



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA



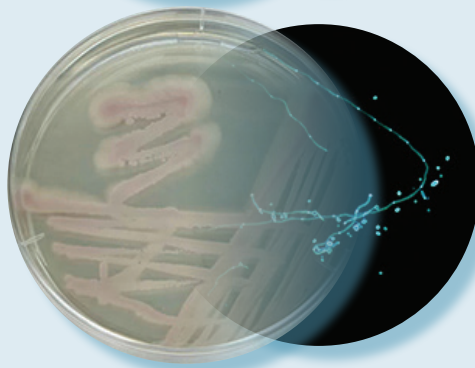
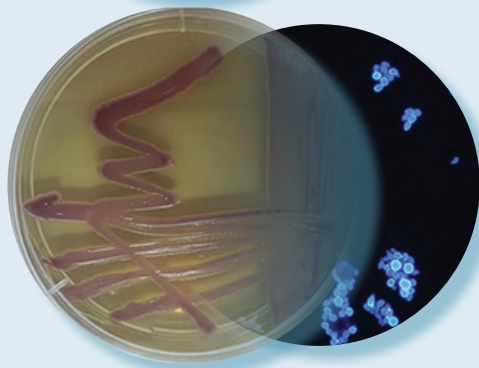
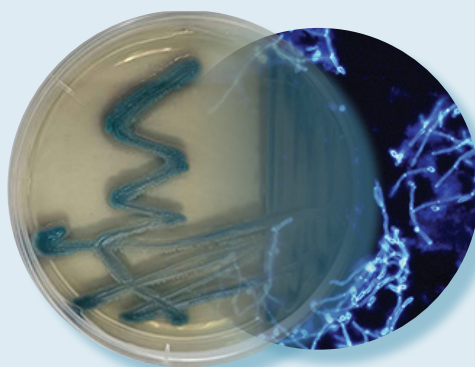
ANSP
AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂȚATE PUBLICĂ



UNIVERSITATEA DE STAT
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

GHID

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR FUNGICE INVAZIVE





MINISTERUL SĂNĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA



ANSP
AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂȚATE PUBLICĂ



UNIVERSITATEA DE STAT
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

GHID

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR FUNGICE INVAZIVE

Chișinău, 2025

Aprobat la ședința Consiliului de Experți al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova din 24.04.2024, proces-verbal nr. 1.

Aprobat prin ordinul ministrului sănătății al Republicii Moldova nr. 500 din 06.06.2024

COLECTIVUL DE AUTORI:

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

RECENZENȚI:

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

Tipărit cu suportul Organizației Mondiale a Sănătății și al Biroului pentru Populație, Refugiați și Migrație din cadrul Departamentului de Stat al SUA în contextul eforturilor de răspuns la criza refugiaților din Ucraina. Conținutul acestei publicații ține de responsabilitatea exclusivă a autorilor și nu reflectă în niciun fel punctele de vedere și politicile OMS și ale Guvernului SUA.

DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAȚIONALE A CĂRȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA

Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive: Ghid/colectivul de autori: Olga Burduniuc, Nicolae Jelamschi, Greta Bălan [et al.]; Ministerul Sănătății al Republicii Moldova, ANSP: Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. - Chișinău: [S. n.], 2025 (Continental Grup). - 101 p.: fig., tab. color.

Aut. indicați pe verso p. de tit. - Referințe bibliogr.: p. 100-101 (29 tit.). - Cu suportul Organizației Mondiale a Sănătății și al Biroului pentru Populație, Refugiați și Migrație din cadrul Departamentului de Stat al SUA. - 300 ex.

Tipar realizat „Continental-Grup” SRL

ISBN 978-5-86654-216-1



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

ORDIN
mun. Chișinău

06 iunie 2024

Nr. 500

Cu privire la aprobarea Ghidului „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive”

În vederea standardizării și asigurării calității serviciilor medicale de laborator acordate populației, în temeiul Hotărârii Guvernului nr.148/2021 Cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății,

ORDON:

