikotike je lahko vzrok neuspešnega zdravljenja. *Aspergillus terreus* je odporen na amfotericin B. Mutacije gena *cyp51A* pri *A. fumigatus* povezujejo z odpornostjo na itraconazol. Izolati z mutiranim genom *cyp51A* naj bi bili tudi manj občutljivi tudi za druge azole, ki delujejo proti plesnim (Sherif in Segal, 2010).

Za zdravljenje bolnikov z IA, pri katerih zdravljenje z vorikonazolom ni dovolj učinkovito ali pa so odporni na vorikonazol, lahko uporabimo amfotericin B ali ehinokandine. Za zdravljenje IA je FDA odobril kaspofungin. Raziskave so pokazale, da je bilo zdravljenje bolnikov samo s kaspofunginom uspešno pri 37 izmed 83 (45 %) bolnikov z IA, pri čemer

kar pri 86 % od teh bolnikov zdravljenje s standardnimi zdravili ni bilo uspešno (Sherif in Segal, 2010).

Marr in sod. (2004) so objavili retrospektivno analizo o zdravljenju IA, po kateri naj bi zdravljenje samo z vorikonazolom uspešnejše od kombiniranega zdravljenja z vorikonazolom in kaspofunginom. Ta študija je vključevala majhno število bolnikov in obe skupini bolnikov nista istočasno prejemale zdravljenje, kar je lahko vplivalo na rezultate študije (Sherif in Segal, 2010).

2.2 *Scedosporium* spp.

2.2.1 Rast in mikrobiologija

2.2.1.1 Makroskopske in mikroskopske značilnosti *Pseudallescheria boydii* oz. *Scedosporium apiospermum*

Kolonije *P. boydii* hitro rastejo na Sabouradovem agarju pri 25 °C. Gliva lahko raste tudi pri 37 °C in celo pri 42 °C. Poleg tega lahko raste pri nizkih koncentracijah kisika in celo v striktno anaerobnih pogojih. Gliva lahko asimilira ureo, asparagin, kalij, nitrat in amonijev nitrat. Večina izolatov bolje tolerira magnezijev klorid (5 %) kot natrijev klorid. *P. boydii* je proteolitična in amilolitična plesen. Vrsta lahko asimilira glukozo, ne more pa asimilirati laktoze ali maltoze. Študije o potrebah po ogljikovih hidratih in sporulaciji *P. boydii* so pokazale, da so ti organizmi sposobni asimilirati manitol, maltozo in laktozo ter da lahko rastejo na gojiščih, ki vsebujejo do 8 mg/ml cikloheksamida (Cortez in sod., 2008).

P. boydii tvori puhaste kolonije, ki izgledajo drugače na površini kot na dnu gojišča. Na površini so kolonije bele barve in sčasoma postanejo temno sive ali dimasto rjave barve. Na nasprotni strani oz. na dnu gojišča pa so blede barve z rjavo črnimi predeli. Čeprav so kolonije temno obarvane zaradi pigmentov ali produkcije rjavih konidijev, so hife transparentne. Barvanje po Fontana-Masson-u za dokazovanje prisotnosti melanina, da negativen rezultat. Na gojišču so kolonije manj pigmentirane. V primeru večletne rasti

kolonij na agarju postanejo umazano bele barve in imajo nekoliko puhasto, krznu podobno površino, saj ne tvorijo več konidijev (Cortez in sod., 2008).

Pseudallescheria (teleomorf) je homotalična gliva. Številni izolati tvorijo na revnih gojiščih (npr. koruzni agar, krompir-korenčkov agar in vodnemu agarju) rjave kleistotecije (v premer merijo 100-300 μm). Sevi izolirani iz kliničnega materiala redko tvorijo spolne, reproduktivne strukture in za tvorbo kleistotecijev je potrebna 2-3 tedenska inkubacija. Aski so nepravilno kroglaste do kroglaste oblike in vsebujejo 8 askospor. Askospore so enocelične, ovalne do elipsoidne oblike, blede rumeno-rjave do bakrene barve in običajno velike $4-5 \times 7-9 \mu\text{m}$. Kleistotecij nima priveskov ali ostiol (Cortez in sod., 2008).

Scedosporium kot anamorf je skoraj vedno prisoten. Zanj so značilne septirane, brezbarve, cilindrične hife (2 do 4 μm), iz katerih zrastejo kondiogene celice. Med kondiogenezo se tvorijo ovalni, lepljivi, anelidni konidiji. Za *Graphium* spp. je značilen pokončen, olivno zelen-rjav šop hif. Konidiogeneza poteka podobno kot pri *Scedoporum*, le da so celice manjše in kondiji tanjši in slabše pigmentirani. Prevladujoča anamorfna oblika je *Scedosporium*. Kondiji (4 do 7 $\mu\text{m} \times$ 5 do 12 μm *S. apiospermum* in *G. eumorphum*) so enocelični in ovalne oblike. Pri bazi so značilno skrajšani (Cortez in sod., 2008).

2.2.1.2 Makroskopske in mikroskopske značilnosti *Scedoporum prolificans*

Kolonije *S. prolificans* na Sabouraudovem agarju pri 25 °C rastejo z zmerno hitrostjo do hitro. Zorijo do 5 dni. V enem tednu lahko zrastejo do 3 cm kolonije. Kolonije so ploske in imajo usnju podobno, vlažno površino. Kolonije so bele barve in kasneje postanejo rjavo olivno-sive do črne barve. Na spodnji strani gojišča so kolonije temno rjave barve. *S. prolificans* slabše raste na obogatenem agarju in ne raste na gojiščih, ki vsebujejo cikloheksamid. V nasprotju s *S. apiospermum* lahko *S. prolificans* lahko raste pri 45 °C in nima znanega teleomorfa (Cortez in sod., 2008).

Mikroskopske značilnosti *S. prolificans* sta prvič opisala Malloch in Salkin (1984) pri pediatričnemu bolniku z osteomielitosom. Takrat je bila gliva znana kot *Scedosporium inflatum*. Identifikacija *S. prolificans* in razlikovanje od *S. apiospermum* temelji na morfoloških značilnostih konidiogenih celic v kulturi. Za *S. prolificans* so značilne septirane brezbarvne hife in bazalno zadebeljene, stekleničasto oblikovane konidiofore, iz

katerih izraščajo enoceličnih konidiji. Kondiji so brezbarvni do blede rjavo obarvani, veliki 2 do 5×3 do 13 μm (povprečje 3,4 do 5,3 μm). Poleg tega lahko nekateri izolati tvorijo okrogle konidije s tanko steno, ki izhajajo direktno iz hife (Cortez in sod., 2008).

2.2.2 Klinične manifestacije

Okužbe s *Pseudallescheria boydii* (*S. apiospermum*) kot tudi s *S. prolificans* naj bi bile povezane s štirimi različnimi kliničnimi stanji. Ta klinična stanja, so (Cortez in sod., 2008):

- micetom, ki je najpogostejša podkožna okužba;
- saprofitna kolonizacija dihalnih poti predvsem pri bolnikih z bronhiektazo;
- lokalizirane okužbe obnosnih sinusov, pljuč in zunajpljučne okužbe;
- diseminirane okužbe.

2.2.2.1 Saprofitna kolonizacija dihalnih poti

V primeru poškodbe sluznice ali prisotnosti votlin v pljučih, ki so posledica drugih bolezni pljuč (bronhiektaza, kronična obstruktivna bronhopulmonarna bolezen, tuberkuloza, cistična fibroza, Jobov sindrom itd.) je kolonizacija dihalnih poti lahko trajna. Najpogostejši dejavniki tveganja za kolonizacijo in nastanek glivnega klobčiča so tuberkuloza, sarkoidoza in predhodne bakterijske okužbe, ki povzročijo nastanek cist in pljučnih vdolbinic. Glivne klobčiče lahko opazimo tudi znotraj pljučnih votlin pri imunsko odpornih gostiteljih, medtem ko za invazivno boleznijo zbolijo samo imunsko oslabljeni bolniki. V primeru saprofitne kolonizacije nekateri bolniki nimajo nobenih ali imajo minimalne simptome, medtem ko pri drugih bolnikih pride do alergijske reakcije na prisotnost glive (Cortez in sod., 2008).

P. boydii in *Scedosporium* spp. lahko tvorijo glivne klobčiče, ki jih radiološko težko razlikujemo od aspergiloma. Čeprav glivne klobčiče najpogosteje najdemo v pljučih in sinusih, so lahko prisotni tudi v drugih organih in njihove histološke lastnosti se lahko razlikujejo glede na prizadeti organ (Cortez in sod., 2008).

P. boydii povezujejo z alergijsko bronhopulmonarno mikozo (ABPM). Klinične značilnosti ABPM so astma, vnetje pljuč, sistemska ali pljučna eozinofilija in povišane vrednosti protiteles IgG in IgE v serumu. Ostale značilnosti vključujejo Th2 imunski odziv, prisotnost precipitirajočih protiteles proti glivi, tvorba sluzi in metaplazija čašastih celic. V različnih fazah bolezni se lahko pojavi pljučna fibroza in remodelacija tkiva. Slednje je značilno za vse oblike ABPM ne glede na vrsto glive, ki povzroča bolezen. V literaturi so bili do sedaj opisani le 3 primeri ABPM zaradi plesni iz rodu *Scedosporium* (Cortez in sod., 2008).

2.2.2.2 Lokalizirane okužbe

Lokalizirane okužbe delimo na okužbe sinusov in pljuč ter zunajpljučne okužbe.

Najpogostejši klinični znak in simptom okužb sinusov in pljuč, ki jo povzročajo *Scedosporium* spp., je povišana telesna temperatura (76-100 %). Drugi pogosti simptomi so težko dihanje in plevritična bolečina v prsih. V številnih člankih so bile opisane klinične manifestacije pljučnih okužb, ki jih povzročajo *P. boydii*, *S. apiospermum* in *S. prolificans*. Simptomi značilni za okužbe pljuč so vročina, kašljanje, krvav izmeček oz. hemoptiza in nenormalni zvoki dihanja. Preden je potrjena diagnoze pljučnice, ki jo povzročajo plesni iz rodu *Scedosporium*, se bolezen pri mnogih bolnikih razširila že na kožo. Zgoraj omenjene manifestacije se lahko pojavilo v obliki makulopapularnega izpuščaja ali nodularnih sprememb, ki se lahko razširijo in postanejo nekrotične (Cortez in sod., 2008).

