



MINISTERUL
SĂNĂȚĂȚII AL
REPUBLICII
MOLDOVA



AGENȚIA
NAȚIONALĂ
PENTRU
SĂNĂȚATE
PUBLICĂ



UNIVERSITATEA
DE STAT DE
MEDICINĂ ȘI
FARMACIE
"NICOLAE
TESTIMIȚEANU"

**GHID
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR FUNGICE INVAZIVE**



Chișinău, 2024

**Aprobat la ședința Consiliului de Experți al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova
din 24.04.2024 proces-verbal nr. 1
Aprobat prin Ordinul Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr. 500 din 06.06.2024**

Colectivul de autori:

Burduniuc Olga, dr. hab. șt. med., conf. cercet., MSP, ANSP
Jelamschi Nicolae, dr. șt. med., MSP, ANSP
Bălan Greta, dr. hab. șt. med., conf. univ., MSP, USMF „Nicolae Testemițanu”
Sofronie Olga, asistent universitar, MSP, USMF „Nicolae Testemițanu”
Ulinici Mariana, dr. șt. med., asist. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Plăcintă Gheorghe, dr. hab. șt. med., conf. univ., MSP, USMF „Nicolae Testemițanu”
Cojuhari Lilia, dr. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Behta Emilia, asistent universitar, USMF „Nicolae Testemițanu”

Recenzenți:

Rudic Valeriu dr. hab. șt. biol., prof. univ., academician, USMF „Nicolae Testemițanu”
Bucov Victoria dr. hab. șt. med., profesor universitar, ANSP
Bețiu Mircea dr. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”

Ghidul a fost examinat, avizat și aprobat de:

Structura/instituția	Prenume, nume, funcția
Consiliul științific al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică	Nicolae Jelamschi , președinte, director ANSP, dr. șt. med., master în managementul SP
Comisia științifico-metodică de profil „Medicină comunitară” a USMF „Nicolae Testemițanu”	Gheorghe Plăcintă , președinte, dr. hab. șt. med., conf. univ., decan, Facultatea de Medicină nr. 1, șef, Catedra de boli infecțioase
Catedra de medicină de laborator, USMF „Nicolae Testemițanu”	Anatolie Vișnevschi , dr. hab. șt. med, prof. univ., șef, Catedră
Catedra de Farmacologie și farmacologie clinică, USMF „Nicolae Testemițanu”	Nicolae Bacinschi , dr. hab. șt. med, prof. univ., șef, Catedră
Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale	Dragoș Guțu , director general
Compania Națională de Asigurări în Medicină	Ion Dodon , director general
Consiliul de Experți al Ministerului Sănătății	Aurel Grosu , dr. hab. șt. med., prof.univ., președinte

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții

Ghid

Chișinău, Tipărit _____ 2024, - pag.

ISBN _____ ex. _____

Lista abrevierilor

ADN	Acidul dezoxiribonucleic
AI	Aspergiloza invazivă
AMP	Asistență medicală primară
AMS	Asistența medicală spitalicească
AMSA	Asistență medicală specializată de ambulatoriu
ARN	Acidul ribonucleic
BG	Beta D-Glucan
BHI	<i>eng.</i> Brain Heart Infusion/ bulion infuzie cord-creier
CGB	<i>eng.</i> The selective medium l-canavanine glycine bromothymol blue agar/agar cu L-canavanin glicin - albastru de bromtimol
CLSI	<i>eng.</i> Clinical&Laboratory Standards Institute/Institutul pentru Standarde Clinice și de Laborator
CMI	Concentrația minimă inhibitoare
CRAG	<i>eng.</i> Cryptococcal Antigen/antigenul criptococic
TC	Tomografie computerizată
CVC	Cateter venos central
DLCO	<i>eng.</i> Diffusing Capacity Of The Lungs For Carbon Monoxide/ Capacitatea de difuzie a monoxidului de carbon în plămâni
GM	galactomanan
GMS	<i>eng.</i> Gomori's Methenamine Silver/ Impregnare argentică tehnica Gomori
ECMM	<i>eng.</i> European Confederation of Medical Mycology/Confederația Europeană de Mycologie Medicală
ELISA	<i>eng.</i> Enzyme-linked immunosorbent assay/analiza imunoenzimatică
EORTC/MSGERC	<i>eng.</i> The European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium/ Consorțiul pentru Educație și Cercetare al Grupului de Studiu al Organizației Europene pentru Cercetare și Tratamentul Cancerului/ Micozelor
EUCAST	<i>eng.</i> European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/ Comitetul European pentru Testarea Sensibilității la Antimicrobiene
FDA	<i>eng.</i> Food and Drug Administration/ Administrația pentru Alimente și Medicamente
H&E	Hematoxilină și eozină
HIV	<i>eng.</i> Human Immunodeficiency Virus/Virusul Imunodeficienței Umane
HRCT	<i>eng.</i> High-resolution computed tomography/tomografie computerizată de înaltă rezoluție
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation/transplant de celule stem hematopoitice
IFI	Infecții fungice invazive
LBA	Lavaj bronhoalveolar
LCR	Lichid cefalorahidian
LDH	Lactat dehidrogenaza
LFA	Lateral flow assay/test de flux lateral
LPCB	<i>eng.</i> Lactophenol cotton blue/Albastru de lactofenol sau albastru de bumbac

MALDI-TOF MS	<i>eng.</i> Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry/ Spectrometrie de masa MALDI-TOF
ME	Meningită/encefalită
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
ORL	Otorinolaringolog
PAS	<i>eng.</i> Periodic acid-Schiff/acidul periodic-Schiff
PBA	Periajul bronhiilor
PCR	<i>eng.</i> Polymerase chain reaction/Reacția de polimerizare în lanț
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis/electroforeza pe gel în câmp pulsat
RFLP	Restriction fragment length polymorphism/polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție
PPJ	Pneumonia cu <i>P. jirovecii</i>
RAM	Rezistența la antimicrobiene
REA	Restriction enzyme analysis/analiza enzimelor de restricție
SAM	S-adenosilmetionina
SaO2	Saturația cu oxigen a sângelui arterial
SDA	<i>eng.</i> Sabouraud Dextrose Agar/Agar Sabouraud cu dextroză
SIDA	Sindromul imunodeficienței umane dobândite
SNC	Sistemul nervos central
TNF	<i>eng.</i> Tumor necrosis factor/factorul de necroză tumorală

Cuprins

I. Introducere	7
A. Scopul și obiectivele ghidului	7
B. Prezentarea infecțiilor fungice invazive	8
II. Caracteristici și specii de fungi prioritari implicați (conform OMS)	9
III. Biosiguranța, cerințe specifice laboratorului de diagnostic microbiologic	17
IV. Cerințe pentru probe, tehnici de pre-examinare.....	19
V. Particularități ale diagnosticului de laborator al infecțiilor fungice invazive	21
A. Candidoza invazivă (C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata, C. auris, etc.).....	21
1. Generalități.....	21
2. Factori de risc pentru candidoza invazivă.....	22
3. Aspecte clinice	23
4. Descriere Candida spp.....	26
5. Tehnici de diagnostic în candidoză	29
6. Interpretarea rezultatelor	33
B. Aspergiloza.....	39
1. Generalități.....	39
2.Aspecte clinice/epidemiologie.....	40
3.Diagnosticul de laborator	41
C. Criptococoza	44
1. Generalități.....	44
2. Epidemiologia	44
3. Aspecte clinice	45
4. Diagnostic de laborator	46
D. Pneumocystis jirovecii	50
1. Generalități.....	50
2.Aspecte clinice ale infecției cu Pneumocystis jirovecii	50
3.Diagnostic de laborator	51
E. Histoplasmoza	54
1. Generalități.....	54
2. Epidemiologia	55
3. Aspecte clinice	55
4. Diagnostic de laborator	56
F. Mucormicoza	60

1. Generalități.....	60
2. Factorii de risc ai mucormicozei.....	61
3. Epidemiologia.....	62
4. Aspecte clinice.....	63
5. Diagnosticul de laborator al mucormicozei.....	64
6. Tratamentul și prevenția mucormicozei.....	69
VI. Anexe.....	70
VII. Referințe bibliografice.....	82

I. Introducere

A. Scopul și obiectivele ghidului

Scopul ghidului este de a reglementa activitățile de supraveghere și control ale infecțiilor fungice invazive.

Obiectivele ghidului:

- Ameliorarea calității vieții pacienților critici prin implementarea diagnosticului etiologic corect și posibilitatea monitorizării riguroase a terapiei antifungice reprezintă argumentul primordial al elaborării acestui ghid.
- Asistarea specialiștilor de laborator în procedurile corecte de diagnosticare a infecțiilor fungice invazive,
- Ghidarea medicilor clinicieni în opțiunile de tratament.

Utilizatorii ghidului sunt:

- Prestatorii de servicii medicale la nivel de AMP (medici de familie și asistentele medicale de familie);
- Prestatorii de servicii medicale la nivel de AMSA (medicii infecționiști, dermatovenerologi, ginecologi, terapeuți, ftiziopneumologi, ORL din instituțiile/secțiile consultative);
- Prestatorii de servicii medicale la nivel de AMS (secțiile de boli infecțioase, terapie, reanimare și de terapie intensivă ale spitalelor raionale/municipale (specialiști de laborator, medici epidemiologi, infecționiști, pediatri-infecționiști, pediatri, ORL, ș. a.).

Notă: Ghidul la necesitate poate fi utilizat și de alți specialiști, inclusiv în procesul didactic în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor și personalului medical cu studii medii.

Elaborat: 2024

Revizuire: 2029

Partea generală

Prezentul ghid include o varietate de tehnici validate de laborator, instrucțiuni detaliate privind diagnosticul infecțiilor fungice invazive pentru a oferi rezultate precise, fiabile și reproductibile cu relevanță și utilitate clinică.

Standardizarea la nivel național a metodelor și tehnicilor de diagnosticare a infecțiilor fungice va permite managementul consecvent și optimal al pacienților cu infecții fungice invazive.

Rezultatele evaluării rapoartelor anuale de activitate a laboratoarelor microbiologice din țară au evidențiat unele provocări privind standardizarea metodologiei de izolare, identificare și testare a sensibilității la antifungice.

Disponibilitatea metodelor standardizate la nivel național redate în acest ghid va îmbunătăți calitatea diagnosticului micozelor umane, utilizarea mai bună a resurselor, reducerea costurilor, facilitarea achizițiilor centralizate, supravegherea și controlul epidemiologic al acestor infecții.

Ghidul va contribui la comunicarea și colaborarea dintre specialiștii de laborator implicați în activitatea de diagnostic a infecțiilor fungice, clinicieni, farmaciști și medicii epidemiologi responsabili de prevenire și control.

Ghidul include caracteristici generale ale fungilor ce cauzează infecții fungice invazive (*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, Mucorales ș. a.), principii de clasificare, proceduri de examinare micologică a biosubstratelor

umane (microscopie, cultura fungică, identificare, interpretarea și raportarea rezultatelor). Ghidul are ca scop reglementarea activităților de supraveghere și control ale infecțiilor fungice, metodelor de diagnostic de laborator, îmbunătățirea managementului pacienților cu infecții fungice invazive.

Totodată, va servi ca suport metodologic laboratoarelor medicale în implementarea, validarea și pregătirea documentației pentru acreditare.

B. Prezentarea infecțiilor fungice invazive

Fungii sunt pretutindeni, unii fiind agenți patogeni umani semnificativi, frecvent subestimați iar dintre miile de specii, doar o parte pot cauza afecțiuni la om.

În ultimele două decenii, în special, spectrul agenților responsabili de infecții fungice s-a modificat ca răspuns la schimbările din populația susceptibilă, în special, creșterea numărului persoanelor imunocompromise, utilizarea abuzivă și neargumentată a preparatelor antifungice.

Limita dintre fungii patogeni și nepatogeni poate fi foarte greu de diferențiat, cei considerați nepatogeni cu 1-2 decenii în urmă sunt actualmente recunoscuți ca agenți etiologici ai micozelor umane în cazul gazdelor imunocompromise.

Receptivitatea la infecțiile fungice oportuniste este influențată de factorii intrinseci ai gazdei și extrinseci ambientali. Astfel, pacienții deosebit de susceptibili la aceste infecții includ persoane cu diabet, leucemie, cancer, HIV (virusul imunodeficienței umane) și alte tipuri de imunodeficiență. Apariția conflictului între fungi și gazdă este favorizată de o serie de factori, care fie induc gazdei o stare de imunosupresie, fie modifică cantitativ raportul existent între fungi și celelalte categorii de microorganisme. Factorii favorizanți endogeni sunt reprezentați de: vârstă (nou născuți prematuri, vârsta a III-a), stările fiziologice particulare (graviditate). Factorii favorizanți exogeni includ: corticoterapia, terapia imunosupresoare post-transplant, antibioticoterapia prelungită, intubația endotraheală prelungită, dispozitivele protetice, radioterapia, etc.

Fungii pot fi izolați din probele biologice umane primite în laboratorul clinic în următoarele situații: infecția cu aceste microorganisme, colonizarea cu levuri a tegumentelor, mucoaselor, cavităților și contaminarea probei prin manevre defectuoase în cursul prelevării. Astfel, interpretarea rezultatelor de laborator va fi efectuată permanent în asociere cu simptomatologia clinică a pacientului.

Dacă se detectează fungi în probe din zone normal sterile (cum ar fi sângele, lichidul cefalorahidian, lichidul din articulații sau cavitatea abdominală) și dacă toate măsurile de prevenire a contaminării au fost respectate în timpul prelevării, aceasta indică de obicei prezența unei infecții fungice invazive. Pentru probele provenite din zone nesterile asocierea rezultatelor de laborator cu datele clinice și epidemiologice este absolut necesară pentru interpretarea relevanței clinice a fungilor.

Fungii pot dezvolta infecții superficiale (dermatofite), invazive (sistemice) și oportuniste. Infecțiile dermatofite sunt cauzate de infectarea straturilor superficiale ale pielii de către agenții dermatofiți. Noțiunea dată este bazată de fapt pe localizarea specifică a afecțiunilor și nu pe apartenența sistematică a agenților cauzali, cu toate că majoritatea dermatofiților fac parte din genurile *Microsporum*, *Trichophyton* și *Epidermophyton*.

Infecțiile fungice invazive (sistemice) au o incidență mai mică decât cea a infecțiilor superficiale, dar provoacă o îngrijorare mai mare deoarece acestea sunt asociate cu o rată de mortalitate ridicată, acestea soldându-se anual cu aproximativ un milion și jumătate de decese la nivel global.

Proporții îngrijorătoare a atins numărul de pacienți receptivi la infecții invazive provocate de fungi filamentoși, întâlniți în diverse habitate naturale (sol, substraturi organice, etc.). Cei mai cunoscuți

agenți ai micozelor invazive fac parte din genurile *Aspergillus* și *Mucor*. Această listă a fost completată în ultimele decenii cu fungi filamentoși mai rar întâlniți în mediul ambiant, cum ar fi *Fusarium* spp. și *Penicillium* spp.

În ultima perioadă conștientizarea rolului fungilor oportuniști în dezvoltarea infecțiilor fungice este în creștere, astfel laboratoarele microbiologice trebuie să dispună de tehnici standardizate, reagenți pentru izolarea, identificarea fungilor și personal competent în diagnosticul micozelor umane.

II. Caracteristici și specii de fungi prioritari implicați (conform OMS)

Candida auris

Informații cheie

- *Candida auris* este un fung care poate produce candidoză invazivă. Candidoza invazivă cu *C. auris* este o boală care pune viața în pericol, prezentând o mortalitate ridicată.
- *Candida auris* la nivel mondial a produs deja mai multe focare intraspitalicești.
- Este rezistent în mod intrinsec la majoritatea medicamentelor antifungice disponibile, iar unele tulpini sunt pan-rezistente.
- Dificil de identificat prin tehnici convenționale. Deși recomandările de tratament sunt bine stabilite, antifungicele recomandate nu sunt disponibile în multe țări.
- Măsurile preventive nu sunt bine stabilite. În general, este termorezistentă și parțial rezistentă la dezinfectanții de uz curent.
- Mortalitate foarte mare. Rezistența emergentă la azoli este îngrijorătoare.

Prezentare generală

Candida auris este o ciupercă patogenă distribuită la nivel global care poate provoca candidoză invazivă (candidemie), cu afectarea inimii, sistemului nervos central, ochilor, oaselor și organelor interne. Utilizarea anterioară a medicamentelor antifungice, în special a triazolilor, este, de asemenea, asociată cu risc crescut pentru *C. auris*. *C. auris* a apărut ca o cauză a focarelor spitalicești.

Mortalitatea candidozei invazive cu *C. auris* variază între 29% și 53%. Pacienții cu candidemie *C. auris* au avut o perioadă mai îndelungată de spitalizare în staționar sau în terapie intensivă decât cei cu candidemie cauzată de alte *Candida* spp. Durata medie a spitalizării a fost de 46-68 de zile la pacienții adulți și copii cu candida cu *C. auris*, variind până la 70-140 de zile.

Candida albicans

Informații cheie

- *Candida albicans* este un agent patogen fungic care poate face parte din microbiomul uman sănătos, dar poate provoca și infecții ale mucoasei, sau produce candidoză invazivă.
- Candidoza invazivă este o boală care pune viața în pericol, cu mortalitate ridicată.
- Tratamentul este posibil și rezistența antifungică rămâne mai puțin frecventă (scăzută).

Prezentare generală

Candida albicans este o specie de fungi patogenă distribuită la nivel global. Este un membru comun al microbiotei umane (cavitate bucală, gât, intestin, vagin și piele) și nu dăunează în condiții sănătoase.

Candidoza invazivă are o mortalitate globală cuprinsă între 20% și 50%, în ciuda disponibilității tratamentului antifungic activ. Durata spitalizării este de aproximativ 2-4 săptămâni până la 2 luni și este influențată de condițiile de bază.

Tendențele pentru *C. albicans* în ultimii 10 ani sunt stabile, dar estimările spitalicești ale incidenței și distribuției speciilor indică că infecțiile cauzate de *C. albicans* sunt în scădere față de alte specii de *Candida*. Prevenirea colonizării și supravegherea sunt de importanță majoră în monitorizarea pacienților cu risc de infecții cu *Candida*.

***Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*)**

Informații cheie

- *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*) este o ciupercă comensală care poate provoca candidoză invazivă.
- Mortalitatea ca urmare a candidozei invazive cauzată de *N. glabrata* poate fi de până la 20–50%.
- Măsurile preventive pentru infecțiile invazive nu sunt bine stabilite. Sunt disponibile recomandări, deși RAM este în creștere și reprezintă o provocare.

Prezentare generală

Nakaseomyces glabrata (*Candida glabrata*) este o ciupercă comensală cu potențial patogen, distribuită la nivel global. Este o cauză principală a candidozei, de obicei a doua după *C. albicans*, ca incidență. Poate provoca candidoză invazivă (candidemie), cu afectarea inimii, sistemului nervos central, ochilor, oaselor și/sau organelor interne.

Candida tropicalis

Informații cheie

- *Candida tropicalis* este o ciupercă care poate face parte din microbiomul uman sănătos, dar este și capabilă să provoace infecții invazive.
- Infecția invazivă pune viața în pericol, mortalitatea variind de la 55% până la 60% la adulți și 26% până la 40% la copii și adolescenți.

Prezentare generală

C. tropicalis poate produce infecții invazive ale inimii, sistemului nervos central, ochilor, oaselor, organelor interne și candidemie. Datele privind complicațiile și sechelele infecției nu sunt descrise. Factorii de risc pentru infecție includ boala critică și scăderea imunității gazdei, iar aceasta include și pacienții din unitățile de terapie intensivă neonatale.

Tendențele din ultimii 10 ani arată o creștere a infecțiilor cauzate de *C. tropicalis*.

Candida parapsilosis

Informații cheie

- *Candida parapsilosis* este o specie de fungi care poate face parte din microbiomul uman sănătos, dar care provoacă și infecții invazive. Abilitatea acestui fung este de a forma biofilme cu implicarea deosebită pentru infecțiile cateterelor venoase centrale.
- *Candidoza invazivă* este o boală care pune viața în pericol, cu o mortalitate cuprinsă între 20% și 45%.
- În ciuda unor provocări legate de RAM, sunt disponibile tratamente eficiente. Deoarece infecția este asociată cu cateterul venoase centrale, măsurile de îngrijire pentru a reduce infecția sunt importante.

Prezentare generală

Candida parapsilosis face parte din microbiota umană și animală normală și nu dăunează în condiții sănătoase. Cu toate acestea, poate produce infecție invazivă, a inimii, a sistemului nervos central, a ochilor, a oaselor și a organelor interne, candidemie în special la pacienții grav bolnavi și imunocompromiși, cum ar fi cancerul sau pacienții cu transplant de organe și măduva osoasă. Acest patogen este important în secțiile de terapie intensivă neonatală.

S-a demonstrat că îndepărtarea timpurie a cateterelor centrale reduce incidența infecției.

Pichia kudriavzeveii (Candida krusei)

Informații cheie

- este un agent patogen fungic care poate provoca infecții ale mucoaselor sau produce candidoză invazivă.
- Tratatamentul este posibil și rezistența antifungică este îngrijorătoare (moderată), deoarece accesul la un regim de tratament eficient este încă limitat.

Prezentare generală

Pichia kudriavzeveii (Candida krusei) este o specie de fungi patogenă oportunistă distribuită la nivel global. Este un membru obișnuit al microbiotei umane. Cu toate acestea, poate invada mucoasele și poate provoca candidoză orofaringiană, candidoză esofagiană, candidoză vulvovaginală și candidoză cutanată. De asemenea, poate provoca candidoză invazivă.

Candidoza invazivă cu *P. kudriavzeveii* are o mortalitate globală cuprinsă între 44% și 67% la pacienții adulți.

Aspergillus fumigatus

Informații cheie

- *Aspergillus fumigatus* este o ciupercă omniprezentă, cu implicații semnificative în sănătatea umană, cauzând predominant boli pulmonare prin inhalare din mediul înconjurător și având capacitatea de a se disemina în alte zone, inclusiv în creier.
- Aspergiloza este un termen folosit pentru un spectru larg de infecții care variază de la reacție alergică, colonizare și infecție semi-invazivă până la aspergiloză acută invazivă.
- Aspergiloza invazivă rezistentă la azoli este o boală care pune viața în pericol, cu mortalitate înaltă. Rezistența emergentă la azoli este îngrijorătoare.

Prezentare generală

Aspergillus fumigatus este un fung de mediu omniprezent, distribuit la nivel mondial, cu potențial patogen.

A. fumigatus poate produce infecții invazive (aspergiloză invazivă (AI)), în principal în sistemul respirator, dar se poate disemina în alte organe, cum ar fi sistemul nervos central.

AI este o infecție gravă care îi afectează în special pe cei grav bolnavi, cei cu boli pulmonare cronice și pacienții imunocompromiși (cancer sau transplant). Factorii de risc pentru dezvoltarea AI sunt bine descriși și includ malignitatea hematologică, boala pulmonară cronică, transplantul (atât solid, cât și măduva osoasă), terapia cu corticosteroizi, neutropenia și boala cronică hepatică.

Ratele de mortalitate la cei cu infecție cauzată de *A. fumigatus* rezistentă la azoli sunt ridicate (47–88%) și au fost raportate a fi de până la 100%. Datele privind durata totală a șederii în spital legate de AI sunt limitate și variază pe scară largă (21-532 de zile);

Prevalența AI este variabilă din punct de vedere geografic, variind de la < 1% la 5–10%; variază și incidența anuală. Infecția cu *A. fumigatus* rezistentă la azoli continuă să crească. Tendințele din ultimii 10 ani nu au putut fi stabilite din cauza lipsei de studii.

Cryptococcus neoformans

Informații cheie

- *Cryptococcus neoformans* este un agent patogen fungic oportunist. Criptococoza este dobândită pe cale respiratorie atunci când ciupercile sunt inhalate din mediu.
- Criptococoza cerebrală este o boală care pune viața în pericol, cu mortalitate ridicată, în ciuda terapiei antifungice.
- Deși ghidurile de tratament sunt bine stabilite pentru grupurile cu risc major (pacienți cu HIV), antifungicele recomandate nu sunt disponibile în multe țări și nu există recomandări clare pentru grupurile de risc non-HIV.

Prezentare generală

Cryptococcus neoformans este un fung patogen distribuit la nivel global care trăiește în mediu (sol, lemn în descompunere). După inhalarea celulelor fungice din mediu, *C. neoformans* poate infecta oamenii. Criptococoza afectează inițial plămâinii, dar se poate răspândi la sistemul nervos central (meningită criptococică) și sânge (criptococemie).

Acest fung nu se transmite de la om la om. Majoritatea pacienților sunt imunocompromiși, iar principalul factor de risc este infecția cu HIV. Cu toate acestea, pacienții cu transplant de organe și alții care administrează medicamente ce slăbesc sistemul imunitar sunt, de asemenea, expuși riscului, iar infecția poate apărea la indivizi aparent sănătoși. Factorii de risc pentru boala criptococică invazivă includ infecția cu HIV, imunosupresia iatrogenă, bolile autoimune și ciroza hepatică decompensată.

Criptococoza cauzată de *C. neoformans* este o boală foarte gravă, cu o mortalitate de la 41% la 61%, îndeosebi la pacienții cu infecție HIV. Durata spitalizării la pacienții cu infecție cu *C. neoformans* variază de la 18 la 39 de zile, raportată predominant pentru pacienții HIV-pozitivi. Complicațiile cauzate de infecția cu *C. neoformans* și tratamentul acesteia sunt insuficiență renală acută, creșterea presiunii intracraniene și orbire.

Cryptococcus gattii

Informații cheie

- *Cryptococcus gattii* este un agent patogen fungic distribuit la nivel global, caracteristic mai frecvent în zonele tropicale și subtropicale, deși se poate adapta la diferite condiții climatice temperate.
- Infecția invazivă pune viața în pericol, iar mortalitatea variază de obicei între 10% și 25%. Persoanele imunocompromise sunt expuse unui risc mai mare, dar și persoanele sănătoase pot fi afectate.
- Există ghiduri de tratament pentru infecția cu *C. gattii*, rezistența rămâne scăzută, deși medicamentele cheie sunt frecvent indisponibile în țările cu venituri mici sau medii.

Prezentare generală

Cryptococcus gattii este un fung patogen distribuit la nivel global. Se găsește în mediul înconjurător (sol, anumiți copaci, etc.) din zonele tropicale și subtropicale.

Poate infecta gazda umană după inhalarea sporilor. Criptococoza afectează inițial plămâinii, dar se poate răspândi la sistemul nervos central (meningită criptococică), sânge (criptococemie) și alte părți ale corpului. Nu se transmite de la om la om. Criptococoza invazivă cauzată de *C. gattii* este o infecție gravă, de obicei afectează pacienții imunocompetenți (spre deosebire de *C. neoformans*). Factorii de risc sunt boală critică, imunocompromisă, vârsta mai înaintată și imunosupresia preexistentă (de ex., utilizarea corticosteroizilor orali, disfuncție a organelor). Sechele neurologice au fost prezente la 27% din pacienți.

Criptococoza invazivă cu *C. gattii* este o boală foarte gravă, cu mortalitatea raportată la 43% în cazul infecțiilor în sânge, deși această cifră a fost obținută pe baza unor date limitate. Ratele de mortalitate pentru infecțiile sistemului nervos central și infecțiile pulmonare au variat între 10-23% și respectiv 15-21%..

În general, *C. gattii* a fost agentul etiologic în 11-33% din infecțiile criptococice. Distribuția variază în funcție de tipurile moleculare. Incidența anuală generală este scăzută, deși unele zone (și populații) endemice au rate mai mari și focare noi pot să apară.

Pneumocystis jirovecii

Informații cheie

- *Pneumocystis jirovecii* este un agent fungic patogen oportunist care se transmite de la om la om prin aer.

- Pneumonia cu *P. jirovecii* este o boală care pune viața în pericol, cu o mortalitate substanțială, dar foarte variabilă.
- Tratatamentul este bine stabilit, dar antifungicele nu sunt disponibile în multe țări.

Prezentare generală

Pneumocystis jirovecii este un fung patogen oportunist, distribuită la nivel global. Pneumonia cu *Pneumocystis jirovecii* (PPJ) se transmite de la om la om prin aer. Ca și purtători pot fi persoane sănătoase care sunt asimptomatice.

P. jirovecii poate afecta indivizii sănătoși, pacienții imunocompromiși, cum ar fi cei cu HIV/SIDA, cu transplant de organe solide (în special, renale), bolile autoimune și inflamatorii și sindromul nefrotic și cei care administrează medicamente imunosupresoare.

PPJ este o boală foarte gravă, iar mortalitatea variază de la 0% la 100% în ansamblu (foarte variabilă). Durata spitalizării la pacienții cu infecție cu *P. jirovecii* variază între 0-123 de zile (mediană de 6,6-30 de zile). Complicațiile includ insuficiența respiratorie, insuficiența organului transplantat pe termen lung și insuficiența renală.

Histoplasma spp.

Informații cheie

- *Histoplasma spp.* sunt agenți patogeni distribuiți la nivel global care provoacă histoplasmoză. Histoplasmoza diseminată afectează în special pacienții cu imunosupresie, dar poate infecta și indivizi sănătoși.
- *Histoplasma spp.* are potențialul de a produce focare.
- Histoplasmoza diseminată este o boală care pune viața în pericol, cu o mortalitate cuprinsă între 21% și 53% la pacienții cu HIV.
- Tratatamentul este posibil, iar RAM rămâne moderată, dar este puțin analizată.

Prezentare generală

Histoplasma spp. sunt fungi dimorfi distribuiți la nivel global care trăiesc ca mușcari în mediu (sol și excremente de păsări și lilieci) și ca o formă asemănătoare levurilor la temperatura corpului uman. Histoplasmoza afectează în principal plămânii și se poate extinde la sistemul nervos central, sânge și alte părți ale corpului. Nu se poate transmite între pacienți (fără transmitere de la om la om).

Majoritatea persoanelor care inhalează *Histoplasma spp.* nu se îmbolnăvesc. Pacienții sănătoși se recuperează de obicei fără medicamente. Cu toate acestea, pacienții grav bolnavi și imunocompromiși, cum ar fi cei cu HIV, cancer și cei cu transplant de organe, pot dezvolta forme severe ale bolii. Un număr de celule T CD4 $\leq 50-75$ celule/ μ L este un factor de risc pentru pacienții cu SIDA.

Un studiu a raportat o rată a mortalității de 2,7% la copiii cu histoplasmoză. Durata șederii în spital este de aproximativ 5-7 zile la adulți și copii, cu variabilitate mare. La pacienții cu meningită fungică s-a observat o ședere medie de o lună. Incidența complicațiilor și a sechelelor este necunoscută.

Mucorales

Informații cheie

- Mucorales este un grup mare de ciuperci format din diferite genuri. Mucorales sunt distribuite la nivel global și provoacă un spectru larg de infecții numite mucormicoze.
- Mucorales infectează în special pacienții imunocompromiși, dar pot apărea la cei cu diabet zaharat slab controlat și la cei care au suferit traumatisme, în special leziuni ale pielii și țesuturilor moi.
- Mucormicoza invazivă este o boală care pune viața în pericol, cu mortalitate ridicată. Sunt disponibile tratamente precum intervenții chirurgicale și preparate antifungice.

Prezentare generală

Mucorales este un grup mare (ordin) de ciuperci patogene distribuite la nivel global și include *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Lichthiemia* spp. și altele. Ele pot infecta gazda umană după inhalarea sporilor, producând mucormicoză. Prin urmare, *Mucorales* afectează în mod obișnuit plămâni și sinusurile și se pot răspândi la ochi, sistemul nervos central și tractul gastrointestinal. Invazia fungică poate apărea și prin rupturi ale pielii și după arsuri sau alte leziuni traumatiche.

Agentul cauzal al Eumycetomei

Informații cheie

- Eumicetomul este o infecție profundă a țesuturilor asociată cu dizabilități semnificative. Poate fi cauzată de diverși agenți patogeni fungici, care intră în organism prin rupturi ale pielii.
- Incidența globală este necunoscută. Eumicetomul este predominant în special în rândul celor săraci din țările cu venituri mici-medii și pare să aibă o variabilitate geografică semnificativă.
- Intervențiile comportamentale sunt cel mai bine descrise în termeni de prevenire a infecțiilor, dar impactul lor nu a fost evaluat în mod cuprinzător. Deși sunt disponibile tratamente antifungice și rezistența nu este considerată o problemă majoră, amputarea zonei afectate este frecvent necesară.

Prezentare generală

Eumicetomul este o infecție a țesuturilor profunde cauzată de ciuperci găsite în sol și apă. Ciupercile pătrund în organism prin pielea afectată. Agenții cauzali includ *Madurella* spp., *Falciformispora senegalensis*, *Curvularia lunata*, *Scedosporium* spp., *Zopfia rosatii*, *Acremonium* spp. și *Fusarium* spp., deși datele microbiologice sunt limitate. Eumicetomul este o infecție gravă care afectează în special persoanele cu venituri mici, cu multe complicații și sechele. Până la 60-80% dintre pacienții cu micetom raportează un impact semnificativ asupra vieții lor de zi cu zi și au fost raportate rate de amputație de până la 39%.

Prevenirea constă frecvent în intervenții educaționale și de igienă comportamentală (în special utilizarea pantofilor), deși datele privind impactul și rentabilitatea sunt limitate.

Fusarium spp.

Informații cheie

- *Fusarium* spp. aparțin unui gen mare de ciuperci filamentoase distribuite la nivel global, care se găsesc în natură și pot infecta oamenii provocând fuzarioza.
- Fuzarioza invazivă este o boală care pune viața în pericol, cu mortalitate de la 43% la 67%.
- Tratamentul este dificil din cauza rezistenței intrinseci la mulți dintre preparatele antifungice disponibile în prezent.

Prezentare generală

Fusarium spp. sunt un grup de ciuperci patogene. Deși sunt distribuite la nivel global, ele apar mai frecvent în regiunile tropicale. Sunt saprotrofe, întâlnite predominant în sol, materie organică descompusă și plante. *Fusarium* spp. poate provoca boli invazive (fuzarioza invazivă), în principal a sistemului respirator și a ochilor (keratită), dar se poate disemina și în sistemul nervos central și în alte organe. Se știe că provoacă fungemie datorită capacității lor de sporulare adventițială.

Fuzarioza invazivă este o infecție gravă care afectează în special pacienții imunocompromiși, cum ar fi cei cu afecțiuni maligne hematologice sau post-transplant de celule stem hematoapoietice (HSCT). Factorii de risc pentru fuzarioza invazivă includ leucemia mieloidă acută, HSCT alogenă, reactivarea citomegalovirusului și prezența leziunilor cutanate pozitive cu *Fusarium* spp.

Ratele de mortalitate (30 de zile) variază între 43% și 67% pentru fuzarioza invazivă și au fost mai ales mari pentru infecțiile care implică complexul de specii *F. solani* și *F. proliferatum*. Nu există date privind durata spitalizării pentru fuzarioza invazivă. Endoftalmita endogenă poate complica

fuzarioza invazivă, dar este mai puțin frecventă (<10%). Acest lucru poate provoca rareori pierderea vederii/orbirea.