1. Se aprobă Ghidul „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive”, conform anexei.
2. Conducătorii prestatorilor de servicii medicale vor organiza implementarea și monitorizarea aplicării în practică a Ghidului „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive”.
3. Conducătorul Agenției Medicamentului și Dispozitivelor Medicale va întreprinde măsurile necesare în vederea autorizării și înregistrării dispozitivelor medicale, consumabilelor, reagenților și echipamentelor incluse în Ghidul „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive”.
4. Conducătorul Companiei Naționale de Asigurări în Medicină va organiza ghidarea angajaților din subordine de prevederile Ghidului „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive” în procesul de executare a atribuțiilor funcționale, inclusiv în validarea volumului și calității serviciilor acordate de către prestatorii încadrați în sistemul asigurării obligatorii de asistență medicală.
5. Conducătorul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică va organiza evaluarea respectării cerințelor Ghidului „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive”, în contextul controlului activității instituțiilor prestatoare de servicii medicale.
6. Conducătorul Consiliului Național de Evaluare și Acreditare în Sănătate va organiza evaluarea implementării Ghidului „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive” în procesul de evaluare și acreditare a prestatorilor de servicii medicale.
7. Direcția managementul calității serviciilor de sănătate, de comun cu Agenția Națională pentru Sănătate Publică, vor asigura suportul consultativ-metodic în implementarea Ghidului „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive” în activitatea prestatorilor de servicii medicale.
8. Rectorul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, conducătorul Centrului de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo” și conducătorii colegiilor de medicină vor organiza implementarea Ghidului „Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice invazive”, în activitatea didactică a catedrelor respective.
9. Controlul executării prezentului ordin se atribuie secretarilor de stat.

Ministru

Ala NEMERENCO



Lista abrevierilor	6
I. Introducere	8
A. Scopul și obiectivele ghidului	8
B. Prezentarea infecțiilor fungice invazive.....	9
II. Caracteristica speciilor de fungi prioritari implicați în etiologia infecțiilor fungice invazive (conform OMS)	11
III. Biosiguranța, cerințe specifice laboratorului de diagnostic microbiologic	21
IV. Cerințe pentru probe, tehnici de preexaminare	23
V. Particularitățile diagnosticului de laborator al infecțiilor fungice invazive	26
A. Candidoza invazivă (<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. auris</i> etc.).....	26
1. Generalități.....	26
2. Factori de risc pentru candidoza invazivă	27
3. Aspecte clinice.....	29
4. Descrierea speciilor de <i>Candida spp</i>	32
5. Tehnici de diagnostic în candidoză.....	36
6. Interpretarea rezultatelor	49
B. Aspergiloza.....	49
1. Generalități.....	49
2. Aspecte clinice/epidemiologia	50
3. Diagnosticul de laborator.....	51
C. Criptococoza	54
1. Generalități.....	54
2. Epidemiologia	55
3. Aspecte clinice.....	56
4. Diagnosticul de laborator.....	57

D. Pneumocystis jirovecii.....	62
1. Generalități.....	62
2. Epidemiologia pneumoniei provocate de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	62
3. Aspecte clinice ale infecției cu <i>Pneumocystis jirovecii</i>	63
4. Diagnostic de laborator	63
E. Histoplasmoza.....	68
1. Generalități.....	68
2. Epidemiologia	68
3. Aspecte clinice.....	69
4. Diagnosticul de laborator.....	70
F. Mucormicoza	74
1. Generalități.....	74
2. Factorii de risc	75
3. Fiziopatologia.....	75
4. Epidemiologia	76
5. Aspecte clinice.....	77
6. Diagnosticul de laborator.....	79
7. Tratamentul și prevenția	84
VI. Anexe	86
VII. Referințe bibliografice.....	100



LISTA ABREVIERILOR

ADN	Acid dezoxiribonucleic
AI	Aspergiloză invazivă
AMP	Asistență medicală primară
AMS	Asistență medicală spitalicească
AMSA	Asistență medicală specializată de ambulatoriu
ARN	Acid ribonucleic
BG	Beta D-Glucan
BHI	<i>eng. Brain Heart Infusion/</i> bulion infuzie cord-creier
CGB	<i>eng. The selective medium I-canavanine glycine bromothymol blue agar/</i> agar cu L-canavanin glicin - albastru de bromtimol
CLSI	<i>eng. Clinical&Laboratory Standards Institute/</i> Institutul pentru Standarde Clinice și de Laborator
CMI	Concentrație minimă inhibitoare
CRAG	<i>eng. Cryptococcal Antigen/</i> antigenul criptococic
TC	Tomografie computerizată
CVC	Cateter venos central
DLCO	<i>eng. Diffusing Capacity Of The Lungs For Carbon Monoxide/</i> Capacitatea de difuzie a monoxidului de carbon în plămâni
GM	Galactomannan
GMS	<i>eng. Gomori's Methenamine Silver/</i> Impregnare argentică tehnica Gomori
ECMM	<i>eng. European Confederation of Medical Mycology/</i> Confederația Europeană de Mycologie Medicală
ELISA	<i>eng. Enzyme-linked immunosorbent assay/</i> analiza imunoenzimatică
EORTC/MSGERC	<i>eng. The European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium/</i> Consorțiul pentru Educație și Cercetare al Grupului de Studiu al Organizației Europene pentru Cercetare și Tratamentul Cancerului/ Micozelor
EUCAST	<i>eng. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/</i> Comitetul European pentru Testarea Sensibilitatii la Antimicrobiene
FDA	<i>eng. Food and Drug Administration/</i> Administrația pentru Alimente și Medicamente
H&E	Hematoxină și eozină