Pseudallescheria boydii in *S. prolificans* lahko povzročata druge lokalizirane okužbe, kot so okužbe kože, ki so običajno posledica lokalne inokulacije glive v kožna in podkožna tkiva pri posameznikih z določeno stopnjo imunske pomanjkljivosti (npr. zdravljenje s steroidi, imunosupresivno zdravljenje). Okužbe kože, ki jih povzročajo *Scedosporium* spp., lahko posnemajo okužbe, ki jih povzročajo *Aspergillus* spp. Opisani so tudi primeri lokalizirane bolezni kože pri imunsko oslabljenih posameznikih, ki jo povzroča *S. apiospermum* oz. *P. boydii* (Cortez in sod., 2008).

2.2.3 Laboratorijska diagnostika

2.2.3.1 Odvzem kužnine

Diagnostika kolonizacije in okužb dihal s *Scedosporium* spp. temelji na osamitvi in identifikaciji gliv iz izmečka, trahealnega izločka, BAL in pljučnega tkiva. Zbrane kužnine iz dihal je potrebno čimprej po odvzemu transportirati v laboratorij in jih nacepiti na ustrezna gojišča (najkasneje 3 ure po transportu vzorca) (Horré in Marklein, 2009; Horrér in sod. 2009).

2.2.3.2 Osamitev

Plesni iz rodu *Scedosporium* je težko osamiti na standardnih mikoloških gojiščih, saj jih pogosto prerastejo hitro rastoče glive, najpogosteje vrste iz rodu *Aspergillus* (Blyth in sod., 2010). Za osamitev *Scedosporium* spp. iz vzorcev dihal je primeren agar SceSel+. V primeru agarja SceSel+ je zaradi odsotnosti ravnih dejavnikov (npr. kri) in dodatka antibiotikov (kloramfenikol, ciprofloksacin in streptomycin sulfat) inhibirana rast bakterij. Hitro rastoče hifomicete (običajno *Aspergillus fumigatus*) so inhibirane z dodatkom benomila in na benomil odporne zigomicete so inhibirane z dodatkom diklorana (Rainer in sod., 2008; Horrér in Marklein, 2009; Horrér in sod., 2009).

2.2.3.3 Serološke preiskave

Okužbe, ki jih povzročajo vrste iz rodu *Scedosporium* lahko odkrijemo s CIE elektroforezo, vendar lahko pri tem pride do navzkrižnih reakcij z antigeni drugih gliv (npr. *Aspergillus* spp.). Pinto in sod. (2001) so izolirali peptidopolisaharid, ki je peptidoramnomananski antigen iz micelijskih oblik *P. boydii*. Avtorji študije so dokazali, da so ti antigeni podobni peptidosaharidom *Sporothrix schenckii*, ne reagirajo navzkrižno s peptidosaharidi in se razlikujejo od glavnih glikokonjugatov plesni iz rodu *Aspergillus*. Zato je mogoče, da bodo v prihodnosti peptidoramnomanan uporabili za razvoj diagnostičnega antigeneskega testa za dokazovanje *P. boydii* (Cortez in sod., 2008).

2.2.3.4 Molekularna diagnostika

Za razlikovanje med sevi in identifikacijo možnih virov okužbe z vrstami iz rodu *Scedosporium* so v literaturi opisane naslednje genotipizacijske molekularne tehnike (Harun in sod, 2009):

- multilokusna encimska elektroforeza (MLEE);
- tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA (RAPD);
- PCR fingerprinting;
- med-mikrosatelitski PCR (ISSR-PCR);
- polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (RFLP);
- polimorfizem dolžine pomnoženih fragmentov (AFLP);
- tipizacija zaporedij multiplih lokusov (MLST).

2.2.4 Zdravljenje okužb s *Scedosporium* spp.

2.2.4.1 Amfotericin B

Polien amfotericin B je v preteklosti veljal za zlati standard zdravljenja življenja ogrožajočih glivičnih okužb. Klinično uporabnost amfotericina B omejuje njegova relativno šibka protiglivična aktivnost proti vrstam iz rodu *Scedosporium*. Vrednosti MIC₅₀ (minimalna inhibitorna koncentracija antimikotika, pri kateri antimikotik inhibira 50 % izolatov) za glivi *Scedosporium apiospermum* in *Scedosporium prolificans* znašata 2-4 µg/ml in 8- >16 µg/ml. Klinični pomen amfotericina B je omejen zaradi njegovih stranskih učinkov, ki so povezani z deoksiholatno formulacijo. Zaradi manjše toksičnosti lipidnih oblik amfotericina B so povečali njegovo odmerje, da bi s tem povečali učinkovitost zdravljenja. Slednje se je izkazalo za dokaj uspešno v primeru miši z invazivno scedosporiozo, ki jo je povzročila *Scedosporium prolificans*. V študiji AmbiLoad so ugotovili, da ima zdravljenje s povečanimi odmerki amfotericina B toksični učinek na ledvice in je povezano s slabšim preživetjem bolnikom (Wiederhold in Lewis, 2009).

2.2.4.2 Inhibitorji biosinteze sterolov

Substance kot so azoli (npr. ketokonazol, flukonazol in itrakonazol) in terbinafin imajo minimalno protiglivično aktivnost proti izolatom *Scedosporium apiospermum* in *Scedosporium prolificans*. Novejše substance, ki vključujejo klinično dostopne triazole (vorikonazol in poskonazol) in preizkusne substance (albakonazol, ravukonazol in izavukonazol) so bolj učinkovite proti *Scedosporium apiospermum* kot starejši predstavniki te skupine antimikotikov, medtem ko so manj učinkovite proti *S. prolificans*. V nasprotju s tem albakonazol deluje proti *S. prolificans*, in sicer njegov MIC₅₀ znaša 0,125-4 µg/ml. Izmed klinično dostopnih azolov je najbolj učinkovit vorikonazol, katerega MIC₅₀ v primeru *S. apiospermum* je znašala 0,125-1 µg/ml in v primeru *S. prolificans* pa 2- >8 µg/ml. Dobro *in vitro* aktivnost proti filamentoznim glivam, vendar manjšo kot vorikonazol, ima poskonazol, saj se je zdravljenje z njim učinkovito tako, pri živalskih modelih kakor tudi pri bolnikih z invazivno scedosporizo. Aktivnost omenjenih substanc naj bi bila odvisna od testiranih vrst, saj je *P. boydii* kompleks vrst. Ko so testirali odpornost novo opisanih vrst kompleksa *P. boydii* proti antimikotikom, se je za najbolj učinkovitega izkazal vorikonazol (MIC₅₀ je 0,5-1 µg/ml), medtem ko je bila aktivnost poskonazola in ravukonazola različna. Potrebne so še nadaljnje študije, izvedene na velikemu številu izolatov, ki bodo potrdile te rezultate. Vorikonazol in poskonazol nimata fungicidnega učinka na vrste iz rodu *Scedosporium* (Wiederhold in Lewis, 2009).

2.2.4.3 Ehinokandini

Raziskave so pokazale, da lahko ehinokandini zmanjšajo produkcijo polisaharida β-1,3-glukana v celični steni ter preko nekompetitivne inhibicije glukana sintaznega kompleksa preprečijo rast *S. apiospermum* in *S. prolificans*. Študije so pokazale zelo raznoliko aktivnost ehinokandinov, saj znaša MIK za caspofungin in anidulafungin proti *S. apiospermum* 0,2-16 µg/ml, proti *S. prolificans* pa 4-16 µg/ml. MIK micafungina za obe vrsti znaša 0,25- >32 µg/ml. Ta raznolika aktivnost je lahko posledica slabe standardizacije. Za ehinokandine je značilen edinstven vzorec inhibicije rasti filamentoznih gliv. Kot je bilo prikazano v primeru vrst iz rodu *Aspergillus*, se β-1,3

glukan sintazni kompleks nahaja na rastočih, apikalnih koncih filamentoznih gliv. Mikroskopske študije so pokazale, da izpostavitvev gliv ehinokandinu inhibira sintezo β -1,3 glukana na teh mestih, kar povzroči nenormalno rast hif. Podobne morfološke učnike so opazili pri plesnih iz rodu *Scedosporium* (Wiederhold in Lewis, 2009).

2.2.4.4 Kombinirano zdravljenje

Zaradi slabe *in vitro* učinkovitosti antimikotikov proti vrstam iz rodu *Scedosporium* in visoke stopnje smrtnosti, povezane z invazivnimi okužbami, ki jih povzročajo omenjene glive, so številne študije testirale učinkovitost kombinacije različnih zdravil z namenom povečanja protiglivične aktivnosti. V primeru zdravljenja živali z IA s kombinacijo azolov in polienov niso opazili antagonističnega delovanja proti vrstam iz rodu *Scedosporium*. V eni od študij so bile opisane sinergistične interakcije (posledica dodatka substance) proti 16 od 22 izolatov *Pseudallescheria boydii*, ko so bili le-ti simultano izpostavljeni amfotericinu B, mikonazolu (azol) in itrakonazolu ali flukonazolu. Podobno so *in vitro* študije, v katerih so uporabili kombinacijo različnih antimikotikov, ki so delovali na različne stopnje biosinteze sterola, pokazale sinergistično in aditivno delovanje proti vrstam iz rodu *Scedosporium* (vključno s *S. prolificans*). Obstaja le malo kliničnih podatkov, ki podpirajo uporabo kombiniranega protiglivičnega zdravljenja pri scedosporiozi (Wiederhold in Lewis, 2009).

2.3 HOMOGENIZACIJA IN MUKOLITIKI

2.3.1 Homogenizacija

Homogenizacija je postopek, kjer ob obdelavi nehomogeniziranega vzorca z mukolitičnim sredstvom dobimo homogeniziran vzorec. Glede na način delovanja ločimo kemijsko in mehansko homogenizacijo. Za mehansko homogenizacijo (npr. VirTris homogenizacija) je značilno, da ne poškoduje proteinov, peptidov in encimov, medtem ko pri kemijskem načinu homogenizacije (npr. homogenizacija s tripsinom ali kimotripsinom) pride do cepitve peptidnih vezi v vzorcu, kar uniči proteine in peptide (Rogers, 2007).

Hoppe in sod. (1996) so poskušali ugotoviti kakšen vpliv imajo kemična in mehanska homogenizacija ter njuna kombinacija na osamitev bakterij in gliv iz izmečka bolnikov s cistično fibrozo. Raziskavo so izvedli tako, da so na gojišča nacepili najprej neobdelan in nato obdelan oz. homogeniziran izmeček. Ugotovili so, da nobena izmed treh metod homogenizacije (kemična, mehanska in njuna kombinacija) ni bistveno vplivala na osamitev bakterij in gliv, kar je v skladu z rezultati predhodnih študij. Pri tem je potrebno tudi poudariti, da bolniki, ki so bili vključeni v študijo, redno prejemale fizioterapijo in inhalirali mukolitичne agense, kar je verjetno vplivalo na rezultate študije. V nasprotju s tem, so v študiji, ki so jo izvedli Maduri-Traczewski in sod. (1986), iz homogeniziranih vzorcev so osamili večje število izolatov *Pseudomonas aeruginosa* kot iz nehomogeniziranih.