Scedosporium spp.

Informații cheie

- *Scedosporium spp.* sunt agenți patogeni fungici distribuiți la nivel global, întâlniți în natură, care pot infecta oamenii și pot produce scedosporioza.
- Scedosporioza invazivă este o boală care pune viața în pericol, cu rate de mortalitate de până la 42-46%.
- Tratatamentul este amenințat de ratele ridicate ale RAM.

Prezentare generală

Scedosporium spp. sunt ciuperci patogene oportuniste distribuite la nivel global. *Scedosporium spp.* poate produce infecție invazivă (scedosporioza invazivă), în principal a sistemului respirator, dar și sânge, sistemul nervos central, alte organe, precum și infecții sistemice, care pot fi mortale. Factorii de risc pentru scedosporioză includ prezența malignității, HSCT și infecții severe. Ratele de mortalitate sunt de până la 42-46% la adulți și copii. Un studiu mai recent din Franța a raportat rate mai scăzute ale mortalității (mortalitate la 30 de zile de 9%, mortalitate la 3 luni de 19%) la adulți și copii cu scedosporioză invazivă.

Durata îngrijirii pacientului, și complicațiile și sechelele sunt necunoscute din cauza lipsei de studii. Tendințele din ultimii 10 ani sunt stabile.

Nivelul de prevenire a scedosporiozei invazive este scăzut. Nu este disponibil niciun vaccin. Datele privind măsurile preventive lipsesc.

Accesul la diagnosticare este moderat, iar disponibilitatea și accesibilitatea tratamentelor bazate pe dovezi sunt scăzute. Scedosporioza invazivă este de obicei tratată cu Voriconazolum în asociere cu alte medicamente antifungice. În multe cazuri, este necesară o intervenție chirurgicală pentru a îndepărta țesutul infectat.

Rezistența antifungică este mare. Nu există valori de interpretare farmacologice. Sensibilitatea redusă la Amphotericinum B*, Itraconazolum, Isavuconazolum* și echinocandine este frecventă. Voriconazolum este de obicei cel mai activ antifungic împotriva acestor specii.

Lomentospora prolificans

Informații cheie

- *Lomentospora prolificans* este un agent patogen distribuit la nivel global care poate provoca lomentosporioză invazivă la pacienții imunocompromiși.
- Lomentosporioza invazivă este o boală care pune viața în pericol, cu mortalitate variind de la 50% la 71% la adulți și 50% la copiii imunocompromiși.
- Tratatamentul este amenințat de ratele ridicate ale RAM.

Prezentare generală

Lomentospora prolificans este un agent patogen fungic oportunist, distribuit la nivel global. Poate produce infecții invazive (lomentosporioza invazivă) la nivelul sistemului respirator, sângelui, sistemului nervos central, altor organe, precum și infecții sistemice, care sunt de obicei mortale. Lomentosporioza invazivă este o infecție nosocomială gravă care afectează în special pacienții grav bolnavi și imunocompromiși, în special pe cei cu cancer. Mortalitatea lomentosporiozei invazive variază între 50% și 71% la adulți și 50% la copiii imunocompromiși. Durata îngrijirii pacientului și complicațiile și sechelele sunt necunoscute din cauza lipsei de studii.

*Produsele marcate astfel nu sunt înregistrate în Nomenclatorul de stat al medicamentelor, dar au fost incluse în ghid conform recomandărilor EUCAST

Coccidioides spp.

Informații cheie

- *Coccidioides* spp. sunt unii dintre cei mai virulenți agenți patogeni fungici. Coccidioidomicoza este dobândită pe cale respiratorie atunci când ciupercile sunt inhalate din mediu.
- Coccidioidomicoza invazivă este o boală care pune viața în pericol, mai ales la pacienții vulnerabili, dar poate infecta și pacienții sănătoși.
- Ghidurile de tratament sunt bine stabilite, dar sunt amenințate de ratele ridicate ale RAM.

Prezentare generală

Coccidioides este un gen de ciuperci dimorfe patogene distribuite în America de Nord și Sud, care trăiește ca mușgai în mediu (sol, etc.). După inhalarea celulelor fungice din mediu, *Coccidioides* spp. poate infecta oamenii. Coccidioidomicoza afectează inițial plămânii, dar se poate extinde la sistemul nervos central, sânge, oase și alte părți ale corpului. Nu a fost descrisă nicio transmitere de la om la om.

Deși poate afecta indivizii sănătoși, pacienții imunocompromiși, cum ar fi cancerul, HSCT sau pacienții cu transplant de organe, sunt mai afectați. Factorii de risc includ persoanele de origine africană, inclusiv afro-americieni, vârsta peste 40-60 de ani, ocupația și expunerea la praf/sol din mediu.

Coccidioidomicoza invazivă este o boală foarte gravă, cu mortalitate cuprinsă între 2% și 13%. Ratele mortalității sunt mai mari la pacienții vulnerabili. Durata spitalizării la pacienții cu infecția cauzată de *Coccidioides* spp. variază de la 3 - 7 zile, fiind până la 22,7 zile în meningita coccidioidă.

Talaromyces marneffei

Informații cheie

- *Talaromyces marneffei* se transmite pe cale respiratorie.
- Talaromicoza invazivă este o boală care pune viața în pericol, în special la adulții cu infecție HIV, dar poate infecta și persoane sănătoase.
- Tratamentul este bine stabilit, dar antifungicele nu sunt disponibile în multe țări.

Prezentare generală

Talaromyces marneffei este un fung dimorf patogen endemic în Asia de Sud-Est și în unele zone din China. Poate fi găsit în mediu (sol, lemn în descompunere etc.) și poate infecta gazda umană după inhalarea sporilor. Talaromicoza afectează plămânii, dar se poate extinde la sistemul nervos central, fluxul sangvin și alte părți ale organismului. Nu se transmite de la om la om.

Talaromicoza invazivă afectează în special pacienții gravi și imunocompromiși, cum ar fi cei cu HIV (factorul de risc fiind număr scăzut de CD4), pacienții cu cancer sau cu transplant de organe. Talaromicoza invazivă este o boală gravă, iar mortalitatea variază între 12-21% la adulții cu infecție HIV. Durata spitalizării la pacienții cu *T. marneffei* este de aproximativ 27 de zile. Complicațiile datorate infecției cu *T. marneffei* au inclus insuficiența respiratorie, cașexie.

***Paracoccidioides* spp.**

Informații cheie

- *Paracoccidioides* spp. sunt agenți patogeni fungici inhalați pe cale respiratorie din mediu.
- Paracoccidioidomicoza este o boală care pune viața în pericol, cu mortalitate medie, în ciuda terapiei antifungice. Persoanele imunocompromise prezintă un risc mai mare, dar agentul patogen poate infecta și persoanele sănătoase.
- Tratamentul este bine stabilit, dar antifungicele nu sunt disponibile în multe țări.

Prezentare generală

Paracoccidioides spp. sunt fungi dimorfi patogeni endemici în America Centrală și de Sud care trăiesc în mediu (sol). După inhalarea sau pătrunderea în piele a sporilor fungici din mediu, agentul patogen poate infecta oamenii. Paracoccidioidomicoza afectează în principal plămânii, membranele mucoase și pielea și se poate extinde la ganglionii limfatici și la alte organe ale sistemului reticuloendotelial. Majoritatea persoanelor infectate cu *Paracoccidioides* spp. nu dezvoltă niciodată simptome. Nu poate fi transmisă între pacienți (fără transmitere de la om la om).

Factorii de risc includ vârsta >40 de ani și sexul masculin.

Paracoccidioidomicoza este o boală gravă. Mortalitatea variază de la 3% la 23%, în special la pacienții cu HIV. Durata spitalizării la pacienții cu *Paracoccidioides* spp. nu a putut fi evaluată din cauza lipsei de date. Complicațiile datorate infecției cu *Paracoccidioides* spp. și tratamentul acesteia includ rezervă suprarenală scăzută și limfedem.

Paracoccidioides spp. sunt endemice în America Centrală și de Sud, dar ratele globale de incidență anuală nu pot fi evaluate din cauza lipsei de studii. Tendințele din ultimii 10 ani sunt stabile.

III. Biosiguranța, cerințe specifice laboratorului de diagnostic microbiologic/micologic

Fiecare laborator microbiologic care probe suspecte la infecții fungice va evalua riscurile pentru a se asigura că poate efectua testări în condiții de biosiguranță și biosecuritate.

Prelucrarea probelor biologice suspecte la infecții fungice trebuie efectuată respectând regulile de bune practici de laborator, conform procedurilor stabilite.

Măsurile de biosiguranță trebuie întotdeauna respectate în lucrul cu probele suspecte la prezența agenților fungici și impun ca laboratorul microbiologic/micologic să funcționeze cu circuit în sens unic (separarea în timp și spațiu a circulației probelor, pentru evitarea contaminărilor încrucișate) și să existe acces limitat sau controlat în cadrul laboratorului.

Fiecare probă trebuie considerată potențial suspectă la prezența fungilor patogeni și respectiv procesată în hote de protecție biologică, în special cele care provin din regiuni cu infecții fungice endemice cauzate de fungi dimorfi sau când provin de la pacienți cu suspjecție la infecție sistemică.

Culturile fungice, în special cele cu miceliu aerian sporulat și probele clinice se vor procesa în interiorul unei hote de protecție biologică clasa II, pentru evitarea contaminării personalului și incintei laboratorului.

Plăcile inoculate se vor închide și se vor așeza cu capacul în jos pentru evitarea deschiderii accidentale și contaminării. Incubarea plăcilor se va face în termostate cu umidificatoare (preferabil). În cazul utilizării mediilor de cultură repartizate în tuburi, acestea trebuie să se închidă etanș. Deschiderea plăcilor și tuburilor pentru examinarea ulterioară se va efectua în interiorul hotei de protecție biologică clasa II.

Investigarea fungilor dimorfi (*Histoplasma* spp.) este necesar de efectuat în hote de protecție biologică clasa III. Plăcile cu astfel de culturi se etanșează obligator cu bandă adezivă sau sigilată cu parafină în jurul marginii, pentru a preveni eliberarea accidentală a particulelor infecțioase.

Pentru a lucra în siguranță, trebuie respectate regulile de funcționare a hotelor: pornire conform instrucțiunilor, așteptarea stabilizării fluxului.

Se recomandă a nu se încărca excesiv spațiul de lucru, pentru a nu împiedica circuitul fluxului de aer, a se evita mișcările excesive din jurul hotei care îi perturbă fluxul. Persoana care lucrează la

hotă să efectueze mișcări lente. Pentru a reduce numărul intrărilor/ieșirilor să fie pregătite prealabil la îndemână toate lucrurile necesare, obiectele necesare pentru activitatea sub hotă trebuie puse cât mai în spate.

Recipientul pentru deșeuri mici prevăzute cu saci se amplasează în interiorul hotei, pentru a evita scoaterea și introducerea repetată a mâinilor în hotă și perturbarea fluxului de aer.

Recipientul pentru deșeuri mici, prevăzut cu saci se amplasează într-o parte a hotei (dreapta pentru dreptaci). Aceste recipiente pentru colectarea deșeurilor nu se vor pune în afara hotei, deoarece scoaterea și introducerea repetată a mâinilor în hotă perturbă fluxul de aer.

În cazul incidentelor, accidentelor prin stropire în incinta hotei, hota trebuie dezinfectată imediat. Probele biologice de la pacienții suspecți/confirmați cu infecții fungice trebuie transportate ca și substanțe biologice de categoria B.

Echipamentul de protecție personală conform riscului estimat este esențial în asigurarea managementului riscului biologic. În zonele de lucru ale laboratorului se poartă halate cu mâneci lungi, cu manșetă elastică care se fixează în jurul încheieturii mâinii, suficient de lung să acopere genunchii, rezistent la lichide.

Echipamentul de protecție cu care se lucrează în zonele de lucru cu risc biologic, după utilizare se vor păstra într-o zonă amenajată cu spații (dulapuri), separat de hainele și lucrurile personale. Este interzis de purtat halatele cu care se lucrează în laborator în afara zonei de lucru, cum ar fi sala de odihnă.

Se va purta mănuși de fiecare dată când se lucrează cu probe biologice care la finalizarea lucrului se vor scoate respectând regulile de îndepărtare a lor pentru a se evita contaminarea mâinilor, se aruncă în recipiente speciale. După îndepărtarea mănușilor, mâinile se igienizează.

Trebuie evaluate riscurile biologice în vederea stabilirii necesității protecției respiratorii, în special în timpul procedurilor care se efectuează în afara hotei de biosiguranță, cele generatoare de aerosoli (centrifugarea, manevrarea unor probe scurse).

În caz de incidente, accidente la locul de muncă (deteriorarea recipientelor cu scurgerea conținutului ce prezintă risc biologic), materialul scurs se acoperă cu prosop de hârtie, peste care se aplică dezinfectantul și se lasă pe durata timpului de contact, conform instrucțiunii de la producător, apoi îndepărtarea ulterioară a prosopului. Pe toată durata procesului de înlăturare a incidentului sau accidentului se va purta mănuși de protecție.

Decontaminarea deșeurilor sau materialului infecțios rezultat din procesarea probelor se va realiza prin autoclavare.

Activitatea antifungică (fungicidă și fungistatică) a preparatelor dezinfectante este diferită în funcție de structura chimică a acestora și de tipul de fungi asupra cărora dorim să acționăm, spectrul este destul de limitat, existând doar câteva opțiuni. Pentru decontaminare se vor folosi dezinfectante înregistrate în RM și introduse în Registrul Național al produselor biocide respectând concentrația, timpul de contact recomandat de producător și termenul de valabilitate.

IV. Cerințe pentru probe, tehnici de pre-examinare

CONSIDERAȚII GENERALE

Prelevarea probelor în condiții de asepsie și plasarea în recipiente sterile și etanșe.

1. Transportarea specimenului la laborator în termen de 2 ore.
2. Transportul rapid este esențial pentru a asigura supraviețuirea și izolarea microorganismelor pretențioase și pentru a preveni dezvoltarea excesivă a bacteriilor mai rezistente la factori de mediu.
3. Prelucrarea probelor în termen de 2 ore de la primire sau păstrarea în mod corespunzător.
4. Dacă procesarea va fi întârziată, probele se încubează (sânge, măduvă osoasă, LCR sau material de leziune profundă) la 37°C (sau 35°C dacă nu este disponibil un incubator de 37°C). Se refrigerază la 4°C probele care sunt potențial contaminate cu microbiota bacteriană (de ex., aspirații transtraheale, aspirații ale urechii interne).

CERINȚE PENTRU PROBE

Specimenele trebuie trimise în recipiente închise, fără conservanți. Toate probele trimise la laborator sunt inițial examinate macroscopic, iar părțile reprezentative sunt selectate pentru investigații ulterioare. Specimenele cum ar fi sputa și țesuturile sunt examinate pentru orice semne evidente de purulență, sânge sau necroză/necroză cazeoasă, aceste zone fiind selectate pentru microscopie și cultură.

Când probele sunt trimise în laborator, pe lângă informațiile demografice trebuie să se obțină și următoarele date.

- Sursa și/sau locul anatomic
- Cum și când a fost colectat
- Cum a fost transportat
- Cum a fost întreținut specimenul de către laborator după primire.

Comunicarea cu clinicianul despre detaliile zonei de reședință a pacientului, istoricul călătoriei, contactul cu animalele și terapia anterioară cu preparate antibacteriene, antifungice sau imunosupresoare poate ajuta, de asemenea, să ghideze laboratorul către procesarea probei pentru un anumit patogen fungic. Astfel de informații nu sunt adesea obținute cu ușurință de la medicul care transmite specimenul, de aceea va fi mai bine dacă toată informația dorită este inclusă pe formularul de trimitere/solicitare pe hârtie sau electronic.

Specimenele pot fi obținute atât din surse sau zone anatomice sterile, cât și nesterile.

1. Specimene colectate din surse considerate sterile:

- LCR
- sânge
- măduvă osoasă
- țesut chirurgical
- fluide corporale
- urina din cateter

2. Specimene obținute din surse considerate nesterile:

- spută
- aspirat traheal
- lavajul și periajul bronhiilor (LBA, PBA)
- urina din jetul mijlociu
- lichid de lavaj gastric
- tampoane pentru răni

- material mucocutanat al faringelui, cavității bucale sau nazofaringelui
- material otic
- material vaginal sau cervical
- materii fecale

Specimenele primite pe tampoane sunt inferioare probelor de țesut sau lichid, dar nu trebuie respinse pentru cultură, decât dacă tamponul este uscat sau fără mediu de transport. Dacă circumstanțele permit, laboratorul poate solicita o probă mai bună.

Rebutare

Alte specimene necorespunzătoare includ material primit în fixativ, urină de 24 de ore, specimene primite în recipiente cu scurgeri și cu material insuficient. În aceste circumstanțe, laboratorul trebuie să comunice cu medicul și să solicite recoltarea unui alt specimen, dacă este posibil.

TEHNICI DE PRE-EXAMINARE

1. Sânge

Tehnica filtrului bifazic

Recuperarea fungilor din sânge poate fi îmbunătățită prin utilizarea unui flacon bifazic care conține agar în pantă, cu 60-100 ml de bulion infuzie cord-creier (BHI). Se recomandă un raport de 1:10 la 1:20 (sânge la bulion), fiind necesar minim 5,0 ml de sânge pentru fiecare flacon de cultură. Flaconul de cultură bifazică este menținut cu aerisire și este înclinat zilnic pentru a permite bulionului să curgă peste suprafața agarului. Aceste culturi trebuie verificate pentru creștere, zilnic și cu atenție. Deoarece levurile nu vor transforma bulionul foarte turbure, este imperativ de efectuat din conținutul flaconului frotiu Gram pentru a detecta elementele fungice. Culturile trebuie incubate la 30°C și menținute timp de 4 săptămâni (pentru toți fungii).

Tehnica filtrului cu membrană

Aceasta este o tehnică superioară flacoanelor bifazice ventilate utilizate pentru concentrarea și cultivarea probelor de sânge și LCR. Probele sunt tratate secvențial cu Triton-X și soluții de carbonat de sodiu pentru a liza celulele sanguine și apoi filtrate prin vid printr-o membrană de 0,45 um. Această membrană este apoi plasată pe medii agarizate.

Sistem izolator de centrifugare-liză

S-a constatat că sistemul Wampole Izolator îmbunătățește în mod semnificativ recuperarea fungilor din sânge. Izolatorul utilizează un tub care conține componente ce lizează leucocitele și eritrocitele și, de asemenea, inactivează complementul plasmatic și anumite antibiotice. Odată lizate, celulele eliberează microorganismele conținute în ele, iar etapa de centrifugare servește la concentrarea microorganismelor în proba de sânge. Acest concentrat este apoi inoculat pe suprafața mediilor de cultură adecvate. Sunt necesari zece mililitri de sânge pentru fiecare tub, iar culturile trebuie incubate la 30°C și menținute timp de 4 săptămâni.

Sisteme automatizate (hemoculturi)

Unii furnizori produc mediu de cultură special pentru îmbunătățirea culturii fungice din sânge folosind instrumentele automatizate. Celulele sanguine sunt lizate de mediu pentru a îmbunătăți recuperarea fungilor, de menționat că au fost adăugate și antimicrobiene pentru a limita creșterea bacteriilor.

2. Fluide corporale (LCR; urină; lichide pericardice, pleurale și peritoneale; ascită)

- a) Se centrifughează cantități > de 2 ml.
- b) Până la 0,5 ml de specimen pot fi inoculate prin stiere pe fiecare tip de mediu.
- c) Urina poate fi inoculată și striată cu o ansă calibrată dacă se dorește cuantificarea.
- d) Se inoculează LCR pe medii fără cicloheximidă (inhibitor al *Cryptococcus neoformans*). Supernatantul din preparatul probei poate fi îndepărtat aseptice și utilizat pentru testarea antigenului.

3. Aspirat măduvă osoasă

- a) Se aplică 3-5 picături pe fiecare placă de mediu, se striază inoculul.
- b) Centrifugarea prin liză folosind izolatorul pediatric (1,5 ml) poate îmbunătăți recuperarea.

4. Periaj bronșic

- a) Se vortexează peria în apă distilată sterilă.
- b) Se inoculează 3 până la 5 picături pe fiecare placă de mediu.
- c) Se aplică peria pe suprafața mediului selectiv.

5. Probe respiratorii

Pentru populația generală, cu intenția de a obține o probă omogenă a probelor vâscoase, cum ar fi sputa, se recomandă lichefierea cu ajutorul unui agent mucolitic, cum ar fi Pancreatin, Sputolysin sau prin sonicare și 1,4-ditiotreitol. De asemenea, este recomandată centrifugarea LBA sau a aspiratelor bronșice. Pentru a obține o recuperare optimă a *Aspergillus* din LBA prin centrifugare și investigarea sedimentului, este esențial să se izoleze *Aspergillus* în funcție de volumul de cultură. Sputa recoltată și păstrată 24 de ore nu este acceptabilă pentru cultura fungică.

6. Țesut

Se mărunțește și se pun mai multe bucăți pe fiecare placă cu mediu, dacă se suspectează contaminarea bacteriană poate fi inclus și mediu inhibitor. Se zgârie suprafața și încorporează o porțiune de țesut în zgârietură (această metodă oferă un gradient de tensiune a oxigenului, care poate ajuta la inițierea creșterii fungice).

V. Particularități ale diagnosticului de laborator al infecțiilor fungice invazive

A. Candidoza invazivă (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. auris*, etc.)

1. Generalități

Infecțiile cauzate de speciile *Candida* sunt cauze majore de morbiditate și mortalitate la om, provocând un spectru divers de boli clinice, de la infecții superficiale și ale mucoasei până la boli invazive asociate cu candidemie și implicarea metastatică a organelor. Ca entitate, candidemia este una dintre cele mai frecvente infecții ale fluxului sangvin asociate asistenței medicale, fiind a treia sau a patra cea mai frecventă cauză de infecții ale fluxului sangvin asociate asistenței medicale. Printre pacienții cu candidemie și alte forme de candidoză invazivă, speciile de *Candida non-albicans* constituie aproximativ 50% din toate izolatele relevante, reprezentând o tendință constantă în multe regiuni din lume pentru mai mult de un deceniu.

Candidemia este asociată cu până la 47% mortalitate atribuibilă, iar aceasta este chiar mai mare în rândul persoanelor cu șoc septic. Mai mulți autori au demonstrat că mortalitatea este strâns legată atât de momentul terapiei, cât și/sau de controlul sursei. Adică, intervenția mai timpurie cu terapie antifungică adecvată și îndepărtarea unui cateter venos central (CVC) contaminat sau drenajul materialului infectat sunt asociate cu rezultate generale mai bune.

Cateterile venoase centrale sunt de obicei legate de candidemie, dar nu sunt întotdeauna sursa, în special în rândul pacienților neutropenici la care sistemul gastro-intestinal este o sursă comună. Managementul precaut al CVC-ului specific pacientului este critic în managementul general al infecției.

Dependența continuă de hemoculturi, care sunt notoriu insensibile ca markeri ai bolii, rămâne un obstacol semnificativ în calea intervenției timpurii pentru candidemie. Dezvoltarea de teste nonculturale fiabile este esențială pentru a oferi oportunitatea unei intervenții mai timpurii și a unei

terapii antifungice direcționate în rândul unui număr mare de pacienți la care hemoculturile tradiționale sunt insensibile sau oferă rezultate preliminare incerte.

Candidoza nu este una, ci mai degrabă mai multe boli, fiecare specie de *Candida* prezentând propriile caracteristici unice în ceea ce privește tropismul tisular, tendința de a provoca boli invazive, virulența și sensibilitatea antifungică. O cunoaștere a epidemiologiei locale și a ratelor de rezistență antifungică este esențială în luarea unor decizii terapeutice empirice.

Candidoza este o infecție micotică primară sau secundară cauzată de membrii genului *Candida* și de alte genuri înrudite (*Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Pichia*, etc). Manifestările clinice pot fi acute, subacute sau cronice până la epizodice. Implicarea poate fi localizată: cavitate bucală, esofag, piele, scalp, vagin, degete, unghii, bronhii, plămâni, tract gastro-intestinal sau poate deveni sistemică cauzând sepsis (candidemie), endocardită și meningită. La indivizii sănătoși, infecțiile cu *Candida* sunt cauzate de afectarea funcțiilor barierei epiteliale și de obicei apar la toate grupele de vârstă, dar sunt cele mai frecvente la nou-născuți și vârstnici. Deseori acestea rămân superficiale și răspund rapid la tratament. Candidoza sistemică este observată la pacienții cu deficiență imunitară mediată celular și la cei care primesc tratament agresiv pentru cancer, imunosupresiv sau terapie de transplant.

2. Factori de risc pentru candidoza invazivă

Candidemia se referă la prezența speciilor de *Candida* în sânge. *Candida* într-o hemocultură nu ar trebui niciodată privită ca un contaminant și ar trebui să determine evaluarea infecției metastatice. actori de risc pentru candidoza invazivă

Candidoza invazivă se referă la infecția sistemică cu *Candida*, în prezența sau absența candidemiei; exemplele includ infecția osteoarticulară și candidoza hepatosplenică. Candidemia este cea mai frecventă manifestare a candidozei invazive.

Factorii de risc asociați candidozei mucocutanate, invazive sau sistemice includ următoarele:

- catetere venoase centrale pe termen lung
- neutropenie sau agranulocitoză
- diabet
- intervenții chirurgicale abdominale
- tumori maligne hematologice
- expunere la antibacteriene cu spectru larg (>7 zile)
- utilizare de steroizi
- imunosupresie
- transplant de organe
- insuficiență renală, hemodializă
- arsuri
- internări prelungite în terapie intensivă (>15 zile),
- colonizare cu levuri (≥ 3 locuri)
- ventilație mecanică mai mult de 3 zile
- pacienți cu risc ridicat de transplant de celule stem hematopoietice
- citarabină în doze mari
- mucozită severă sau colonizare de către levuri la > 1 situs în neutropenie
- pacienții HIV/SIDA
- nutriție parenterală
- nou-născuți prematuri
- catetere Foley
- neoplazii solide
- chimioterapie sau radioterapie recentă
- corticoterapie, inhibitori TNF- α și produse biologice care vizează IL-17
- infecție cu *Clostridioides difficile*

- consumatorii de droguri intravenoase (predispuși la candidoză invazivă, în special pentru infecții ale fluxului sangvin, valvelor cardiace, oaselor și articulațiilor).

Primul pas în dezvoltarea unei infecții candidozice este colonizarea suprafețelor muco-cutanate. Căile de invazie includ dereglarea unei suprafețe colonizate (piele sau mucoasă), permițând accesul microorganismelor în fluxul sangvin și persorbția prin peretele gastrointestinal, care poate apărea în urma unei colonizări masive cu fungi care trec direct în fluxul sangvin.

Patofiziologia: Speciile de *Candida* conțin propriul lor set de mecanisme de virulență bine recunoscute, dar slab caracterizate, care contribuie la capacitatea lor de a provoca infecții. Principalii factori de virulență includ următoarele:

- Molecule de suprafață care permit aderența microorganismului la alte structuri (de exemplu, celule umane, matrice extracelulară, dispozitive protetice).
- Proteaze acide și fosfolipaze care implică penetrarea și deteriorarea învelișurilor celulare.
- Capacitatea de a se transforma într-o formă hifalică (schimbare fenotipică).
- Creșterea numărului de căi alternative de utilizare a carbonului (adaptare metabolică).
- Inducerea unor răspunsuri diferențiate de rezistență la stres (superoxid dismutaze).
- Mascarea componentelor peretelui celular pentru evitarea răspunsului imun.

3. Aspecte clinice

CANDIDOZA SISTEMICĂ

Candidoza sistemică poate fi împărțită în 2 sindroame primare: candidemia și candidoza diseminată (infecție a organelor cu *Candida* spp.). Infecțiile profunde ale organelor datorate speciilor de *Candida* sunt în general observate ca parte a sindroamelor de candidoză diseminată și pot implica unul sau mai multe organe.

Candidemia

Speciile de *Candida* sunt o cauză frecventă a infecției de flux sangvin, fiind raportate ca fiind al patrulea cel mai frecvent microorganism izolat în hemoculturi. Infecția cu *Candida* este în general considerată o infecție asociată asistenței medicale. Istoricul pacientului dezvăluie de obicei următoarele:

- Câteva zile de febră care nu răspunde la antimicrobienele cu spectru larg; frecvent singurul marker al infecției;
- Cateterizare intravenoasă prelungită;
- Un istoric al mai multor factori de risc cheie;
- Posibil asociat cu infecția multiorganică.

Rezultatele examenului fizic pot include următoarele:

- Febră;
- Leziuni cutanate macronodulare (aproximativ 10%);
- Endoftalmita cauzată de *Candida* (aproximativ 10%);
- Ocazional, șoc septic (hipotensiune, tahicardie, tahipnee).

Alte cauze ale candidemiei fără boală invazivă includ următoarele:

- Candidoza legată de cateterul intravascular: această entitate răspunde de obicei prompt la îndepărtarea cateterului și la tratamentul antifungic.
- Tromboflebita supurativă: aceasta este asociată cu cateterismul venos central prelungit. Tromboflebita supurativă se manifestă cu febră și candidemie persistentă, în ciuda terapiei antifungice adecvate și a îndepărtării cateterului. Se poate dezvolta sepsis și șoc septic.
- Endocardita: cele mai frecvente cauze ale endocarditei fungice sunt speciile de *Candida*, în special *C. albicans* și *C. parapsilosis* cu implicarea valvei aortice și mitrale. Endocardita poate fi

exogenă (datorită inoculării directe în timpul intervenției chirurgicale) sau endogenă (datorită diseminării hematogene). Endocardita cauzată de *Candida* spp. este asociată cu 4 factori de risc principali, inclusiv consumul intravenos de droguri (asociată frecvent cu *C. parapsilosis*), chimioterapia, proteze valvulare (aproximativ 50%) și utilizarea prelungită a cateterelor venoase centrale. Examenul fizic relevă o gamă largă de manifestări, inclusiv febră care nu răspunde la antimicrobiene, hipotensiune arterială, șoc, suflu nou sau în schimbare și embolii septice vaste a organelor.

Candidoză diseminată

Aceasta este asociată frecvent cu infecții profunde și multiple ale organelor sau poate implica infecția unui singur organ. Din păcate, hemoculturile sunt negative la 40-60% dintre pacienții cu candidoză diseminată. Istoricul unui pacient cu candidoză diseminată prezumtivă relevă o febră care nu răspunde la antimicrobienele cu spectru larg și rezultate negative din hemocultură. Examenul fizic evidențiază febră (poate fi singurul simptom) cu sursă necunoscută, sepsis asociat și șoc septic.

Candidoza hepatosplenica (candidoza sistemica cronica)

Candidoza hepatosplenică este o formă de candidoză sistemică la pacienții cu o malignitate hematologică subiacentă și neutropenie, se dezvoltă în timpul fazei de recuperare a unui epizod neutropenic. Istoricul pacientului include următoarele:

- Febră care nu răspunde la antimicrobienele cu spectru larg;
- Durere în hipocondrul drept;
- Dureri abdominale și distensie;
- Icter (rar).

Rezultatele examenului fizic includ sensibilitate în hipocondrul drept și hepatosplenomegalie (<40%).

Candidoza renală

Aceasta este frecvent o consecință a candidemiei sau a candidozei diseminate. Istoricul pacientului include febră care nu răspunde la antimicrobienele cu spectru larg. Frecvent, pacienții sunt asimptomatici și lipsesc simptome care se referă la sistemul renal.

Constatățile la examenul fizic sunt, în general, nesemnificative, iar diagnosticul se stabilește în baza analizei generale a urinei și biopsie renală. În caz contrar, această afecțiune este de obicei diagnosticată la necropsie.

Infecții ale sistemul nervos central (SNC)

Infecțiile SNC datorate speciilor de *Candida* sunt rare și dificil de diagnosticat. Cele 2 forme primare de infecție includ infecția exogenă și infecția endogenă. Infecția exogenă rezultă din infecția postoperatorie, traumatisme, puncție lombară sau plasarea șunturilor. Infecția endogenă rezultă din diseminarea hematogenă, astfel implică parenchimul cerebral și se asociază cu multiple abcese mici (de ex. candidoza diseminată).

Ca și în cazul altor infecții de organ cauzate de speciile de *Candida*, pacienții au de obicei factori de risc de bază pentru candidoza diseminată. Infecțiile SNC datorate speciilor de *Candida* sunt frecvent întâlnite la pacienții cu internări prelungite în terapie intensivă. Spectrul acestei boli include următoarele:

- Meningita;
- Vasculita granulomatoasă;
- Cerebrită difuză cu microabcese;
- Aneurisme micotice;
- Febră care nu răspunde la antimicrobienele cu spectru larg;
- Stare mentală alterată.

Examenul fizic prezintă următoarele:

- Febră;
- Rigiditate cervicală;
- Confuzie;
- Comă.

Artrita, osteomielita, costocondrita și miozita

Infecțiile musculo-scheletice cauzate de *Candida* spp. nu sunt comune, dar posibile din cauza frecvenței crescute a candidemiei și a candidozei diseminate. Cele mai frecvente locuri de implicare continuă sunt articulația genunchiului și coloana vertebrală. Modelul de implicare este similar cu modelul observat în infecțiile bacteriene. Infecția poate fi exogenă sau endogenă. Infecția exogenă se datorează inoculării directe a microorganismelor, cum ar fi infecția postoperatorie sau traumatismele. Locurile afectate includ următoarele:

- Coastele și oasele membrilor inferioare (pacienți <20 ani);
- Coloana vertebrală și abcesul paraspinal (la vârsta adultă);
- Oasele plate (orice grup de vârstă);
- Sternul - se observă în general postoperator după intervenția chirurgicală cardiacă.

Pacientul este frecvent asimptomatic, iar istoricul relevă factori de risc tipici candidozei diseminate, precum și durere localizată. Rezultatele examenului fizic sunt frecvent neremarcabile, dar pot evidenția sensibilitate în zona afectată, eritem și deformare osoasă, ocazional în asociere cu un tract fistulos drenant.

Artrita cauzată de *Candida* spp. este, în general, o complicație a candidozei diseminate, dar poate fi cauzată de traumatisme sau de inoculare directă din cauza intervențiilor chirurgicale sau a injecțiilor cu steroizi. Majoritatea cazurilor sunt acute și încep ca o sinovită supurată. Un procent mare de cazuri evoluează spre osteomielită. În plus, artrita cauzată de *Candida* după înlocuirea articulațiilor se întâlnește rar.

Osteomielita cauzată de *Candida* are originea fie exogenă, fie endogenă. Infecția exogenă se datorează inoculării directe a microorganismelor prin căi precum infecția postoperatorie, traumatisme sau injecții cu steroizi. Forma endogenă este o complicație a candidemiei sau a candidozei diseminate. În cele mai multe cazuri, din cauza diseminării hematogene, sunt implicate discurile vertebrale și progresează frecvent spre discită cu extindere contiguă în corpul vertebrelor. Alte oase afectate includ: oasele mâinii, femurul, scapula și humerusul proximal.