HIV	<i>eng. Human Immunodeficiency Virus/</i> Virusul Imunodeficienței Umane
HRCT	<i>eng. High-resolution computed tomography/</i> tomografie computerizată de înaltă rezoluție
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplantation/</i> transplant de celule stem hematopoietice
IFI	Infecții fungice invazive
LBA	Lavaj bronhoalveolar
LCR	Lichid cefalorahidian
LDH	Lactat dehidrogenază
LFA	<i>Lateral flow assay/test de flux lateral</i>
LPCB	<i>eng. Lactophenol cotton blue/</i> Albastru de lactofenol sau albastru de bumbac
MALDI-TOF MS	<i>eng. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i> <i>Mass Spectrometry/</i> Spectrometrie de masa MALDI-TOF
ME	Meningită/encefalită
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
ORL	Otorinolaringologie
PAS	<i>eng. Periodic acid-Schiff/acidul periodic-Schiff</i>
PBA	Periajul bronhiilor
PCR	<i>eng. Polymerase chain reaction/</i> Reacția de polimerizare în lanț
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis/</i> electroforeza pe gel în câmp pulsat
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism/</i> polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție
PPJ	Pneumonia cu <i>P. jirovecii</i>
RAM	Rezistență la antimicrobiene
REA	<i>Restriction enzyme analysis/analiza enzimelor de restricție</i>
SAM	S-adenozilmetionină
SaO₂	Saturația cu oxigen a sângelui arterial
SDA	<i>eng. Sabouraud Dextrose Agar/Agar Sabouraud cu dextroză</i>
SIDA	Sindromul imunodeficienței umane dobândite
SNC	Sistemul nervos central
TNF	<i>eng. Tumor necrosis factor/factorul de necroză tumorală</i>

A. Scopul și obiectivele ghidului

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

Obiectivele ghidului:

- Ameliorarea calității vieții pacienților critici prin implementarea diagnosticului etiologic corect și monitorizarea riguroasă pe baza acestuia a terapiei antifungice
- Asistarea specialiștilor în domeniul medicinei 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, oreliști din instituțiile/secțiile consultative);
- Prestatorii de servicii medicale la nivel de AMS (secțiile de boli infecțioase, de terapie, de reanimare și de terapie intensivă din spitalele raionale/municipale (specialiști în domeniul medicinei de laborator, medici epidemiologi, infecționiști, pediatri-infecționiști, pediatri, oreliști ș.a.).

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

Elaborat: 2024

Revizuire: 2029

Partea generală

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

Standardizarea la nivel național a metodelor și a 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 a fungilor patogeni, de identificare și de testare a sensibilității lor la antifungice.

Disponibilitatea metodelor standardizate de diagnostic de laborator al infecțiilor fungice invazive la nivel național descrise în acest ghid va îmbunătăți calitatea diagnosticului micozelor la om și utilizarea resurselor, va reduce costurile, va facilita achizițiile centralizate, supravegherea și controlul epidemiologic al acestora.

Ghidul va contribui de asemenea la comunicarea și la colaborarea dintre specialiștii în domeniul medicinei de laborator implicați în activitatea de diagnostic al infecțiilor fungice, clinicieni, farmaciști și medici epidemiologi responsabili de prevenirea și controlul micozelor.

Ghidul include caracteristici generale ale fungilor care 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 va servi și ca suport metodologic laboratoarelor medicale în implementarea, în validarea și în pregătirea documentației pentru acreditare.

B. Prezentarea infecțiilor fungice invazive

Fungii sunt pretutindeni, iar dintre miile de specii cunoscute în prezent doar o parte pot cauza afecțiuni la om. În ultimele două decenii, spectrul agenților responsabili de infecții fungice s-a modificat ca răspuns la schimbările din populația susceptibilă precum creșterea numărului persoanelor imunocompromise, utilizarea abuzivă și neargumentată a preparatelor antifungice.