2.3.2 Mukolitiki

Mukolitike uvrščamo med ekspektoranse, to so zdravila oz. snovi, ki omogočajo lažje in hitrejše izkašljevanje. Ekspektoranse glede na mehanizem delovanja delimo na (Rogers, 2007):

- sekretolitike, ki povečajo sekrecijo in zmehčajo izločke pri vnetjih dihal in s tem olajšajo izkašljevanje;
- sekretomotorike, ki pospešijo premikanje izločka in olajšajo izkašljevanje;
- mukolitike, reducirajo oz. zmanjšajo viskoznost sluzi in se uporabljajo za lažje izkašljevanje izmečka.

Mukolitiki, ki se uporabljajo za homogenizacijo oz. utekočinjanje sputuma v laboratoriju, so (Rogers, 2007):

- ditiotreitol (DDT), ki ne povzroča sprememb v morfologiji celic in mikroflora v citoloških vzorcih;
- N-acetilcistein (NAC), ki cepi disulfidne vezi mukoproteinov izločka in s tem zmanjša njegovo viskoznost;
- pankreatin;
- amilaze;
- pankreatin-tripsin;

- natrijev 2-etilheksil sulfat (Hammerschlag in sod., 1980);
- N-acetil-L-cistein (NALC) (Forbes in sod., 2002).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 ŠTEVILO PREISKOVANCEV

V petih mesecih smo zbrali 204 vzorcev iz spodnjih dihal (izmečke, trahealne izmečke, bronhoaleoarne lavaže in aspirate bronha), ki so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko glivičnih okužb in/ali v Laboratorij za diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani na rutinsko preiskavo na patogene glive in/ali bakterije.

V času raziskave smo obdelali 204 kužnin od tega 15 (7,4 %) aspiratov bronha, 78 (38,2 %) trahealnih aspiratov, 1 (0,5 %) bronhoalveoarni lavaž in 110 (53,9 %) izmečkov (preglednica 1).

Preglednica 1: Vrsta, število in delež vzorcev, vključenih v raziskavo

Vrsta vzorca	Število (%) obdelanih vzorcev
Aspirat bronha	15 (7,4)
Trahealni aspirat	78 (38,2)
Bronhoalveoarni lavaž	1 (0,5)
Izmeček	110 (53,9)
Skupaj	204 (100)

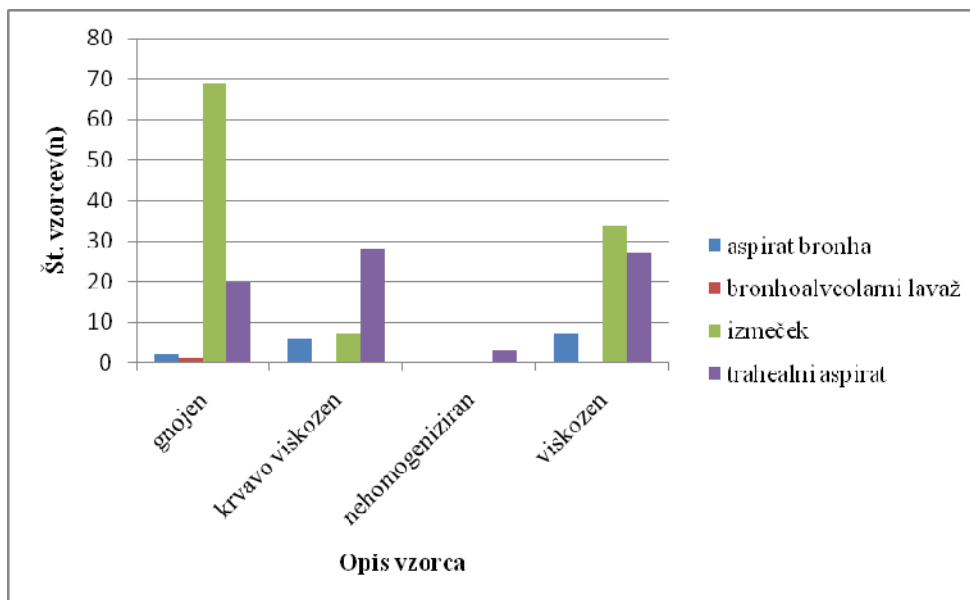
Od 204 kužnin iz spodnjih dihal smo obdelali 92 (45,1 %) gnojnih, 41 (20,1 %) krvavo viskoznih, 3 (1,5 %) nehomogene in 68 (33,3 %) viskoznih vzorcev (preglednica 2).

Preglednica 2: Število in delež kužnin iz spodnjih dihal glede na vrsto in makroskopski izgled, vključenih v raziskavo

Opis vzorca	Število (%) vzorcev				
	AB	AT	BAL	SP	Skupaj
Gnojen	2 (13,3)	20 (25,6)	1 (100)	69 (62,7)	92 (45,1)
Krvavo viskozen	6 (40,0)	28 (35,9)	0 (0)	7 (6,4)	41 (20,1)
Nehomogen	0 (0)	3 (3,8)	0 (0)	0 (0)	3 (1,5)
Viskozen	7 (46,7)	27 (34,6)	0 (0)	34 (30,9)	68 (33,3)
Skupaj	15 (100)	78 (100)	1 (100)	110 (100)	204 (100)

Legenda: AB-aspirat bronha, AT- trahealni aspirat, BAL-bronhoalveolarni lavaž, SP-izmeček

Število posameznih vzorcev je prikazano na sliki 1.



Slika 1: Število in opis kužnin iz spodnjih dihal (n=204)

3.2 MATERIALI

Za ugotavljanje učinkovitosti homogenizacije kužnin z ditiotreitolum (DDT) pri mikološki preiskavi kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili:

- kužnine (izmečke in trahealne aspirate bolnikov);
- delovno raztopino ditiotreitola (Sputasol, Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija);
- Sabouraudov agar ali trdno gojišče po Sabouraudu (SABA);
- barvilo kalkofluor belo (Calcofluor White Reagent Droppers, Beckton Dickinson, Sparks, ZDA).

Za vrednotenje mikroskopskih preparatov in učinkovitosti homogenizacije kužnin z ditiotreitolum kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili:

- kužnine (izmečke, trahealne aspirate, aspirate bronha in bronhoalveolarne lavaže bolnikov);
- barvilo kalkofluor belo (Calcofluor White Reagent Droppers, Becton, Dickinson and Company, ZDA);
- fluorescenčni mikroskop Nikon N600 (Nikon, Tokyo, Japonska).

Za osamitev plesni iz kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili:

- kužnine (izmečke, trahealne aspirate, aspirate bronha in bronhoalveolarne lavaže);
- Sabouraudov agar;
- pol-selektivno gojišče SceSel+ za osamitev plesni *Scedosporium* spp. (preglednica 3) (Horré in Marklein, 2009; Horrre in sod., 2009).

SceSel+ plošče smo pripravili po postopku, ki so ga opisali Rainer in sod. (2008). Rast vrst iz rodu *Pseudallescheria* ali *Scedosporium* smo potrdili z osamitvijo enega seva *Scedosporium prolificans* (CBS 467,74, tipski sev *Lomentospora prolificans*) in enega seva *P. boydii* (CBS 101,22 tipa seva glive *Allescheria boydii*), da ne bi prišlo do napake pri detekciji omenjenih gliv zaradi napake pri pripravi agarja SceSel+ (Horré in Marklein, 2009). Do uporabe smo plošče inkubirali pri 7 ± 1 °C največ 2 tedna. Po inokulaciji kliničnega materiala na plošče, smo le-te inkubirali pri 30 ± 1 °C za 28 do 30 dni. Plošče smo pregledovali na rast gliv vsake 2-3 dni (Horré in Marklein, 2009; Horrre in sod., 2009). V primeru, da je prišlo do rasti hifomicet, smo glive čimprej identificirali s pomočjo morfoloških in fizioloških kriterijev, ki so objavljeni v Atlasu medicinsko pomembnih gliv (angl. Atlas of Clinical Fungi) (Horré in Marklein, 2009).

Za ugotavljanje ustreznosti selektivnega gojišča SceSel+ smo uporabili :

- sev CBS 101,22 *Pseudallescheria boydii*
- sev CBS 467,74 *Scedosporium prolificans*

Preglednica 3: Sestava selektivnega agarja SceSel+

Sladni ekstrakt	6,25 g
Maltoza	6,25 g
KH₂PO₄	1,25 g
Kvasni ekstrakt	1,0 g
Mg₂SO₄ × 7H₂O	0,625 g
Sojin pepton	0,625 g
Kloramfenikol	0,1 g
Ciprofloksacin	0,1 g
Streptomicin sulfat	0,1 g
Dikloran	2 mg
Benomyl	6 mg
Agar	20,0 g
Destilirana voda	983 ml

3.3 METODE

V raziskavo smo vključili 204 kužnine iz spodnjih dihal (izmečke, trahealne aspirate bronhoalveolarne lavaže in aspirate bronha), ki so bile v času raziskave poslane v Laboratorij za diagnostiko glivičnih infekcij in/ali v Laboratorij za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani na rutinsko preiskavo na glive in/ali patogene bakterije. V preiskavo smo vključili le mikroskopsko ustrezne vzorce. Vzorec je bil opredeljen za ustreznega, kadar je bilo pri 100-kratni povečavi mikroskopa Nikon N600 vidnih več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov in manj kot 10 ploščatih epitelnih celic (York, 2004; Tomič in Seme, 2003).

Za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom smo izbrali tiste vzorce, ki jih je bilo količinsko vsaj 1 ml in za katere smo makroskopsko ocenili, da so nehomogeni, viskozni (sluzni), gnojni ali krvavi.

3.3.1 Postopek obdelave kužnin iz spodnjih dihal

Kužnine, ki so ustrezale kriterijem za vključitev v raziskavo, smo nacepili na določena mikološka gojišča in izdelali preparat, ki smo ga pobarvali s kalkofluor belim. Zaradi konzistence nehomogeniziranih vzorcev nismo mogli zagotoviti uporabe enakih količin (volumna) nehomogeniziranega in homogeniziranega vzorca za pripravo razmazov in nacepitev kužnin na gojišča. Pri viskoznih vzorcih je namreč natančna volumska odmera vzorca nemogoča. Šele homogenizacija omogoči natančno volumsko odmerjanje vzorca.