Costocondrita: este o formă neocomună de infecție și se prezintă prin 2 moduri de infecție. Costocondrita candidozică se datorează de obicei răspândirii infecției hematogene sau inoculării directe în timpul intervenției chirurgicale (sternotomie mediană). Costocondrita este frecvent asociată cu durere localizată în zona afectată.

Miozita: miozita cu *Candida* este mai puțin frecventă, dar este deseori asociată cu candidoza diseminată. Majoritatea pacienților sunt neutropenici și raportează dureri musculare.

Miocardită-pericardită

Această infecție se datorează de obicei răspândirii hematogene directe în asociere cu candidemie și rareori se datorează extinderii directe din stern sau esofag. Miocardita-pericardita apare sub formă de abcese difuze împrăștiate în întregul miocard înconjurat de țesut cardiac normal. La pacienții cu candidoză diseminată, rata miocardită-pericardită este până la 50%. Istoricul pacientului relevă complicații grave în 10-20% din cazuri fără afecțiuni valvulare. Examenul fizic evidențiază febră, hipotensiune arterială, șoc, tahicardie și noi sufluri cardiace.

Peritonita cauzată de *Candida*

Istoricul pacientului relevă frecvent o asociere cu intervenția chirurgicală a tractului gastrointestinal, perforația vâscoasă sau dializa peritoneală. Peritonita cu *Candida* tinde să rămână localizată, diseminându-se în sânge în doar 15% din cazuri. Gama de manifestări este largă și

include febră, frisoane, dureri și crampe abdominale, greață, vărsături și constipație. Izolarea speciilor de *Candida* din lichidul peritoneal la pacienții operați trebuie evaluată cu atenție.

Examenul fizic poate evidenția următoarele:

- febră și frisoane;
- distensie abdominală;
- durere abdominală de intensitate variabilă;
- greață, vomă;
- inapetență.

Abces splenic și hipersplenism cauzate de *Candida*

Ambele sunt manifestări ale candidozei diseminate și sunt de obicei asociate simultan cu afectarea ficatului. Manifestările hipersplenismului sunt frecvente (vezi Candidoza hepatosplenică).

Colecistita cauzată de *Candida*

Acest fapt este mai puțin frecvent și este, în general, asociat cu colangita bacteriană și colangita ascendentă. În general, colecistita candidozică este diagnosticată în momentul intervenției chirurgicale când este posibilă obținerea culturii.

4. Descriere *Candida* spp

Candidoza reprezintă o infecție cauzată de specii din genul *Candida*, predominant fiind *Candida albicans*. Speciile de *Candida* sunt levuri omniprezente care reprezintă cei mai des întâlniți agenți patogeni fungici ce afectează oamenii. Problema tot mai mare a candidozei mucoase și sistemice reflectă creșterea enormă a numărului de pacienți cu risc și oportunitatea crescută care există pentru speciile de *Candida* de a afecta țesuturile în mod normal rezistente la invazie. Speciile de *Candida* sunt adevărați agenți patogeni oportuniști care exploatează progresele tehnologice recente pentru a invada fluxul sangvin și țesuturile profunde.

Genul *Candida* este caracterizat prin celule globoase până la alungite, blastoconidii care se reproduc prin înmugurire multilaterală cu bază îngustă. Pseudohife și ocazional hife adevărate pot fi, de asemenea, prezente. Pigmentarea coloniilor este de obicei absentă. Nu se formează balistoconidii. Se pot forma artroconidii, dar nu pe scară largă. Reproducerea sexuală este absentă. Glucoza poate fi fermentată. Nitrații pot fi asimilați. Nu se produc compuși asemănători amidonului.

Genul este foarte polifiletic, deoarece cuprinde specii mitosporice care sunt lipsite de caracteristici distinctive speciale. În consecință, s-au făcut mai multe rearanjamente taxonomice și multe specii cunoscute de *Candida* au fost mutate în alte genuri, în special *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*), *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*), *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*), *Diutina catenulata* (*Candida catenulata*), *Diutina rugosa* (*Candida rugosa*) și *Wickerhamomyces anomalus* (*Candida pelliculosa*). *Candida glabrata* și *Candida parapsilosis* sunt recunoscute ca specii complexe.

Mai multe specii pot fi agenți etiologici, cel mai frecvent fiind *Candida albicans*, urmată de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* și *Pichia kudriavzevii*. În total, aceste cinci specii reprezintă mai mult de 95% din infecțiile umane. Cu toate acestea, o serie de alte specii pot fi, de asemenea, izolate. Toate sunt omniprezente și apar în mod natural la oameni.

Speciile de *Candida* semnificative din punct de vedere medical sunt următoarele:

- *Candida albicans*, cea mai comună specie identificată (50-60%);
- *Candida glabrata* (cunoscută anterior ca *Torulopsis glabrata*) (15-20%);
- *Candida parapsilosis* (10-20%);
- *Candida tropicalis* (6-12%);

- *Candida krusei* (1-3%);
- *Candida kefyr* (< 5%);
- *Candida guilliermondi* (< 5%);
- *Candida lusitaniae* (< 5%);
- *Candida dubliniensis*, recuperată în primul rând de la pacienții infectați cu HIV;
- *Candida auris*;
- *Candida haemulonii*.

C. albicans și *C. glabrata* reprezintă aproximativ 70-80% din speciile de *Candida* recuperate de la pacienții cu candidemie sau candidoză invazivă.

Candida albicans este un comensal al membranelor mucoase și al tractului gastrointestinal. *C. albicans* este cel mai frecvent agent patogen fungic oportunist al oamenilor și cel mai frecvent izolat din hemoculturi. Deși face parte în mod normal din flora gastrointestinală, *C. albicans* are capacitatea de a coloniza aproape toate țesuturile și organele umane, provocând infecții grave și invazive. *C. albicans* este o specie polimorfă și se poate dezvolta sub formă de celule levurice, pseudohife și hife, acest dimorfism fiind necesar pentru o virulență deplină. *C. albicans* este un microorganism foarte adaptabil, fiind capabil să dezvolte rezistență în urma unei expuneri prelungite la antifungice. Formarea de biofilme, care diminuează accesibilitatea față de antifungice, selecția de mutații spontane care cresc expresia sau scad sensibilitatea țintei, anomalii cromozomiale modificate, supraexpresia pompelor de eflux multidrog și capacitatea de a scăpa de apărarea imunitară a gazdei sunt câțiva dintre factorii care pot contribui la toleranța și rezistența la antifungice.

***Candida glabrata* complex**

Recent, *Candida glabrata* a fost recunoscută ca un complex de specii format din *C. glabrata*, *C. bracarensis* și *C. nivariensis*.

Aceste trei specii nu se pot distinge din punct de vedere fenotipic și sunt cel mai bine identificate prin metode moleculare sau MALDI-TOF MS.

Candida glabrata este una dintre cele mai comune specii de levuri care se găsesc pe suprafața corpului și este adesea izolată ca o descoperire incidentală de pe piele și din urină. Este implicată ca o cauză „oportunistă” atât a infecțiilor superficiale, cât și a celor sistemice, în special la pacienții imunocompromiși, și a fost izolată de la pacienții cu sepsis, pielonefrită, infecții pulmonare, endocardită și hiperalimentare. *C. glabrata* a devenit recent foarte importantă datorită incidenței sale în creștere la nivel mondial, asocierii sale cu rezistența la Fluconazol de până la 20% din probele clinice și sensibilității sale globale scăzute la alți azoli și poliene.

Candida parapsilosis a fost recunoscută ca patru specii: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* și *Lodderomyces elongisporus*.

Aceste patru specii nu se pot distinge din punct de vedere fenotipic și se disting cel mai bine prin secvențierea sau analiza MALDI-TOF MS.

Speciile de *Candida* reprezintă majoritatea infecțiilor sistemice fungice ale fluxului sangvin în unitățile de terapie intensivă din întreaga lume. Deși cea mai răspândită și invazivă specie este *Candida albicans*, în ultimele două decenii, dominația acesteia a scăzut pe măsură ce numărul de infecții invazive provocate de specii de *Candida non-albicans* a crescut. Dintre acestea, *Candida parapsilosis* are o importanță deosebită, deoarece este capabilă să formeze biofilme tenace pe cateterele venoase centrale și pe alte dispozitive implantate medical, amenințând astfel pacienții care au fost supuși unor intervenții medicale invazive. De asemenea, *C. parapsilosis* se dezvoltă rapid în cazul nutriției parenterale totale administrată pacienților de la terapie intensivă, expunând astfel la un risc crescut copiii subnutriți și nou-născuții cu greutate mică la naștere. Deși infecțiile cu *C. parapsilosis* determină, în general, rate mai mici de morbiditate și mortalitate decât infecțiile cu *C. albicans*, s-a raportat că mai multe izolate clinice ale acestei specii sunt mai puțin sensibile la echinocandine și, în unele regiuni, s-a observat, de asemenea, rezistență la tratamentul cu azoli, ceea ce complică alegerea tratamentului empiric cu medicamente antifungice.

Candida tropicalis este o cauză majoră a fungemiei și a candidozei diseminate. De asemenea, se găsește ca parte a florei mucocutanate umane, izolată din materii fecale, creveți, chefir și sol. Este capabilă să producă pseudohife. *C. tropicalis* a fost considerată, de asemenea, o specie producătoare de biofilme rezistente și este foarte aderentă la celulele epiteliale și endoteliale. În plus, mai multe investigații recente au raportat recuperarea de *C. tropicalis* rezistentă la medicamentele antifungice, cum ar fi derivații azolici, Amphotericinum B* și echinocandinele. *C. tropicalis* este considerat un microorganism osmotolerant, iar această capacitate de a supraviețui la concentrații ridicate de sare poate fi importantă pentru persistența fungică în medii salin, contribuind la exprimarea factorilor de virulență *in vitro* și la rezistența antifungică.

Candida krusei este o ascomicetă diploidă, dimorfă, care trăiește pe membrana mucoasă a persoanelor sănătoase. Cu toate acestea, levura poate provoca infecții care pun viața în pericol la pacienții imunocompromiși, cu malignitate hematologică și cei care folosesc profilaxia azolică prelungită. Este importantă datorită rezistenței sale intrinseci la Ketoconazolum și Fluconazolum; este, de asemenea, mai puțin sensibilă la toate celelalte antifungice, inclusiv itraconazol și Amphotericinum B*.

Candida kefyr (anterior *Candida pseudotropicalis*) este o levură al cărei teleomorf este recunoscut în prezent ca fiind *Kluyveromyces marxianus*. *Candida kefyr* - o ascomicetă izolată ocazional din produse lactate, a fost izolată și dintr-o varietate de probe clinice, inclusiv din probe invazive și de pe mâinile lucrătorilor din domeniul sănătății. Rapoartele recente sugerează că *C. kefyr* este un agent patogen emergent la pacienții imunocompromiși, în special la cei cu boli oncohematologice. *C. kefyr* a atras atenția datorită sensibilității sale reduse la Amphotericinum B* și a capacității sale de a dobândi rapid rezistență la echinocandine.

Candida guilliermondii este un izolat neobișnuit în cea mai mare parte a lumii, al cărui comportament ca fung de mediu, saprofit uman și agent de infecții grave a fost evidențiat de-a lungul anilor. În special, bolile provocate de acest agent patogen implică gazde oncologice compromise. Este îngrijorător faptul că poate dobândi sau exprima în mod inerent o sensibilitate redusă *in vitro* la toate clasele de antifungice, deși nu a fost încă descrisă o rezistență generalizată, iar corelația dintre CMI și rezultatele clinice este slabă. *Candida guilliermondii* este un complex eterogen din punct de vedere genetic care cuprinde mai multe specii, dintre care 3 au fost raportate ca fiind cauza candidemiei (*C. guilliermondii* sensu stricto [*Meyerozyma guilliermondii* ca formă teleomorfă], *Candida fermentati* [*Meyerozyma caribbica* ca formă teleomorfă] și *Candida carpophila*).

Candida guilliermondii face parte din microbiota fungică normală a pielii și mucoaselor umane. Incidența candidemiei cauzate de *C. guilliermondii* variază între 1% și 3%, în funcție de localizarea geografică, iar 95% se datorează *C. guilliermondii* sensu stricto. Din cauza sensibilității sale scăzute intrinseci la azoli și echinocandine, tratamentul fungemiei cu *C. guilliermondii* reprezintă o provocare din ce în ce mai mare.

Candida lusitaniae este un microorganism dimorfic care produce celule levurice ovoidale, elipsoidale sau alungite, asemănătoare altor specii cum ar fi *Candida tropicalis*, iar coloniile sunt de culoare și aspect cremos, moi și netede. Comparativ cu *C. albicans*, cea mai studiată specie din acest gen, *C. lusitaniae* nu este capabilă să dezvolte hife adevărate, ci doar pseudohife, care este un blastoconidiu cu un tub de înmugurire îngustat între conidiu și primul compartiment al tubului germinativ emergent. Este demn de menționat faptul că dimorfismul acestui microorganism a fost legat de rezistența fungică la Amphotericinum B*. În plus, această plasticitate morfologică oferă posibilitatea ca o celulă fiică să supraviețuiască apărării imunitare a gazdei. Pe CHROMagar, coloniile generează o culoare roz spre purpurie, ceea ce permite diferențierea lor de *C. tropicalis*, deoarece ambele specii sunt similare din punct de vedere morfologic.

Agentul patogen *Candida lusitaniae* este o levură haploidă oportunistă raportată ca fiind cauza etiologică a infecției la om, cel mai frecvent la pacienții imunocompromiși care au adesea comorbidități. Chiar dacă este considerat un agent patogen nosocomial emergent cu frecvență redusă și sensibil la terapiile antifungice convenționale, *C. lusitaniae* a atras atenția deoarece unele izolate sunt rezistente la Amphotericinum B* și Fluconazolum. Dintre infecțiile provocate de *Candida* spp., *C. lusitaniae* este responsabilă pentru aproximativ 19,3% din cazurile de fungemie la pacienții cu cancer și aproximativ 1,7% din toate cazurile de candidoză genito-urinară la pacienții ambulatori.

Candida dubliniensis este o specie nou descoperită în 1995 și care este foarte strâns înrudită cu *C. albicans*, este o levură pozitivă pentru clamidospori și tuburi germinative, care a fost recuperată în principal din cavitatea bucală a persoanelor infectate cu HIV și a pacienților cu SIDA. Microorganismul a fost recuperat de la pacienți din locații geografice foarte răspândite.

Candida auris este un fung emergent multidrog rezistent care provoacă infecții invazive, fiind descris pentru prima dată în 2009 în Japonia și de atunci a fost raportat în numeroase țări. Infecțiile și focarele cauzate de *C. auris* în spitale sunt mai frecvente în ultimii câțiva ani. Dificultatea de identificare a acestuia, proprietățile de rezistență la mai multe medicamente, ratele mari de mortalitate asociate și supraviețuirea pe termen lung pe suprafețele din mediu fac *C. auris* să fie deosebit de problematică în mediu clinic. *Candida auris* este acum o infecție care trebuie notificată conform reglementărilor de sănătate publică în multe țări.

Candida haemuloni a fost recent reclasificată ca un complex de trei entități fenotipic identice, dar genotipic distincte: *C. haemuloni*, *C. duobushaemulonis* și *C. haemuloni* var. *vulneris*, bazată pe secvențierea ITS și D1/D2.

Notă: *C. haemuloni* și *C. haemulonis* sunt variante ortografice, dar *C. haemuloni* este considerat numele corect.

Candida inconspicua este o cauză rară a candidemiei.

5. Tehnici de diagnostic în candidoză

5.1 EXAMINAREA ȘI EVALUAREA CULTURILOR PRIMARE

5.1.1 Examinarea creșterii fungice pe medii primare

Medii primare de izolare pentru fungi: (a) Agar dextroză Sabouraud cu cloramfenicol, se incubează culturi duplicate la 25-30°C și 35-37°C; și (b) Agar infuzie cord creier (BHIA) suplimentat cu 5% sânge de berbec și incubat la 35-37°C. Culturile se mențin timp de 4 săptămâni.

Notă: Culturile bacteriologice negative de la pacienți cu dovezi clinice de infecție fungică trebuie sigilate cu bandă și menținute la 25-30°C timp de 4 săptămâni pentru a exclude prezența unor fungi cu creștere lentă.

Plăcile primare sunt citite zilnic în prima săptămână, la două zile în a doua săptămână și de două ori pe săptămână în ultimele 2 săptămâni. Termenul de incubație de 4 săptămâni a fost contestat deoarece puține culturi pozitive noi se dezvoltă în a patra săptămână. Însă s-a observat că culturile pozitive semnificative din punct de vedere clinic sunt uneori observate în a patra săptămână, sugerând necesitatea de a păstra această perioadă de incubație. În zonele endemice cu agenți patogeni dimorfi sistemici, trebuie luată în considerare incubarea timp de 5 săptămâni, deoarece izolatele ocazionale de *Histoplasma capsulatum* și *Blastomyces dermatitidis* necesită mai mult timp pentru a forma colonii evidente. În cazurile de eumicetom (micetom fungic), agentul etiologic poate să nu fie evident pe cultură până în a cincea sau a șasea săptămână. Când apare creșterea, necesită diferențierea între levuri și forme filamentoase (mucegaiuri) care pot necesita examinare microscopică. Se utilizează frotiu umed sau colorat cu lactofenol coton bleu (LPCB, anexa 5). Dacă izolatul sugerează un actinomicet, se examinează cu colorația Gram și colorația acido-resistentă modificată.

Mai multe caracteristici cheie ale unor fungi pot fi obținute din culturi primare. Pentru levuri, acestea includ prezența unei capsule, caracteristicile de înmugurire (singure, multiple sau catenate), dimensiunea, morfologia și culoarea coloniei. Dacă în cultura primară este utilizat CHROMagar sau alt mediu cromogen poate fi posibilă o identificare prezumtivă a levurilor. Hemoculturile sau culturile fluide incubate în bulion care au elemente fungice la colorarea Gram trebuie să fie subcultivate pe medii adecvate. Dacă sunt observate levuri, atunci setul de medii pentru subcultură e necesar să includă și agar cromogen sau un mediu diferențial similar, inclusiv tehnica de colorare India ink atunci când morfologia levurilor este suspectă pentru *Cryptococcus* spp.

5.1.2 Examinarea microscopică a levurilor/fungilor

Pentru vizualizarea mai multor specii de fungi pot fi utilizate următoarele tehnici:

- Examinarea coloniilor levurice cu agent de umezire Tween 80 de 0,05%;
- Tehnica LPCB;
- Tuș de India (India ink);
- Colorația Gram.

Notă: Procedura acestor tehnici este descrisă în anexa 5.

5.1.3 Medii cromogene pentru identificarea levurilor din cuturile primare

Medii cromogene

Mediile cromogene conțin substraturi enzimatică care sunt legate de compuși cromogeni. Când enzimele specifice scindează substraturile cromogene, produc culoare. Acțiunea diferitelor enzime produse de speciile de levuri are ca rezultat o variație de culori utilă pentru identificarea prezumtivă a unor levuri. Variația coloniilor este observată pentru unele specii și mediul este potrivit pentru *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis* și *Trichosporon* spp. Mediul cromogen nu este unica soluție pentru o identificare definitivă a levurilor. Mediul conține cloramfenicol pentru a inhiba contaminarea bacteriană a probelor primare. Grupul de levuri identificat pe mediu cromogen poate varia între furnizorii de agar.

Aplicații

Mediile cromogene sunt utile pentru detectarea infecțiilor mixte (în special la răni și la probe considerate sterile) și ca test suplimentar pentru rezolvarea identificărilor dificile.

Procedură

Probele primare trebuie inoculate prin proceduri tipice pentru specimen, subculturile se striază pe plăci pentru a obține colonii izolate.

Pentru respectarea temperaturii și duratei de incubare se va urma instrucțiunile producătorului. Expunerea la temperaturi mai ridicate sau mai scăzute pentru o perioadă prelungită va modifica culoarea finală a coloniilor și va duce la o posibilă identificare prezumtivă incorectă a unor specii de *Candida*.

Pentru a determina caracteristicile microorganismului în scopul identificării prezumtive se vor utiliza doar colonii izolate.

Nu se utilizează coloniile izolate pentru a efectua teste ulterioare de screening sau pentru sisteme de identificare biochimică. Este recomandabilă subcultura pe un mediu neselectiv înainte de a efectua teste suplimentare de identificare a izolatului.

Dacă mediul este utilizat pentru a determina infecția mixtă în probele primare și pentru unele identificări dificile, trebuie efectuate teste suplimentare.

Limitări

Mediile cromogene oferă doar identificarea prezumtivă până la 4-5 specii de levuri (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* și *C. dubliniensis*). Laboratoarele clinice ar trebui să testeze cel puțin cinci izolate din fiecare dintre cele 4-5 specii pentru a deveni conștienți de variația de culoare care poate apărea. Respectarea strictă a condițiilor de incubație ale producătorului este imperativă. Reactivitatea enzimatică este sensibilă la temperatură. De consultat instrucțiunile producătorului înainte de a efectua acest test.

Mediile cromogene au fost dezvoltate pentru a oferi o identificare prezumtivă a *C. albicans*, dar aceste medii ar putea fi folosite și pentru a ajuta la detectarea infecțiilor mixte. Nu trebuie utilizat nici un mediu cromogen sau fluorogen ca unic determinant al identificării speciilor.

5.2 IDENTIFICARE PREZUMTIVĂ A LEVURILOR IZOLATE PE CULTURĂ PRIMARĂ

Testele descrise în tabelul 1 sunt considerate prezumtive deoarece nu testează o caracteristică unică a unei specii respective. Unele dintre teste au valori de specificitate ridicate, ceea ce ar face testul suficient în scopul managementului medical al unor situații clinice (de ex., candidoza intertriginosă cauzată de *Candida albicans*), dar insuficientă pentru altele (de ex., fungemia cauzată de *C. albicans*). Testele prezumtive sunt, de asemenea, limitate în gama de specii pe care le identifică.

Rezultatele a două teste diferite cu specificitate înaltă pentru o anumită specie pot fi adecvate pentru identificarea prezumtivă a speciei. Cu toate acestea, există cazuri când două specii diferite provoacă reacții pozitive identice cu ambele teste. Micologii și microbiologii clinici trebuie să fie conștienți de acest fapt, de ex. *C. albicans*, cea mai des întâlnită specie în cadrul clinic și *Candida dubliniensis* prezintă rezultate pozitive atât la tubul germinativ, cât și pentru enzimele β -galactosaminidază și L-prolin aminopeptidaza.

Rezultatele obținute cu un test prezumtiv trebuie să fie în concordanță cu alte informații referitoare la levuri (culoarea coloniei și morfologia celulară) și specimenul clinic. Astfel, testele prezumtive ar trebui efectuate numai pe izolate care au caracteristici morfologice și culturale compatibile cu utilizarea unui anumit test. Este important de știut că apar infecții mixte cu levuri, cum ar fi fungemia. Testele de identificare prezumtivă presupun că inoculul provine din culturi pure sau din colonii unice. Teste precum cele de screening pentru *C. albicans* necesită colonii multiple în pregătirea inoculului, prin urmare, culturile mixte vor furniza rezultate eronate.

Tab. 1 Teste de identificare prezumtivă a levurilor pe cultură primară

Teste	Microorganism
Mediu cromogen	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Trichosporon</i> spp.
Tub germinativ	<i>C. albicans</i> complex (<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. stellatoidea</i> și <i>Candida africana</i>)
Screening <i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Test rapid urează	<i>Cryptococcus</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Trichosporon</i> spp. (<i>variabil</i>), <i>C. krusei</i> (<i>variabil</i>), <i>Malassezia pachydermatis</i> , <i>Candida lipolytica</i> (<i>levuri bazidiomicete</i>)
Test rapid nitrat reductaza	<i>C. albidus</i> (+), <i>C. neoformans</i> ("), <i>C. terreus</i> (+)
Disc cu acid cafeic	<i>C. neoformans</i>
Test rapid de asimilare a trehalozei	<i>C. glabrata</i>

Tuș de India	<i>Cryptococcus</i> spp.
Hibridizare in situ prin fluorescență folosind sonde de acid nucleic peptidic (PNA FISH), doar pentru hemoculturi	<i>C. albicans</i> , <i>C. albicans/C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. glabrata/C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i>

5.2.1 Testul tub germinativ

Testul tub germinativ oferă una dintre cele mai rapide abordări ale identificării prezumtive pentru *C. albicans* și *C. dubliniensis*.

Procedură

1. Se atinge ușor o colonie de micete levuriforme cu un aplicator de lemn.
2. Se suspendează celulele de micete într-un tub, etichetat corespunzător, cu 0,5 ml de ser fetal bovin, conținând 0,5% glucoză. Ca alternativă, se pot utiliza mai multe medii lichide (de ex., BHI, bulion de soia tripticază, bulion nutritiv).
3. Se incubează la 35-37°C timp de 2,5-3 ore, este esențial să nu se incubeze testul mai mult de 3 ore, deoarece, în cazul unei incubării prelungite, pot dezvolta tuburi germinale și alte specii.
4. Se pune o picătură de suspensie pe o lamă de microscop, apoi se aplică o lamelă peste suspensie.
5. Se examinează la putere mare pentru prezența sau absența tuburilor germinale. Un tub germinativ apare ca o scurtă prelungire laterală de la celula levurică și nu are o constricție (sept) unde se întâlnește cu celula levurică sau orice constricție de-a lungul tubului (dacă tubul este suficient de lung pentru a produce un sept). Trebuie examinate cel puțin 5 tuburi germinative înainte de a declara izolatul pozitiv.

La microscopie, producția de tuburi germinale de către celule este prezumtivă pentru *C. albicans* și *C. dubliniensis* și sunt vizualizate precum în Fig. 1, Fig. 2a.

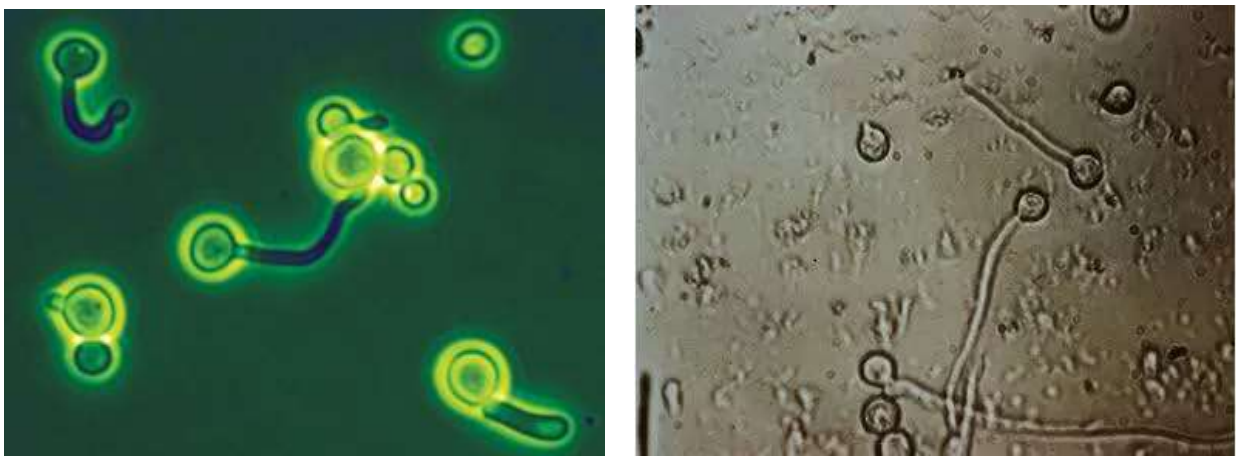


Fig. 1. Producerea de tuburi germinative de către *Candida albicans*, baza de tuburi germinative pozitive nu va avea constricții

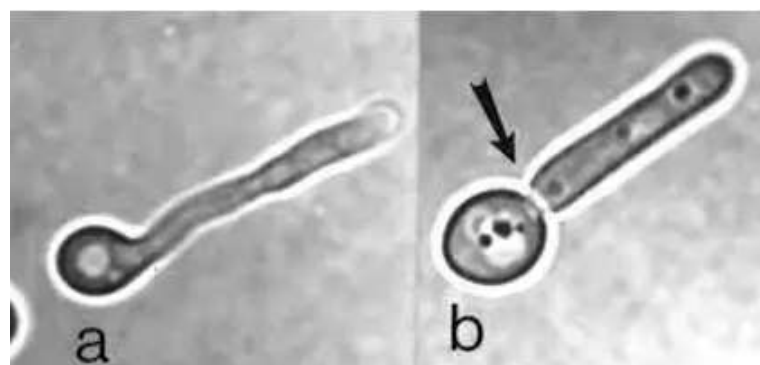


Fig. 2 Tub germinativ a) *C. albicans* și b) *C. tropicalis* (pseudo-hife)

Tuburile germinative sunt prelungiri tinere și cele adevărate nu au o constricție la bază, unde aderă la celula mamă. S-a demonstrat că *C. dubliniensis*, produce tuburi germinative adevărate. Deși *C. dubliniensis* este relativ rară, ar fi nevoie de analize biochimice sau morfologice suplimentare pentru a o deosebi de *C. albicans*. Dacă există o constricție la baza unui tub germinativ, microorganismul este altul decât *Candida albicans/dubliniensis*. Astfel de tuburi germinative septate, cunoscute sub numele de tuburi pseudo-germinale, sunt mai frecvente la *C. tropicalis* (Fig. 2b). Izolatele de *C. tropicalis* vor fi identificate greșit ca fiind *C. albicans* până când descoperirile de laborator vor face distincția între tuburile germinale reale și pseudotuburile germinale.

5.2.2 Teste cu enzime preformate

C. albicans produce două exoenzime, L-prolin aminopeptidaza și β -galactosaminidaza, atunci când este crescută pe medii adecvate. Detectarea acestor enzime cu un disc impregnat cu substrat cuplat cu cromogen, timp de secunde sau minute, oferă identificare prezumtivă a *C. albicans*. Sunt disponibile și kituri comerciale *C. albicans* screen (Remel; Murex) care utilizează discul impregnat. Identificarea prezumtivă a *C. albicans* bazat pe una dintre cele două enzime preformate menționate prezintă un nivel inacceptabil de scăzut a sensibilității.

Acest test, în combinație cu testul tubului germinativ, a fost utilizat pentru a confirma un izolat ca *C. albicans*, însă *C. dubliniensis* va produce aceleași rezultate. Laboratoarele trebuie să fie conștiente că *C. dubliniensis* poate fi izolată din sânge, urină, secreții vaginale și alte probe, în special atunci când pacientul este imunocompromis sau pare refractar la terapia cu azoli. Izolate rare ale altor specii de *Candida*, în special *C. tropicalis*, pot produce tuburi germinale în testul tubului germinativ, deși sunt prezente puține tuburi germinale și sunt mai înguste (constricții) la bază. Testul enzimatic va ajuta la distingerea acestor izolate de *C. albicans*. Acest test poate fi utilizat și în combinație cu mediile cromogene și testul rapid de asimilare a trehalozei pentru a obține identificarea prezumtivă a speciilor comune asociate cu infecțiile fluxului sanguin (Fig. 3);

Procedură

- a) Se vor utiliza numai culturi pure de 18-24 de ore ale microorganismelor de control cultivate pe Sabouraud dextroză (glucoză) agar și numai culturi pure ale microorganismelor de testare crescute pe agar sânge, Sabouraud dextroză agar, Mycosel sau agar cu dextroză din cartofi.
- b) Se scoate un disc din flacon și se pune într-unul dintre tuburile furnizate. Se adăugă 1 picătură de apă sterilă demineralizată (deionizată).
- c) Cu un aplicator, se ia o „pastă” grea vizibilă de cultură fungică și se aplică pe disc. Se incubează la 35°C timp de câteva secunde sau minute (conform instrucțiunii producătorului).
- d) După incubare, se adăugă 1 picătură de NaOH 0,3% și se examinează pe un fundal alb pentru a detecta o culoare galbenă distinctă. Dacă nu apare nicio culoare testul se consideră negativ.
- e) Se adăugă 1 picătură de reactiv cinnamaldehydă. Dezvoltarea unei culori de la roz la roșu, timp de 1 minut se consideră un rezultat pozitiv. Nicio culoare sau o culoare ușor galbenă este un test negativ.

Rezultate

Dezvoltarea unei culori galbene distincte la adăugarea a 0,3% NaOH este un test pozitiv pentru β -galactosaminidază. Nicio culoare galbenă nu indică absența enzimei. Dezvoltarea unei culori roșii în 1 minut după adăugarea reactivului cinnamaldehydă este un test pozitiv pentru L-prolin aminopeptidaza

6. Interpretarea rezultatelor

Un rezultat pozitiv al testului, adică ambele enzime prezente, fiind o identificare prezumtivă a *C. albicans* sau *C. dubliniensis*. Izolate rare de *Candida rugosa* și *Candida tropicalis* pot fi pozitive, se vor exclude aceste posibilități prin efectuarea unui test pe tub germinativ.