Limita dintre fungii patogeni și nepatogeni poate fi foarte greu de diferențiat, deoarece cei considerați nepatogeni acum unul-două decenii, în prezent sunt recunoscuți ca agenți etiologici ai micozelor în cazul gazdelor imunocompromise.

Receptivitatea la infecțiile fungice oportuniste este influențată de factorii intrinseci ai gazdei și extrinseci ambientali. Astfel, deosebit de susceptibili la aceste infecții sunt persoanele cu diabet, cu leucemie, cu cancer, cu HIV și cu 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. Factori favorizanți endogeni sunt vârsta (nou-născuți prematuri, vârsta a treia), stările fiziologice particulare (graviditate), iar la factorii favorizanți exogeni se referă corticoterapia, terapia imunosupresoare posttransplant, antibioterapia 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 din 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 (dermatofitice), invazive (sistemice) și oportuniste. Infecțiile dermatofitice 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, majoritatea dermatofiților făcând parte din genurile *Microsporum*, *Trichophyton* și *Epidermophyton*.

Infecțiile fungice invazive (sistemice) au o incidență mai mică decât cele superficiale, dar provoacă o îngrijorare mai mare, fiind asociate cu o rată de mortalitate ridicată, evaluată anual la aproximativ un milion și jumătate de decese la nivel global.

Proporții împunătoare 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*, iar în ultimele decenii, lista a fost completată cu fungi filamentoși mai rar întâlniți în mediul ambiant, cum ar fi *Fusarium* spp. și *Penicillium* spp.

În legătură cu conștientizarea rolului fungilor oportuniști în dezvoltarea infecțiilor fungice, laboratoarele microbiologice trebuie să dispună de tehnici standardizate, de reagenți pentru izolarea și identificarea fungilor, precum și de personal competent în diagnosticul micozelor umane.

II

Caracteristica speciilor de fungi prioritari implicați în etiologia infecțiilor fungice invazive (conform OMS)

Candida auris

Informații-cheie

- Produce candidoză invazivă care poate fi fatală.
- La nivel mondial, a generat deja mai multe focare intraspitalicești.
- În mod intrinsec, este rezistentă la majoritatea medicamentelor antifungice disponibile, iar unele tulpini sunt panrezistente.
- Este 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, specia fiind termorezistentă și parțial rezistentă la dezinfectanții de uz curent.
- Rata mortalității pentru candidoza invazivă este foarte mare.
- Rezistența emergentă a speciei la azoli este îngrijorătoare.

Prezentare generală

Candida auris este un fung patogen distribuit pe larg la nivel global care poate provoca candidoză invazivă (candidemie) cu afectarea inimii, sistemului nervos central, ochilor, oaselor și organelor interne. Din cauza rezistenței la unele antifungice, în special la triazoli, *C. auris* a generat focare spitalicești de infecții micotice.

Mortalitatea prin candidoză invazivă cu *C. auris* variază între 29% și 53%. Pacienții cu candidemie indusă de *C. auris* au o perioadă mai îndelungată de spitalizare în staționar sau în terapie intensivă decât (46-68 de zile la pacienții adulți și de 70-140 de zile la copii) decât cei cu candidemie cauzată de alte specii de *Candida* spp.

Candida albicans

Informații-cheie

- Este un agent patogen fungic care poate face parte din microbiomul uman normal, dar poate provoca și infecții ale mucoasei sau candidoză invazivă.
- Tratamentul candidozei invazive indusă de *Candida albicans* este posibil, rezistența antifungică fiind mai scăzută decât în cazul *Candida auris*.

Prezentare generală

Candida albicans este o specie de fungi patogeni răspândită la nivel global, un membru comun al microbiotei umane (cavitate bucală, gât, intestin, vagin și piele) care nu dăunează când organismul este sănătos.

Conform estimărilor spitalicești ale incidenței și ale distribuției infecțiilor cauzate de speciile de *Candida*, infecțiile cauzate de *C. albicans* sunt în scădere.

Nakaseomyces glabrata (Candida glabrata)

Informații-cheie

- Este un fung comensal care poate provoca candidoză invazivă.
- Mortalitatea prin candidoză invazivă cauzată de *N. glabrata* poate fi de până la 20-50%.

Prezentare generală

Nakaseomyces glabrata (Candida glabrata), un fung comensal cu potențial patogen distribuit la nivel global, este o cauză principală a candidozei, a doua după *C. albicans*, ca incidență. Poate provoca candidoză invazivă cu afectarea inimii, sistemului nervos central, ochilor, oaselor și/sau a organelor interne.