3.3.1.1 Priprava razmazov nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih s kalkofluor belim (CFW)

Iz vzorca iz spodnjih dihal smo naredili razmaz. S sterilnim vatiranim brisom smo nehomogenizirano kužnino v obliki tanke plasti nanesli in razmazali po objektnem stekelcu. Tako pripravljen razmaz smo posušili, fiksirali s kemijskim sredstvom metanolom in ga nato obarvali s kalkofluor belim. Fiksiran preparat smo prelili z barvilom za 2 minuti. Po pretečenemu času smo barvilo odlili in preparat posušili. Vse tako pobarvane razmaze nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal smo pregledali s fluorescenčnim mikroskopom Nikon N600 pri 200-kratni, 400-kratni in 1000-kratni povečavi in ugotavljali prisotnost hif.

3.3.1.2 Nacepitev nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča

S sterilnim vatiranim brisom smo nehomogenizirani izmeček ali trahealni aspirat nacepili na Sabouraudov agar (SABA) in SceSel+. Sabouraudov agar smo inkubirali 14 dni pri 36 ± 1 °C, medtem ko smo selektivno gojišče SceSel+ inkubirali 14 dni pri 30 ± 1 °C. Zrasle plesni smo identificirali na podlagi mikroskopskih in makroskopskih lastnosti.

3.3.1.3 Priprava delovne raztopine ditiotreitola

Za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili sterilni komercialno dostopni pripravek ditiotreitola Sputasol (Oxoid). Za obdelavo kužnin smo uporabili delovno raztopino koncentracije 1 mg/ml, ki je obstojna 48 ur pri 2-8 °C. Glede na število vzorcev za homogenizacijo smo delovno raztopino ditiotreitola običajno pripravili tako, da smo 1,9 ml ditiotreitola aseptično dodali 23,1 ml sterilne destilirane vode in mešanico dobro premešali.

3.3.1.4 Homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolum (DDT)

Vse kužnine, ki so ustrezale kriterijem za vključitev v raziskavo, smo homogenizirali z DDT, in sicer tako, da smo po standardnem postopku obdelave kužnin iz spodnjih dihal vzorcu, ki je ostal, s pipeto aseptično dodali enak volumen delovne raztopine DDT, dobro premešali in pustili delovati 15 minut pri sobi temperaturi (Hammerschlag in sod., 1980; HPA, 2008). Po pretečenem času smo homogenizirano kužnino iz spodnjih dihal ponovno dobro premešali in nato obdelali po ustaljenem protokolu mikološke preiskave.

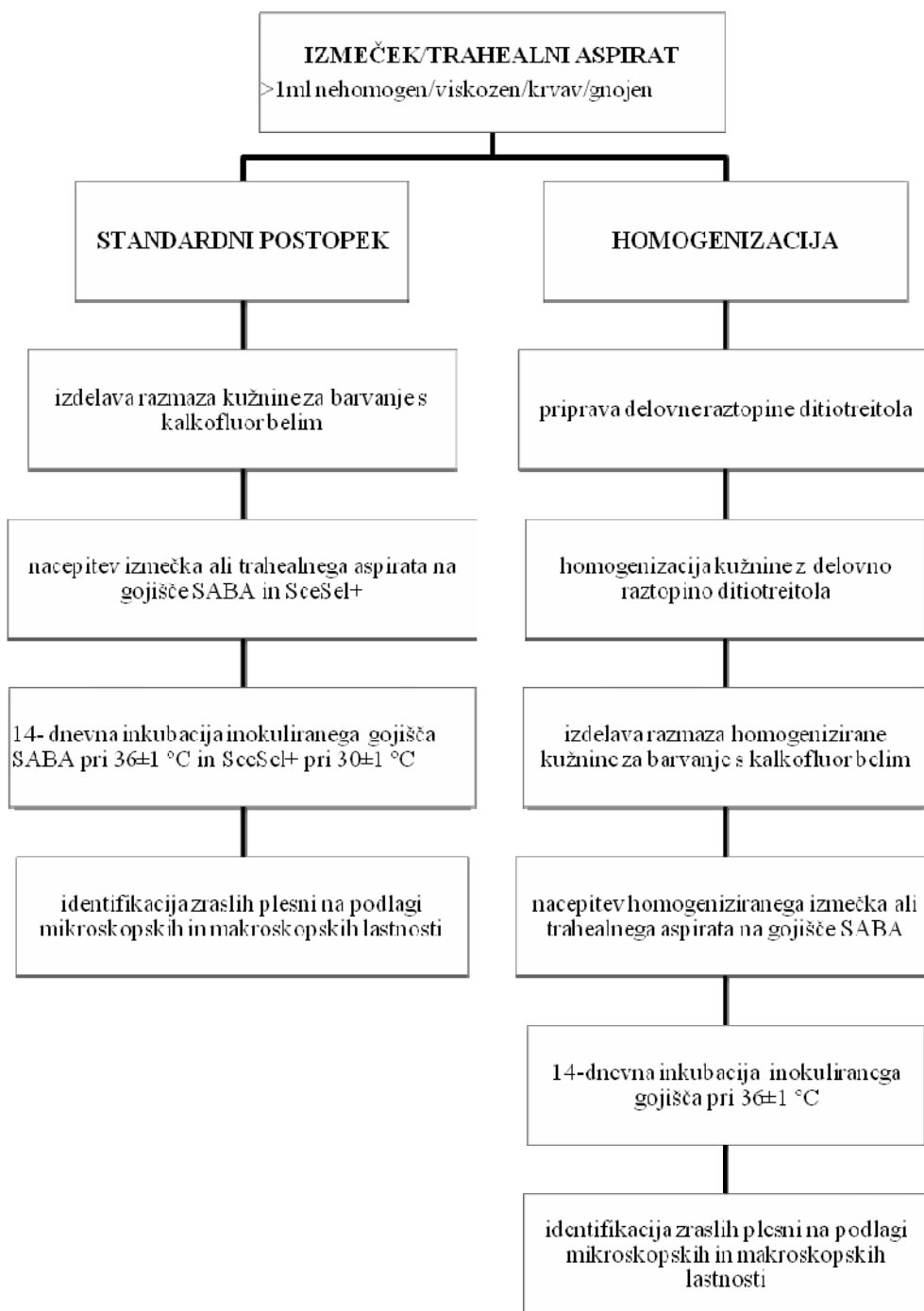
3.3.1.5 Priprava razmazov homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih s kalkofluor belim (CFW)

S sterilno pipeto smo eno kapljico homogenizirane kužnine iz spodnjih dihal nanесли na objektno stekelce in tanko razmazali. Tako pripravljen razmaz smo posušili, fiksirali z metanolom in ga po enakem standardnem postopku pobarvali s kalkofluor belim. Vse pobarvane razmaze homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal smo prav tako pregledali s fluorescenčnim mikroskopom Nikon N600 (Nikon) pri 200-kratni, 400-kratni in 1000-kratni povečavi in ugotavljali prisotnost hif.

3.3.1.6 Nacepitev homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča

Homogeniziran izmeček ali trahealni aspirat smo s sterilno pipeto aspetično nacepili na Sabouraudov agar. SABA smo inkubirali 14 dni pri 36 ± 1 °C. Zrasle plesni smo identificirali na podlagi mikroskopskih in makroskopskih lastnosti.

Shematski prikaz obdelave kužnin iz spodnjih dihal je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Shematski prikaz obdelave kužnin iz spodnjih dihal

3.3.1.8 Vrednotenje rezultatov

Pri primerjavi rezultatov, dobljenih iz razmazov nehomogeniziranih in homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, pobarvanih z kalkofluor belim, smo predvideli naslednje možnosti:

- prisotnost hif samo v razmazu homogenizirane kužnine, ne pa v razmazu nehomogenizirane kužnine;
- prisotnost hif v razmazu homogenizirane in nehomogenizirane kužnine.

Pri primerjavi rezultatov kultivacije nehomogeniziranih in homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal smo predvideli naslednje možnosti:

- enaka vrsta in število izolatov v homogenizirani in nehomogenizirani kužnini;
- rast plesni v homogenizirani kužnini in odsotnost rasti v nehomogenizirani kužnini.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI MIKOLOŠKIH PREISKAV

4.1.1 Osamitev plesni

4.1.1.1 Vpliv homogenizacije z ditiotreitolum na osamitev plesni iz kužnin iz spodnjih dihal

Prvih 100 kužnin iz spodnjih dihal smo po homogenizaciji z ditiotreitolum nacepili na Sabouraudov agar in izdelali razmaz, ki smo ga pobarvali s kalkofluor belim. Kot pozitivne kulture smo označili tiste, pri katerih smo osamili plesni, medtem ko kvasovk nismo identificirali. Ostalih 104 kužnin iz spodnjih dihal nismo obdelali s ditiotreitolum (izjema so vzorci bolnikov s cistično fibrozo), saj smo po začetni analizi rezultatov ugotovili, da se s homogenizacijo kužnin ni bistveno povečala učinkovitost osamitve plesni in gliv kvasovk.

Vrsta, število in delež plesni, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo, so prikazani v preglednici 4. Iz 50 homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov smo izolirali enako število in vrsto plesni. Plesen smo osamili samo iz 3 izmečkov, medtem ko je bila pri ostalih vzorcih rast odsotna. Izmed 50 nehomogeniziranih trahealnih aspiratov smo plesen osamili samo iz enega nehomogeniziranega trahealnega aspirata. Plesni nismo osamili iz nobenega homogeniziranega trahealnega aspirata.

Preglednica 4: Vrsta, število in delež plesni, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo (n=100)

Organizem	Število (%) izolatov, osamljenih iz vzorcev			
	Izmeček n=50		Trahealni aspirat n=50	
	Nehomogeniziran	Homogeniziran	Nehomogeniziran	Homogeniziran
<i>A. fumigatus</i>	1 (2,0)	1 (2,0)	1 (2,0)	0 (0)
<i>A. niger</i>	1 (2,0)	1 (2,0)	0 (0)	0 (0)
<i>Fusarium spp.</i>	1 (2,0)	1 (2,0)	0 (0)	0 (0)
RO	47 (94,0)	47 (94,0)	49 (98,0)	50 (100)
Skupaj	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)

Legenda: RO-rast odsotna

Iz 50 homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov smo osamili enako število gliv kvasovk. Iz 50 homogeniziranih in nehomogeniziranih trahealnih aspiratov smo tudi osamili enako število gliv kvasovk (preglednica 5).