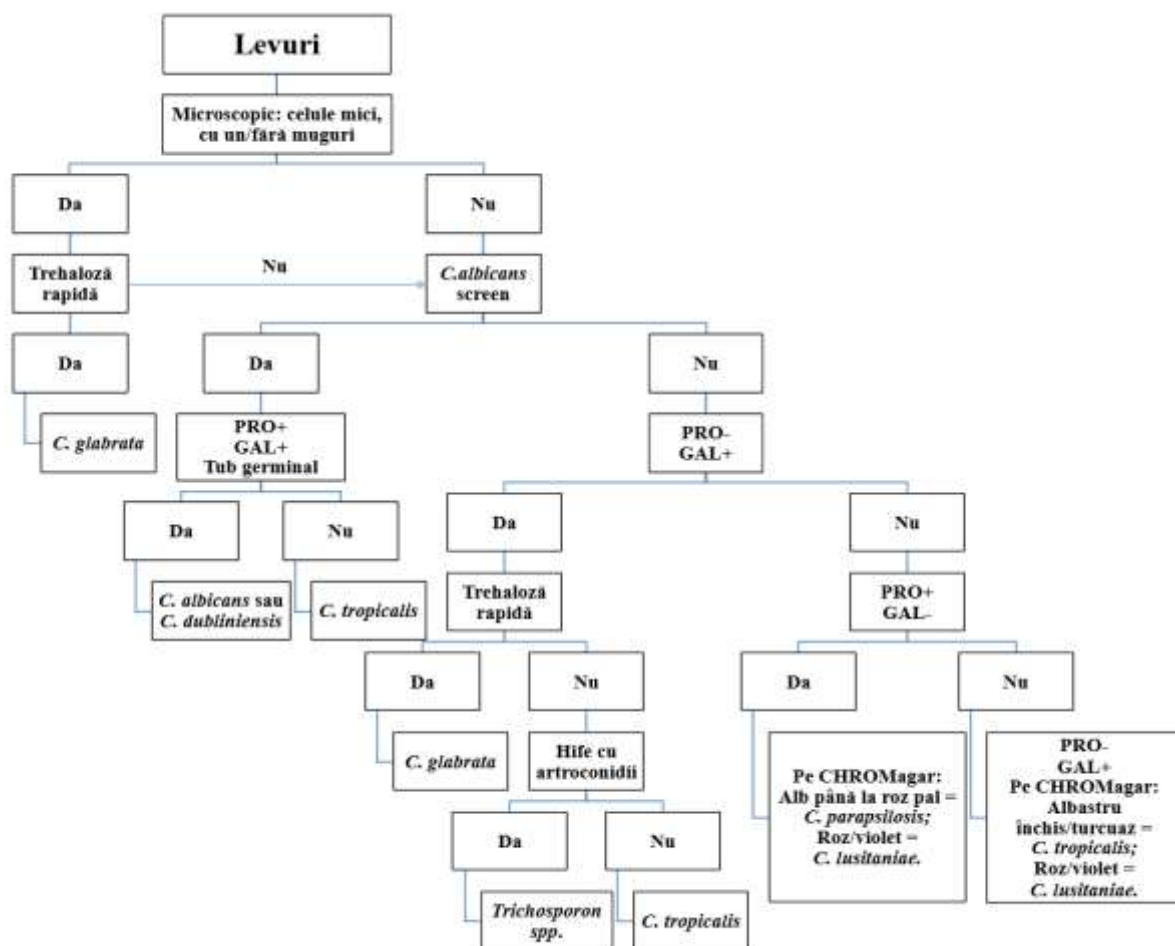


Fig. 3 Identificarea celor mai frecvente și importante din punct de vedere clinic specii de *Candida*, izolate din specimene sterile. Algoritmul presupune că a fost inclus ca mediul primar CHROMagar *Candida*

Notă: Dacă levurile provin dintr-un fluid corporal steril sau din sânge, două teste trebuie să fie pozitive pentru a fi identificate *C. albicans* sau *C. dubliniensis* (de ex., dacă *C. albicans* screen a fost pozitiv, se va efectua un test pe tub germinativ). *C. dubliniensis* este un agent patogen rar până la ocazional (asociat de obicei cu catetere) în funcție de densitatea sa endemică. De diferențiat între *C. albicans* și *C. dubliniensis*, folosind creșterea la 45°C (prezumtiv, deoarece nu toate izolatele de *C. albicans* tolerează această temperatură și nu toate izolatele de *C. dubliniensis* sunt inhibitate de aceasta). Dacă flaconul de hemocultură este pozitiv pentru levuri (microscopic) se vor face subculturi pe mediu cromogen pentru a verifica puritatea.

5.2.3 Testul urează pentru diferențierea levurilor

Testul disc/tub urează este un test de detectare rapidă pentru a distinge levurile bazidiomicete (de ex., *Cryptococcus*) de fungii levuriform ascomiceți. Ureaza descompune ureea pentru a forma amoniac și dioxid de carbon, care crește pH-ul și provoacă o schimbare a culorii indicatorului roșu fenol de la chihlimbar la roșu roz. Când un microorganism dă un rezultat negativ al ureazei, dar există o suspiciune puternică că acest microorganism ar trebui să fie pozitiv, e necesar de efectuat un test definitiv al ureazei (de exemplu, agar cu uree înclinată).

Procedură test disc urează

- Se emulsionează o colonie de levuri în 0,5 ml de apă distilată sterilă într-un tub de 16 x 125 mm.
- se adăugă un disc de uree și se incubează la 28°C.
- se verifică la 4 ore și zilnic timp de 72 ore.

Rezultate

- a) Pozitiv, se transformă în roz - roșu.
- b) Negativ, fără schimbare de culoare.

Activitatea ureazei la diferite specii:

- C. albicans* (-)
- C. glabrata* (-)
- C. guilliermondii* (-)
- C. kefyr* (-)
- C. krusei* (+)*
- C. parapsilosis* (-)
- C. tropicalis* (-)
- Cryptococcus* spp. (+), puternic pozitiv
- Geotrichum* spp. (-)
- Saccharomyces* spp. (-)
- Rhodotorula* spp. (+)
- Trichosporon* spp. (+)*
- Malassezia* spp. (+)

*Variabil, în dependență de tulpină.

5.2.4 Test rapid de trehaloză pentru *C. glabrata*

Bulionul de asimilare rapidă a trehalozei inoculat dens și incubat la 42°C detectează în 3 ore asimilarea trehalozei asociată cu *C. glabrata*. Această reacție este utilizată pentru identificarea prezumtivă a *C. glabrata*. Izolatele care sunt negative la utilizarea tubului germinativ și nu au pseudohife, microscopic sunt mici (comparativ cu organisme precum *C. albicans*) pot fi *C. glabrata* și, prin urmare, acest test rapid oferă o identificare prezumtivă.

Este important de menționat că testul dat nu trebuie utilizat în locul metodelor standard pentru a detecta asimilarea trehalozei la alte specii de levuri. Alte teste care evaluează în mod specific asimilarea sau fermentația trehalozei și pot fi utilizate pentru a identifica prezumtiv *C. glabrata* sunt disponibile (de ex., Hardy Diagnostics Trehalose Fermentation cu Durham Tube și Remel Yeast Fermentation Broth cu Durham Tube). Ca și în cazul testului Remel Rapid Trehalose Assimilation Broth, incubația are loc la 42°C, deoarece aceasta oferă o selectivitate mai bună pentru *C. glabrata* față de alte specii. Cu toate acestea, cele două teste de fermentație necesită incubare prelungită (24 de ore) și, prin urmare, compromit capacitatea de a furniza rapid informații utile medicilor.

Procedură

- a) Se lasă numărul de tuburi (depozitate la 2-8°C) necesare pentru testare să ajungă la temperatura camerei.
 - b) Se prepară o suspensie de izolat într-un tub de bulion etichetat corespunzător.
 - c) Se incubează tuburile la 42°C.
 - d) Monitorizarea tuburilor se efectuează timp de 3 ore pentru o schimbare a culorii în galben.
- Notă: Incubarea peste 3 ore poate duce la rezultate fals pozitive.

Rezultate

- a) Test pozitiv
O schimbare de culoare în galben în 3 ore de la incubare.
- b) Test negativ
Culoare albastră, albastru-verde sau verde după 3 ore de incubație.

5.2.5 CONTROL DE CALITATE

- a) Testul tub germinativ

Următoarele tulpini de referință trebuie incluse de fiecare dată când se efectuează testul.

1. Tub germinal pozitiv, *C. albicans* ATCC 14053
2. Tub germinal negativ, *Candida tropicalis* ATCC 66029

b) Testul cu enzime preformate (*C. albicans* screen sau CA-50)

Se selectează aleatoriu două tuburi din fiecare lot de truse primite și se efectuează testul folosind *C. albicans* ATCC 14053 (pozitiv pentru β -galactosaminidază și L-prolina aminopeptidaza) și *Cryptococcus laurentii* ATCC 18803 (negativ pentru ambele enzime).

c) Testul urează - se testează fiecare lot nou folosind următoarele tulpini de control:

- control pozitiv, *Cryptococcus neoformans* ATCC 6603
- control negativ, *C. albicans* ATCC 60193,
- Control reactivului, neinoculat.

d) Test rapid cu trehaloză

Fiecare test trebuie să includă controlul pozitiv, *Candida glabrata* ATCC 2001, producând o schimbare de culoare în galben și un control negativ, *C. albicans* ATCC 10231, care produce o schimbare de culoare în albastru sau verde.

5.3 TESTE DE IDENTIFICARE COMPLETĂ A LEVURILOR

Într-o epocă a rezistenței în creștere a levurilor la agenții antifungici și a unei game tot mai largi de specii capabile să provoace infecții, nu există aproape nicio situație în care identificarea la nivel de specie nu este justificată. Acest lucru este valabil, în special, având în vedere creșterea numărului de pacienți imunocompromiși, ceea ce a oferit mai multe oportunități pentru apariția infecțiilor fungice și de a complica și prelungi perioada de recuperare. Metodele moleculare de identificare directă a fungilor în specimene și după creșterea în cultură sunt în curs de dezvoltare. Recent, tehnologia MALDI-TOF MS a fost introdusă ca o metodă cu potențial de a identifica o gamă largă de bacterii și fungi. Mai multe grupuri de cercetare au utilizat MALDI-TOF MS pentru a identifica o varietate de fungi importanți din punct de vedere clinic, cu baza de date IVD aprobată, enumerând un spectru vast de fungi.

5.3.1 Teste biochimice

Sunt disponibile comercial o varietate de sisteme fiabile de identificare a fungilor API 20C AUX, API ID 32C, Biolog YT Station și Vitek 2 YST ID, etc. Cu toate acestea, ele pot fi utilizate doar pentru a identifica acele specii din bazele de date respective și pot uneori identifica greșit fungii care nu sunt reprezentați.

5.3.2 Identificare moleculară

Sensibilitatea globală a hemoculturii pentru diagnosticarea candidozei invazive este de aproximativ 50%. Limita de detecție a hemoculturii este ≤ 1 unitate formatoare de colonii/ml. Limita de detecție pentru culturi este la sau sub cea a PCR. De fapt, hemoculturile ar trebui să fie pozitive în timpul mării majorități infecțiilor active ale fluxului sanguin cu *Candida*. Acestea pot fi negative în cazuri de candidemie extrem de scăzută, intermitentă, candidoză profundă rezultată din inocularea directă cu *Candida* în absența candidemiei. Hemoculturile sunt limitate de timp de răspuns lent (timpul mediu până la pozitivitate de 2-3 zile, variind de la 1 la ≥ 7 zile) și de faptul că pot deveni pozitive relativ târziu în cursul bolii.

Culturile de țesuturi sau lichide recuperate din locurile infectate în timpul candidozei profunde prezintă, de asemenea, sensibilitate slabă (adesea $< 50\%$), timp de răspuns lent și necesită proceduri invazive de prelevare care pot fi periculoase sau contraindicate din cauza afecțiunilor medicale subiacente.

O limitare majoră a studiilor PCR este lipsa metodologiilor standardizate și a validării multicentru a performanței testelor. Testul PCR multiplex în timp real cu sânge integral (SeptiFast, Roche) care detectează 19 bacterii și 6 ciuperci (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* și *Aspergillus fumigatus*).) a fost investigat în mai multe studii legate de sepsis și febră neutropenică. Printre pacienții cu candidemie, sensibilitatea testului a fost de 94%; singurul rezultat negativ a fost observat cu *C. famata*. Există și sisteme PCR multiplex rapid care detectează unii funghi din flacoanele de hemocultură pozitivă și LCR, în timp scurt, însă spectrul de identificare este limitat.

Secvențierea ITS este utilă pentru identificarea majorității fungilor de importanță clinică, prin analiza secvenței interne transcrise spațial (ITS) și regiunii D1/D2 a subunității ribozomale mari.

Cu toate acestea, echipamentele necesare pentru secvențiere nu sunt disponibile pe scară largă în laboratoarele de microbiologie, astfel încât au fost dezvoltate o varietate de metode de recunoaștere genetică care utilizează echipamente disponibile. Aceste metode includ analiza enzimelor de restricție (REA), electroforeza în gel în câmp pulsant (PFGE), sondele și aplicațiile PCR.

REA sau polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (RFLP) a fost utilizat pentru recunoașterea speciilor și tulpinilor, rezultatele depinzând de enzima de restricție utilizată.

Metoda necesită extragerea ADN-ului, urmată de digestia cu o enzimă de restricție adecvată și electroforeza pentru a separa fragmentele de ADN. Modelul benzilor de fragmente este apoi comparat pentru similitudinea cu tulpinile de referință sau cu alte izolate din aceeași specie.

PFGE este o tehnică utilizată pentru a separa fragmente mari de ADN și levura întreagă, cromozomi întregi de levuri care nu se rezolvă cu ajutorul electroforezei pe gel convenționale. Metoda de extracție este diferită de alte metode de extragere a ADN-ului, deoarece celulele levurice sunt expuse la enzimele de digestie a peretelui celular și sunt lizate în timp ce sunt imobilizate în interiorul unor blocuri de agaroză.

Acest lucru asigură faptul că cromozomii rămân intacti și nu sunt fragmentați de acțiunea mecanică, cum ar fi pipetarea sau vortexarea. Profilurile cromozomiale electroforetice, sau cariotipuri, pot fi utilizate pentru identificare, în special pentru speciile care prezintă o variație mică sau deloc în modelul cariotipului între izolate.

PCR a devenit un instrument puternic pentru identificarea speciilor, deoarece necesită mai puțin timp decât celelalte metode și poate fi efectuată pe probe care conțin cantități foarte mici de ADN. PCR amplifică secțiuni specifice de ADN, care sunt determinate de alegerea primerilor, iar produsele amplificate sunt separate prin electroforeză sau se determină secvența lor de acid nucleic. Au fost concepuți primeri care recunosc secvențe comune tuturor ciupercilor, cum ar fi secvența internă transcris spațial și secvențele nucleare mici din regiunile ADN-ului ribozomal.

5.4 TESTE ALTERNATIVE

5.4.1 Detectarea antigenului și a anticorpilor

Detectarea antigenului *Candida* și a anticorpilor anti-*Candida* a câștigat o acceptare mai mare în Europa. Au fost exprimate îngrijorări cu privire la fiabilitatea detectării anticorpilor la gazdele imunodeprimare, dar testele au avut rezultate bune la pacienții cu neutropenie și defecte imunitare mediate celular (inclusiv cei care primesc transplant de celule hematopoietice și organe solide).

Răspunsurile serice ale imunoglobulinei G (IgG) împotriva antigenelor specifice au avut de obicei rezultate mai bune decât răspunsurile imunoglobulinei M (IgM), ceea ce sugerează că mulți pacienți au răspunsuri amnestice sau au invazie tisulară subclinică în curs. Cel mai studiat test este

un cel combinat cu Ag mannan/Ac antimannan, care este în prezent aprobat pentru utilizare în Europa (Platelia Candida Ag și Ab; Bio-Rad). Într-o meta-analiză a 14 studii, sensibilitatea/specificitatea pentru diagnosticul candidozei invazive a Ag mannan și IgG anti-mannan individual a fost de 58%/93% și, respectiv, 59%/83%. Valorile pentru testul combinat au fost 83% și 86%, cu cele mai bune performanțe pentru infecțiile cu *C. albicans*, *C. glabrata* și *C. tropicalis*. Acest test nu este utilizat pe scară largă, iar rolul său în diagnosticul și managementul candidozei invazive este neclar.

5.4.2 Detectarea β -D-glucanului

β -D-glucanul este un component al peretelui celular al speciilor *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis jirovecii* și mai multor fungi. Un test seric de β -D-glucan (Fungitell) a fost aprobat de FDA ca adjuvant la cultură pentru diagnosticarea infecțiilor fungice invazive.

Rezultatele cu adevărat pozitive nu sunt specifice pentru candidoza invazivă, ci sugerează mai degrabă posibilitatea unei infecții fungice invazive. Din acest motiv, printre pacienții care sunt, de asemenea, expuși riscului de infecții invazive cu fungi filamentoși, cum ar fi beneficiarii de transplant de celule hematopoietice, β -D-glucanul oferă un avantaj teoretic față de testele mai limitate pentru candidoză. Detectarea β -D-glucanului poate identifica cazurile de candidoză invazivă cu zile până la săptămâni înainte de hemoculturile pozitive și poate scurta timpul până la inițierea terapiei antifungice. Este posibil ca tratamentul antifungic profilactic sau empiric să afecteze performanța testului. Pe de o parte, agenții antifungici pot reduce sensibilitatea diagnostică, dar scăderea nivelurilor de β -D-glucan se poate corela și cu răspunsurile la terapia antifungică.

În studiile meta-analitice, privind testul β -D-glucan, sensibilitatea și specificitatea combinate pentru diagnosticarea candidozei invazive au fost de 75%–80% și, respectiv, 80%. O serie de probleme complică interpretarea acestor date, inclusiv incertitudinile cu privire la cea mai bună valoare limită pentru un rezultat pozitiv, numărul de teste pozitive necesare pentru a stabili un diagnostic, momentul optim și frecvența testării în rândul pacienților cu risc.

Preocuparea majoră cu privire la detectarea β -D-glucanului este potențialul de specificitate slabă și pozitivitate falsă. Cauzele pozitivității false includ alte infecții sistemice, cum ar fi bacteriemia gram-pozitivă și gram-negativă, anumite antibiotice, cum ar fi amoxicilină-clavulanat intravenos, hemodializa, colonizarea fungică, administrarea de albumină sau imunoglobuline, utilizarea de tifon chirurgical sau alt material care conține glucan; mucozită sau alte tulburări ale mucoasei gastrointestinale. Specificitatea β -D-glucanului poate fi îmbunătățită prin necesitatea unor rezultate pozitive consecutive, decât a unui singur rezultat, dar pozitivitatea falsă rămâne o limitare semnificativă dacă factorii enumerați mai sus sunt comuni în populația testată.

Rolul testării β -D-glucanului pe alte probe decât serul în diagnosticul candidozei invazive nu este bine stabilit. Studiile privind testarea β -D-glucanului din LCR au raportat sensibilitate și specificitate de 100% și, respectiv, 95%-98%, pentru diagnosticul infecțiilor fungice non-*Candida* ale SNC. Date limitate sugerează că valorile predictive pozitive ale β -D-glucanului în lichidul de lavaj bronhoalveolar sunt slabe pentru diagnosticarea pneumoniei fungice.

În prezent, nu se recomandă utilizarea testării β -D-glucanului pentru a ghida luarea deciziilor clinice la copii.

Hemoculturile sau cultura altor probe colectate în condiții sterile au fost mult timp considerate standarde de aur pentru diagnosticare în candidoza invazivă. Testele non-culturale de diagnostic, cum ar fi testele de detecție ale antigenului, anticorpilor sau β -D-glucanului și reacția de polimerizare în lanț (PCR) intră acum în practica clinică ca adjuvant la cultură. Dacă sunt utilizate și interpretate judicios, aceste teste pot identifica mai mulți pacienți cu candidoză invazivă și e

posibilă o terapie antifungică directă mai bună. Pentru a realiza pe deplin beneficiile combinării testelor de cultură și non-cultură, totuși, clinicienii trebuie să ia în considerare cu atenție tipurile de candidoză invazivă, să înțeleagă punctele forte și limitările fiecărui test și să interpreteze rezultatele testelor în contextul cadrului clinic.

5.4.3 Hibridizare in situ prin fluorescență folosind sonde de acid nucleic peptidic (PNA FISH), doar pentru hemoculturi pozitive

1. Procedură

Sondele PNA marcate cu fluoresceină și rodamină hibridizează la secvențe de ARNr specifice speciei din microorganismele țintă după ce peretele celular este făcut suficient de permeabil.

a) Se va urmări insertul tehnic pentru pași specifici.

b) În general, se face un frotiu din cultură și se fixează pe lama de testare.

Amestecul de sonde este adăugat și acestea sunt lăsate să hibridizeze la secvențele lor țintă, după care lamelele sunt spălate. Frotiul este apoi examinat prin microscopie cu fluorescență.

2. Rezultate

a) Pentru *C. albicans*/*C. glabrata* Testul PNA FISH: *C. albicans* prezintă fluorescență verde și *C. glabrata* - fluorescență roșie.

b) Pentru testul Yeast Traffic Light PNA FISH: *C. albicans* și *C. parapsilosis* prezintă fluorescență verde, *C. glabrata* și *C. krusei* - fluorescență roșie, *C. tropicalis* - fluorescență galbenă.

6. Interpretare rezultate

Unele teste descrise anterior sunt menite să ofere informații preliminare sau prezumtive (cum ar fi mucegai, levuri, feoid (dematiacee) sau încapsulate) despre identitatea unui microorganism recuperat dintr-un specimen. În consecință, raportarea ar trebui să indice că informațiile de identificare a speciilor nu sunt definitive și că sunt necesare teste suplimentare pentru a obține informații de identificare definitivă (de exemplu, „[specie] presupusă; sunt necesare teste suplimentare pentru identificarea definitivă”). Izolatele semnificative trebuie identificate întotdeauna la nivel de specie. Când semnificația clinică este pusă la îndoială, raportul prezumtiv ar trebui să fie suficient.

Una dintre cele mai controversate probleme cu privire la culturile primare este cuantificarea. Pentru levuri, cuantificarea este raportată în general folosind criterii similare cu cele utilizate în bacteriologie pentru a decide semnificația clinică. Însă o problemă cu abordarea cuantificării bacteriologice pentru levuri este că volumul celulelor levurice este mult mai mare decât volumul bacteriilor, astfel încât spațiul ocupat de un anumit număr de celule levurice va depăși de obicei de 10 ori spațiul ocupat de același număr de bacterii. Acest fapt ridică problema că 2+ de levuri pe o placă de izolare primară nu este echivalent cu 2+ de bacterii (levurile ocupă mai mult spațiu tisular).

B. Aspergiloza

Aspergiloza invazivă

1. Generalități

Speciile de *Aspergillus* sunt responsabile pentru o mare varietate de boli la om, de la invazie directă la reacții de hipersensibilitate. Majoritatea bolilor umane sunt cauzate de *Aspergillus fumigatus* și *Aspergillus niger*, mai rar de *Aspergillus flavus* și *Aspergillus clavatus*.

Aspergiloza invazivă (AI) reprezintă o afecțiune gravă care poate afecta pacienții hematologici/oncologici. Aceasta poate apărea fie ca o infecție primară, fie ca o infecție secundară, care se dezvoltă pe parcursul tratamentului și poate deveni rezistentă la terapia antifungică. AI prezintă o rată ridicată de mortalitate asociată.

Pe lângă pacienții hematologici/oncologici, există și alte grupuri de pacienți cu risc crescut de AI. Printre acestea se numără pacienții internați în unitățile de terapie intensivă, în special cei care suferă de infecții virale respiratorii severe, inclusiv COVID-19.

Repertoriul extins de tratamente pentru afecțiuni maligne hematologice și oncologice, cum ar fi Ibrutinibum și celulele T ale receptorilor antigenici umani (CAR-T), a dus la o supraviețuire mai lungă a pacienților, dar și la o imunosupresie pe termen lung și nouă, expunând pacienții la un risc crescut de AI și alte infecții fungice invazive (IFI). AI are o mortalitate ridicată (30-60%) și au apărut noi grupuri de pacienți cu risc.

Consortiul pentru Educație și Cercetare al Grupului de Studiu al Organizației Europene pentru Cercetare și Tratamentul Cancerului/Micozelor (EORTC/MSGERC) a inclus acum Reacția de a polimerizare în lanț *Aspergillus* (PCR) și detectarea moleculară a ADN-ului *Aspergillus* în țesut ca criterii de diagnostic pentru AI. De asemenea, s-au stabilit praguri specifice pentru testul *Aspergillus* galactomanan (GM) în fiecare tip de probă. Aceste modificări în clasificarea probabilității AI sunt prezentate în tabelul din anexa 2.

2.Aspecte clinice/epidemiologie

Epidemiologia AI în hematologie și oncologie/ Factori de risc

Printre pacienții cu malignități hematologice, incidența tuturor infecțiilor fungice invazive este cea mai mare la pacienții cu leucemie mieloidă acută, având o incidență de până la 12% pentru IFI dovedite/probabile. Riscul de IFI după transplantul alogen de celule stem este estimat la 5-15%, în timp ce pacienții cu leucemie limfoblastică acută au fost identificați recent ca un grup cu risc ridicat, cu o incidență de 6-10%. Cu toate că incidența bolilor fungice invazive în tulburările limfoproliferative cronice este mai mică, între 0,5-8%, introducerea de tratamente noi poate schimba acest lucru. Speciile de *Aspergillus* reprezintă cea mai mare proporție din infecțiile invazive cu mușegai, majoritatea fiind cauzate de membrii complexului *A. fumigatus*. Deoarece speciile predominante variază în funcție de zona geografică, datele epidemiologice locale sunt critice.

Factorii de risc tradiționali pentru AI includ: durata și gradul de neutropenie, malignitate activă, chimioterapie cu doze mari, corticoterapia, feritina crescută, AI anterioară și în transplanturile alogene, donator necorespunzător sau înrudit, boala grefă-contra-gazdă și infecția cu citomegalovirus. Mai multe linii de tratament pot crește riscul în malignitățile hematologice asociate în mod tradițional cu o incidență mai mică a AI. Pacienții cu mielom care au primit mai mult de trei linii de tratament prezintă un risc crescut de infecții fungice invazive, în timp ce medicamentele imunomodulatoare sau inhibitorii de proteazom în sine nu au crescut acest risc. Avansarea bolii poate afecta sistemul imunitar și contribui la imunosupresie, și riscul de infecții oportuniste.

Moleculele mici care au ca țintă inhibitori și agenți imunoterapeutici au revoluționat tratamentele în domeniul oncologiei și hematologiei. Acești agenți, administrați pacienților pretratați intens, sunt asociați cu un risc crescut de apariție a infecțiilor fungice invazive.

Unul dintre acești agenți este Ibrutinibum, alături de alți inhibitori ai tirozin kinazei Bruton, inhibitori ai punctelor de control imunitar, inhibitori ai janus kinazei și celule CART modificate genetic. Utilizarea Ibrutinibum este asociată cu un risc crescut de infecții fungice invazive, cu apariție timpurie după începerea tratamentului și cu rate relativ ridicate de infecții ale sistemului nervos central, în special în cazul limfomului cerebral primar. De asemenea, riscul de infecții fungice invazive după terapia cu celule CART CD19 este asociat cu tratamentele anterioare, sindromul de eliberare de citokine care necesită administrare de steroizi sau Tocilizumabum, precum și cu neutropenia prelungită.

Interacțiunile farmacocinetice cu agenții antifungici care sunt inhibitori ai CYP3A4 sunt importante de luat în considerare atunci când se utilizează medicamente noi, cum ar fi Venetoclax și Ibrutinibum. Alte grupuri de pacienți imunodeprimați, în special cei care au beneficiat de transplant de organe solide, prezintă un risc crescut de infecții invazive cu *Aspergillus*. Printre aceștia, pacienții cu transplanturi pulmonare au cel mai mare risc, în timp ce beneficiarii de transplant renal au cel mai mic risc. Afecțiunile imunodeficienței primare, cum ar fi boala granulomatoasă cronică, pot fi, de asemenea, asociate cu infecții fungice invazive și trebuie luate în considerare la pacienții fără factori de risc evidenți. De asemenea, pacienții din unitățile de terapie intensivă, chiar dacă nu sunt considerați în mod obișnuit "imunosupresori", prezintă un risc crescut de infecții invazive cu *Aspergillus*, cu o incidență globală între 0,3% și 5,8% și o mortalitate ridicată. Diagnosticarea în aceste cazuri este dificilă din cauza lipsei unui diagnostic clinic și radiologic clasic, precum și a lipsei factorilor de risc tradiționali conform definițiilor EORTC/MSGERC pentru infecții fungice invazive.

Există un risc crescut de infecții invazive cu *Aspergillus* în contextul infecției cu COVID-19 (între 4% și 33% dintre pacienții internați în unitățile de terapie intensivă cu COVID-19), numită în prezent aspergiloză pulmonară asociată cu COVID-19.

3. Diagnosticul de laborator al ASPERGILOZEI INVAZIVE

Recomandări

- Examinarea histopatologică și cultura rămân "Standardul de aur" pentru diagnosticarea AI (recomandare puternică, dovezi de nivel II).
- Se recomandă colectarea adecvată a specimenelor clinice (de exemplu, țesut, lavaj bronhoalveolar (LBA), spută) pentru microscopie fungică și cultură fungică, precum și pentru examinarea cito-histologică (recomandare puternică, dovezi de nivel II).
- Pentru a diferenția *Aspergillus fumigatus* sensu stricto (în sensul său strict, sau forma sa cea mai caracteristică) de alte specii din complexul de specii *A. fumigatus*, se recomandă cultivarea probelor într-un mediu adecvat și incubarea acestora la o temperatură de 50°C (recomandare puternică, dovezi de nivel II).
- Pentru identificarea speciilor, poate fi utilizată spectrometria de masă (MALDI-TOF MS)(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) (recomandare moderată, dovezi de nivel II).
- Secvențierea ADN ar trebui rezervată pentru izolatele cu caracteristici atipice sau pentru speciile de *Aspergillus* mai puțin frecvente (recomandare puternică, dovezi de nivel II).

Diagnosticul AI rămâne o provocare și necesită o combinație de **date clinice, radiologice și microbiologice**. Deși s-au făcut progrese în diagnosticarea fără cultură, examenul histopatologic și cultura rămân cele mai importante metode de diagnostic. Detectarea vizuală a hifelor fungice în țesuturi este considerată "standardul de aur" și este necesară pentru a clasifica o persoană ca având AI pulmonară dovedită și alte tipuri de AI asociate cu țesuturile. De asemenea, cultura de *Aspergillus* spp. dintr-o zonă sterilă susține un diagnostic de AI dovedită. Caracteristicile cheie ale acestor teste, împreună cu recomandări privind efectuarea lor, sunt rezumate în anexa 1. Este important ca rezultatele testelor să fie interpretate în contextul prezentării pacientului și al administrării preparatelor antifungice anterioare sau actuale. Se recomandă recoltarea de probe clinice adecvate (de exemplu, țesut, LBA, spută) pentru microscopie, cultură fungică și examinare cito-histologică.

Cultura de *Aspergillus* spp., în special din zone non-sterile, ar trebui să fie o prioritate pentru clinicieni, deoarece poate ajuta la diagnosticarea unei posibile infecții invazive cu *Aspergillus* și poate transforma un caz posibil de AI într-un caz probabil de AI, în funcție de caracteristicile

gazdei, radiologice și clinice relevante. De asemenea, cultura poate furniza un izolat care poate fi utilizat pentru identificarea speciei și testarea sensibilității la medicamente (consultați anexa 4 pentru metodele comune de identificare). O metodă simplă de a distinge *A. fumigatus* sensu stricto de alte specii din complexul de specii *A. fumigatus* este creșterea la 50°C. Utilizarea MALDI-TOF MS pentru identificarea speciilor este din ce în ce mai frecventă, iar secvențierea ADN (de exemplu, prin targetarea regiunii spațiale transcrise intern și/sau a locusului β -tubulină) este de obicei rezervată pentru izolatele cu caracteristici atipice sau pentru speciile de *Aspergillus* mai puțin frecvente.

Metode de diagnostic a aspergilozei invazive

Examinare directă

În diagnosticarea aspergilozei, asemenea candidozei, procesul începe cu o examinare directă a materialului clinic. Există colorații specifice care arată structurile ciupercilor. Putem suspecta prezența aspergilozei examinând morfologia structurilor fungice. Suspectăm infecții cu *Aspergillus* dacă structurile fungice au hife înguste, regular septate și ramificate dicotomic (figura 4). În contrast, în cazul altui grup de ciuperci filamentoză, *Mucorales*, suspectăm infecția dacă observăm hife largi, rareori septate și ramificate la unghiuri drepte. Detalierea acestor caracteristici morfologice este esențială pentru diferențierea precisă între diversele tipuri de infecții fungice.

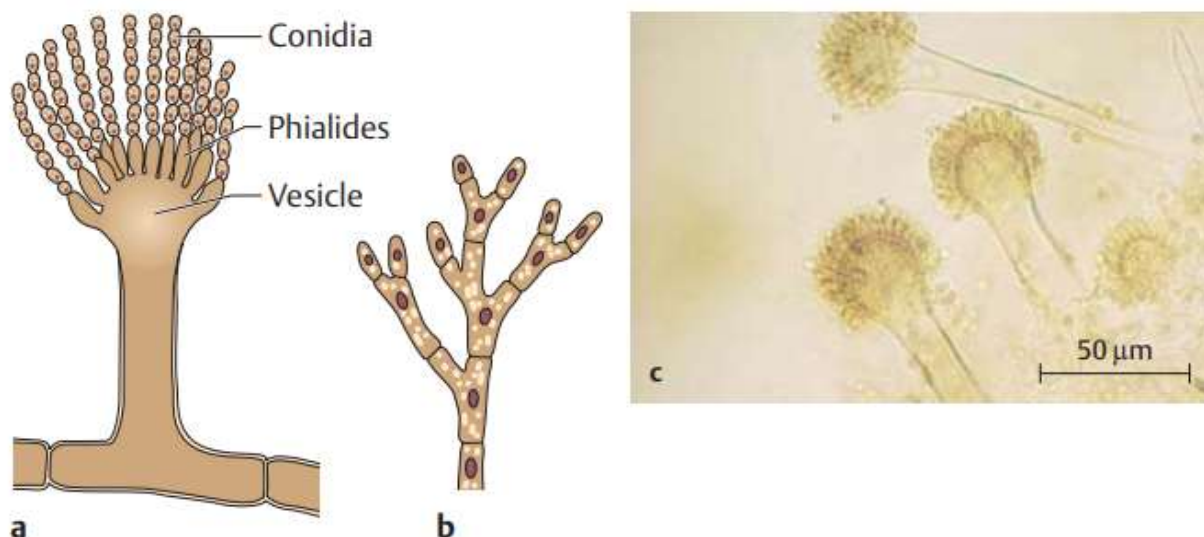


Fig. 4. *Aspergillus fumigatus*: (a) Un conidiofor cu conidii (2–5 µm), (b) Hife în formă de Y, septate (1.5–8 µm), (c) Preparat nativ; conidiile au căzut.

Cultură

Cultivarea are o sensibilitate redusă. La fel ca la *Candida*, izolarea permite testarea sensibilității. Cu toate acestea, o izolare pozitivă din probele respiratorii: indică aspergiloza invazivă sau poate fi doar un indicator al unei colonizări (aceasta se întâmplă de obicei după transplantul pulmonar și în bolile pulmonare cronice). Interpretarea depinde de tabloul clinic al pacientului, de statutul său imun, etc. Czapek-Dox agar este un mediu de cultură frecvent utilizat pentru cultivarea fungilor, în special pentru speciile de *Aspergillus*. Utilizarea principală a acestui mediu este de a promova producția de conidii sau spori pentru a facilita identificarea lor. Odată ce mucegaiul este izolat, îl identificăm. Examinându-i morfologia și cu ajutorul metodelor moleculare și a spectrometriei de masă.

Aspergillus fumigatus este singurul *Aspergillus* spp. care tolerează până la 50°C și se dezvoltă bine la 45°C.

Identificarea speciilor de *Aspergillus* se bazează pe o combinație de biotip (analiza morfologică și culturală) și genotip (secvența genelor). Fiecare specie de *Aspergillus* are particularități morfologice unice, iar culoarea capetelor conidiale (structuri pentru reproducere asexuală) este adesea un indicator al speciei. De exemplu, culoarea verde-albăstruiă a capetelor conidiale de *A. fumigatus* este clar distinctă de cea a capetelor conidiale de verde-gălbui-verzui, cafeniu, verde închis sau negru ale capetelor conidiale de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. nidulans* și, respectiv *A. niger*.

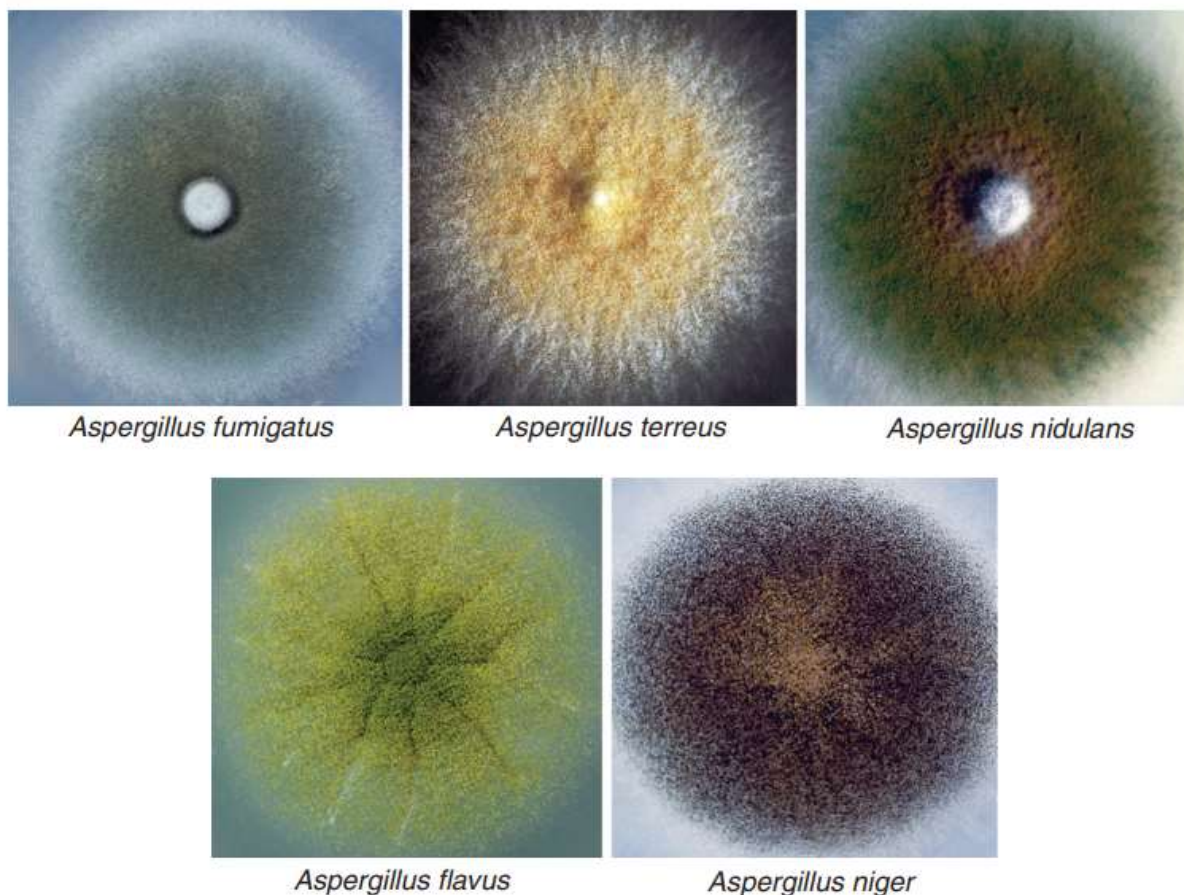


Fig. 5. Principalele specii patogene de *Aspergillus*. *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. flavus* și *A. niger* au fost inoculate pe agar Czapek-Dox și cultivate la 37°C

Galactomannan – antigen fungic

Antigenul galactomannan este o componentă a peretelui celular al *Aspergillus* spp. și se extinde în jurul său dacă țesutul este invadat. Acesta poate fi detectat prin testul imunoenzimatic. Testul poate fi efectuat din ser sau probe bronhoscopice. Antigenul GM apare înaintea semnelor radiologice și clinice ale aspergilozei invazive. Aceasta este motivul pentru care folosim GM ca test de screening la pacienții neutropenici hemato-oncologici, care nu sunt sub profilaxie fungică. Pot apărea și reacții încrucișate cu ciuperci care sunt strâns legate de *Aspergillus* spp., cum ar fi *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.

RT-PCR – diagnostic molecular

Această metodă este deja validată, standardizată și inclusă în ghidurile internaționale de diagnostic, lucru care nu se întâmplă în PCR pentru candidoză. RT-PCR este la fel de fiabil ca teste GM și β -DG. Dar are un avantaj: în probele LBA detectează mai bine *Aspergillus*, decât GM, care ar putea fi confundat cu alte ciuperci. De aceea, este mai utilă în scopuri diagnostice.

C. Criptococoza

1. Generalități

Deși genul *Cryptococcus* cuprinde mai mult de 50 de specii, doar *Cryptococcus neoformans* și *Cryptococcus gattii* sunt considerați principalii agenți patogeni ai omului. Anterior, *C. neoformans* a fost definit ca având două variante – var. *neoformans* și var. *gattii*. Cu toate acestea, pe baza elucidării secvențelor genomice, *C. neoformans* și *C. gattii* sunt considerate acum două specii distincte. Aceste două specii au 5 serotipuri bazate pe specificitatea antigenică a capsulei polizaharidice; acestea includ serotipurile A, D și AD (*C. neoformans*) și serotipurile B și C (*C. gattii*).

C. neoformans este cea mai răspândită specie în întreaga lume și se găsește în excrementele de porumb. Până de curând, *C. gattii* a fost găsit în principal în climatele tropicale și subtropicale. *C. gattii* nu este asociat cu păsările, dar se găsește în așternutul din jurul anumitor specii de eucalipt.

La nivel mondial, serotipul *C. neoformans* A cauzează majoritatea infecțiilor criptococice la pacienții imunocompromiși, inclusive pacienții infectați cu HIV. Din motive necunoscute, *C. gattii* rareori infectează persoanele cu HIV și alți pacienți imunocompromiși. Pacienții infectați cu *C. gattii* sunt de obicei imunocompetenți, răspund lent la tratament, și sunt expuși riscului de a dezvolta leziuni intracerebrale (de exemplu, criptococoma). Un studiu epidemiologic din 2016 a relevat că *Cryptococcus tetragattii* (AFLP7/VGIV), unul dintre cele cinci genotipuri recunoscute de *C. gattii* sensu lato, este asociat cu o prevalență mai mare a meningitei criptococice în rândul pacienților cu HIV.

C. neoformans se reproduce prin înmugurire și formează celule rotunde, asemănătoare levurilor, care au un diametru de 3-6 μm. În organismul gazdă și în anumite medii de cultură, o capsulă polizaharidică mare înconjoară fiecare celulă. *C. neoformans* formează colonii netede, convexe, galbene sau colonii bronzate pe mediu solid la 20-37°C. Această levură este identificată pe baza aspectului său microscopic, rezultatele testelor biochimice și capacitatea de a crește la 37°C, majoritatea tulpinilor de *Cryptococcus* nepatogene nu cresc la această temperatură. În plus, *C. neoformans* nu asimilează lactoza și nitrații și nu produce pseudomicelii pe agar cu făină de porumb sau agar-Tween de orez.

Majoritatea tulpinilor de *C. neoformans* pot folosi creatinina ca sursă de azot, ceea ce poate explica parțial creșterea lor din fecalele aviare bogate în creatinină. O altă caracteristică biochimică utilă a *C. neoformans*, care îl deosebește de tulpinile nepatogene, este capacitatea sa de a produce melanină. Enzima fungică fenol oxidaza acționează asupra anumitor substraturi (de exemplu, dihidroxifenilalanina, acid cafeic) pentru a produce melanina.

Contractarea levurii *C. neoformans* poate duce la colonizarea inofensivă a căilor respiratorii, dar poate duce, de asemenea, la meningită sau boli diseminate, în special la persoanele imunocompromise. Criptococoza reprezintă o infecție fungică majoră care pune viața în pericol la pacienții cu infecția HIV și poate, de asemenea, complica transplantul de organe, malignitatea reticuloendotelială, tratamentul cu corticosteroizi sau sarcoidoza.

2. Epidemiologia

Expunerea la *C. neoformans* este frecventă deoarece 80% dintre adulți au anticorpi direcționați împotriva *C. neoformans*. Cu toate acestea, criptococoza era rar întâlnită în anii 1980. Odată cu apariția SIDA, levura a câștigat o importanță medicală din ce în ce mai mare. În anii 1990, 80% din infecții cu *Cryptococcus* spp. au fost înregistrate la pacienții cu SIDA. Datorită introducerii terapiei antiretrovirale foarte active, rata criptococozei a scăzut semnificativ în țările dezvoltate în ultimii câțiva ani, cu o creștere a criptococozei la pacienții HIV negativi. Cu toate acestea, această infecție a apărut ca o cauză majoră de mortalitate în rândul persoanelor care nu au acces la terapia

antiretrovirală în țările în curs de dezvoltare. Un milion de cazuri de criptococoză sunt raportate în fiecare an în Africa Subsahariană, cu peste 600.000 de decese/an la pacienții HIV infectați. La nivel mondial, incidența anuală a criptococozei la pacienții cu HIV/SIDA a fost estimată la 220.000 de cazuri.

C. neoformans este o cauză majoră a meningitei la persoanele care trăiesc cu HIV/SIDA, cu aproximativ 1 milion de cazuri de meningită criptococică care apar în întreaga lume în fiecare an. Pacienții cu imunodeficiență mediată de celule T, prezintă cel mai mare risc de infecții criptococice. Alți factori predispozanți (*ex.* transplantul de organe, utilizarea corticosteroizilor sau a altor medicamente imunosupresoare) sunt frecvent raportați de sinestătător sau în asocieră cu alți factori de risc. Au fost înregistrate cazuri și la pacienți aparent sănătoși cu posibile erori de imunitate (*ex.* o singură genă în axa IL-12/IFN γ). Mai mult, autoanticorpi împotriva GM-CSF (*C. neoformans* și *C. gattii*) sau IFN γ (*C. neoformans*) au fost descriși la pacienții cu criptococoză fără factori de risc cunoscuți. Spre deosebire de *C. neoformans*, *C. gatti* poate afecta aparent indivizii sănătoși

3. Aspecte clinice

Simptomatologia în criptococoză variază în funcție de locul infecției și de statutul imun al pacientului.

Simptomele clinice în criptococoza pulmonară la pacienții imunocompetenți:

- Tuse (54%);
- Tuse cu producere de spută mucoasă redusă (32%);
- Durere toracică pleuritică (46%);
- Febră de grad scăzut, dispnee, scădere în greutate și stare de rău (mai puțin frecvente).

Simptomele clinice în criptococoza pulmonară la pacienții cu HIV:

- Febră (84%);
- Tuse (63%);
- Dispnee și tahipnee (50%);
- Cefalee (41%);
- Pierdere în greutate (47%).

Alte simptome posibile în infecția pulmonară:

- Durere pleuritică;
- Hemoptizie;
- Raluri sau crepitații pleurale;
- Sindromul de detresă respiratorie acută.

Meningita și meningoencefalita, cele mai frecvente manifestări ale criptococozei SNC, sunt de obicei subacute sau cronice. Pacienții infectați cu HIV pot prezenta simptome minime sau nespecifice. Simptomele comune sunt următoarele:

- Cefalee;
- Iritabilitate;
- Confuzie;
- Letargie;
- Obnubilare;
- Comă;
- Temperatura normală sau ușor crescută;
- Greață și vomă (cu creșterea presiunii intracraniene);
- Febră și rigiditatea mușchilor occipitali (cu un răspuns inflamator agresiv; mai puțin frecvente);
- Vedere încețoșată, fotofobie și diplopie;
- Defecte de auz, convulsii;
- Afectarea nervilor cranieni cu ataxie, afazie și mișcări coreoatetozice.

După infecția pulmonară și a SNC, următoarele organe cel mai frecvent implicate în criptococoza diseminată includ pielea, prostata și cavitatea medulară a oaselor. Manifestările cutanate (10-15% din cazuri) sunt următoarele:

- Papule, pustule, noduli, ulcere sau sinusuri drenante;
- Papule ombilicate la bolnavii cu HIV în stadiul SIDA;
- Celulită cu vasculită necrozantă la persoanele cu transplant de organe.

Alte forme mai puțin frecvente de criptococoză includ următoarele:

- Nevrita optică sau endoftalmita;
- Miocardita;
- Corioretinita;
- Hepatita;
- Peritonita;
- Pielonefrită;
- Necroză, medulară a rinichilor;
- Abces renal;
- Miozita;
- Implicarea suprarenalelor.

4. Diagnostic de laborator

Examenul la pacienții cu suspiciune de criptococoză include următoarele:

- Leziuni cutanate: Biopsie cu microscopie și cultură;
- Sânge: cultură fungică, serologie și testare antigen criptococic;
- Lichidul cefalorahidian: frotiu cu tuș de India, cultură fungică și testarea antigenului criptococic;
- Culturi de urină și spută, chiar dacă patologia renală sau pulmonară nu este evidentă clinic;
- La bolnavii cu SIDA, pneumonie criptococică, cultură din lavaj bronhoalveolar.

Examenul microscopic direct

Preparatul extemporaneu colorat cu tuș de India (anexa 5) este folosit ca instrument de diagnostic rapid și ieftin care se bazează pe vizualizarea directă a capsulei criptococilor din fluidele corporale, în special LCR. Acest preparat poate fi efectuat din toate probele lichide (urină, spută, lichid ascitic). Sensibilitatea acestui test pentru LCR de la pacienții cu meningită criptococică este de aproximativ 80% la pacienții cu HIV și de 30% până la 50% la pacienții non-HIV.

Prezența celulelor levuriforme de 4-6 μm cu un halou clar în jur (grosimea capsulei: 1 până la 30 μm) indică prezența criptococilor. Rezultate fals negative sunt posibile în cazul capsulei subțiri și conduc la un diagnostic greșit (*Candida* spp., *Histoplasma* spp.).

Pentru a pune în evidență mai bine *C. neoformans* din LCR este propusă tehnica cu tuș de India modificată (anexa 5).

Examenul histologic

Colorațiile histologice nespecifice (Acid periodic – Schiff, May-Grünwald-Giemsa) sunt mai sensibile decât tehnica cu tuș de India pentru detectarea levurei în probele de țesut. Colorația cu hematoxilina-eozină pune în evidență un halou clar, iar unele tehnici de colorație (mucicarmină, albastru alcian) vizează în mod specific capsula polizaharidă. Răspunsul inflamator în țesut pare a fi minim, în special la pacienții infectați cu HIV cu un infiltrat polimorf moderat (în principal macrofage și limfocite T).

Metoda culturală

C. neoformans dezvoltă colonii în decurs de 48 până la 72 de ore (până la 7 zile în cazul terapiei antifungice) pe majoritatea mediilor (ex., agar dextroză Sabouraud) la temperatura de 25-30°C sau la 35-37°C. Mediile care conțin cicloheximidă nu sunt utilizate pentru cultivarea *C. neoformans*,

deoarece el este sensibil la acest preparat. De asemenea, pot fi utilizate așa medii ca geloza-sânge, agar cu infuzie creier cord, etc. Coloniile de pe mediul Sabouraud sunt cremoase, albe și mucoide (datorită capsulei) (Fig. 6a).

Geloza cu semințe de Niger suplimentată cu antibiotice este un mediu selectiv pentru *C. neoformans*. *C. neoformans* posedă feniloxidază care oxidează acidul cafeic (din extractul din semințe de niger) pentru a produce melanină. Pe acest mediu *C. neoformans* formează colonii maronii, spre deosebire de *Candida* spp., care dezvoltă colonii albe (Fig. 6b, c). Această caracteristică este utilă pentru cultivarea *C. neoformans* din prelevate contaminate sau colonizate de *Candida* spp. Cu toate acestea, unele tulpini de *C. neoformans* și non-*neoformans* nu au fenoloxidază și nu produc colonii de culoare maro.

Performanța metodei culturale poate fi îmbunătățită utilizând un volum mare de umori corporale, cum ar fi 3 - 5 ml pentru LCR. Mai mult, metoda de liză-centrifugare poate fi mai sensibilă în detectarea levurilor în hemocultură. Culturile negative cu examinări microscopice pozitive (preparatul cu tuș de India) pot fi explicate prin prezența criptococilor neviabili după terapie.



Figura 6. a) Colonii mucoide de *C. neoformans* pe SDA; b) *C. neoformans* - colonii de culoare maro-neagră pe geloza cu semințe de Niger; c) *Cryptococcus laurentii*/*Saccharomyces cerevisiae*/*E. coli* - colonii nepigmentate pe geloza cu semințe de Niger

Profilele biochimice nu arată nicio fermentație, producere de urează și nicio asimilare de nitrat. Profilul fiziologic complet oferă o identificare certă după cultura primară.

Detectarea antigenelor și/sau anticorpilor

Detectarea antigenului capsular polizaharidic criptococic (CRAG) este utilă atât în diagnosticul infecției, cât și în predicția prognosticului și a răspunsului la terapie. Sunt disponibile mai multe teste imunologice precum latexaglutinarea, analiza imunoenzimatică și, mai recent, teste imunocromatografice pentru antigen criptococic. Testele CRAG se bazează pe detectarea glucuronoxilomananului polizaharidic al capsulei criptococice. Sensibilitatea și specificitatea în ser și LCR sunt excelente în special la bolnavii de SIDA (peste 95%). Clinicienii trebuie informați că CRAG în ser este pozitiv la doar 85% dintre pacienții non-HIV cu meningită diseminată și/sau meningită.

Pozitivitatea neașteptată a unui antigen criptococic în fluidele corporale ar trebui să conducă la un control și, atunci când este cazul, la o evaluare exhaustivă. Un antigen pozitiv poate precede o criptococoză autentică de mai mult de câteva luni. Titrurile ridicate de CRAG în ser ($>1/512$) sau LCR la momentul inițial prezic o sarcină fungică mare în LCR și, prin urmare, o mortalitate mai mare. Cinetica dispariției antigenului nu este utilizată în practica de rutină, studiile anterioare nu au raportat nicio corelație între scăderea nivelului de CRAG în ser, dar nu și pentru LCR în prognosticul meningitei criptococice.

Au fost raportate atât teste fals pozitive (datorită factorului reumatoid, reacție încrucișată cu antigenul *Trichosporon* spp. și specii nepatogene de *Cryptococcus*), cât și fals negative (datorită fenomenului prozon, absența utilizării pronazei, infecției precoce).

FDA a aprobat un test de flux lateral (LFA) pentru detectarea semi-cantitativă rapidă (≤ 15 minute) a antigenului polizaharidic în ser sau LCR. Testul constă din benzi optimizate pentru a detecta toate cele patru serotipuri criptococice majore. Un studiu prospectiv multicentric a arătat cea mai mare sensibilitate și specificitate pentru LCR ($>99\%$) în comparație cu alte metode de diagnostic, cum ar fi preparatul cu tuș de India, culturile din LCR sau CRAG.

Detectarea anticorpilor: anticorpilor serici pot fi detectați prin reacția de aglutinare și imunofluorescență.

Diagnosticul molecular

Metodele moleculare oferă o abordare de diagnosticare potențial mai rapidă pentru a identifica *C. neoformans* și *C. gattii* și pentru a face diferențierea între tipurile moleculare ale acestora. O serie de teste comerciale, bazate pe testarea sindromică PCR pentru infecțiile SNC și respiratorii (Biofire meningită/encefalită (ME) (bioMérieux) și teste Multiplex Tandem PCR (MT-PCR) Pneumonie atipică și LCR (AusDiagnostics)) sunt utilizate pentru detectarea speciilor de *Cryptococcus* în scop diagnostic. Aceste teste sunt aplicabile numai anumitor tipuri de specimene și, important, nu diferențiază *C. neoformans* de *C. gattii*. Cu toate acestea, există puține date despre utilizarea testelor PCR în detectarea speciilor *Cryptococcus* în scopuri de diagnostic.

Diferențierea speciilor de Cryptococcus

Diagnosticul de laborator al *C. gattii* nu diferă de *C. neoformans*. Diagnosticul *Cryptococcus* spp. se bazează pe: vizualizarea directă a unei levuri capsulate, cultură pozitivă sau test CRAG (antigen criptococic) pozitiv. Strategia de evaluare trebuie să fie similară cu cea a infecției cu *C. neoformans*.

Specificul *C. gattii*:

- Preparatul cu tuș de India este mai sensibil decât pentru *C. neoformans* la pacienții non-HIV
- sensibilitatea la antigenul criptococic în ser este de 90% pentru boala pulmonară
- sensibilitatea la antigenul criptococic în LCR este de 87-100% pentru meningită
- Titruri serice CRAG ≥ 256 la momentul inițial au prezis moartea și/sau sechele neurologice la 12 luni
- coloniile crescute pe medii agarizate sunt mai mucoide și mai lipicioase ca textură decât cele ale *C. neoformans*.

Cultura pe CGB (mediu selectiv agar cu L-canavanin glicin - albastru de bromtimol) este standardul de aur pentru diferențierea celor două specii. *C. gattii* transformă mediul albastru prin asimilarea glicinei ca unică sursă de carbon și azot, ceea ce crește pH-ul, în timp ce *C. neoformans* nu schimbă culoarea. *C. gattii* crește în prezența D-prolinei, în timp ce *C. neoformans* nu. *Cryptococcus*, alte specii decât *C. neoformans* sau *C. gattii*, nu produc pigmentul maro pe agar cu semințe Niger.

În combinație cu metoda culturală, serotiparea *Cryptococcus* spp. cu un test de imunofluorescență directă cu un anticorp monoclonal (EI) specific pentru polizaharidul criptococic permite rapid și fiabil serotipizarea izolatelor clinice în patru categorii (A sau D pentru *C. neoformans*, B sau C pentru *C. gattii*). Cu toate acestea, deoarece serotiparea nu este utilizată în mod obișnuit, unele laboratoare clinice recomandă combinarea metodei moleculare, cum ar fi secvențierea ADN-ului subunității ribozomale mari D2 (D2 LSU).

Unii autori consideră, că clinicienii nu este necesar să cunoască în practica de rutină specia care provoacă infecția pentru a gestiona bine un pacient cu criptocoză, în special în țările cu resurse limitate. Unele metode moleculare sau proteomice promițătoare ar putea să diferențieze cele două specii și genotipuri, mai ales în situații particulare: eșecul metodei culturale, preparate histologice negative sau diagnostic diferențial cu alți agenți fungici. Accesibilitatea la aceste metode depinde de experiența anumitor laboratoare și acestea sunt uneori incapabile să diferențieze cele două specii.

Recomandări pentru diagnosticarea, prevenirea și managementul infecției criptococice în rândul adulților, adolescenților și copiilor cu HIV

Diagnosticul meningitei criptococice

La adulți, adolescenți și copii cu HIV, suspectați de un prim episod de meningită criptococică pentru diagnostic se recomandă puncția lombară cu măsurarea presiunii LCR și determinarea rapidă a antigenului criptococic.

Dacă un test de determinare a antigenului criptococic nu este disponibil și/sau nu sunt disponibile rezultate rapide, se recomandă puncția lombară cu examinarea preparatului extemporaneu colorat cu tuș de India.

Pentru un prim episod se recomandă și cultura criptococică din LCR în paralel cu testarea antigenului criptococic, dacă aceasta este posibil.

În cazul în care nu sunt condiții de efectuare a puncției lombare sau când puncția lombară este contraindicată clinic se recomandă determinarea antigenului criptococic din ser, plasmă sau sânge integral.

Prevenire și screening

Screeningul pentru antigenul criptococic din plasmă, ser sau sânge integral este abordarea optimă pentru identificarea infecției atunci când se monitorizează persoanele care sunt cu HIV de 10 ani și mai mult.

Recomandări

În cazul în care testul de determinare a antigenului criptococic este pozitiv, indicarea terapiei antifungice pentru a preveni dezvoltarea criptococozii invazive, se recomandă înainte de inițierea sau reinițierea terapiei antiretrovirale pentru adulți și adolescenți cu HIV și care au un număr de celule CD4 <100 celule/mm³.

Toate persoanele cu HIV cu un screening pozitiv al antigenului criptococic trebuie să fie evaluate cu atenție pentru semne și simptome de meningită și să fie supuse puncției lombare, dacă este posibil, cu examinarea LCR.

Atunci când testele de screening nu sunt disponibile, profilaxia primară cu Fluconazolum trebuie administrată adulților și adolescenților cu HIV și care au un număr de celule CD4 <100 celule/mm³.

Antigenul criptococic poate fi detectat în sânge cu multe săptămâni înainte de apariția simptomelor. Pacienții pozitivi la AgCr seric prezintă un risc cu 25% mai mare de a dezvolta meningită criptococică în primul an de terapie antiretrovirală. Screeningul AgCr al pacienților înainte de inițierea terapiei antiretrovirale asociat cu tratamentul preventiv cu Fluconazolum odată ce AgCr este pozitiv a fost asociat cu un număr redus de cazuri de meningită meningită criptococică. Această strategie combinată este asociată cu o mortalitate semnificativ redusă.

D. *Pneumocystis jirovecii*

1. Generalități

Pneumocystis jirovecii (anterior *Pneumocystis carinii*), un fung unicelular ubicuitar, cu un ciclu de viață complex. El se găsește la nivelul tractului respirator al multor mamifere și al oamenilor și se consideră că 60% din populație este infectată până la vârsta de patru ani. *P. jirovecii* provoacă boala doar la indivizii susceptibili, cu un sistem imunitar slăbit, la fel ca orice alt microorganism oportunist. Calea de transmitere a microorganismului nu este încă foarte clar stabilită, însă se consideră a fi transmitere aerogenă.

După inhalare, microorganismul aderă la pneumocitele de tip I de la nivel alveolar. În cazul unui sistem imunitar competent, macrofagele alveolare, împreună cu limfocitele T CD4+, reușesc să împiedice multiplicarea acestuia. În cazul unui deficit al sistemului imun, mai ales la nivelul celulelor CD4+, *P. jirovecii* se poate replica necondiționat, ducând la apariția unui exsudat eozinofil spumos care umple spațiile alveolare și compromite funcția respiratorie.

Epidemiologia pneumoniei provocate de *Pneumocystis jirovecii*

Pneumonia cu *P. jirovecii* (PPJ) este una dintre cele mai frecvente și mai severe infecții oportuniste apărute la persoanele cu imunitate scăzută, în special la persoanele cu infecție HIV.

Apărută inițial la copiii prematuri sau cu malnutriție severă din Europa Centrală sau Estică în timpul celui de-al Doilea Război Mondial, pneumonia cu *Pneumocystis jirovecii* era la început o boală destul de rară, asociată până în anii 1980 cu pacienții imunodeprimați, precum bolnavii oncologici care primeau chimioterapice sau persoanele care primeau imunosupresoare după transplant de organ solid. Abia în anul 1981, când infecția este observată la un grup de utilizatori de droguri intravenoase și fără o cauză cunoscută de imunosupresie, apare noțiunea de SIDA (care va fi corelată la scurt timp cu infecția HIV), iar numărul de cazuri de PPJ crește considerabil.

Odată cu introducerea tratamentelor infecției HIV și a profilaxiei la persoanele imunodeprimite, incidența pneumoniei cu *P. jirovecii* a intrat în declin. În SUA de exemplu, incidența pneumoniei cu *P. jirovecii* este astăzi de aproximativ 9% la pacienții HIV/SIDA spitalizați și de 1% la pacienții care au suferit un transplant de organ.

Principalele categorii de risc pentru această infecție sunt:

- persoanele cu infecție HIV care au un titru al limfocitelor T CD4+ mai mic de 200/mm³ și nu primesc profilaxie pentru PPJ (prezența unei alte infecții oportuniste la un bolnav cu HIV crește riscul de PPJ, indiferent de nivelul limfocitelor T CD4+);
- persoanele cu imunodeficiențe primare;
- persoanele care administrează corticosteroizi sau alt tratament imunosupresor pe termen lung pentru boli de țesut conjunctiv, vasculite sau transplant de organe solide;
- persoanele cu tumori maligne hematologice sau non-hematologice, inclusiv tumorile solide și limfoamele;
- persoanele cu malnutriție severă.

2. Aspecte clinice ale infecției cu *Pneumocystis jirovecii*

În cazul persoanelor cu infecție HIV, pneumonia cu *P. jirovecii* evoluează subacut, de-a lungul câtorva săptămâni și se caracterizează prin acuze precum dispnee progresivă la efort, febră cu frisoane, fatigabilitate și tuse neproductivă, la care se pot adăuga uneori dureri toracice, scădere ponderală sau hemoptizie (rar).

În cazul pacienților fără infecție HIV, ca urmare a faptului că imunosupresia nu este atât de pronunțată și răspunsul inflamator pulmonar este mult mai amplu, tabloul clinic este mai sever. Infecția cu *P. jirovecii* este acută, cu debut brusc, însoțit de febră înaltă cu frisoane, astenie generală, tuse și dispnee severă, care poate progresa până la insuficiență respiratorie acută, comparabilă cu cea din sindromul de detresă respiratorie acută, necesitând ventilație mecanică.

În 2-6% din cazuri, pneumonia cu *P. jirovecii* se poate prezenta sub forma unui pneumotorax spontan. În rare cazuri, infecția poate să se extindă și la alte organe sau să afecteze alte organe per primam. Aceste afectări extrapulmonare se întâlnesc mai frecvent la pacienții care au făcut profilaxie cu Pentamidinum* în aerosoli sau la cei cu infecție HIV severă care nu au făcut profilaxie. Cele mai frecvente afectări extrapulmonare pot apărea la nivelul sistemului nervos central, al măduvei osoase, ganglionilor limfatici, ochilor, tiroidei sau tractului digestiv, determinând o simptomatologie variată.

3. Diagnostic de laborator

Lavajul bronhoalveolar

Actualmente, cel mai indicat prelevat pentru diagnosticul pneumoniei pneumocistice este LBA, care este considerat a fi proba respiratorie de cea mai înaltă calitate. Cu toate acestea, lipsa unei tehnici de recoltare standardizate, poate influența calitatea testului. S-a constatat că bronhoscopia efectuată după obținerea rezultatului negativ al investigării sputei induse, permite stabilirea diagnosticului în 51% din cazuri și, dacă este negativă, permite întreruperea tratamentului. Limitările includ faptul că această procedură invazivă este costisitoare, implică un risc mai mare pentru pacient și s-ar putea să nu fie posibil de efectuat în cazul pacienților cu boală pulmonară severă.

Sputa

Au fost făcute încercări de a dezvolta tehnici mai puțin invazive pentru obținerea probelor pentru testare. Conform unei meta-analize care a inclus 322 de indivizi, s-a constatat că performanța testului imunofluorescent din spută indusă are o valoare predictivă negativă > 95% în situații de prevalență scăzută (prevalență <10%), ceea ce face un test negativ adecvat pentru a exclude pneumonia pneumocistică. Cu toate acestea, în zonele cu prevalență ridicată și cazuri de suspiciune mare de pneumonie pneumocistică, trebuie de efectuat bronhoscopie pentru a obține LBA, în cazul rezultatelor negative și o bună concordanță cu rezultatele LBA atunci când sunt utilizate teste PCR de detectare.

Spălături orale

P. jirovecii poate fi găsit în spălăturile orale dacă microorganismul a fost tușit sau recent inhalat în tractul orofaringian. Spălăturile orale pot fi obținute rapid și neinvaziv, iar testele pozitive pot reflecta o încărcare fungică și mai mare în tractul respirator inferior. Cu toate acestea, există dezavantaje teoretice, cum ar fi gradul crescut de inhibare a *P. jirovecii* datorită secrețiilor faringiene și incapacitatea microorganismelor de a ajunge în cavitatea bucală în infecțiile cu sarcină fungică joasă. Studii multiple au evaluat capacitatea de a detecta *P. jirovecii* în probele de spălături orale folosind sisteme de detecție PCR foarte sensibile. În comparație cu sputa și LBA, s-a observat că PCR ale spălăturilor orale are o sensibilitate de 75–91% și o specificitate de 68–100%. Spălăturile orale pot fi cel mai utile în susținerea unui diagnostic de pneumonie pneumocistică dacă sunt pozitive, dar un rezultat negativ nu poate exclude în mod sigur pneumonia pneumocistică la pacienții simptomatici.

Aspirat nazofaringian

Specimenele tractului respirator inferior, cum ar fi LBA și sputa, sunt dificil de obținut la copii. Într-un studiu, s-a constatat că determinarea glicoproteinei majore de suprafață prin PCR din probe

nazofaringiene are o sensibilitate de 86% și o specificitate de 95% pentru detectarea *P. jirovecii*. Prin urmare, PCR pe probe nazofaringiene, dacă este pozitivă, poate evita necesitatea obținerii probelor mai invazive.

Sânge/ser

Prezența *P. jirovecii* în sânge reflectă progresia bolii, deoarece agentul patogen nu se limitează doar la tractul respirator. Mai multe studii au sugerat că detectarea ADN-ului *P. jirovecii* în ser poate fi un marker de diagnostic util pentru pneumonia pneumocistică.

Un raport recent a arătat că tehnica PCR în timp real pe ser a demonstrat o sensibilitate foarte înaltă (100%) și o valoare predictivă negativă bună (99%) pentru diagnosticul de pneumonie pneumocistică la pacienții HIV infectați. Serul este utilizat și în alte teste de diagnostic, inclusiv analiza imuno-enzimatică (ELISA) pentru detectarea anticorpilor și antigenelor asociate cu *P. jirovecii*.

P. jirovecii este extrem de dificil de cultivat și, prin urmare, a fost diagnosticat în mod clasic prin simptome clinice și constatări radiografice cu confirmare prin vizualizarea microscopică a microorganismului.

Diagnosticul specific se bazează pe identificarea *P. jirovecii* în secrețiile bronhopulmonare obținute ca spută indusă sau material de lavaj bronhoalveolar. În situațiile în care aceste două tehnici nu pot fi utilizate, se poate dovedi necesară biopsia transbronșică sau biopsia pulmonară deschisă.

Identificarea microscopică a trofozoizilor și chisturilor de *P. jirovecii* se realizează cu colorații care demonstrează fie nucleii trofozoizilor și stadiile intrachistice (cum ar fi Giemsa), fie pereții chistului (cum ar fi colorația argentică).

Microscopia cu imunofluorescență folosind anticorpi monoclonali posedă o sensibilitate și o specificitate mai mare decât colorațiile convenționale. Sensibilitatea variază de la 48 la 100%, iar specificitatea de la 82 la 100%.

Sensibilitatea acestor metode este mult mai scăzută la pacienții fără infecție HIV, deoarece gradul de multiplicare al microorganismului este mai mic.

Reacția de polimerizare în lanț

PCR s-a dovedit a fi mai sensibilă pentru detectarea *P. jirovecii* decât metoda microscopică la pacienții cu și fără HIV. Trei meta-analize publicate în ultimii ani au raportat o sensibilitate combinată de 98%, 99% și 97%, cu o specificitate comună de 91%, 90% și 94%, majoritatea probelor fiind LBA. Această sensibilitate și specificitate ridicate au persistat atât la pacienții HIV-pozitivi, cât și la cei HIV-negativi. În mod remarcabil, cea mai mare sensibilitate și specificitate au fost înregistrate în studiile care utilizează metode cantitative PCR. Deoarece sensibilitatea este mare, un rezultat fals negativ al testului este rar. Prin urmare, un PCR negativ pe LBA înseamnă că pneumonia pneumocistică este un diagnostic puțin probabil. În schimb, specificitatea ridicată înseamnă că un PCR pozitiv pe LBA sugerează foarte mult prezența *P. jirovecii*.