Preglednica 5: Število in delež gliv kvasovk, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo (n=100)

Organizem	Število (%) gliv kvasovk, osamljenih iz vzorcev			
	Izmeček n=50		Trahealni aspirat n=50	
	Nehomogeniziran	Homogeniziran	Nehomogeniziran	Homogeniziran
Glive kvasovke	42 (84,0)	42 (84,0)	38 (76,0)	38 (76,0)
RO	8 (16,0)	8 (16,0)	12 (24,0)	12 (24,0)
Skupaj	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)

Legenda: RO-rast odsotna

Iz ostalih 104 kužnin iz spodnjih dihal smo osamili 22 plesni. Najpogosteje smo izolirali *Aspergillus fumigatus* (16,3 %). *Aspergillus fumigatus* smo izolirali iz 12 izmečkov, 4 trahealnih aspiratov in 1 aspirata bronha. *Aspergillus niger* smo izolirali iz enega izmečka in enega trahealnega aspirata. Iz 2 izmečkov smo osamili *Penicillium spp.* in iz enega izmečka smo izolirali *Scopulariopsis spp.* (preglednica 6).

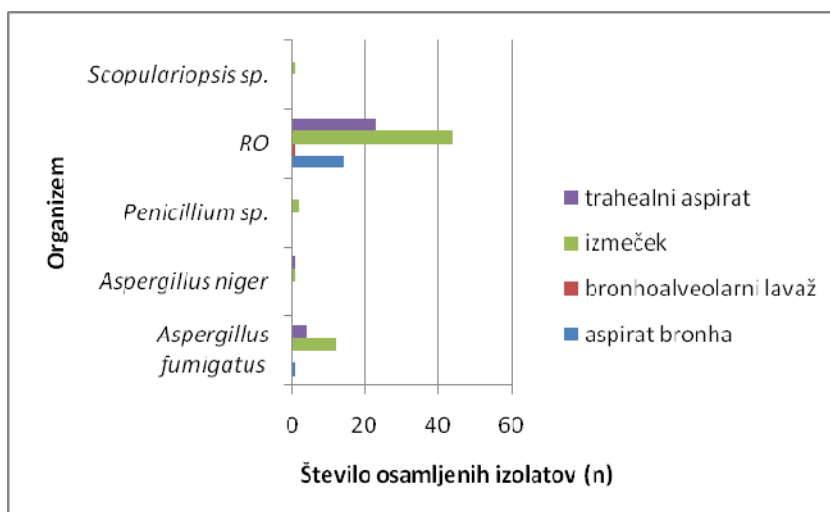
Preglednica 6: Število, delež in vrsta plesni, osamljenih iz 104 vzorcev*, vključenih v raziskavo

Izolati	Število (%) izolatov, osamljenih iz vzorcev				
	AB	AT	BAL	SP	Skupaj
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 (6,7)	4 (14,3)	0 (0)	12 (20,0)	17 (16,3)
<i>Aspergillus niger</i>	0 (0)	1 (3,6)	0 (0)	1 (1,7)	2 (1,9)
<i>Penicillium spp.</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (3,3)	2 (1,9)
<i>Scopulariopsis spp.</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,7)	1 (1,0)
RO	14 (93,3)	23 (82,1)	1 (100)	44 (73,3)	82 (78,8)
Skupaj	15 (100)	28 (100)	1 (100)	60 (100)	104 (100)

Legenda: AB-aspirat bronha, AT- trahealni aspirat, BAL-bronhoalveolarni lavaž, RO-rast odsotna, SP-izmeček; *-nehomogenizirani vzorci (izjema so vzorci bolnikov s CF)

Klinične značilnosti oseb, pri katerih smo osamili *A. fumigatus*, so prikazane v preglednici 7. Povprečna starost bolnikov je znašala 44 let. Večina oseb je bila ženskega spola (n=11, 64,7 %). *A. fumigatus* smo najpogosteje osamili iz izmečka (n=12, 70,6 %). *A. fumigatus* smo osamili pri šestih bolnikih s cistično fibrozo (35,3 %), pri treh bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (17,6 %), dveh bolnikih z rakavim obolenjem (11,8 %), pri enem bolniku z endokarditisom (5,9 %), enem bolniku s presajenimi jetri in eni bolnici s presajenim srcem (5,9 %). Pri dveh bolnikih niso bili dostopni podatki o diagnozi. Izmed 17 bolnikov, pri katerih smo osamili *A. fumigatus*, je bil pri 3 pozitiven galaktomananski test (17,6 %). Le pri treh bolnikih (bolniki št. 103, 104 in 175) smo pod fluorescenčnim mikroskopom opazili hife v razmazu nehomogenizirane kužnine. V ostalih kužninah hif v mikroskopskih preparatih nismo videli.

Število in vrsta plesni, osamljenih iz 104 nehomogeniziranih vzorcev (izjema so vzorci bolnikov s CF) iz spodnjih dihal je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Število in vrsta osamljenih plesni iz 104 nehomogeniziranih vzorcev (izjema so vzorci bolnikov s CF), vključenih v raziskavo

Preglednica 7: Klinične značilnosti oseb, pri katerih smo osamili *Aspergillus fumigatus*

Značilnost	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Število bolnikov, n	17
Povprečna starost	44
Spol, n (%)	
Moški	6 (35,3)
Ženske	11 (64,7)
Vrsta vzorca, n (%)	
Aspirat bronha	1 (5,9)
Trahealni aspirat	4 (23,5)
Izmeček	12 (70,6)
Diagnoza, n (%)	
Akutni miokardni infarkt	1 (5,9)
Cistična fibroza	6 (35,3)
Endokarditis	1 (5,9)
Kronična obstruktivna pljučna bolezen	3 (17,6)
Ni diagnoze	2 (11,8)
Presaditev jeter	1 (5,9)
Presaditev srca	1 (5,9)
Rakovo obolenje	2 (11,8)
Prisotnost hif v razmazu, n (%)	3 (17,6)
 Pozitiven galaktomanaski test, n (%)	3 (17,6)

Na sliki 4 je prikazana kultura *A. fumigatus*, osamljena iz izmečka bolnice št. 175.



Slika 4: Kultura *Aspergillus fumigatus* osamljena iz izmečka bolnice št. 175

4.1.1.2 Osamitev *Scedosporium* spp. iz kužnin iz spodnjih dihal

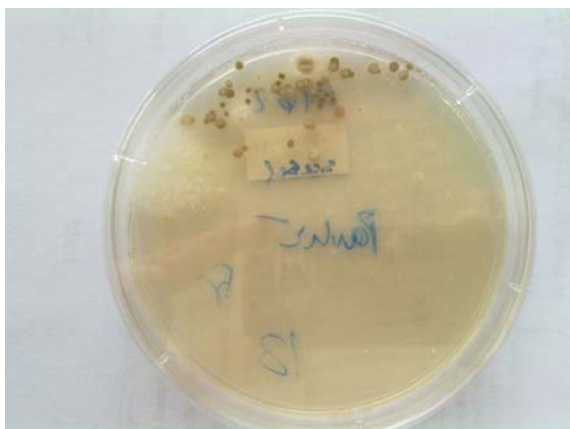
Izmed 204 kužnin iz spodnjih dihal ni iz nobene kužnine na selektivnem gojišču SceSel+ porasla plesen iz rodu *Scedosporium*. Le pri bolniku št. 137 smo iz izmečka osamili plesen *Scopulariopsis* spp., ki je porasla tudi na Sabouraudovem agarju (preglednica 8).

Preglednica 8: Število in delež plesni osamljenih na gojišču SceSel+ (n=204)

Organizem	Število osamljenih plesni na gojišču SceSel+
<i>Scopulariopsis</i> spp.	1 (0,5)
RO	203 (99,5)
Skupaj	204 (100)

Legenda: RO-rast odsotna

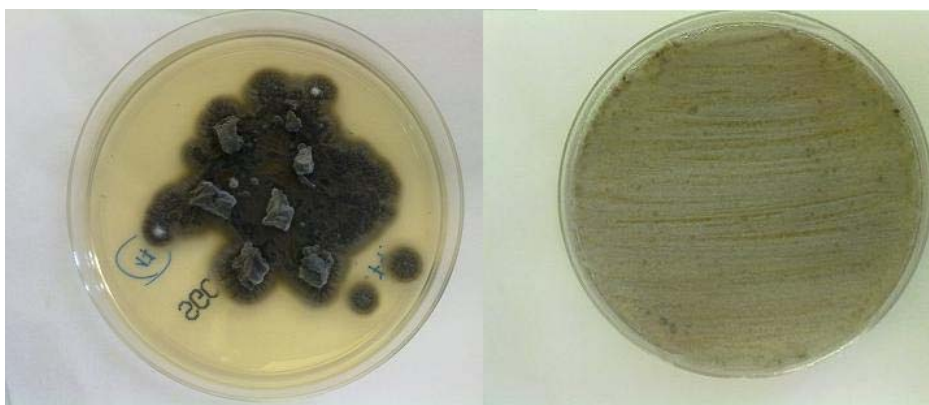
Plesen *Scopulariopsis* spp., ki smo jo osamili iz izmečka bolnika št. 137, je prikazana na sliki 5.



Slika 5: Kultura *Scopulariopsis* spp., osamljena iz izmečka bolnika št. 137



Slika 6: Makroskopski izgled tipskega seva CBS 101, 22 *Pseudallescheria boydii* (levo-na Sabouradovem agarju; desno-na selektivnem gojišču SceSel+)



Slika 7: Makroskopski izgled tipskega seva CBS 467,74 *Scedosporium prolificans* (levo-na Sabouradovem agarju; desno-na selektivnem gojišču SceSel+)

4.1.2 Mikroskopski pregled razmazov kužnin iz spodnjih dihal, pobarvanih s kalkofluor belim

Vse razmaze homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, smo obarvali s kalkofluor belim in jih pregledali s fluorescenčnim mikroskopom Nikon Eclipse N600 (Nikon) pod 400-kratno in 1000-kratno povečavo. Rezultate mikrobiološkega pregleda homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin smo med seboj primerjali. Ob mikroskopskem pregledu 100 nehomogeniziranih kužnin (50 izmečkov in 50 trahealnih aspiratov) nismo videli hif. Enako tudi ob mikroskopskem pregledu homogeniziranih kužnin nismo videli hif (preglednica 9). Le pri 5 bolnikih (bolniki št. 23, 24, 25, 26 in 61) smo ob pregledu mikroskopskem pregledu videli glive kvasovke, tako v razmazu homogenizirane kužnine kakor tudi v razmazu nehomogenizirane kužnine (preglednica 10).