Citometrie în flux

Citometria în flux poate detecta un singur sau mai multe microorganisme într-un mod ușor, fiabil și rapid. Aceste microorganisme pot fi identificate prin parametri citometrici, fluorocromi precum CW sau anticorpi monoclonali *P. jirovecii*. Citometria în flux poate detecta, de asemenea, anticorpi anti-*Pneumocystis* și comenta sensibilitatea antifungică. Barbosa și colab. au dezvoltat o metodă care utilizează colorarea imunofluorescentă cu kitul Detect IF (Axis-Shield Diagnostics Limited, Marea Britanie) urmată de citometrie în flux. Această metodă permite detectarea *P. jirovecii* în

LBA și probe bronșice cu sensibilitate și specificitate de 100%. Deși aplicațiile sunt vaste, datele sunt limitate, iar acest lucru nu este recomandat în prezent ca metodă de diagnostic.

Determinarea anticorpilor

O abordare promițătoare de diagnostic este utilizarea unui instrument antigenic într-o tehnică ELISA pentru a detecta anticorpii IgM și IgG împotriva *P. jirovecii*. Au fost descriși mai mulți antigeni imunogeni potențiali, inclusiv antigeni naturali precum Meu10 și antigeni sintetici recombinanți. Un studiu a arătat că ELISA IgM anti-*P. jirovecii* are o sensibilitate de 100% și o specificitate de 81% la testarea probelor de ser. Este de remarcat, că răspunsul imun poate fi variabil în funcție de natura stării de imunodepresie și poate afecta sensibilitatea acestui test la anumite categorii de pacienți. Studiile anterioare au arătat modificări ale răspunsului imun la pacienții cu HIV, antecedente de transplant, cancer, care nu reușesc să adere la terapia profilactică, fumători, pacienții cu boală pulmonară obstructivă cronică, cu consum excesiv de alcool, consum de droguri injectabile și chiar pacienți din diferite zone geografice. Infecția clinică anterioară sau expunerea subclinică la *Pneumocystis* pot avea, de asemenea, un impact asupra răspunsului imun și pot duce la teste fals pozitive.

Teste de determinare a antigenelor și biomarkerilor

Componenta (1,3)-Beta D-Glucan (BG) este un constituent al peretelui celular în forma de viață ascus a *Pneumocystis jirovecii* și a multor alți agenți patogeni fungici. Au fost dezvoltate diverse teste care detectează BG în ser, cele mai populare fiind testul Fungitell, un test cromogen aprobat de FDA. În mai multe studii de meta-analiză, acest test a demonstrat o sensibilitate în proporție de 91%, 96% și 95%, sensibilitatea înaltă fiind demonstrată atât la pacienții HIV pozitivi, cât și la cei negativi. Cu toate acestea, BG a fost doar în 75%, 84% și 86% specific pentru pneumonia pneumocistică, deoarece testul poate să fie pozitiv și în alte infecții fungice, la pacienții cu endotoxemie gram-negativă, la pacienții tratați cu anumite antibiotice, sub terapie cu albumină sau globulină și la cei supuși hemodializei. Avantajul semnificativ al acestui test este natura neinvazivă și rezultatul negativ este suficient pentru a exclude diagnosticul de pneumonie pneumocistică. Dezavantajul este că BG pozitiv nu este specific pentru diagnosticul acestei patologii și trebuie efectuate teste suplimentare pentru validarea rezultatelor.

Lactat dehidrogenaza (LDH) este o enzimă intracelulară care se găsește în aproape toate țesuturile. S-a constatat că nivelurile serice de LDH sunt semnificativ crescute la pacienții cu pneumonie pneumocistică în comparație cu pacienții fără acest diagnostic. Sensibilitatea și specificitatea acestui marker pentru pneumonia pneumocistică au fost estimate a fi de 66%–91% și, respectiv, 36–52%. Într-un studiu, s-a constatat că sensibilitatea creșterii LDH este de 100% la pacienții HIV pozitivi, și doar 63% la pacienții HIV negativi, indicând faptul că acest marker poate fi util numai în detectarea pneumoniei pneumocistice la pacienții HIV pozitivi.

Alți antigeni, cum ar fi KL-6 și S-adenosilmetionina, au fost, de asemenea, evaluați ca potențiali markeri. Antigenul KL-6 este o mucin-glicoproteină exprimată pe pneumocitele alveolare de tip 2 și pe celulele epiteliale bronșolare. S-a constatat că nivelurile serice de KL-6 sunt crescute la pacienții cu pneumonie pneumocistică, dar acest marker are specificitate scăzută datorită creșterii sale în boala pulmonară interstițială și alte boli infecțioase. S-adenosilmetionina (SAM) este un intermediar în multiple funcții celulare pe care *Pneumocystis* nu le poate sintetiza și trebuie să le extragă din plasma gazdei sale. Unele studii au demonstrat niveluri serice de SAM semnificativ mai scăzute la pacienții infectați cu *P. jirovecii* în raport cu pacienții infectați cu alți agenți patogeni și pacienții de control.

În ceea ce privește diagnosticul clinic, este de reținut că triada clasică de simptome reprezentată de febră, dispnee progresivă la efort și tuse neproductivă apare doar în aproximativ 50% din cazuri.

Examenul fizic este și el destul de nespecific și include: tahipnee, febră, tahicardie, alături de modificări la auscultația pulmonară (raluri crepitante sau ronflante) în aproximativ 50% din cazuri și scăderea saturației O₂ în sângele periferic. Modificările sunt mai grave la pneumonia cu *P. jirovecii* apărută la pacienții fără infecție HIV.

La copii, examenul clinic mai poate decela cianoză, bătăi ale aripioarelor nazale și tiraj intercostal, în cadrul sindromului funcțional respirator.

Toate aceste semne și simptome pot apărea într-o mulțime de alte afecțiuni, precum sindromul de detresă respiratorie acută, pneumonia cu citomegalovirus, pneumonia interstițială limfocitară, pneumonia virală, embolismul pulmonar, legioneloza, tuberculoza sau infecția cu *Mycobacterium avium* complex. Tocmai de aceea, un rol important în stabilirea diagnosticului îl are și anamneza pacientului, care poate fi îndeajuns de sugestivă pentru a-i ridica medicului suspiciunea de pneumonie cu *P. jirovecii*.

Odată suspectată, PPJ poate fi confirmată de anumite modificări găsite la efectuarea unor investigații paraclinice. Astfel, citopenia relevată ca urmare a efectuării hemogramei, LDH-ul seric crescut (ca expresie a afectării pulmonare), gazometria arterială modificată cu o scădere a saturației sângelui arterial cu oxigen (SaO₂), precum și serologia HIV pozitivă la o persoană care nu se știa infectată sau titrul scăzut al limfocitelor T CD4+ la un infectat HIV sunt sugestive pentru pneumonia cu *P. jirovecii*, însă nu foarte specifice.

Radiografia pulmonară ar trebuie efectuată la toți pacienții imunodeprimați cu febră și/sau semne și simptome respiratorii. Modificările tipice induse de *P. jirovecii* pe radiografie sunt reprezentate de infiltrate perihilare sau interstițiale difuze, dar există cazuri în care pe radiografie apar modificări nespecifice sau aspectul pulmonar este normal (în aproximativ 1/3 din cazuri). În aceste cazuri echivoce, este utilă efectuarea unei tomografii computerizate de înaltă rezoluție (HRCT). Modificările tipice ale pneumoniei cu *P. jirovecii* pe HRCT sunt zonele neregulate cu aspect de sticlă mată și îngroșarea septurilor interlobulare.

Testele funcționale respiratorii vor evidenția la un pacient cu pneumonie provocată de *P. jirovecii* scăderea capacității de difuzie a CO (DLCO) la mai puțin de 75%. O valoare normală a DLCO exclude diagnosticul de pneumonie pneumocistică

Diagnosticul diferențial al pneumoniei provocate de P. jirovecii

Diagnosticul diferențial al pneumoniei cu *P. jirovecii* se face cu următoarele afecțiuni:

- Sindromul de insuficiență respiratorie acută;
- Infecția cu citomegalovirus;
- Pneumonie interstițială limfocitară;
- Infecții cu micoplasme;
- Pneumonie virală;
- Embolie pulmonară;
- Legioneloza;
- Tuberculoza;
- Infecția cu *Mycobacterium avium* complex;
- Sindromul inflamator de reconstituire imunitară.

E. Histoplasmoza

1. Generalități

Histoplasmoza este o infecție cauzată de *Histoplasma capsulatum*, un fung ce se localizează mai ales la nivelul parenchimului pulmonar. Ocazional, pot fi afectate și alte organe, în special dacă histoplasmoza se complică și apare forma diseminată a bolii. Această afecțiune apare mai frecvent la pacienții cu un sistem imunitar incapabil de a face față agresiunilor fungice, cum este cazul

pacienților imunocompromiși, al celor cu infecție HIV/SIDA, sau pacienților care au suferit recent un transplant de organ.

H. capsulatum este un fung dimorf, ce poate fi identificat prin prezența hifelor, care poartă atât spori mari, cât și mici (microconidii). În pofida numelui sau, fungul nu prezintă capsulă.

H. capsulatum se găsește în formă inactivă în mediu, însă care poate să devină agresiv când este în organismul uman, unde găsește un mediu favorabil de multiplicare. Majoritatea indivizilor cu histoplasmoză rămân asimptomatici pentru o perioadă foarte lungă. În cazul în care boala devine manifestă, este un semn că rezistența macroorganismului este scăzută, sau că persoana a fost în contact cu o cantitate foarte mare de funghi.

Organismul are propriile mecanisme de rezistență împotriva fungilor, reprezentate de proprietățile fungistatice ale neutrofilelor și macrofagelor. În limitarea extinderii infecției un rol crucial îl au limfocitele T, acesta fiind și motivul pentru care un organism cu un sistem imun deprimat nu poate limita o astfel de infecție. În cazul în care organismul se opune activ împotriva infecției, răspândirea acesteia se reduce pentru 1-2 săptămâni.

Răspunsul sistemic imun și inflamator este adesea foarte complex și implică o cascadă de reacții generale ce presupun activarea citokinelor proinflamatorii, interleukinelor, macrofagelor. Sistemul imun competent poate limita semnificativ infecția. Astfel, în doar 3-6 săptămâni de la expunere se poate dezvolta o reacție de hipersensibilizare față de antigenele fungice. Între 85 - 90% dintre indivizii cu sistem imun integru au reacție pozitivă la testarea cutanată pentru *Histoplasma*, ceea ce înseamnă că s-au confruntat cu acest agent patogen, însă nu au dezvoltat o afecțiune clinic manifestă deoarece organismul a putut face față infecției.

2. Epidemiologia

Histoplasmoza este una din cele mai frecvente infecții fungice în Statele Unite ale Americii. Majoritatea persoanelor din zonele endemice contactează agentul în copilărie. Acești funghi se dezvoltă doar dacă mediul pe care îl populează îi oferă condiții favorabile: umiditate, pH acid, azot, temperatură optimă de 37°C. În mediul exterior se găsește în soluri contaminate cu fecalele păsărilor, în special în dejectele liliecilor. Păsările și liliecii nu sunt infectați și nu prezintă manifestări clinice ci sunt doar purtători de funghi. *Histoplasma* colonizează solurile dar se găsește și pe penele păsărilor, în rezervațiile acestora, în cuiburi, în peșteri. Există și cazuri de histoplasmoză urbană. În oraș, dacă solul este maturat, spori de *Histoplasma* sunt vehiculați în aer și apoi sunt inhalați. De exemplu, un studiu efectuat în Statele Unite a demonstrat că aproximativ 700 de cazuri noi de histoplasmoză au fost înregistrate în decursul a 20 de ani în zona unui șantier de construcții.

3. Aspecte clinice

Manifestările clinice ale histoplasmozei se corelează în general cu cantitatea agentului patogen cu care pacientul a fost în contact. Cu cât contactul este mai prelungit, cu atât și simptomele vor fi mai intense. Infecția pulmonară inițială poate disemina sistemic, se poate răspândi pe cale hematogenă și astfel apar manifestările extrapulmonare.

Histoplasmoza nu este limitată strict la poarta de intrare, deoarece germenele are factori de patogenitate care îi permite să se extindă și la alte organe și sisteme. Totuși, histoplasmoza diseminată este rar întâlnită la adulții imunocompetenți. Ea apare însă frecvent la pacienții cu afecțiuni ale sistemului imun și implică afectarea sistemului nervos central, a ficatului, splinei, ochiului și poate determina apariția unor manifestări reumatologice sau a unor tulburări ale sistemului hematologic.

Aproximativ 90% din pacienții cu histoplasmoză pulmonară acută sunt asimptomatici sau paucisimptomatici (febră cu frisoane, tuse, oboseală, cefalee, dureri toracice, dureri musculare, dispnee, iar unii pacienți prezintă eritem nodos). Pacienții care au simptome pot să dezvolte

pericardită acută. Pericardita poate declanșa la rândul ei apariția pleureziilor și astfel starea pacientului se agravează din ce în ce mai mult.

Histoplasmoza pulmonară cronică este întâlnită mai frecvent în cazul pacienților cu afecțiuni pulmonare și respiratorii deja diagnosticate. Dacă histoplasmoza apare ca o boală pulmonară cronică de fond, există riscul ca în timp să se ajungă la fibroză pulmonară cu limitarea severă a funcționalității plămânilor și cu reducerea ventilației. Acești pacienți prezintă: tuse cu spută condensată, transpirații nocturne, pierdere în greutate și dificultăți de respirație. Histoplasmoza diseminată apare la 1 din 2000 de pacienții imunocompetenți care au făcut boala simptomatică, însă este mult mai frecventă la copii (până la 30%), vârstnici, pacienți imunodeprimați. Simptomele pot include: cefalee, febră, astenie fizică, hepatosplenomegalie, dificultăți de respirație, ulceratii la nivelul buzelor și gurii, hipotensiune arterială.

Granulomatoza mediastinală se caracterizează prin apariția unor adenopatii toracice mari, uneori cu cavități intraparenchimotoase, ce pot determina un sindrom de compresie asupra esofagului, căilor aeriene sau vaselor mari toracice.

Deși histoplasmoza poate să apară la orice vârstă, specialiștii au observat că cele mai afectate categorii sunt copiii și bătrânii, deoarece sistemul lor imun este mai slăbit (fie insuficient maturat, fie extenuat).

4. Diagnostic de laborator

Metodele convenționale de diagnostic sunt încă utilizate pe scară largă pentru diagnosticul histoplasmozei. Diagnosticul se bazează pe izolarea fungilor în cultură sau vizualizarea levurilor intracelulare în țesuturi sau alte probe clinice. Astfel, în pofida limitărilor cunoscute, aceste metode sunt foarte utile și continuă să fie utilizate în multe laboratoare, în special în cele cu resurse reduse.

Metoda culturală

Izolarea *H. capsulatum* pe medii de cultură este standardul de aur pentru diagnosticul histoplasmozei. Recuperarea levurii prin cultură din probe clinice (hemocultură, lavaj bronhoalveolar, etc.) este recunoscută drept criteriu de definire a histoplasmozei dovedite conform definițiilor consensuale ale EORTC-MSGERC.

H. capsulatum este un fung pretențios, deoarece creșterea poate dura până la 4 săptămâni și necesită măsuri de izolare în laborator de nivel de biosiguranță 3 (BSL-3). La 25–30°C, crește ca un miceliu de culoare albă care evoluează spre maro (Fig. 7 a, b), reprezentând forma invazivă a bolii.

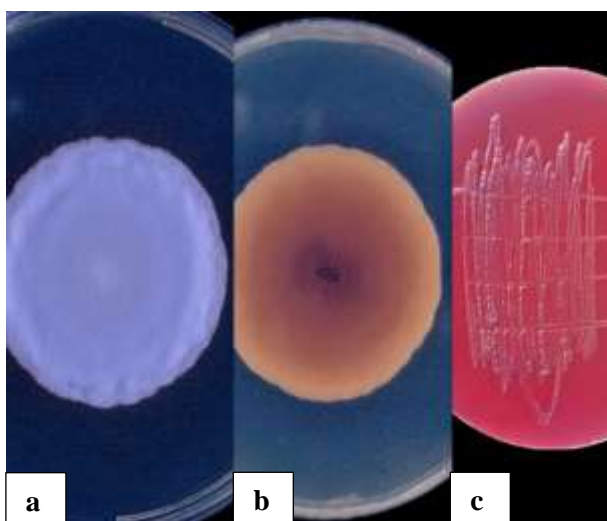


Fig. 7. a-b) Colonii de *H. capsulatum* pe Sabouraud dextroză agar; c) Colonii de *H. capsulatum* pe agar infuzie creier cord cu sânge de berbec

Această formă micelară este cea mai periculoasă, deoarece spori ar putea fi inhalați provocând infecții. Au fost raportate infecții dobândite în laborator prin manipularea culturii. Microscopic, forma micelară produce macroconidiile tuberculate tipice, care sunt ușor de identificat (Fig. 8A). Cu toate acestea, alte specii precum *Sepedonium* spp., un organism izolat din obiectele de mediu, care este de obicei considerat un contaminant de laborator, produc structuri similare. De asemenea, *H. capsulatum* poate produce colonii levurice, umede, moi și cremoase atunci când este cultivată la 37°C pe anumite medii (agar infuzie creier cord cu sânge de berbec, figura 7 c). La 37°C (temperatura corpului uman), are loc o conversie din faza micelară la forma de levură, care este forma patogenă. Aceste levuri sunt ușor de recunoscut după peretele lor gros și forma ovoidă cu o bază îngustă la capătul mai mic (Fig. 8B).

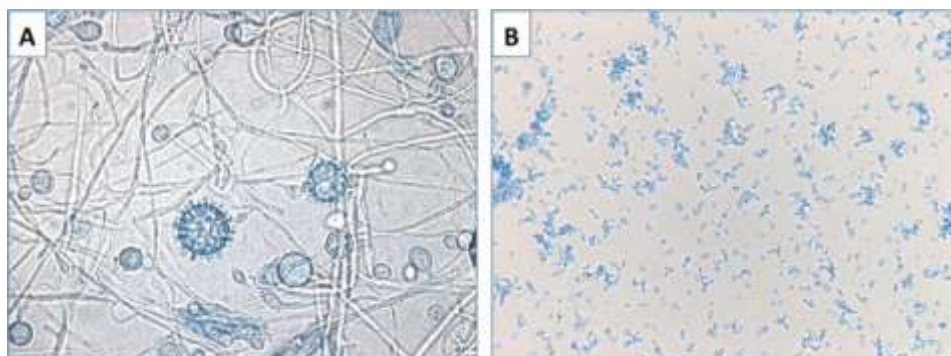


Fig. 8. Preparate a formelor filamentoase și levurice de *H. capsulatum*. (A) Cultură la 30°C care prezintă macroconidii tuberculate (mărire 63x). (B) Cultură la 37°C care prezintă levuri (mărire de 20 x).

Sensibilitatea culturilor depinde de starea clinică a pacientului și de originea probei. Culturile sunt negative în majoritatea cazurilor de boală asimptomatică și ușoară, totuși sunt utile în histoplasmoza pulmonară diseminată și cronică, deși sensibilitatea lor variază de la 50 la 85%.

Principalul impediment al metodei culturale este timpul îndelungat de cultivare necesar pentru a obține cultura pură. Mai mult, examinarea microscopică a micetelor crescute necesită o confirmare suplimentară prin alte metode. Identificarea moleculară este un instrument puternic pentru a confirma prezența *H. capsulatum*, dar extinde și mai mult timpul de obținere a rezultatului. Pentru identificarea tulpinilor de *H. capsulatum* poate fi utilizată spectrometria de masă (MALDI-TOF MS) care are posibilitate să diferențieze diferite variante (var. *capsulatum*, var. *duboisii*) și forme ale agentului patogen (levură și filamentoasă), reducând astfel timpul de răspuns și scăzând riscul de manipulare a culturii.

Deoarece limitările menționate mai sus fac metoda culturală inutilă pentru un diagnostic precoce al histoplasmozei, există metode alternative de diagnostic care ar putea fi utilizate singure sau în combinație cu metoda culturală.

Histopatologie și microscopie directă

Microscopia directă a probelor clinice sau examenul histopatologic al țesuturilor pentru depistarea levurii după Impregnare argentică tehnica Gomori (GMS) sau acid periodic Schiff (PAS), sunt tehnici utilizate în mare măsură pentru diagnosticul histoplasmozei. *H. capsulatum* poate apărea ca o levură ovală de 2 - 4 μm (var. *capsulatum*) sau 8 - 15 μm (var. *duboisii*). Deoarece levurile sunt fagocitate de macrofage, acestea ar putea fi găsite formând grupuri, care pot ajuta la diagnostic. Cu toate acestea, mai mulți fungi pot fi confundați microscopic cu *H. capsulatum*, cum ar fi, *Blastomyces dermatitidis*, endosporii *Coccidioides* spp., *Candida glabrata*, precum și agenții cauzali ai leishmaniozei, toxoplasmozei și bolii Chagas. Sensibilitate mai mare ar putea fi obținută în probele respiratorii sau biopsia măduvei osoase la pacienții cu histoplasmoză diseminată. Cu

toate acestea, specificitatea scăzută și nevoia de personal calificat pentru a realiza un diagnostic prezumtiv sunt principalele limitări ale acestei tehnici.

Detectarea antigenului

Detectarea antigenelor *H. capsulatum* în probele clinice a reprezentat un progres în diagnosticul precoce al histoplasmozei și a fost inclusă în criteriile EORTC/ MSGERC pentru diagnosticul infecțiilor fungice invazive de aproape 20 de ani. Antigenul polizaharidic *H. capsulatum* poate fi detectat atât în probele de ser cât și de urină cu valoare diagnostică similară și a fost recent listat ca un test de diagnostic esențial pentru pacienții cu SIDA în stadiu avansat. În pofida nivelului ridicat de reacții încrucișate cu alte specii de fungi, testele de detectare a antigenelor sunt utilizate pe scară largă pentru a diagnostica histoplasmoza și unele studii indică capacitatea acestora de a monitoriza răspunsul la tratament.

În ultimii ani tot mai mult sunt utilizate testele imuno-cromatografice. Aceste teste sunt ușor de utilizat, rezultatul este rapid (mai puțin de o oră) și necesită echipamente de laborator minime care facilitează implementarea lor în țările cu venituri mici și medii. Deși a fost testat doar pe probe de ser de la pacienții cu SIDA, performanța lor de diagnostic este promițătoare (sensibilitate de 96%, specificitate de 90%). Cu toate acestea, rezultate fals pozitive și negative au apărut în continuare din cauza reactivității încrucișate cu alte micete endemice a tratamentului cu antibiotice, fiind necesară o etapă pre-tratament care prelungește timpul de obținere a rezultatelor.

Detectarea anticorpilor

Principalele avantaje ale testelor de detectare a anticorpilor sunt necesitatea probelor minim invazive și obținerea de rezultate atunci când cultura este încă negativă, reducând necesitatea de manipulare a fungilor potențial infecțioși. Tehnicile serologice precum fixarea complementului sau imunodifuzia sunt utile atunci când se testează pentru prima dată probe de la călători care provin din regiuni endemice. Ambele tehnici sunt disponibile comercial (Immuno Mycologics, SUA) și sensibilitatea acestor teste în histoplasmoza pulmonară acută și subacută a fost raportată ca fiind de 95%. Cu toate acestea, sensibilitatea este foarte limitată la pacienții imunodeprimați din cauza titrurilor scăzute sau absente de anticorpi. O meta-analiză recentă a descris valori de sensibilitate și specificitate de 58% și, respectiv, 100%, în probe de la pacienții cu HIV. Anticorpii specifici apar într-un interval de 2-6 săptămâni de la expunere astfel încât au valoare limitată în diagnosticul histoplasmozei acute însă pot fi importante în formele cronice. În cele din urmă, deoarece seropozitivitatea rămâne mult timp după boală, interpretarea rezultatelor serologice ar putea fi dificilă. În ciuda limitărilor descrise anterior, testele de detectare a anticorpilor sunt încă considerate instrumente de diagnosticare valoroase și s-a demonstrat că îmbunătățesc randamentul diagnosticului atunci când sunt combinate cu alte metode de diagnostic.

Metode bazate pe detectarea ADN-ului

Metodele PCR bazate pe detectarea ADN-ului fungic direct din probele clinice sunt implementate în prezent în rutina mai multor laboratoare pentru diagnosticarea principalelor infecții fungice, dar există considerabil mai puține teste PCR pentru diagnosticul histoplasmozei. Avantajele lor se bazează pe simplitate, specificitate înaltă și timp scurt de răspuns. PCR în timp real (qPCR) permite determinarea sarcinii fungice la pacienți prin utilizarea coloranților nespecifici de legare a ADN-ului sau a sondelor marcate fluorescent. Cu toate acestea, tehnică are, de asemenea, unele limitări, cum ar fi cantitatea moderată de ADN din probele invazive, lipsa standardizării și disponibilitatea scăzută a sistemelor comerciale validate pe scară largă. Metode bazate pe PCR au fost incluse în criteriile EORTC/ MSGERC pentru diagnosticul unor infecții fungice, cum ar fi aspergiloza invazivă sau candidoza, dar nu și pentru micozele endemice.

Majoritatea testelor PCR pentru diagnosticul histoplasmozei au fost dezvoltate „in house” și niciunul dintre ele nu a fost comercializat. Aceste teste au arătat o performanță analitică excelentă (sensibilitate de 95% și specificitate de 99%) la testarea probelor de la pacienți HIV pozitivi, dar

sensibilitatea a scăzut la testarea probelor de sânge și ser de la pacienți imunocompetenți. Testele PCR panfungice sau cu gamă largă sunt utilizate atunci când nu există o claritate despre fungii implicați în infecție, deoarece primeri universali pot primite detectarea a orice ADN fungic. Metodele non-PCR sunt, de asemenea, capabile să amplifice și să detecteze ADN-ul *H. capsulatum* din probele clinice. Amplificarea izotermă mediată de buclă (LAMP) se bazează pe utilizarea unei ADN polimeraze cu activitate mare a catenei de deplasare și a unui set de primeri special proiectați pentru a amplifica ADN-ul țintă. Unele rapoarte au descris implementarea acestei tehnici pentru diagnosticul molecular al histoplasmozei arătând rezultate excelente. Eficiența ridicată, sensibilitatea, specificitatea și rentabilitatea acestor teste le fac candidați buni pentru a fi implementate în rutina de diagnosticare a laboratoarelor cu resurse limitate.

Diagnosticul de meningită provocată de *Histoplasma* este adesea dificil de stabilit. De obicei, examinarea LCR pune în evidență pleocitoză limfocitară, nivel crescut de proteine și nivel scăzut de glucoză.

Preparatele efectuate sunt de obicei negative, iar culturile din LCR sunt pozitive într-un număr foarte mic. Într-un studiu recent privind histoplasmoza SNC, care a inclus pacienți cu infecție HIV, culturile au fost pozitive doar la 38% dintre pacienți. Antigenul *Histoplasma* poate fi detectat în LCR în mai multe cazuri, iar anticorpul împotriva *H. capsulatum* sunt detectați în aproximativ jumătate din cazuri. Un rezultat pozitiv al antigenului sau al anticorpilor din LCR este un criteriu de diagnostic pentru histoplasmoză. În cazurile în care niciunul dintre aceste teste specifice nu este pozitiv, un diagnostic prezumtiv de meningită provocată de *Histoplasma* este adecvat dacă pacientul are histoplasmoză diseminată și se constată infecția SNC care nu poate fi atribuită unei alte cauze.

În figura 9 este prezentat algoritmul de diagnostic disponibil în prezent pentru diagnosticarea histoplasmozei în laboratoarele microbiologice. Deși s-au făcut atât de multe progrese în acest domeniu, cu siguranță mai rămân multe de făcut pentru a îmbunătăți diagnosticul precoce al histoplasmozei, permițând stabilirea unei terapii antifungice prompte și, în consecință, reducerea ratelor de morbiditate și mortalitate ale acestei infecții.

a) Timp lung de răspuns

b) Timp scurt de răspuns

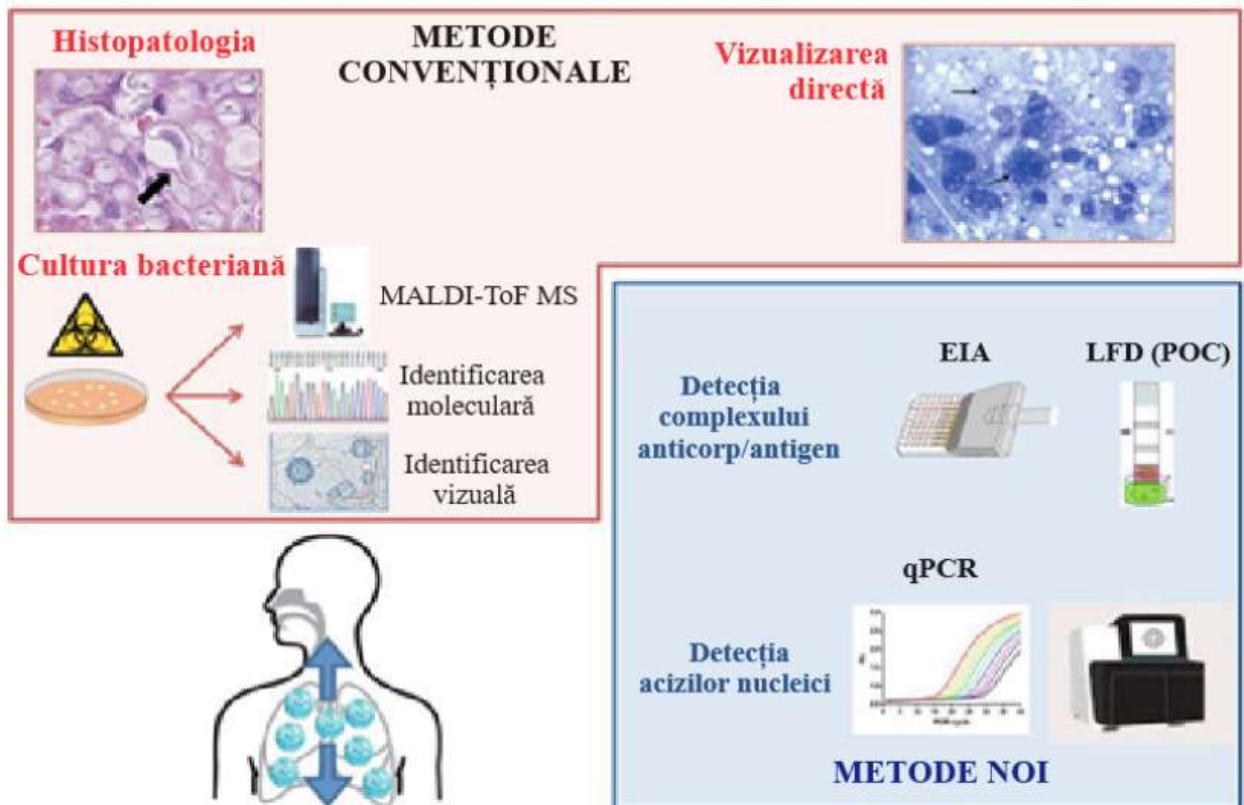


Fig. 9. Algoritmul de diagnostic al histoplasmozei disponibil în prezent.

a) Timp lung de răspuns cu efectuarea preparatului histopatologic care prezintă levuri de *H. capsulatum*. b) Timp scurt de răspuns cu vizualizarea directă a citologiei de aspirație cu ac fin care pune în evidență levuri intra și extracelulare de *H. capsulatum* și utilizarea metodelor rapide.

ID: identificare; EIA: test imunoenzimatic; LFD: dispozitiv de flux lateral; POC: punct de îngrijire; qPCR: PCR cantitativ; NGS: secvențierea de generație următoare.

F. Mucormicoza

1. Generalități

Mucormicoza, denumită anterior zigomicoză, se referă la mai multe boli diferite cauzate de fungi, aparținând ordinului Mucorales. Speciile *Rhizopus* sunt cele mai multe microorganisme implicate în infecțiile umane. Genurile importante din punct de vedere medical care provoacă mucormicoza sistemică sunt *Mucor*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces*, *Lichtheimia*, *Saksenaea*, *Rhizomucor*, *Cokeromyces* și *Mortierella* (Fig. 10). Acestea sunt ciuperci primitive, cu creștere rapidă, terestre, în mare parte saprofite, cu o distribuție cosmopolită. Până în prezent, au fost descrise aproximativ 665 de specii, deși infecțiile la om și la animale sunt, în general, rare.

Regn	Fungi				
Încregătură	Mucormycota				
Subîncregătură	Mucoromycotina				
Clasa	Mucoromycetes				
Ordin	Mucorales				
Familie	Mucoraceae	Cunninghamellaceae	Lichtheimiaceae	Saksenaeaceae	Rhizopodaceae
Gen	<i>Mucor</i> 18%	<i>Cunninghamella</i> 7%	<i>Lichtheimia</i> 5%	<i>Saksenaea</i> 5%	<i>Rhizopus</i> 47%
	<i>Apophysomyces</i> 5%	<i>Absidia</i>	<i>Rhizomucor</i> 4%		

Fig. 10. Ierarhia taxonomică a genurilor care provoacă cel mai frecvent mucormicoză

Mucormicozele invazive pun viața în pericol. Sinuzita severă, complicată cu abces cerebral, este cea mai frecventă prezentare. Infecțiile pulmonare, cutanate și gastrointestinale sunt, de asemenea, recunoscute.

2. Factorii de risc ai mucormicozei

Condițiile imunocompromițatoare sunt principalii factori de risc pentru mucormicoză. Pacienții cu diabet zaharat necontrolat, în special cei cu cetoacidoză, prezintă un risc ridicat. Alte grupuri cu risc ridicat includ pacienții cu transplant de organe, cancer, în special cei neutropenici și cei care administrează antibiotice cu spectru larg, precum și persoanele care primesc agenți imunosupresori, inclusiv steroizi pe cale orală sau intravenoasă și blocante ale factorului de necroză tumorală (TNF)-alfa (pacienți cu afecțiuni reumatoide). În plus, pacienții cu cancer hematologic care prezintă infecții oportuniste cu citomegalovirus și boală greșă contra gazdă prezintă un risc crescut. Administrarea anterioară de Voriconazolum este un alt factor de risc pentru mucormicoză.

Malnutriția extremă este, de asemenea, legată de mucormicoză, în special de forma gastrointestinală. Fierul este un stimulent de creștere pentru Mucorales; chelatorii de fier mai vechi, cum ar fi Deferoxaminum* și toate cauzele supraîncărcării cu fier sunt factori de risc suplimentari pentru mucormicoză. Traumatismele și utilizarea de materiale medicale contaminate peste răni sunt asociate cu mucormicoza cutanată. În plus, banda nesterilă și atelele de lemn contaminate sunt factori de risc pentru bolile cutanate. Astfel de cazuri sunt asociate cu traumatisme/intervenții chirurgicale sau cu prezența unei răni preexistente sau a unei linii intravasculare. Pacienții cu arsuri și cei care utilizează medicamente intravenoase, la fel sunt supuși riscului de a dezvolta mucormicoza.