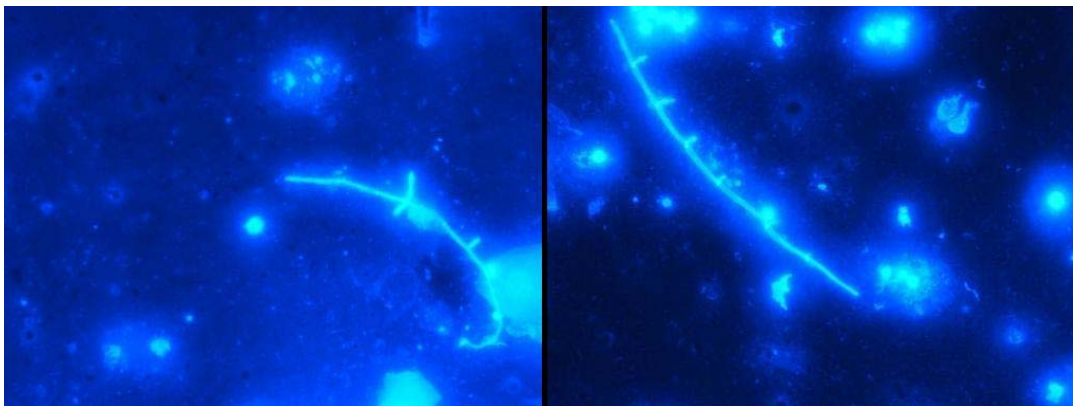
Preglednica 9: Prisotnost hif v razmazih homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, pobarvanih s kalkofluorbelim (n=100)

Prisotnost hif v razmazu	Število (%) vzorcev			
	Izmeček n=50		Trahealni aspirat n=50	
	Nehomogeniziran	Homogeniziran	Nehomogeniziran	Homogeniziran
Da	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ne	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)
Skupaj	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)

Preglednica 10: Prisotnost gliv kvasovk v razmazih homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, pobarvanih s kalkofluor belim (n=100)

Prisotnost kvasovk v razmazu	Število (%) vzorcev			
	Izmeček n=50		Trahealni aspirat n=50	
	Nehomogeniziran	Homogeniziran	Nehomogeniziran	Homogeniziran
Da	2 (4,0)	2 (4,0)	3 (6,0)	3 (6,0)
Ne	48 (96,0)	48 (96,0)	47 (94,0)	47 (94,0)
Skupaj	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)

Na sliki 8 so prikazane glive kvasovke v mikroskopskem preparatu razmaza homogenizirane in nehomogenizirane kužnine, obarvanega s kalkofluor belim.



Slika 8: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 63 pod 400-kratno povečavo (levo-nehomogeniziran trahealni aspirat in fluorescirajoče glive kvasovke; desno-homogeniziran trahealni aspirat in fluorescirajoče glive kvasovke)

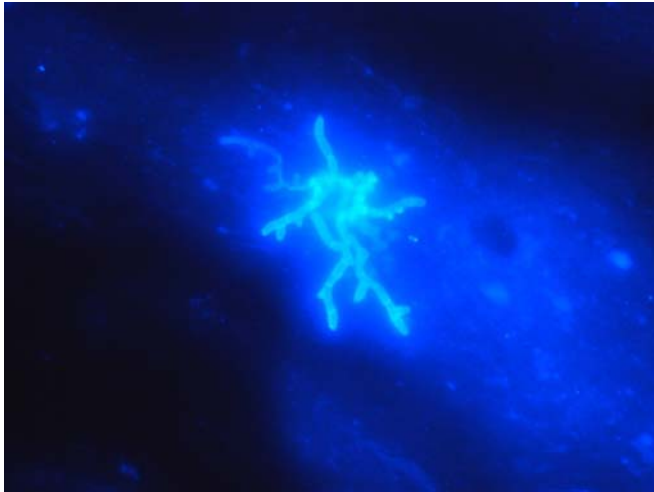
Ker se mikroskopski pregled homogeniziranih kužnin, obarvanih s kalkofluor belim, ni izkazal za bolj učinkovitega, v nadaljevanju raziskave kužnin nismo več obdelali z ditiotreitolum. Ob mikroskopskem pregledu nadaljnjih 104 nehomogeniziranih vzorcev, obarvanih s kalkofluor belim, so bile hife vidne le v 3 (2,9 %) vzorcih, ki so bili odvzeti 3 različnim bolnikom (preglednica 12).

V nadaljevanju so podrobneje opisani vsi 3 primeri bolnikov, pri katerih smo videli hife v razmazu.

Preglednica 11: Prisotnost hif v razmazih nehomogeniziranih kužnin (izjema so bolniki s CF), ki so bile odvzete 104 bolnikom

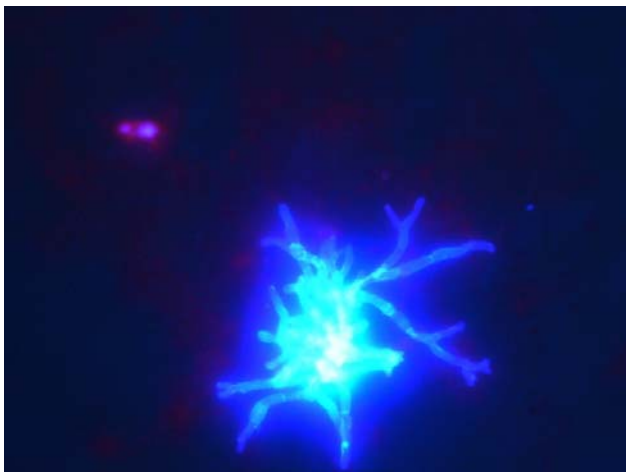
Prisotnost hif v preparatu	Število (%) razmazov
Da	3 (2,9)
Ne	101 (97,1)
Skupaj	104 (100)

Pri mikroskopskem pregledu nehomogeniziranega izmečka bolnika št. 103 smo pod 400-kratno povečavo videli modro fluorescirajoče hife (slika 9). Iz nehomogeniziranega vzorca smo na Sabouraudovem agarju osamili *A. fumigatus*. Bolniku smo kasneje potrdili prisotnost galaktomananskega antigena. Bolnik je prejemal antibiotike za zdravljenje endokarditisa.



Slika 9: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 103 pod 400-kratno povečavo (nehomogeniziran izmeček in vidne hife)

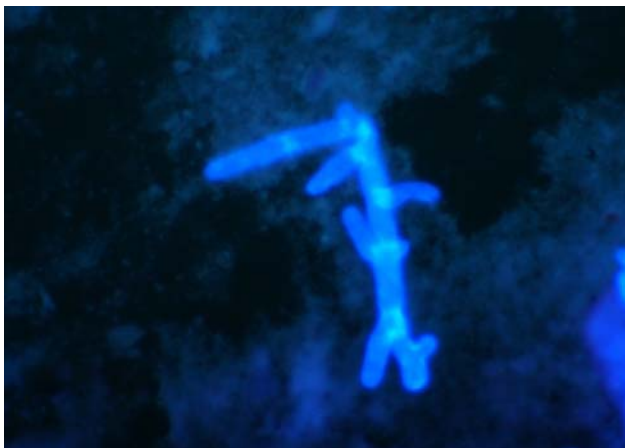
Pri bolnici št. 175 smo pri mikroskopskem pregledu nehomogeniziranega trahealnega aspirata pri 400-kratni videli močno fluorescirajoče hife (slika 10). Po 24-urni inkubaciji je iz trahealnega aspirata porasla plesen *A. fumigatus*, poleg tega je bil rezultat galaktomanaskega testa pozitiven. Bolnica je imela presajeno srce.



Slika 10: Mikroskopski pregled kužnine bolnice št. 175 pod 400-kratno povečavo (nehomogeniziran trahealni aspirat in vidne hife)

Pri mikroskopskem pregledu nehomogeniziranega izmečka bolnika št. 104 smo pri 1000-kratni povečavi videli slabše fluorescirajoče odseke hif z značilnimi dihodontnimi

razvejitvami (slika 11). Bolnik je imel presajena jetra. Poleg tega je obstajal tudi sum za glivično pljučnico. Pri bolniku smo osamili *A. fumigatus* iz kužnine. V serumu bolnika smo ugotovili tudi povečano vrednost galaktomanskega antigena.



Slika 11: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 104 pod 1000-kratno povečavo (nehomogeniziran izmeček in viden odsek hife)

Pri nobenemu drugemu bolniku, pri katerem smo osamili *A. fumigatus* (n=17), ni bil povišan galaktomanaski antigen in ni bi postavljen sum na IA.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V zadnjem desetletju je močno naraslo število objavljenih primerov kolonizacije in/ali okužbe človeka s hifomicetami (Horré in sod., 2009). Zaradi povečanja števila imunsko oslabilih bolnikov in uporabe močnih modernih imunosupresivnih zdravil je v zadnjih letih čedalje več oporutnističnih okužb. V zadnjih 10 letih se je *A. fumigatus* uveljavila kot najbolj prevalentna patogena gliva, ki povzroča v razvitih deželah resne, pogosto usodne invazivne okužbe pri imunsko oslabljenih osebah. V zadnjih 12 letih se je število bolnikov, obolelih za IA, povečalo za štirikrat. Leta 1992 je bila IA odgovorna za 30 % glivičnih okužb pri bolnikih, ki so umrli za rakom, in naj bi po podatkih za IA zbolelo 10 % do 25 % vseh bolnikov z levkemijo, pri katerih smrtnost presega 80 % kljub zdravljenju. IA je danes glavni vzrok smrti pri bolnikih obolelih za levkemijo, bolnikih s presajenim krvotvornimi matičnimi celicami in bolnikih s presajenimi čvrstimi organi (Lalgé, 1999).

Čeprav je *A. fumigatus* odgovoren za približno 90 % okužb pri človeku, ni edini patogen iz rodu *Aspergillus*, saj lahko tudi *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* in *A. nidulans* povzročajo okužbe pri ljudeh (Lalgé, 1999).

Opisanih je tudi čedalje več primerov kolonizacij in/ali okužb dihal z vrstami iz rodu *Scedosporium* (Horré in sod., 2009). *Scedosporium* spp. so povsod navzoče filamentozne glive, ki jih najpogosteje najdemo v zemlji, odpadnih in onesnaženih vodah. Glive iz rodu *Scedosporium* povzročajo različne bolezni od prehodne kolonizacije dihal, alergijske bronhopulmonarne reakcije, invazivne lokalizirane in disimenirane bolezni (Cortez in sod., 2008). Zelo težko je pridobiti čisto kulturo teh vrst, saj je zanje značilna počasna rast in druge hitro rastoče bakterije in glive (najpogosteje *Pseudomonas aeruginosa* in plesni iz rodu *Aspergillus*) lahko prerastejo gojišče in s tem onemogočijo njihovo osamitev. Te probleme lahko rešimo z uporabo semi-selektivnih izolacijskih gojišč (Horré in sod., 2009).

V prvemu delu diplomske naloge smo poskušali ugotoviti kakšen vpliv ima homogenizacija z ditiotreitolum na osamitev plesni in kvaliteto mikroskopskih preparatov

iz kužnin iz spodnjih dihal pri bolnikih s kroničnimi boleznimi pljuč, saj so bile podobne raziskave izvedene samo v primeru bakterij in gliv kvasovk (Hoppe in sod., 1996).

V petih mesecih smo zbrali 204 kužnin iz spodnjih dihal, in sicer 15 (7,4 %) aspiratov bronha, 78 (38,2 %) trahealnih aspiratov, 1 (0,5 %) bronhoalveolarni lavaž in 110 (53,9 %) izmečkov. Od 204 kužnin iz spodnjih dihal smo obdelali največ gnojnih kužnin (45,1 %) in najmanj nehomogenih kužnin (1,5 %). Z DDT smo homogenizirali samo prvih 100 kužnin. Iz 99 kužnin smo osamili enake vrste filamnetoznih gliv in kvasovk ne glede na predhodno obdelavo kužnine. Le v enem primeru smo plesen osamili le iz nehomogenizirane kužnine (preglednica 4). Najverjetnejši vzorok tega je zračna kontaminacija gojišča z *A. fumigatus*, saj smo rast zaznali šele po 5 dneh inkubacije. Iz 50 homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov in 50 trahealnih aspiratov smo osamili enako število gliv kvasovk (preglednica 5), ki jih nismo natančno identificirali. Nizek odstotek osamljenih plesni lahko pojasnimo z redko pojavnostjo izoliranih plesni (*A. fumigatus*, *Fusarium* spp. in *A. niger*) pri imunsko odpornih bolnikih, saj je bila večina bolnikov, vključenih v raziskavo, imunsko odpornih. Na osnovi rezultatov osamitve plesni in gliv kvasovk iz homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin lahko zaključimo, da homogenizacija nima bistvenega vpliva na učinkovitost osamitve plesni in gliv kvasovk. V nadaljevanju študije smo zato z DDT obdelali samo vzorce bolnikov s CF, saj v rutinski bakteriološki in mikološki diagnostiki njihove vzorce vedno homogeniziramo z DDT, ker so le-te zelo viskozne in nam homogenizacija bistveno olajša obdelavo vzorca.

Iz nadaljnjih 104 kužnin iz spodnjih dihal smo osamili plesni iz 22 kužnin (21,1 %). Iz preglednice 6 je razvidno, da smo največkrat osamili *A. fumigatus* (16,3 %). *A. fumigatus* smo najpogosteje osamili iz vzorcev bolnikov s cistično fibrozo (35,3 %) in bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (17,6 %), kar je v skladu z našimi pričakovanji, saj *A. fumigatus* pogosto kolonizira dihalne poti omenjenih bolnikov (Garnacho-Montero in sod., 2005; Pihet in sod., 2009) (preglednica 7). Plesen smo osamili tudi pri 4 imunsko oslabljenih bolnikih (2 bolnika z rakovim obolenjem, bolnica s presajenim srcem in bolnik s presajenimi jetri), pri katerih obstaja veliko tveganje, da zbolijo za invazivno aspergilozo (Latgé, 1999). Pri 2 izmed teh bolnikov (bolnika št. 104 in 175) smo kasneje potrdili tudi povišane vrednosti galaktomananskega antigena in prisotnosti hif v razmazu, obarvanem s kalkofluor belim. Za oba bolnika lahko rečemo, da je obstajal visok sum, da sta

prebolevala invazivno pljučno aspergilozo. Diagnozo bi bilo potrebno potrditi še z ostalimi kliničnimi podatki in izvidi slikovnih diagnostičnih preiskav. Povišane vrednosti galaktomananskega antigena in prisotnost hif v preparatu smo zaznali pri bolniku št. 103, ki ni bil imunsko oslavljen. Poleg *A. fumigatus* smo iz vzorcev bolnikov osamili še *A. niger* (1,9 %), *Penicillium* spp. (1,9 %) in *Scopulariopsis* spp. (1,0 %). Plesni iz rodu *Scopulariopsis* so znane kot povzročiteljice onihomikoz, vendar lahko v nekaterih redkih primerih povzročajo okužbe dihal pri imunsko oslavljenih bolnikih (Walsh in sod., 2004). Oba izolata *Penicillium* spp. sta zelo verjetno posledica kontaminacije gojišča, saj so te glive pogosti laboratorijski kontaminanti in običajno ne povzročajo okužb pri ljudeh (Walsh in sod., 2004).

Pri primerjavi rezultatov mikroskopskega pregleda razmazov 100 homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, obarvanih s kalkofluor belim, nismo videli hif v nobenemu razmazu (preglednica 9). Pri 5 bolnikih smo v razmazu homogenizirane in nehomogenizirane kužnine, obarvane s kalkofluor belim, videli glive kvasovke (slika 8). Pri tem nismo opazili nobenih razlik v fluorescenci kvasovk. Pri vseh 5 bolnikih je na gojišču poraslo večje število gliv kvasovk, ki jih nismo dokončno identificirali. V nadaljevanju raziskave smo pregledali še 81 nehomogeniziranih razmazov in 23 homogeniziranih razmazov (bolniki s cistično fibrozo) kužnin iz spodnjih dihal, pri čemer smo hife videli le v nehomogeniziranih razmazih bolnikov št. 103, 104 in 175 (slike 9, 10 in 11), katerim smo kasneje s testom potrdili povišano vrednost galaktomanskega antigena v krvi. Pri ostalih 14 bolnikih, pri katerih smo osamili *A. fumigatus*, v preparatu nismo videli hif. Torej je bil rezultat mikroskopskega pregleda pozitiven le pri 3 bolnikih z potrjenimi povišanimi vrednostimi galaktomanskega antigena, pri 14 bolnikih koloniziranih s *A. fumigatus* pa negativen. Velik delež negativnih rezultatov mikroskopskih preparatov (97,1 %) smo pričakovali, saj je po podatkih iz literature tipična prisotnost hif v neposrednih mikroskopskih preparatih statistično bolj značilna pri bolnikih z invazivno okužbo (Ulffredi in sod., 2003). Poleg tega so v študiji, ki so jo izvedli Lass-Flörl in sod. (2007), kar pri 80 % imunsko oslavljenih bolnikih z CT dokazano sumljivo spremembo za IA dokazali prisotnost glivnih elementov. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je mikroskopski pregled kužnin, obarvanih s kalkofluor belim, iz spodnjih

dihal bolj smiselno pri bolnikih s sumom na invazivno glivično okužbo, pri katerih je večja verjetnost, da vidimo hife.

V drugem delu diplomske naloge nas je zanimalo, ali je pol-selektivno gojišče SceSel+ primerno za osamitev plesni *Scedosporium* spp. iz kužnin iz spodnjih dihal. Pričakovali smo, da bomo največ plesni osamili iz kužnin bolnikov s cistično fibrozo, saj so *Scedosporium apiospermum* drugi najpogostejši kolonizatorji dihalnih poti bolnikov s cistično fibrozo (Pihet in sod., 2009). V naši raziskavi iz nobenega izmed 204 vzorcev nismo osamili *Scedosporium* spp. (preglednica 8). Le iz izmečka bolnika št. 137 smo na gojišču SceSel+ osamili *Scopulariopsis* spp. (slika 5). V nasprotju z našimi pričakovanji je bila pri vseh 22 vzorcih, ki so bili odvzeti 17 bolnikom s cistično fibrozo, rast na gojišču odsotna. Vzrok za nizek delež osamljenih plesni pri bolnikih s cistično fibrozo je najverjetneje majhno število vzorcev, vključenih v raziskavo. Pri zbiranju vzorcev bolnikov s cistično fibrozo smo imeli precej težav, saj v Sloveniji po podatkih Društva pljučnih in alergijskih bolnikov Slovenije iz leta 2009 le okoli 70 bolnikov s cistično fibrozo. Tako je bilo v našo raziskavo vključenih le četrtnina bolnikov s CF (24,3 %). Za pravilnejše vrednotenje koloniziranosti dihalnih poti te skupine bolnikov z *Scedosporium* spp. bi bilo potrebno v raziskavo vključiti vsaj 50 bolnikov in od vsakega izmed njih prejeti več kužnin.

V obdobju 2005-2008 so v Laboratoriju za glivične okužbe Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani na standardnih mikoloških gojiščih osamili *Scedosporium apiospermum* pri 8 bolnikih. Plesen so najpogosteje osamili iz brisa sluhovoda (n=6), poleg tega smo jo osamili iz izmečka (n=1) in brisa abscesa (n=1). Velik delež izoliranih plesni iz brisa sluhovoda ni presenetljiv, saj je v literaturi opisanih kar nekaj primerov kolonizacije sluhovoda s *Scedosporium* spp. (Baumgartner in sod., 2007).

Plesni iz rodu *Scedoporium* redko povzročajo okužbe pri imunsko odpornih osebah, počasne rasti (inkubacija od 14 do 29 dni), neobčutljivosti postopka in ker je za identifikacijo izolata potrebno usposobljeno osebje, je uporaba gojišča smiselna le ob sumu na invazivno okužbo. Bolniki, pri katerih obstaja večje tveganje, da zbolijo za invazivno okužbo, so: bolniki z napredovalo obliko HIV, bolniki s primarnimi imunskimi pomanjkljivostmi (običajno kronična granumaltozna bolezen in Jobov sindrom), bolniki s hematološkimi obolenji, bolniki s presajenimi matičnimi celicami in bolniki, ki so

zdravljeni z citostatiki ali drugimi imunosupresivnimi zdravili (Cortez in sod., 2008; Cooley in sod., 2007). Zaradi počasne rasti teh vrst priporočajo različni avtorji za osamitev uporabo selektivnega gojišča SceSel+ (Rainer in sod., 2008; Horr  in sod., 2009; Blyth in sod., 2010). Uporaba gojišča SceSel+ je smiselna tudi v primeru bolnikov s CF, saj nam omogoči zaznati kolonizacijo dihalnih poti s *Scedosporium* spp., ki je ni mogoče zaznati s standardnimi mikološkimi gojišči (Horr  in sod., 2009). Po podatkih iz literature naj bi pri bolnikih s CF, katerih respiratorni trakt kolonizirajo *Scedosporium* spp., obstajala veliko tveganje, da zbolijo za življenje ogro ajouo invazivno okužbo (Horr  in sod., 2009; Blyth in sod., 2010).

5.2 SKLEPI

- Homogenizacija kužnin spodnjih dihal z DDT ni vplivala na občutljivost mikroskopskega pregleda kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih s kalkofluor belim, saj nismo opazili razlik v fluorescenci glivnih elementov.
- Mikroskopski pregled kužnin, obarvanih s CFW, je smiseln pri bolnikih s sumom na invazivno glivično okužbo.
- Homogenizacija z DDT ni vpliva na učinkovitost osamitve plesni in gliv kvasovk iz kužnin iz spodnjih dihal.
- Iz kužnin smo najpogosteje osamili *A. fumigatus*.
- Največji delež *A. fumigatus* smo osamili iz kužnin bolnikov s CF.
- Na selektivem gojišču SceSel+ nismo osamili plesni *Scedosporium* pri nobenemu izmed 204 bolnikov, vključenih v raziskavo.
- Uporaba selektivnega gojišča je smiselna v primeru imunsko oslabljenih bolnikov in bolnikov s CF.