Unii pacienți cu mucormicoză nu au factori de risc identificabili. Mucormicoza invazivă a fost, de asemenea, asociată cu focare asociate asistenței medicale și cu dezastre naturale.

Fiziopatologie

Mucorales sunt ciuperci omniprezente care se găsesc în mod obișnuit în sol și în materia în descompunere. *Rhizopus* poate fi găsit în pâinea mucegăită. Principala cale de infectare este prin inhalarea conidiilor; alte căi includ ingestia și inocularea traumatică. Ingestia duce la afecțiuni gastrointestinale și apare în principal în rândul pacienților cu malnutriție, dar poate apărea și după ingerarea de substanțe nenuțitive.

Mucorales sunt mucegaiuri din mediul înconjurător care devin forme hifalice în țesuturi. Odată ce sporii încep să se dezvolte, hifele fungice invadează vasele de sânge, producând infarct tisular, necroză și tromboză. Atunci când sporii se depun în cornetele nazale, se dezvoltă boala rinocerebrală (Mucormicoza rinocerebrală); când sporii sunt inhalați în plămâni, se dezvoltă boala

pulmonară; când sunt ingerați, apare forma gastrointestinală; iar când agenții sunt introduși prin lezarea barierei tegumentare, se dezvoltă boala cutanată.

Factorul de virulență implicat în patogeniza Mucorales este permeaza de mare afinitate pentru fier (FTR1), ceea ce permite supraviețuirea Mucorales în medii sărace în fier. Proteina de acoperire a sporilor (Cot H) prezentă pe suprafața Mucorales are ca rezultat afectarea apărării gazdei; factorul de ADP-ribosilare joacă un rol semnificativ în creșterea Mucorales. Neutrofilele sunt principala apărare a gazdei împotriva acestor ciuperci; astfel, persoanele cu neutropenie sau disfuncție a neutrofilelor (de exemplu, diabet, utilizarea de steroizi) prezintă cel mai mare risc. Au fost raportate puține cazuri de mucormicoză la pacienții cu SIDA, ceea ce sugerează că apărarea gazdei împotriva acestei infecții nu este mediată în primul rând de imunitatea celulară.

Mucormicoza trebuie luată în considerare în diagnosticul diferențial al unei plăgi cu aspect necrotic sau al unei plăgi cu un răspuns inadecvat la tratamentul cu antibiotice. Factorii externi, cum ar fi toxinele produse de endosimbioza bacteriană, pot dereglă bariera endotelială, ceea ce duce la creșterea virulenței fungice. În plus, expunerea la Voriconazol printr-un mecanism necunoscut și nu datorită presiunii selective, permite apariția mucormicozei invazive.

3. Epidemiologia

Mucormicoza este rară, iar incidența sa este dificil de calculat cu exactitate, deoarece nu este o boală care trebuie declarată.

Incidența mucormicozei pare să fie în creștere ca urmare a creșterii numărului de persoane imunocompromise. Există, de asemenea, tot mai multe rapoarte de apariție a mucormicozei în contextul profilaxiei antifungice sau al tratamentului (de ex., Voriconazol, echinocandine) care este eficient împotriva majorității fungilor, cum ar fi *Aspergillus*, dar nu și împotriva mucormicozei. Odată cu îmbunătățirea diagnosticului timpuriu prin intermediul unor modalități precum MALDI-TOF, PCR și secvențierea ARNr 18s sugerează că mucormicoza este cauza a peste 10% din infecțiile fungice invazive.

La nivel mondial, s-a înregistrat o creștere a numărului de cazuri de mucormicoză, până la 910.000. S-a observat o creștere a numărului de cazuri în Asia și Europa.

Povara bolii

Rata de incidență a mucormicozei la nivel mondial variază între 0,005 și 1,7 la un milion de locuitori. În India, prevalența mucormicozei este estimată de 140 la un milion de locuitori, ceea ce reprezintă o prevalență de aproximativ 80 de ori mai mare decât cea din țările dezvoltate.

Ca urmare a valului de mucormicoză asociată cu COVID-19 și a directivei guvernului indian, mai multe state din India au făcut din mucormicoză o boală cu declarare obligatorie în mai 2021. Acest lucru va permite o mai bună înțelegere a poverii bolii, a caracteristicilor populației, a factorilor de risc, a spectrului clinic și a rezultatelor acestor pacienți.

Tendențele actuale indică faptul că valul este mai mare la cei cu diabet preexistent, la cei care administrează corticosteroizi sistemici și se observă atât la persoanele cu COVID-19, cât și la cele care se recuperează din această boală.

Transmiterea mucormicozei

Mucormicoza nu este contagioasă, nu se răspândește prin contact de la o persoană la alta.

Fiind răspândiți în mediu, acești fungi se transmit prin inhalare, inoculare sau ingestie de spori din mediul înconjurător.

Deși cele mai multe cazuri sunt sporadice, focarele asociate asistenței medicale au fost legate de bandajele adezive, spatulele din lemn, lenjerie de spital, de camerele cu presiune negativă, scurgerile de apă, filtrarea deficitară a aerului, dispozitivele medicale nesterile și de construcția clădirilor.

Aceasta afectează cel mai frecvent sinusurile sau plămâni după inhalarea sporilor fungici din mediul înconjurător. În astfel de cazuri, se poate răspândi la creier și ochi.

De asemenea, poate apărea pe piele după ce o tăietură, o arsură sau alt tip de leziune a pielii se infectează.

4. Aspecte clinice

În baza localizării anatomice, mucormicoza poate fi clasificată în 1 din cele 6 forme: (1) rinocerebrală, (2) pulmonară, (3) cutanată, (4) gastrointestinală, (5) diseminată și (6) prezentări neobișnuite. Manifestările mucormicozei depind de localizarea afectării.

Forma rinocerebrală

Forma rinocerebrală se poate manifesta prin cefalee unilaterală, retro orbitală, durere facială, amorțelă, febră, hiposmie și congestie nazală, care evoluează spre secreție neagră. Inițial, mucormicoza poate mima sinuzita bacteriană.

Simptomele tardive care indică invazia nervilor și vaselor orbitale includ diplopia și pierderea vederii, edem facial unilateral. Aceste simptome tardive indică un prognostic slab și sunt de obicei urmate de un status mental alterat. Majoritatea pacienților cu boală rinocerebrală au diabet (în special cu cetoacidoză) sau au tumori maligne cu neutropenie asociată și primesc antibiotice cu spectru larg de acțiune.

Tumefierea orbitală și celulita facială sunt progresive. Se pot observa escare necrotice cu secreție purulentă neagră în cavitatea nazală, pe palatul dur sau față. Deși aceste leziuni sugerează mucormicoza, absența lor nu exclude posibilitatea apariției acestei boli.

Proptoza, ptoza, chemoza și oftalmoplegiile indică o extensie retroorbitală. Nervii cranieni V și VII sunt cei mai frecvent afectați. Pierderea vederii poate apărea în cazul trombozei arterei retiniene.

Forma pulmonară

Mucormicoza pulmonară se manifestă nespecific prin febră, dispnee, dureri toracice și tuse. Această formă apare mai frecvent la pacienții cu tumori hematologice maligne, antecedente de neutropenie, leucemie asociată cu chimioterapie și transplant de celule stem hematopoietice. Ea apare frecvent cu afectarea concomitentă a sinusurilor.

Examenul pulmonar poate evidenția scăderea sunetelor respiratorii și raluri. Ocazional, celulita peretelui toracic poate apărea adiacent bolii parenchimotoase de bază, având în vedere capacitatea acestei infecții de a traversa planurile tisulare.

Forma cutanată

Boala cutanată se manifestă prin celulită, care evoluează spre necroză dermică și formarea de ulcerații necrotice. Leziunea necrotică neagră progresivă a mucormicozei cutanate reflectă invazia vasculară caracteristică tuturor formelor de boală. Ea poate fi primară și secundară.

Pacienții cu afecțiuni cutanate pot prezenta traumatisme anterioare, arsuri sau au fost expuși la echipamente medicale contaminate, cum ar fi bandajele (primară). Cazuri rare au apărut la pacienții diabetici sau imunocompromiși și în locurile de introducere a cateterelor sau la locurile de injectare a insulinei sau a drogurilor ilicite.

Mucormicoza cutanată secundară are loc prin răspândirea hematogenă a agentului patogen și debutează prin dezvoltarea unor leziuni dureroase, eritematoase ce progresează într-o ulceratie necrotică.

Forma gastrointestinală

Mucomicoza gastrointestinală afectează de obicei persoanele cu subnutriție gravă sau la nou-născuții prematuri. Unele rapoarte de caz au descris mucormicoza gastrointestinală la pacienții care au suferit un transplant de organe (de ex., transplant renal), cu SIDA și lupus eritematos sistemic. Această infecție poate apărea în tot tractul gastrointestinal, dar cel mai frecvent afectează stomacul, ileonul și colonul (Fig. 11). Prezentarea este nespecifică, cu dureri abdominale, distensie, greață și vărsături. Poate apărea hematochezie sau obstrucție. Unii pacienți au sensibilitate la palpare. Ruptura poate duce la semne de peritonită.

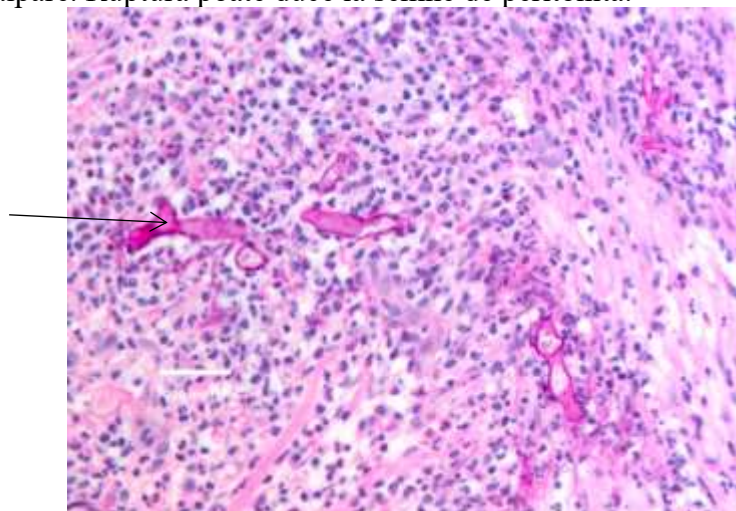


Fig. 11. Elemente fungice compatibile cu Mucorales în peretele jejunului. Colorație Diastase-periodic acid-Schiff

Forma diseminată

Mai frecvent este întâlnită la pacienții neutropenici cu infecție pulmonară. Alte forme diseminate de mucormicoză pot implica rinichii, oasele, inima și alte localizări, cu simptome atribuite acestor sisteme de organe, a fost descrisă peritonita în cadrul dializei peritoneale continue ambulatorii.

Alte forme care includ sistemul nervos central

Afectarea sistemului nervos central, fiind una din cele mai frecvente cauze ale bolii diseminate ce se manifestă prin cefalee, simptome/semne neurologice focale, inclusiv afectarea nervilor cranieni. Pacienții cu infecție diseminată către creier pot dezvolta modificări ale stării mentale sau comă cu antecedente de traumatism cranian deschis, utilizare de droguri intravenoase sau tumori maligne.

5. Diagnosticul de laborator al mucormicozei

Considerații generale

Diagnosticul în timp util este primordial în cazurile de mucormicoză. Diagnosticul de mucormicoză necesită o cultură pozitivă și modificări histopatologice. Cu toate acestea, există anumite cazuri în care cultura nu poate fi disponibilă sau rezultatele pot fi negative; în astfel de cazuri, diagnosticul se face doar prin histopatologie.

Pacienții cu mucormicoză suspectă sau confirmată trebuie tratați ca o urgență medicală; aceștia trebuie să fie trimiși la instituții care pot oferi cel mai înalt nivel de îngrijire. Confederația Europeană de Mycologie Medicală (ECMM) stabilește o abordare diagnostică bazată pe simptome și pe factorii de risc subiacenți:

- În rândul pacienților cu simptome respiratorii (febră, tuse) care sunt neutropenici, ar trebui obținută o tomografie computerizată toracică; o biopsie ghidată prin TC sau un lavaj bronhoalveolar cu biopsie, iar specimenul trebuie trimis pentru histopatologie, cultură cu test de sensibilitate și identificare moleculară cu PCR și PCR multiplex (18s, ITS, 28s sau ADN ribozomal).

- În rândul pacienților cu durere facială, sinusită și diabet zaharat subiacent, trebuie obținută o tomografie craniană sau o imagistică prin rezonanță magnetică, urmată de biopsie; proba trebuie trimisă pentru: histopatologie (colorație GMS și PAS), cultură cu test de sensibilitate și identificare moleculară cu testul PCR, PCR multiplex (18s, ITS, 28s sau ADN ribosomal).
- În rândul pacienților care prezintă antecedente de traumatisme și manifestări cutanate, trebuie obținută o biopsie a leziunii și trimisă pentru histopatologie, cultură cu test de sensibilitate și identificare moleculară cu testul PCR, PCR multiplex (18s, ITS, 28s sau ADN ribozomal).

Teste de laborator

Recunoașterea timpurie, diagnosticarea și administrarea promptă a unui tratament antifungic adecvat și debridarea chirurgicală (după caz) sunt importante pentru îmbunătățirea rezultatelor pacienților cu mucormicoză.

Metodele de diagnosticare includ biopsia și colorarea fungică (montaj KOH), care rămâne principalul pilon al diagnosticului de laborator. Unitățile în care sunt disponibile culturi fungice și teste de sensibilitate pot ajuta la confirmarea speciei de mucormicoză. Cu toate acestea, inițierea tratamentului nu trebuie să aștepte rezultatele culturii fungice.

Trebuie obținută o enumerare completă a celulelor sangvine pentru a evalua dacă există neutropenie. Un panel chimic care include glicemia, bicarbonatul și electroliții este util pentru a monitoriza homeostazia și corectarea acidozei. Un studiu al gazelor din sângele arterial poate ajuta la determinarea gradului de acidoză și poate ghida terapia corectivă. În plus, pot fi indicate teste pentru a evalua prezența supraîncărcării cu fier, așa cum reiese din nivelurile ridicate de feritină și o capacitate totală scăzută de fixare a fierului. În cazurile de afectare a sistemului nervos central, rezultatele din lichidul cefalorahidian pot include niveluri ridicate de proteine și o pleiocitoză mononucleară modestă. Colorația și culturile fungice din LCR sunt de obicei sterile. O tomografie computerizată ar trebui să precedă puncția lombară pentru a evalua dacă există dovezi de leziuni care ocupă spațiu, ce ar putea duce la hernie.

Se pot obține hemoculturi; cu toate că, acestea sunt de obicei negative, în ciuda naturii angioinvasive a microorganismului. Hemoculturile pot fi utile pentru a detecta bacteriemia pe lângă infecția cu Mucorales. Nu există biomarkeri specifici pentru a identifica mucormicoza. Cultura lavajului bronhoalveolar are un randament scăzut, cu o sensibilitate de 20%-50%. Testele antigenice (beta-D-glucan sau galactomannan) nu sunt utile pentru detectarea acestei infecții. Orientările ECMM sugerează cu tărie obținerea unei culturi a specimenului pentru a identifica microorganismul. Culturile trebuie incubate la 25-30°C și 35-37°C.

Examinare directă (microscopie în câmp luminos)

Examinarea microscopică a secreției nazale sau a materialului de biopsie în montaj umed cu KOH arată hife caracteristice largi, neseptate, în formă de panglică, cu ramificații în unghi larg sau în unghi drept la intervale neregulate (Fig. 12). Datorită absenței pereților încrucișați, fluidele din hifă pot scăpa liber, iar în timpul manipulării țesuturilor de biopsie, hifele se prăbușesc și se încrețesc, dând aspectul caracteristic de panglică.

Microscopia directă trebuie efectuată în principal pentru a identifica septarea, unghiul de ramificare și lățimea hifelor (procedura, vezi anexa 5).



Fig. 12. Montajul umed cu KOH prezintă hife caracteristice largi, neseptate, în formă de panglică, cu ramificații în unghi larg sau drept (Mucorales)

Cultură

Permite identificarea la nivel de gen și specie. Majoritatea Mucorales importante din punct de vedere medical sunt termotolerante și pot crește rapid la 35-37°C. Acestea cresc practic pe orice mediu carbohidrat, coloniile apărând în 24-48 de ore.

Identificarea se bazează pe morfologia coloniei, morfologia microscopică și temperatura de creștere. Se dezvoltă pe SDA cu antibiotice la ambele temperaturi, respectiv 25°C și 35-37°C.

Notă importantă: Specimenul trebuie inoculat direct pe medii de cultură, fără a fi supus măcinării sau omogenizării. În aproximativ 50% din cazuri nu există creștere în ciuda demonstrării directe a fungilor. Motivul este că acești fungi cu septuri rare, în timpul manipulării/procesării biopsiei, întreaga citoplasmă se scurge, pierzând viabilitatea microorganismului. Prin urmare, ar trebui să se utilizeze medii de îmbogățire pentru izolare.

Coloniile miceliene cu creștere rapidă sunt albe, flocoase, dense și au un aspect păros. Miceliile sunt descrise ca o creștere fibroasă sau ca o vată de zahăr, care este foarte viguroasă, de aceea unele dintre ele sunt numite "ridicători de capac", deoarece apasă de jos pe capacul ceștii Petri (Fig. 13, 14). Coloniile mai vechi sunt de culoare crem sau gri-maronie. Hifele nu au rizoizi sau stoloni la speciile *Mucor*, în comparație cu *Rhizopus*.



Fig. 13. *Mucor* pe Sabouraud dextrose agar

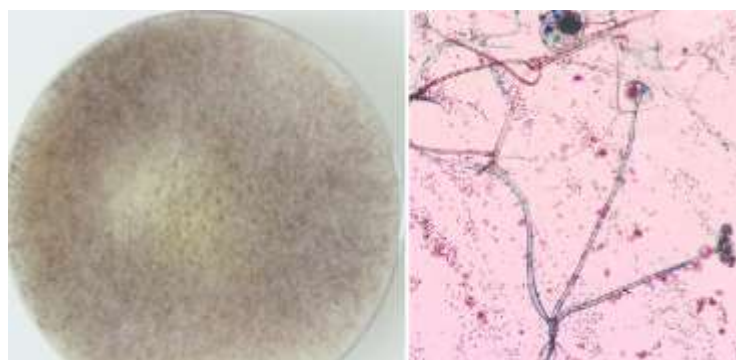


Fig. 14. *Rhizopus* pe SDA și tease montare (Lactophenol cotton blue, ×100)

Sporii asexuați includ clamidoconidele, conidele și sporangiosporii conținute în sporangii purtați pe sporangiofori simpli sau ramificați. Reproducerea sexuală este izogamă, producând un spor sexual de repaus cu pereți groși, numit zigospore.

Prezența sau absența columelilor și a apofizelor este o caracteristică cheie a sporangiului. *Mucor* are o columelă, dar nu are apofiză, în timp ce *Lichtheimia* are atât columelă, cât și apofiză (Fig. 15).

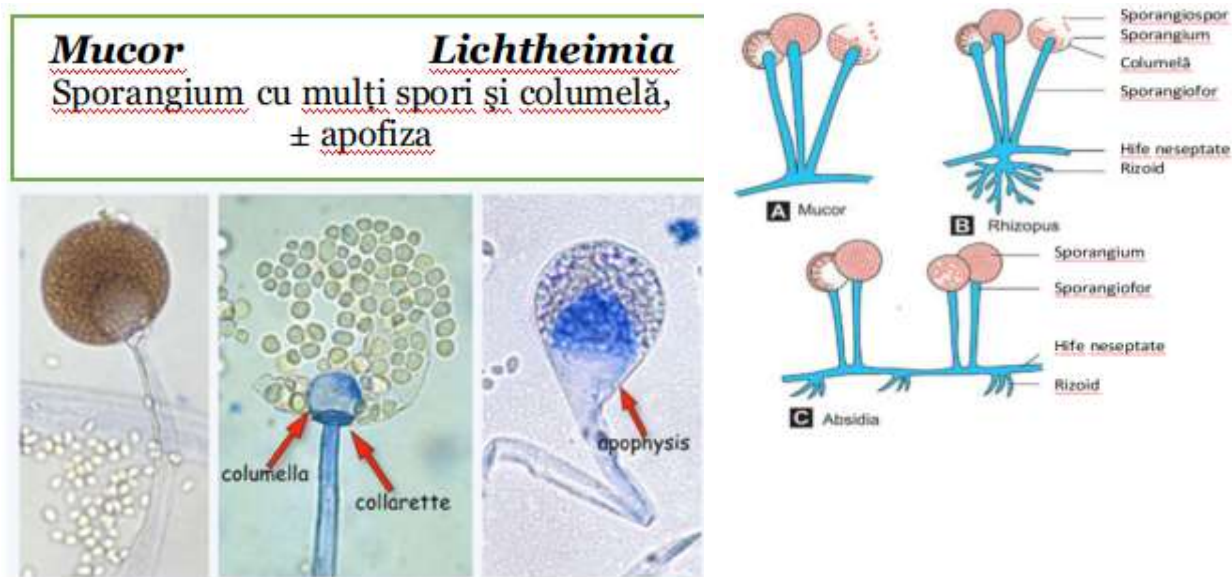


Fig. 15. Reprezentarea microscopică a Mucorales

Majoritatea izolatelor sunt heterotalice, adică lipsesc zigosporii, prin urmare identificarea se bazează în principal pe morfologia sporangiului. Aceasta include dispunerea și numărul sporangiosporilor, forma, culoarea, prezența sau absența columelilor și a apofizelor, precum și dispunerea sporangioforilor și prezența sau absența rizoizilor. Studiile privind temperatura de creștere (25, 37, 45°C) pot fi, de asemenea, utile. Cele mai bune sunt tease montările, utilizându-se o picătură de alcool 95% ca agent de umezire pentru a reduce bulele de aer.

Identificarea în laborator a unor ciuperci zigomicetoase, în special *Apophysomyces elegans* și *Saksenaea vasiformisma* poate fi dificilă sau întârziată din cauza faptului că mucegaiul nu sporulează pe mediul de izolare primară sau la subcultura ulterioară pe agarul dextroză de cartof. Sporularea poate fi stimulată prin utilizarea unor medii cu deficit de nutriție, cum ar fi agar făină de porumb-glucoză-sucoză-extract de drojdie, agar Czapek Dox (vezi anexa 6).

Metode generale de preparare și colorare a coloniilor de fungi filamentoși

- Frotiu umed cu Tween 20
- Montare cu bandă adezivă
- Tease mount (o tehnică în care o parte a creșterii este tachinată cu ace, se adaugă o picătură de LPCB, se acoperă cu o lamelă și se observă la microscop)
- Cultură pe lamă (slide culture)

Aceste tehnici sunt descrise în anexa 5.

Identificare

Testarea pe bază moleculară este susținută moderat, din cauza lipsei de standardizare; se preferă țesutul proaspăt în locul celui de parafină, deoarece formalina deteriorează ADN-ul. A fost descrisă utilizarea testelor qPCR pentru detectarea ADN-ului circulant a speciilor comune de Mucorales (*Lichtheimia* spp., *Rhizomucor* spp. și specii de *Mucor/Rhizopus*), deși nu sunt încă disponibile în comerț, par promițătoare pentru diagnosticarea precoce a mucormicozei la pacienții cu risc ridicat. Într-o analiză retrospectivă a 44 de cazuri, identificarea prin qPCR a fost pe deplin concordantă cu cea prin cultură. Pozitivitatea testului a fost observată la o medie de 9 zile, cu cel puțin 2 zile

înainte de rezultatele imagistice pozitive. Testele PCR negative, după tratament au fost asociate cu rate de supraviețuire mai mari (48% față de 4%), sugerând că această modalitate ar putea fi utilizată pentru monitorizarea tratamentului. Detectarea ADN-ului poate fi efectuată în probele clinice de LCR sau LBA.

Secvențierea ARN ribozomal 18s poate oferi o identificare la nivel de gen, chiar dacă deteriorarea țesutului împiedică dezvoltarea fungilor.

De asemenea, tehnica MALDI-TOF poate asigura o identificare rapidă și precisă la nivel de specie, dar necesită o bază de date de referință.

Biopsie și caracteristici histologice

Biopsia țesutului implicat este cea mai definitivă modalitate de stabilire a diagnosticului de mucormicoză. Ar trebui efectuată o evaluare histologică rapidă a unei secțiuni de țesut congelat pentru a institui prompt un tratament chirurgical și medical pentru infecție.

Biopsia țesutului necrotic

Biopsia țesutului necrotic poate fi obținută din zona nazală, palatină, pulmonară, cutanată, gastrointestinală sau din peretele abcesului.

Colorarea țesuturilor fixate cu hematoxină și eozină (H&E) sau cu coloranți fungici specializați, cum ar fi impregnarea argentică tehnica Gomori sau acidul periodic-Schiff (PAS) arată hifele patognomonice largi (de obicei cu diametrul de 6-25 μm), neregulate, sub formă de panglică, neseptate (sau slab septate), cu ramificații neregulate care apar la 45-90° (Fig. 16). Invazia vasculară și necroza sunt consecințele caracteristice ale procesului infecțios. Astfel, se observă adesea infiltrarea neutrofilelor, invazia vaselor și infarctul tisular. Se poate observa, de asemenea, o reacție granulomatoasă.

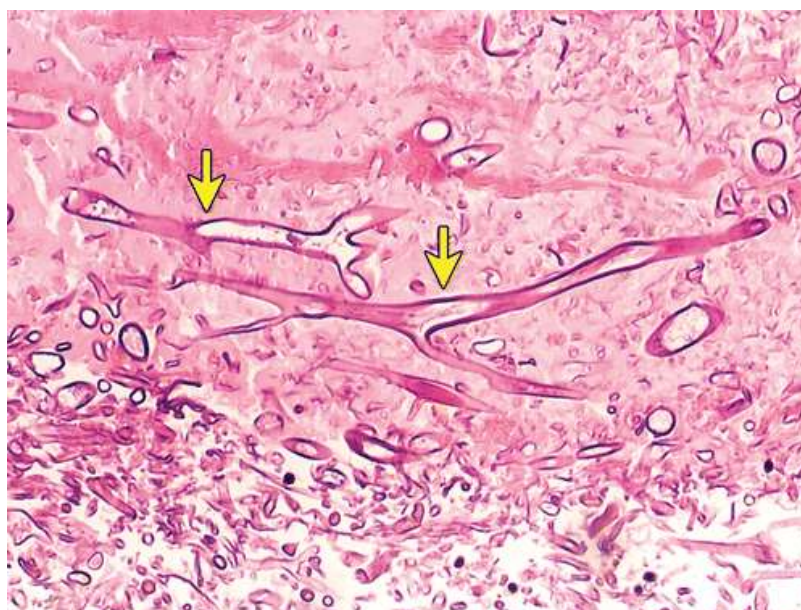


Fig. 16. Fotomicrografia hifelor *Mucor* arată hifele largi (săgeți), asemănătoare unor panglici, cu o lățime de 7-15 μm . (Colorație cu hematoxină-eozină; mărire originală, x600.) Hifele nu au septuri regulate și sunt pauciseptate, au ramificații neregulate cu unghiuri largi.

Testarea sensibilității la antifungice

Se recomandă testele de sensibilitate pentru a extinde cunoștințele epidemiologice, deși utilizarea generală a metodelor standard de testare a sensibilității pentru Mucorales este limitată, deoarece nu există valori limită stabilite de EUCAST sau CLSI. CMI pentru azoli sunt în general mai mari

pentru *Mucor* spp. comparativ cu *Rhizopus* spp. Mucorales sunt în mod inerent rezistente la Fluconazol, Voriconazol și echinocandine.

6. Tratamentul și prevenția mucormicozei

Tratamentul mucormicozei

Corectarea anomaliilor subiacente, inițierea promptă a tratamentului cu Amphotericinum B* liposomală și rezecția chirurgicală sunt esențiale.

Alte considerente importante în tratamentul medical includ următoarele:

- Cetoacidoza diabetică necesită insulină și restabilirea volumului cu lichide intravenoase.
- Neutropenia este asociată cu malignitatea hematologică și trebuie inversată, dacă este posibil, prin utilizarea de factori de stimulare și retragerea chimioterapiei citotoxice.
- Îndepărtarea glucocorticosteroidelor și alte medicamente imunosupresoare.
- Întreruperea tratamentului cu Deferoxaminum*; Deferoxaminum* poate fi înlocuită cu agenți chelatori de hidroxipiridină.

Tratamentul cu succes al mucormicozei necesită corectarea factorului (factorilor) de risc subiacent(ți), terapie antifungică (în mod tradițional cu un polien) și o intervenție chirurgicală agresivă.

Mucormicoza este dificil de tratat. Uneori, poate necesita atât terapie antifungică intravenoasă, cât și excizie chirurgicală, necesitând astfel o abordare multidisciplinară în cadrul unei instituții medicale.

Amphotericinum B* liposomală este medicamentul de elecție și trebuie inițiat precoce. Alte antifungice, cum ar fi posaconazolul sau Isavuconazolul*, au fost, de asemenea, descrise pentru tratament.

Prognosticul general depinde de mai mulți factori, inclusiv de rapiditatea diagnosticului și a tratamentului, de locul infecției, precum de afecțiunile subiacente ale pacientului și de gradul de imunosupresie. Mortalitatea generală a cazurilor este de aproximativ 50%, deși diagnosticul și tratamentul precoce duc la rezultate mai bune.

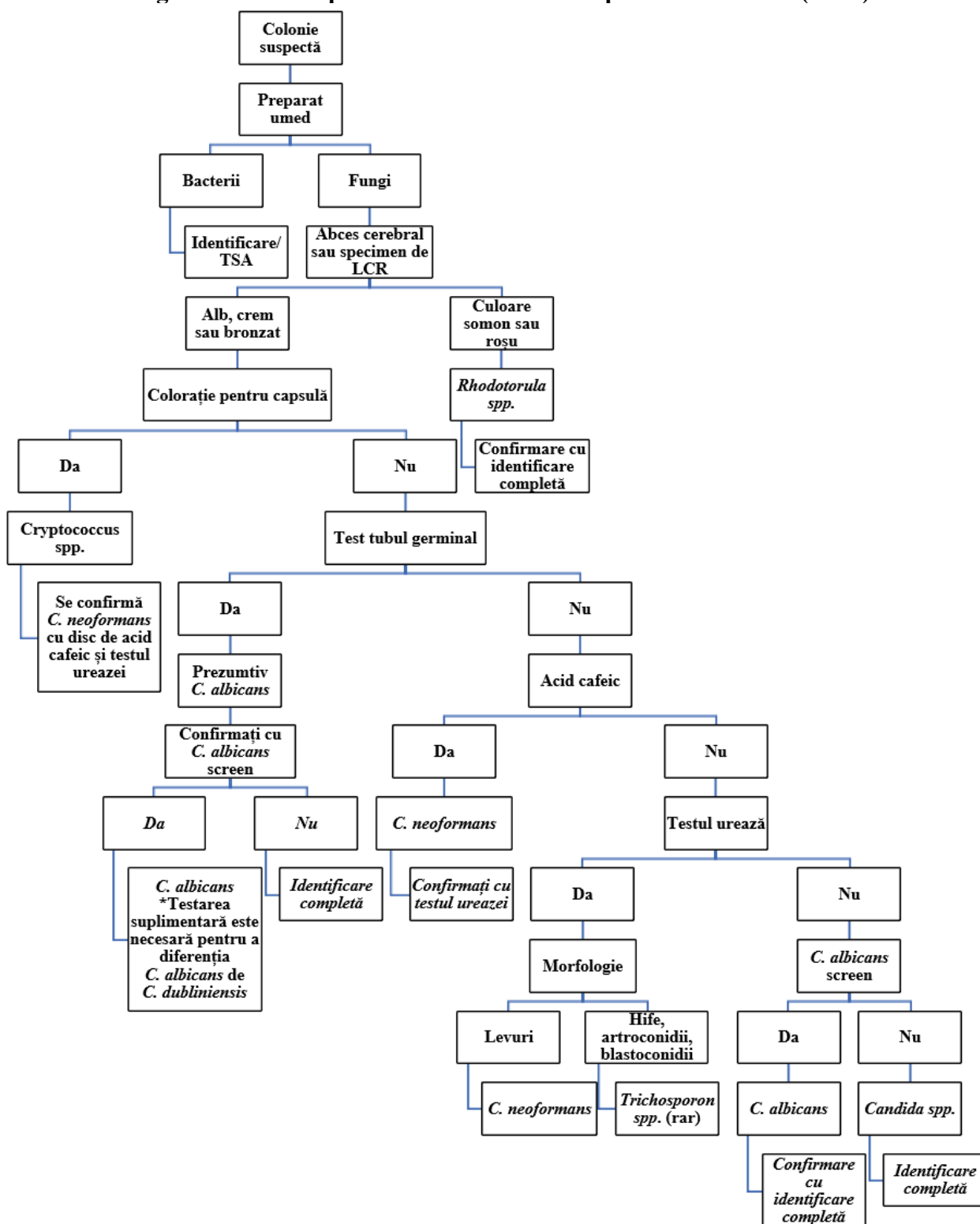
Plasarea pacienților cu neutropenie prelungită severă în camere echipate cu filtre de aer HEPA, atunci când este posibil, poate fi benefică.

Prevenția mucormicozei

Prevenirea mucormicozei trebuie să se concentreze pe abordarea factorilor de risc subiacenți:

- vizând un mai bun control al glicemiei la cei cu diabet,
- utilizarea adecvată a corticosteroidelor sistemici și prevenirea utilizării inutile a antibioticelor, antifungicelor și altor imunomodulatoare.
- sterilizarea și dezinfectarea echipamentului utilizat de mai mulți pacienți (tuburi traheale, ventilatoare), sisteme de ventilație (dacă există o ventilație deficitară în spital care poate contribui la umezeală și praf);
- gestionarea adecvată a rănilor (bandajul, adevizi, inclusiv benzile pentru fixarea dispozitivelor medicale, cum ar fi tuburile endotraheale, dispozitivele de stomie trebuie sterilizate și schimbate în mod regulat);
- gestionarea adecvată a unităților sanitare.

Diagramă de lucru pentru evaluarea culturii primare de levuri (LCR)



Notă: mediul cromogen descris - CHROMagar

Modificări ale definițiilor EORTC/MSGERC ale aspergilozei invazive de-a lungul unui deceniu: definiții actualizate în 2019 (Donnelly et al.) în comparație cu cele publicate în 2008 (De Pauw et al.)