6 POVZETEK

Število oportunističnih glivičnih okužb se je v zadnjih letnih povečalo, kar je posledica povečanja števila imunsko oslabiljenih bolnikov in zdravljenja z močnimi imunosupresivnimi zdravili. Filamentozne glive so ubikvitani mikroorganizmi, ki ob inhalaciji konidijev vstopijo v dihala, kjer povzročijo življenje ogrožujoče okužbe, med katerim je najpogostejša invazivna aspergiloza (Segal in Walsh, 2006). Najpogostejši povzročitelj invazivne aspergiloze je *A. fumigatus*. Najpogostejša oblika invazivne aspergiloze je invazivna pulmonarna aspergiloza, ki prizadene le določene skupine imunsko oslabiljenih bolnikov. Najpogosteje prizadene bolnike s presajenimi krvotvornimi matičnimi celicami, ki prejemajo kemoterapijo. Delež preživelih bolnikov s invazivno pulmonarno aspergilozo je nizek, kar je posledica težavne diagnostike bolezni in neučinkovitega zdravljenja težkih osnovnih bolezni teh bolnikov (Oren in Goldstein, 2002). Pri imunsko odpornih osebah *A. fumigatus* najpogosteje povzroča alergijske oblike bolezni (alergijska pulmonarna aspergiloza) in aspergilom (Latgé, 1999; Ulffrredi in sod., 2003).

Opisanih je tudi čedalje več primerov okužb imunsko oslabiljenih in imunsko odpornih oseb s *S. apiospermum* in *S. prolificans*. Zdravljenje okužb je težavno, saj so omenjene plesni odporne na večino dostopnih antimikotikov (Wiederhold in Lewis, 2009).

V okviru diplomskega dela smo želeli ovrednotiti mikroskopske preparate pri diagnostiki glivičnih okužb. Poleg tega smo želeli ugotoviti, kakšen vpliv ima homogenizacija na kvaliteto mikroskopskih preparatov in osamitev plesni iz kužnin iz spodnjih dihal. Preizkusili smo selektivno gojišče SceSel+, da bi ugotovili, ali je primernejše za osamitev *Scedosporium* spp. od standardnih mikoloških gojišč.

V raziskavo smo vključili 204 kužnin iz spodnjih dihal. Prvih 100 kužnin smo homogenizirali z ditiotreitolum. Homogenizacija ni povečala učinkovitosti osamitve plesni in gliv kvasovk, saj smo osamili enako število plesni in kvasovk iz homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin z izjemo enega bolnika, pri kateremu smo plesen osamili le iz nehomogeniziranega aspirata traheje, kar je bilo verjetno posledica zračne kontaminacije z *A. fumigatus*. Rezultati mikroskopskega pregleda razmazov homogeniziranih in

nehomogeniziranih kužnin so se ujemali, saj nismo opazili razlik v fluorescenci glivnih elementov. V nadaljevanju raziskave smo pregledali še 81 nehomogeniziranih in 23 homogeniziranih (bolniki s cistično fibrozo) razmazov kužnin, pri čemer smo hife videli le v treh nehomogeniziranih razmazih. V vseh treh primerih je šlo za imunsko oslABLjenje bolnike s potrjeno diagnozo invazivne aspergiloze. Iz nadaljnjih 104 kužnin iz spodnjih dihal smo osamili 22 plesni. Najpogosteje izolirana plesen je bila *A. fumigatus* (16,3 %), ki smo jo največkrat osamili iz kužnin bolnikov s cistično fibrozo (35,3 %).

S pomočjo selektivnega gojišča SceSel+ iz nobene izmed 204 kužnin iz spodnjih dihal nismo osamili plesni iz rodu *Scedosporium*, kar je najverjetneje posledica prenizkega števila kužnin, vključenih v raziskavo. Le pri enem bolniku smo osamili *Scopulariopsis* spp. Kljub nizkemu deležu osamljenih plesni priporočamo uporabo gojišča SceSel+ pri imunsko oslabeledih bolnikih s sumom na invazivno glivično bolezen in bolnikih s cistično fibrozo.

7 VIRI

Ansorg R., van den Boom R., Rath P.M. 1997. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*, 40: 353–357

Baumgartner B.J., Rakita R.M., Backous D.D. 2007. *Scedosporium apiospermum* otomycosis. *American Journal of Otolaryngology*, 28, 4: 254-256

Buchheidt D., Baust C., Skladny H., Ritter J., Suedhoff T., Baldus M., Seifarth W., Leib-Moesch C., Hehlmann R. 2001. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 4: 428-435

Blyth C.C., Harun A., Middleton P.G., Sleiman S., Lee O., Sorrell T.C., Meyer W., Chen S.C.A. 2010. Detection of occult species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 1: 314-316

Cooley L., Spelman D., Thursky K., Slavin M. 2007. Infection with *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans*, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 8: 1170-1177

Cortez K.J., Roilides E., Quiroz-Telles F., Meletiadis J., Antachopoulos C., Knudsen T., Buchanan W., Milanovich J., Sutton D.A., Fothergill A., Rinaldi M.G., Shea Y.R., Zaoutis T., Kottitil S., Walsh T.J. 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 1: 157-197

De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 1160 str.

Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. 2002. *Mycobacteria*. V: Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 11th ed. Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. (eds.). St. Louis, Mosby: 538–571

Garnacho-Montero J., Amaya-Villar R., Oritz-Leyba C., León C., Álvarez-Lerma F., Nolla-Salas J., Iruretagoyena J.R., Barcenilla F. 2005. Isolation of *Aspergillus* spp. from respiratory tract in critically ill patients: Risk factors, clinical presentation and outcome. *Critical Care*, 9, 3: R191-R199

Grebski E., Peterson C., Medici T. 2001. Effect of physical and chemical methods of homogenization on inflammatory mediators in sputum of asthma patients. *Chest*, 119, 5: 1521-1525

Hammerschlag M.R., Harding L., Macone A., Smith A.L., Goldmann D.A. 1980. Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: Evaluation of dithiothreitol as mucolytic agent. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 6: 552-557

Harun A., Perdomo H., Gilgado F., Chen S.C., Cano J., Guarro J., Meyer W. 2009. Genotyping of *Scedosporium* species: A review of molecular approaches. *Medical Mycology*, 47, 4: 406-414

HPA. 2008. Investigation of bronchoalveolar lavage, sputum and associated specimens. National Standard Method BSOP 57 Issue 2.2. London, HPA- Health Protection Agency: 27.str.

http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp (Februar, 2011)

Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infectious Diseases*, 5, 10: 609-622

Hoppe J.E., Holzwarth J., Stern M. 1996. Comparison of four methods for pretreatment of cystic fibrosis sputa. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15, 11: 895-896

Horré R., Marklein G., Siekmeier R., Nidermajer S., Reiffert S.M. 2009. Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respiration*, 77, 3: 320-324

Horré R., Marklein G. 2009. Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. *Medical Mycology*, 47, 4: 415-421

Kami M., Fukui T., Ogawa S., Kazuyama Y., Machida U., Tanaka Y., Kanda Y., Kashima T., Yamazaki Y., Hamaki T., Mori S., Akiyama H., Mutou Y., Sakamaki H., Osumi K., Kimura S., Hirai H. 2001. Use of real-time pcr on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 9: 1504-1512

Kaufman L., Standard P.G., Jalbert M., Kraft D.E. 1997. Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp. and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 9: 2206-2209

Lass-Flörl C., Aigner J., Gunsilius E., Petzer A., Nachbaur D., Gastl G., Einsele H., Löffler J., Dierich D.P., Würzner R. 2001. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, 113, 1: 180-184

Lass-Flörl C., Resch G., Nachbaur D., Mayr D., Gastl G., Auberger J., Bialek R., Freund M.C. 2007. The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 7: e101-e104

Latgé J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 2: 310-350

Maduri-Traczewski M., L'Heureux C., Escalona L., Macone A., Goldmann D. 1986. Facilitated detection of antibiotic-resistant *Pseudomonas* in cystic fibrosis sputum using homogenized specimens and antibiotic-containing media. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 5, 4: 299-305

Malloch D.I., Salkin I.A. 1984. A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans. *Mycotaxon*, 21: 247–255

Marr K.A., Boeckh M., Carter R.A., Kim H.W., Corey L. 2004. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 6: 797-802

Matos T. 2002a. Oportunistične glive. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 481-495

Matos T. 2002b. Značilnosti patogenih gliv. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 457-468

Oren I., Goldstein N. 2002. Invasive pulmonary aspergillosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 8, 3: 195-200

Pihet M., Carrere J., Cimon B., Chabasse D., Delhaes L., Symoens F., Bouchara J.P. 2009. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis – a review. *Medical Mycology*, 47, 4: 387-397

Pinto M.R., Mulloy B., Haido R.M., Travassos L.R., Barreto Bergter E. 2001. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology*, 147, 6: 1499-1506

Rainer J., Kaltseis J., de Hoog S.G., Summerbell R.C. 2008. Efficacy of selective isolation procedure for members of *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93, 3: 315-322

Ribaud P., Chastang C., Latgé J.P., Baffroy-Lafitte L., Parquet N., Devergie A., Espérou H., Séliami F., Rocha V., Derouin F., Socié G., Gluckman E. 1999. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 28, 2: 322-330

Rogers D.F. 2007. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. *Respiratory Care*, 52, 9: 1176-1193

Segal B.H., Walsh T.J. 2006. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173, 7: 707-717

Sherif R., Segal B.H. 2010. Pulmonary aspergillosis: Clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 16, 3: 242-250

Simčič S., Matos T. 2010. Mikrobiološka diagnostika invazivne aspergiloze. *Zdravstveni vestnik*, 79: 716-725

Tomič V., Šorli J. 2002. Diagnostična vrednost razmaza sputuma in endotrahealnega aspirata, obarvanega po Gramu. *Zdravstveni vestnik*, 71: 83-86

Ulffredi M.L., Mangiapan G., Cadranel J., Kac G. 2003. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22, 8: 457-462

Walsh T.J., Groll A., Hiemenz J., Fleming R., Roilides E., Anaissie E. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1: 48-66

Wiederhold N.P., Lewis R.E. 2009. Antifungal activity against *Scedosporium* species and novel assays to assess antifungal pharmacodynamics against filamentous fungi. *Medical Mycology*, 47, 4: 422-432

York M.K. 2004. Gram stain. V: *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed. Isenberg H.D. (ed.). Washington DC, ASM Press: 3.2.1.1–3.2.1.22