Categoria de AI	Riscuri asociate gazdei și modalități de diagnosticare	Modificări sau adăugiri făcute (pentru definiția completă a criteriilor, consultați Donnelly et al.)
AI Posibilă și probabilă	Factori de risc pentru IFI	<ul style="list-style-type: none"> ● Adăugarea utilizării imunosupresoarelor cu celule B (de exemplu, Ibrutinibum) ● Adăugarea explicită a transplanturilor de organe solide
AI probabilă	<p>Constatări imagistice sugestive pentru AI pulmonară</p> <p><i>Aspergillus</i> galactomannan</p> <p><i>Aspergillus</i> PCR</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Adăugarea de opacități în formă de pană și segmentare sau consolidare lobară. ● Stabilirea pragurilor clare de "pozitivitate" specifice lichidului corporal testat. ● Un singur ser sau plasmă, lichid BAL sau lichid cefalorahidian (prag ODI ≥ 1.0) ● Un singur ser sau plasmă (prag ODI ≥ 0.7) plus un singur lichid BAL (prag ODI ≥ 0.8) ● Măsură micologică adăugată: PCR pentru <i>Aspergillus</i> (două citiri pozitive consecutive pentru a se califica drept "pozitiv" sau poate fi realizată din sânge consecutiv, eşantioane consecutive; sau eşantioane duplicat în cazul în care este utilizat lichidul LBA; sau un singur rezultat pozitiv din sânge și un singur rezultat pozitiv din lichidul LBA poate fi considerat "pozitiv") ● când hifele fungice sunt observate într-un eşantion de țesut, materialul poate fi folosit pentru a extrage ADN-ul fungic, apoi amplificat și secvențiat pentru a identifica regiunile specifice ale ARNr (cum ar fi regiunile ITS - spațiile interne transcrise).
AI confirmată	Diagnosticare moleculară (secvențierea ADN)	

Contexte clinice ale aspergilozei invazive - definiții

Context clinic	Definiție
AI primară	AI la un pacient care nu a fost expus la un medicament antifungic la momentul diagnosticării sau în ultimele 7 zile. În această situație, medicul ar începe cu tratamentul standard preferat, cunoscut ca terapie de primă linie.
AI descoperită	AI care apare în timpul expunerii la un medicament antifungic (administrat fie sub formă de profilaxie antifungică sau tratament)
AI refractară	Progresia bolii, cu înrăutățire sau simptome clinice noi, semne sau caracteristici radiologice atribuite AI ca urmare a eșecului la tratamentul antimicotic specific împotriva <i>Aspergillus</i> †

†această evaluare a AI refractare este realizată de un medic expert după o perioadă de timp adecvată din punct de vedere clinic. De obicei, acest interval de timp este de aproximativ 2 săptămâni.

Recomandări pentru examinarea specimenelor clinice prin histopatologie, microscopie, cultură și identificarea *Aspergillus* din culturi izolate din culturi

Abordare sau test de diagnostic	Detaliile metodei	SoR	QoE	Performanța testului și observații
Microscopie Examinarea histopatologică a secțiunilor de țesut	Impregnare argentică tehnica Gomori (GMS), colorația cu acid periodic-Schiff (PAS), coloranți fluorescenți (de exemplu, calcofluor alb)	A	II	Abordare esențială pentru examinarea specimenelor clinice în diagnosticul infecțiilor fungice, inclusiv a infecțiilor cu <i>Aspergillus</i> . Sensibilitatea testelor depinde de calitatea eșantionării și de factorii tehnici implicați în analiză. Deși morfologia hifelor nu este specifică doar pentru <i>Aspergillus</i> , aspectul lor poate oferi indicii în privința clasei de fungi. Hifele de <i>Aspergillus</i> prezintă de obicei septuri și se ramifică în unghiuri acute dihotomice (la un unghi de 45 de grade). Colorația GMS are capacitatea de a elimina fondul celular și de a evidenția în mod specific elementele de hifă ale ciupercii <i>Aspergillus</i> . Aceasta face ca GMS să fie o tehnică mai sensibilă în detectarea și evidențierea prezenței hifelor în mostrele de țesut. Colorația PAS oferă avantajul contracolorării, ceea ce permite verificarea detaliilor celulare și evidențierea componentelor glucidice din peretele celular al

				<i>Aspergillus</i> -ului. Această colorație poate ajuta în identificarea conidiilor și a altor elemente specifice.
Imunohistochimie	Imunohistochimie cu anticorpi monoclonali specifici WF-AF-1 și hibridizare in situ EB-A1	B	II	Au potențialul de a furniza informații specifice despre genurile și speciile de ciuperci. Anticorpul monoclonal specific WF-AF-1, care se leagă de antigenele specifice pentru <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> și <i>Aspergillus niger</i> . Prin colorarea specifică a acestor antigene, se poate identifica și localiza prezența acestor specii de <i>Aspergillus</i> în probele de țesut. Necesită timp și nu este disponibil pe scară largă.
Microscopia specimenelor clinice proaspete (de exemplu, LBA)	Aplicarea coloranților fluorescenți Calcofluor white™ sau Uvitex 2B sau Blancophor™.	A	II	Investigație esențială Nu este specific pentru speciile de <i>Aspergillus</i> Sensibilitate ridicată Timp de răspuns rapid Aplicabilitate largă Nu se identifică speciile, dar micromorfologia poate oferi informații despre clasa fungică (de exemplu, morfologia dihotomică și septată poate indica prezența <i>Aspergillus</i> , în timp ce ciupercile din clasa <i>Mucorales</i> pot prezenta un aspect pauci-septat și ramificat în unghi de 90 de grade, iar drojdiile pot prezenta caracteristici de înmugurire).
Cultura și identificarea speciilor de <i>Aspergillus</i> Izolarea primară din zone adânci și probe sterile (de exemplu, biopsii, LCR)	Cultivarea și identificarea <i>Aspergillus</i> , se recomandă utilizarea medii standard de cultură micologică, cum ar fi medii de agar Sabouraud (SDA). Culturile trebuie menținute la o temperatură de aproximativ 30°C și trebuie monitorizate timp de până la 3 săptămâni pentru a permite creșterea și	A	II	Abordare esențială. Poate fi nevoie de medii îmbogățite sau de medii care să conțină antibiotice pentru a recupera izolatele

	dezvoltarea speciilor de <i>Aspergillus</i>			
Izolarea primară din materiale nesterile (de exemplu, spută, aspirate respiratorii).	Cultivarea și identificarea <i>Aspergillus</i> , se recomandă utilizarea medii standard de cultură micologică, cum ar fi medii de agar Sabouraud (SDA). Culturile trebuie menținute la o temperatură de aproximativ 30°C și trebuie monitorizate timp de până la 3 săptămâni pentru a permite creșterea și dezvoltarea speciilor de <i>Aspergillus</i>	A	II	Abordare esențială. Poate fi nevoie de medii îmbogățite sau de medii care să conțină antibiotice pentru a recupera izolatele
Identificarea complexului de specii <i>A. fumigatus</i> și identificarea speciilor specifice de <i>A. fumigatus</i>	Examinare macroscopică și microscopică din culturile primare			Identificarea speciilor de <i>Aspergillus</i> , inclusiv a speciei <i>A. fumigatus</i> sensu stricto, se poate realiza prin examinarea următoarelor caracteristici: culoarea coloniei, dimensiunea și forma conidiilor, caracteristicile conidioforului, prezența septelor și testul de termotoleranță. Aceste aspecte pot fi observate în timpul examinării macroscopice și microscopice a culturilor primare de <i>Aspergillus</i> . Identificarea definitivă poate necesita utilizarea altor tehnici precum biologia moleculară sau secvențierea ADN.

Tehnici de colorare/vizualizare a fungilor

1. Examinarea coloniilor levurice/funghi cu agent de umezire Tween 80 de 0,05%

Adăugarea de Tween 80 ajută la reducerea formării bulelor și previne scăparea/eliberarea conidiilor infecțioase. Procedura este următoarea:

1. Pe o lamă se aplică o picătură de 0,05% Tween 80.
2. Cu o ansă, se atinge suprafața coloniei suspecte și se colectează material fungic, apoi se agită ușor materialul în picătura de Tween.
3. Se aplică deasupra picăturii o lamela și se examinează la microscop.

2. Tehnica LPCB (Lactophenol cotton blue)

LPCB este o tehnică excelentă pentru examinarea materialului fungic. Fenolul distruge ciupercile, iar acidul lactic sporește conservarea. Cotonul bleu (china) colorează chitină și celuloză. Procedura este următoarea.

- a) Se aplică o picătură de LPCB pe o lamă.
- b) Folosind un ac de disecție sau o bandă adezivă, se îndepărtează o bucată de material fungic și se pune picătura de colorant.
- c) Deasupra se pune o lamela și se examinează la microscop.

Dacă se vizualizează funghi filamentoși (mușegaiuri) cu hife neseptate, probabil este zigomicet/mucormicet și se realizează subcultura pe dextrosă agar cu cartofi.

3. Tuș de India (India ink)

Tehnica de colorație cu tuș de India este o tehnică negativă de colorație utilizată pentru a studia morfologia unui microorganism. Prin această tehnică se colorează tot preparatul, CU EXCEPȚIA elementelor pe care dorim să le punem în evidență.

Colorația negativă este singura tehnică de colorație în care celulele bacteriene nu sunt colorate, ci sunt făcute vizibile ca corpuri incolore pe un fundal întunecat.

Această tehnică necesită un colorant acid, cum ar fi tușul de India sau Nigrozina.

Principiul: Este o colorație acidă, aceasta înseamnă că colorantul renunță cu ușurință la un ion de hidrogen (proton), iar cromoforul colorantului devine încărcat negativ. Deoarece suprafața majorității celulelor bacteriene este încărcată negativ, aceasta respinge colorantul. Microorganismele vor apărea ca puncte strălucitoare pe un fundal întunecat.

Procedura:

- LCR se centrifughează timp de 5 până la 10 minute.
- Se îndepărtează supernatantul, după care se amestecă sedimentul.
- Se transferă o picătură de sediment pe o lamă la care se adăugă o picătură de tuș de India.
- Ambele picături se amestecă și se acoperă cu o lamelă.
- Preparatul se examinează la microscop folosind obiectivul x40.

Microscopierea: Se caută celule ovale sau rotunde, unele prezentând înmugurire, neregulate ca mărime, măsurând 2-10 μm în diametru și înconjurate de o capsulă mare necolorată (fig. 1). Foarte rar capsula este absentă.

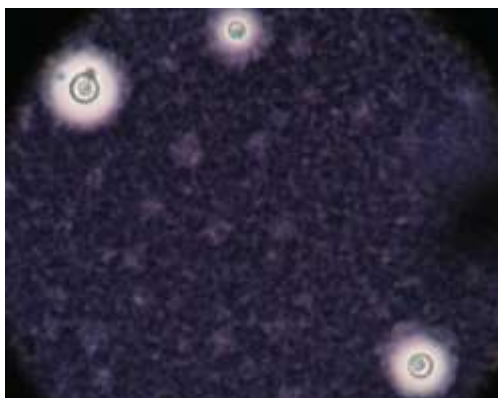


Figura 1. *C. neoformans* în preparatul cu tuș de India

Interpretarea rezultatelor:

Test pozitiv: levuri capsulate

Test negativ: levuri necapsulate

Martor pozitiv: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045

Martor negativ: *Candida albicans* ATCC 10231.

Note cheie:

- Tușul negru pentru desen Pelikan este potrivit pentru acest test.
- Când tușul de India nu este disponibil, se va utiliza soluția de nigrosin (20% m/v).
- Nu se face preparatul prea gros altfel, celulele și capsulele nu se vor vedea.

Limitări ale testului:

- Picăturile de grăsime, leucocitele din sânge și celulele țesuturilor sunt uneori confundate cu celulele de *C. neoformans*. Leucocitele și celulele tisulare pot fi dizolvate prin adăugarea unei picături de 10% KOH.
- Este posibil ca unele tulpini de *C. neoformans*, precum și alți criptococi, să nu formeze capsule vizibile *in vitro*.
- Nu poate fi utilizat pentru a vizualiza structurile interioare ale celulei microbiene.
- Este posibil ca microorganismele foarte mici sau subțiri să nu aibă suficient contrast.
- Când fundalul este neuniform sau necesită a fi îmbunătățit, poate fi dificil de interpretat.

4. Tehnica modificată de colorare cu tuș de India pentru *C. neoformans* în proba de lichid cefalorahidian

Pentru a pune în evidență mai bine *C. neoformans* din LCR este propusă tehnica modificată cu tuș de India.

Tehnica modificată folosește 2% amalgam de crom-mercur. O picătură mică de LCR este plasată pe o lamă curată din sticlă la care se adaugă o picătură mică de 2% amalgam de crom-mercur după care se amestecă cu LCR. Imediat, se adaugă o cantitate mică de tuș de India. Ulterior, se montează lamela și preparatul este examinat la un microscop cu câmp luminos la mărituri de x 40, x100, x 400 și x 1.000.

Prin această tehnică, sunt observate unele structuri externe și interne ale celulelor levuriforme cu obiectivele x 40 și x 100. Astfel, se vizualizează trei straturi din capsula exterioară, care anterior s-au pus în evidență doar prin microscopie electronică, și anume stratul luminos al capsulei, cel fibrilar și zona de lumină. În plus, s-au distins clar și corpusculii interni corespunzători diferitelor dimensiuni ale sporilor endogeni ai microorganismului (fig. 2). Preparatul obișnuit cu tuș de India

pune în evidență celulele levuriforme cu caracteristicile lor obișnuite. Preparatul modificat imită un preparat policromatic, chiar dacă nu au fost utilizați alți coloranți în timpul procedurii. Această prezentare aparent policromatică a *C. neoformans* permite diferențierea microscopică a bulelor de aer, care uneori sunt confundate cu *C. neoformans* când se folosește metoda obișnuită/convențională.

Se propune această pregătire simplă, ieftină și de încredere pentru evaluarea probelor de LCR suspectate de a conține *C. neoformans*.

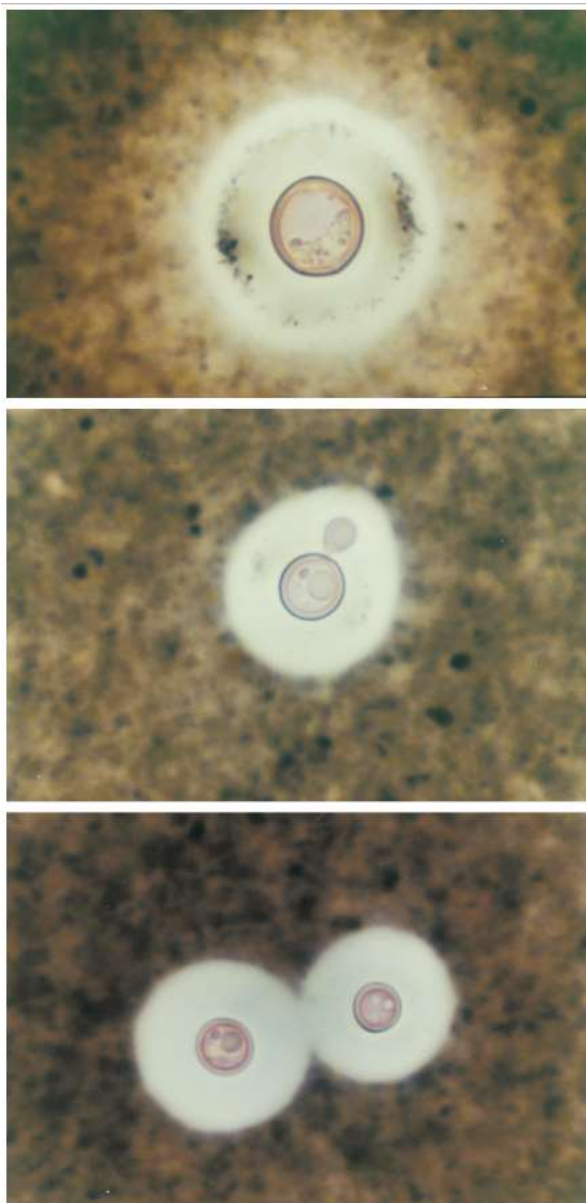


Figura 2. Structurile externe și interne ale *C. neoformans* în preparatul cu tuș de India modificat. Mărire x 1.000.

5. Montare frotiu cu KOH

Procedeu KOH (hidroxid de potasiu) este o metodă utilizată pentru a examina speci­menele în vederea depistării levurilor. KOH servește ca agent enzimatic care descompune resturile dintr-un specimen, cum ar fi celulele epiteliale și celule sangvine albe, pentru a vizualiza levurile sau pseudohifele.

Utilizare: spută (*Aspergillus*), exsudate din leziuni sau țesuturi infectate (mucormicoze), probe de puroi, spută sau piele (*Blastomyces dermatitidis*), resturi de piele, unghii sau păr (dermatofiti).

Procedeu:

1. Se plasează o lamă o picătură de soluție de KOH (10 μl) de 10%.
2. Se transferă specimenul (bucăți mici) sau cu o pipetă sterilă se adaugă o picătură de specimen lichid pe picătura de KOH și se acoperă cu o lamelă. Se așează lama într-o placă Petri sau într-un alt recipient cu capac, împreună cu o bucată umedă de hârtie de filtru sau vată de bumbac pentru a împiedica uscarea preparatului.
3. Se examinează la microscop cu ajutorul obiectivelor 10X și 40X, cu diafragma condensatorului închisă suficient pentru a obține un contrast bun. În cazul în care se utilizează o sursă de lumină prea intensă, contrastul nu va fi adecvat, iar fun­gii necolorați nu vor fi vizibili.
4. Se examinează dacă există levuri înmugurite sau cu pseudohife.

Procedura de preparare a 100 ml de soluție de KOH 10%

- Se cântăresc 10 g de hidroxid de potasiu (KOH).
- Se transferă substanța chimică într-un vas de sticlă cu capac.
- se adaugă 50 ml de apă distilată și se amestecă până când substanța chimică este complet dizolvată. Se adaugă restul de apă distilată astfel ca volumul să fie de 100 ml.
- se etichetează flaconul și se marchează ca fiind coroziv. Se păstrează la temperatura camerei. Reactivul este stabil pentru o perioadă de până la 2 ani.

Atenție: Hidroxidul de potasiu este un produs chimic foarte coroziv, prin urmare, se manipulează cu mare grijă și se asigură că flaconul este închis ermetic după utilizare.

6. Montarea cu bandă adezivă

Majoritatea tipurilor de benzi adezive transparente funcționează pentru a realiza această metodă, dar nu sunt potrivite pentru montări permanente, deoarece banda se va dezintegra cu timpul. Acestea, este potrivită doar pentru culturi în plăci. Aceasta metoda nu trebuie utilizată pe o cultură originală, irepetabilă, a cărei dublură nu există. Se recomandă să existe mai mult de o cultură, deoarece banda poate contamina placa atunci când se face prepararea.

1. O picătură de lactofenol coton bleu sau lactofuchsin se pune pe o lamă curată.
2. O bucată scurtă de bandă este tăiată, iar partea adezivă (lipicioasă) este aplicată pe suprafața mucegaiului cu ajutorul pensei.
3. Banda este apoi aplicată pe lamă cu zona care a fost în contact cu mucegaiul în partea de sus. Se aplică încă o picătură de lactofenol coton bleu.
4. Peste bandă se pune o lamela pentru a încerca să îndepărteze orice bule de aer. Acest fapt asigură că fun­gii filamentoși sunt vizualizați nu prin bandă, ci prin lamelă.

Lama este examinată la microscop, cu vizualizarea structurilor precum hife, conidii, spori sau structuri fructifere.

7. Montura tease

Montura tease este probabil cea mai comună tehnică folosită pentru examinarea microscopică a fungilor; este o tehnică simplă și eficientă, dar necesită practică pentru a obține rezultate optime. Nu se trage doar firul peste suprafață, altfel doar sporii vor fi îndepărtați, ideea este să fie vizualizați cum sunt atașați sporii și orice alte structuri care sunt prezente. Izolatele cu sporulare slabă pot necesita prepararea mai multor montări.

1. O picătură de alcool se pune pe o lamă de sticlă curată.

2. Folosind un fir de inoculare, se prelevează un fragment din cultură, aproximativ la jumătatea distanței dintre marginea și centrul culturii și se plasează în alcool. Mucegaiul este îndepărtat ușor folosind firul și acul de disecție (montare), astfel încât să nu fie distrusă nicio structură fragilă. Ideea este de a separa hifele pentru a permite trecerea luminii și o segregare suficientă a structurilor caracteristice pentru a fi posibilă studierea acestora. Alcoolul servește ca agent de umectare și ajută la eliminarea bulelor de aer.
3. Se adaugă o picătură de lactofenol coton bleu pe mucegai și se plasează o lamela astfel încât să se evite formarea bulelor de aer.
4. După îndepărtarea oricărui exces cu un șervețel, lamela poate fi sigilată adecvat pentru a păstra preparatul.
5. Proba este examinată microscopic, fiind notate elementele vizualizate: hife, conidii, spori sau structuri fructifere.

8. Cultura pe lamă

Tehnica culturii pe lamă este o metodă de neprețuit în activitățile de diagnosticare. Cel mai mare beneficiu pentru identificare este că permite personalului să examineze structurile fungice delicate, care sunt adesea perturbate în timpul pregătirii tehnicilor sus menționate. Obiectul metodei este de a permite mucegaiului să crească dintr-un bloc de agar pe suprafața de sticlă a unei lame sau a unei lame de acoperire, unde caracteristicile mucegaiului pot fi vizualizate fără perturbări minime.

Agarul selectat ar trebui să inducă producția maximă de spori a grupului de mucegai din izolat. Trebuie pregătite două culturi pe lame pentru a permite examinarea după timpi diferiți de incubare. Acestea trebuie pregătite într-un cabinet de siguranță biologică. La finalizare, preparatele de cultură pe lame pot fi sigilate și conservate ca o înregistrare a izolatului.

NOTĂ: Culturile pe lame nu trebuie preparate cu izolate suspecte la *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, *Cladophialophora bantiana* sau *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*, deoarece riscul de infecție este prea mare.

1. Cultura pe lamă este pregătită prin plasarea unei lame de sticlă curată, fără grăsimi, susținută de o tijă de sticlă îndoită în formă de V într-o cutie Petri de sticlă/plastic. Vasele și conținutul sunt apoi sterilizate. .
2. Utilizând tehnici aseptice, un bloc de agar de aproximativ 0,5 cm² trebuie tăiat dintr-o placă de cultură cu agar neutilizat și plasat pe lamă.
3. Se toarnă puțină apă distilată sterilă la baza vasului, astfel încât să se prevină umezirea cubului de agar; alternativ, poate fi folosită o bucată umedă de hârtie de filtru sterilă. Apa trebuie adăugată în mod regulat pentru a preveni uscarea agarului, dar nu trebuie menținută umedă încât să se formeze un condensat excesiv.
4. Se inoculează în jurul marginii cubului cu vârful acului/ansei de inoculare, se acoperă cu o lamelă sterilă curată și se incubează. Temperatura de incubare este selectată în funcție de starea dorită a fungilor și este în funcție de izolat. Este imperativ ca cubul de agar să fie mai mic decât lamela, deoarece hifele cresc pe sticlă. Structurile de diagnosticare probabil să se formeze în jurul marginilor blocului.
5. Preparatul se verifică regulat în timpul incubației, iar când creșterea este vizibilă, se îndepărtează cu atenție lamela cu pensete fine sterile. Pe o lamelă curată se aplică o picătură de lactofenol coton bleu, apoi se așează atent lamela de pe cubul de agar, astfel încât să fie îndepărtate bulele de aer. Se manipulează cu grijă, ca să nu fie deranjate structurile delicate ale fungilor. Un alt frotiu se va realiza astfel: se scoate blocul de agar de pe lamă, se aplică lactofenol coton bleu pe lamă, apoi se acoperă cu o lamelă curată.
6. Înainte de examinare, se șterge partea inferioară și marginile lamei cu dezinfectant. Se observă tipul de spori și modul în care sunt atașați și structura corpurilor purtătoare de spori.
7. Există variații ale tehnicii de cultură pe lame, de asemenea, potrivite. Preocupările importante sunt că există o suprafață de sticlă pe care elementele hife pot crește în timp ce primesc nutrienți din blocul de agar și că creșterea rezultată a mucegaiului pe suprafața sticlei poate fi acoperită cu dezinfectant în suport și poate fi vizualizată cu ușurință prin microscopie.

Medii pentru izolarea și identificarea fungilor

Mediu	Utilizare	Remarci
SDA	Formulat inițial pentru creșterea dermatofiților și producția de pigment. Este inferior agarului Sabhi ca mediu primar.	Modificarea Emmons conține 2% glucoză și este ușor acid (pH 6,9). Se acoperă cu ulei de măsline steril pentru creșterea <i>Malassezia furfur</i> .
BHI agar (Brain Heart Infusion Agar)	Mediu îmbogățit pentru recuperarea levurilor, mai ales <i>Cryptococcus neoformans</i> . Poate fi folosit pentru conversia mucegaiuri-levuri la unii fungi dimorfi	Adăugarea de eritrocite de oaie și/sau agenți antimicrobieni - opțional
Sabhi agar	Mediu îmbogățit pentru recuperarea levurilor	Adăugarea de eritrocite de oaie și/sau agenți antimicrobieni - opțional
Micosel sau micobiotic agar (Becton Dickinson)	Mediu selectiv comercial pentru izolarea primară a fungilor. Inhibă bacteriile și ciupercile saprofitice.	SDA cu Chloramphenicol și cicloheximidă va inhiba unii agenți patogeni fungici. Bacteriile rezistente la Chloramphenicol vor crește pe acest mediu.
IMA(Inhibitory Mold Agar)/IMAA	Mediu selectiv îmbogățit	Conține Chloramphenicol (IMA). IMAA are și Gentamicinum.
Agar dextroză de cartofi și agar cu fulgi de cartofi	Stimulează sporularea mucegaiurilor	Mediu ideal pentru pregătirea culturii de lame (slide culture)
Agar cu extract de malț	Poate îmbunătăți recuperarea zigomicetelor/mucormicetelor	
Yeast extract phosphate mediu (Remel) Agar de porumb cu Tween 80 Agar de orez cu Tween 80	Mediu selectiv pentru fungi dimorfi	De adăugat la suprafață ammonium hydroxide concentrat
Agar cu făină de porumb cu glucoză	Formarea de chlamydoconidium în <i>Candida albicans</i> ; producția de pigment în <i>Trichophyton rubrum</i> (agar cu făină de porumb și glucoză este superior celorlalte două)	
Dermatophyte test mediu	Recuperare selectivă și identificarea prezumtivă a dermatofiților	Dermatofiții schimbă mediul din roz spre roșu. Bacteriile și ciupercile saprofite schimbă mediu în galben. Atenție: unii non-dermatofiți pot schimba mediu în roșu.
Agar Czapek-Dox	Mediu de referință pentru identificarea <i>Aspergillus</i> spp.	Alți fungi, cum ar fi <i>Penicillium</i> spp. sporulează bine pe acest mediu

Agar cu acid cafeic sau agar cu semințe de păsări (bird seed/niger seed agar)	Pentru detectarea <i>C. neoformans</i>	
Medii cromoge pentru <i>Candida</i> ssp.	Mediu selectiv și diferențial pentru identificarea prezumtivă a unor specii de <i>Candida</i>	Dezvoltarea caracteristică a culorii asociate cu anumite specii de <i>Candida</i>

Subcultura, selecția mediului, condiții de incubare pentru fungi

Dacă microorganismul nu poate fi identificat din cultura primară sau există prea multă contaminare pentru o identificare sigură, coloniile de interes trebuie să fie subcultivate pentru puritate și pentru a induce trăsături caracteristice.

Subcultură

Inoculare prin înțepare. Folosind un fir de inoculare îndoit, se îndepărtează o parte din mucegai și se înțeapă centrul unei plăci de agar. Placa se incubează la temperatura corespunzătoare până când există o creștere suficientă pentru identificare. Dacă există un amestec de fungi sau contaminare cu fungi sau bacterii, un inocul în dungi a creșterii fungice va ajuta separarea de contaminanți pentru subcultura ulterioară pentru o obține cultură pură. Un microscop de disecție este adesea util pentru aceasta.

a. Selecția mediului

Mediile standard de laborator pentru subculturi sunt cele care au fost utilizate pentru descrierile coloniilor, cum ar fi mediul Czapek-Dox pentru *Aspergillus*. Alte medii obișnuite de laborator utilizate de micologi includ agar de malț, agar peptonat cu glucoză și agar dextroză cu cartofi. În general, mucegaiurile ar trebui să fie subcultivate pe un mediu limitat din punct de vedere nutrițional, cum ar fi agar dextroză de cartofi.

Există o gamă largă de medii mai specializate dezvoltate pentru anumite genuri de fungi. Agarul cu apă este un mediu minim utilizat pentru a induce sporularea speciilor Mucorales, cum ar fi *Apophysomyces* sau *Saksenaea*.

b. Condiții de incubare

Majoritatea fungilor cresc bine dacă sunt incubate între 28 și 32°C. Cu toate acestea, unele specii pot tolera temperaturi de creștere mai ridicate, iar acesta poate fi un alt ajutor util pentru identificarea mucegaiului.

Două subculturi sunt realizate din colonia inițială, etichetate, datate și incubate, una la 28 până la 30°C și alta la temperatura de testare mai mare. Pentru ca testul să fie valid, trebuie să existe o creștere a mucegaiului la temperatura mai scăzută. *Aspergillus fumigatus* este singurul *Aspergillus* sp. care va tolera până la 50°C și va crește bine la 45°C; *T. verrucosum* va crește mai repede la 35-37°C decât la 28°C, iar *Trichophyton mentagrophytes* va tolera 37°C.

Studiile asupra ciupercilor zigomicete arată că *Rhizomucor pusillus* va tolera 50 - 55°C și că *Rhizopus* spp. va crește la 45°C, în timp ce *Mucor* (cu excepția *Mucor indicus*) are o temperatură maximă de creștere de la 36 până la 37°C.

c. Rezistență la cicloheximidă

Rezistența la cicloheximidă poate fi un indicator pentru identificare, deoarece mai multe ciuperci, inclusiv *Aspergillus* și mucegaiurile Mucorales: *Rhizopus*, *Lictheimia* (*Absidia*) și *Mucor*, sunt sensibile la aceasta. Includerea cicloheximidei în agarurile utilizate pentru izolarea dermatofitelor este utilă, deoarece majoritatea speciilor de dermatofiti și unii dintre agenții patogeni primari dimorfi, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* și *Sporothrix schenckii*, sunt rezistente la acest agent antimicrobial. Se inoculează plăcile de mediu cu și fără cicloheximidă și se incubează în condiții identice. Plăcile comerciale conțin de obicei 500 μg de cicloheximidă/ml. Creșterea va fi aproximativ echivalentă pe ambele plăci dacă organismul este rezistent și foarte redusă sau lipsă pe placa de cicloheximidă dacă organismul este sensibil.

VII. Referințe bibliografice

1. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4).
2. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*. 2012 Dec 19;4(165):165rv13-.
3. BURDUNIUC, O. Actualități în diagnosticul infecțiilor fungice invazive. *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2019, 2(80), 54-60. ISSN 1729-8687.
4. BURDUNIUC, O. Factorii de virulență a fungilor patogeni: semnificația clinică și detectarea fenotipică. *Studia Universitatis, Seria Științe Reale și ale Naturii*. 2018, 6(116), 3-13. ISSN 1814-3237.
5. Calvo B, Melo AS, Perozo-Mena A, Hernandez M, Francisco EC, Hagen F et al. First report of *Candida auris* in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J Infect*. 2016;73(4):369–74.
6. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):e1006290.
7. Collins ME, Popowitch EB, Miller MB. 2020. Evaluation of a novel multiplex PCR panel compared to quantitative bacterial culture for the diagnosis of lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* doi: 10.1128/jcm.02013-19.
8. Denning DW. Antifungal drug resistance: an update. *Eur J Hosp Pharm*. 2022;29(2):109–12.
9. Duong TN, Le TV, Tran KH, Nguyen PT, Nguyen BT, Nguyen TA et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* is highly prevalent in the environment of Vietnam, with marked variability by land use type. *Environ Microbiol*. 2021;23(12):7632–42.
10. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, Arastehfar A, Cornely OA, Krause R et al. The antifungal pipeline: fosmanogepix, ibrexafungerp, olorofim, opelconazole, and rezafungin. *Drugs*. 2021;81(15):1703–29.
11. Hogan CA, Yang S, Garner OB, Green DA, Gomez CA, Dien Bard J, Pinsky BA, Banaei N. 2020. Clinical impact of metagenomic next-generation sequencing of plasma cell-free DNA for the diagnosis of infectious diseases: a multicenter retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* doi: 10.1093/cid/ciaa035.
12. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):134/40.
13. Niazi-Ali S, Atherton GT, Walczak M, Denning DW. Drug–drug interaction database for safe prescribing of systemic antifungal agents. *Ther Adv Infectious Dis*. 2021;8:1–9.
14. Nnadi NE, Carter DA. Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathog*. 2021;17(4):e1009503.
15. Osheroov N, Kontoyiannis DP. The anti-*Aspergillus* drug pipeline: is the glass half full or empty? *Med Mycol*. 2017;55(1):118–24.
16. Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 61:100–111. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770.
17. Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(9):603–16. 20. Denning DW, Bromley MJ. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science*. 2015;347(6229):1414–6.
18. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. 2012;125(1 Suppl):S3–13.
19. Pulmonary Mucormycosis: Risk Factors, Radiologic Findings, and Pathologic Correlation, Rishi Agrawal, Anjana Yeldandi, Hatice Savas, Nishant D. Parekh, Pamela J. Lombardi, Eric M. Hart, Mar 20, 2020, <https://doi.org/10.1148/rg.2020190156>
20. Raut A, Huy NT. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave? *Lancet Respir Med*. 2021;9(8):e77.

21. Rhodes J, Abdolrasouli A, Dunne K, Sewell TR, Zhang Y, Ballard E et al. Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. *Nat Microbiol.* 2022;7(5):663–74.
22. Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Paul RA, Sood P, Kaur H, Capoor MR et al. *Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(6):1794–801.
23. Terrero-Salcedo D, Powers-Fletcher MV. Updates in Laboratory Diagnostics for Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol.* 2020 May 26;58(6):e01487-19. doi: 10.1128/JCM.01487-19. PMID: 32132194; PMCID: PMC7269377.
24. Theel ES. 2019. Crossing a new threshold: use of elevated (1,3)-beta-d- glucan levels to distinguish causation from colonization in *Pneumocystis jirovecii* polymerase chain reaction-positive cancer patients. *Clin Infect Dis* 69:1310–1312. doi: 10.1093/cid/ciy1078.
25. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJ, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007–2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1846–54.
26. Vermeulen E, Lagrou K, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(6):493–500.
27. Wickes BL, Wiederhold NP. 2018. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun* 9:5135. doi: 10.1038/s41467-018-07556-5.
28. Wu X, Lu Y, Zhou S, Chen L, Xu B. Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. *Environ Int.* 2016;86:14-23.
29. Zhou D, Korfanty GA, Mo M, Wang R, Li X, Li H et al. Extensive genetic diversity and widespread azole resistance in greenhouse populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. *mSphere.* 2021;6(1):e00066-21.