Candida tropicalis

Informații-cheie

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

Prezentare generală

C. tropicalis poate produce infecții invazive ale inimii, ale sistemului nervos central, ale ochilor, ale oaselor, ale organelor interne și candidemie. Datele privind complicațiile și sechelele infecției invazive cauzată de această specie lipsesc. Întrucât printre factorii de risc se numără și scăderea imunității gazdei, acestei infecții sunt expuși și pacienții din unitățile de terapie intensivă neonatale. Tendințele din ultimii zece ani arată o creștere a incidenței infecțiilor cauzate de *C. tropicalis*.

Candida parapsilosis

Informații-cheie

- 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, în special în infecțiile cateterelor venoase centrale.
- Candidoza invazivă provocată de această specie pune viața în pericol, mortalitatea fiind cuprinsă între 20% și 45%.

Deși există unele provocări legate de RAM, sunt disponibile tratamente eficiente a candidozei invazive indusă de *Candida parapsilosis*. Deoarece infecția este asociată cu cateterul venoase centrale, pentru a reduce incidența acestei infecții sunt importante măsurile de îngrijire adecvată acestora.

Prezentare generală

Candida parapsilosis face parte din microbiota umană și animală normală. La pacienții grav bolnavi și imunocompromiși, cum ar pacienții cu cancer sau cu transplant de organe și de măduvă osoasă, poate produce infecție invazivă a inimii, a siste-

mului nervos central, a ochilor, a oaselor și a organelor interne, candidemie. Acest patogen este deosebit de periculos în secțiile de terapie intensivă neonatală. S-a demonstrat că îndepărtarea timpurie a cateterelor centrale reduce incidența infecției.

Pichia kudriavzevii (Candida krusei)

Informații-cheie

- Este un agent patogen fungic care poate provoca infecții ale mucoaselor sau candidoză invazivă.
- Tratatamentul candidozei invazive generată de această specie este posibil, dar rezistența antifungică este îngrijorătoare, deoarece accesul la un tratament eficient este încă limitat.

Prezentare generală

Pichia kudriavzevii (Candida krusei) este o specie de fungi patogenă oportunistă distribuită la nivel global. Deși este un membru obișnuit al microbiotei umane, poate invada mucoasele provocând diferite tipuri de candidoză (orofaringiană, esofagiană, vulvovaginală și cutanată), inclusiv candidoză invazivă. La pacienții adulți, mortalitatea globală indusă de *P. kudriavzevii* este cuprinsă între 44% și 67%.

Aspergillus fumigatus

Informații-cheie

- Este un fung omniprezent, cu implicații semnificative în sănătatea umană, cauzând predominant boli pulmonare (aspergiloze) prin inhalare din mediul înconjurător și având capacitatea de a se disemina în alte zone, inclusiv în creier.
- Aspergiloza este un termen generic folosit pentru un spectru larg de infecții cauzate de fungi din genul *Aspergillus* care variază de la reacție alergică, colonizare și infecție semiinvazivă până la aspergiloză acută invazivă.
- Aspergiloza invazivă rezistentă la azoli este o boală care pune viața în pericol, cu o mortalitate înaltă. Rezistența emergentă a speciilor de *Aspergillus* la azoli este îngrijorătoare.

Prezentare generală

Aspergillus fumigatus, un fung omniprezent, distribuit la nivel mondial, cu potențial patogen, poate produce infecții invazive (aspergiloză invazivă (AI)), în principal în sistemul respirator, dar se poate disemina și în alte organe, cum ar fi sistemul nervos central.

AI este o infecție gravă care afectează, în special, persoanele grav bolnave, cu boli pulmonare cronice și imunocompromise (cu cancer sau cu transplant). Printre factorii de risc pentru dezvoltarea AI se numără malignitatea hematologică cronică, boala pulmonară cronică, transplantul (atât solid, cât și de măduvă osoasă), terapia cu corticosteroizi, neutropenia și boala hepatică cronică.

Rata mortalității în infecția cauzată de *A. fumigatus* rezistentă la azoli este destul de ridicată (47-88%, dar poate ajunge și la 100%). Durata spitalizării pentru AI este limitată și variază pe scară largă (de la 21 până la 532 de zile).

Prevalența AI este variabilă din punct de vedere geografic de la < 1% până a 5-10%, la fel și incidența anuală. Infecția cu *A. fumigatus* rezistentă la azoli continuă să crească, tendințele din ultimii zece ani nu au putut fi stabilite din lipsă de date.

Cryptococcus neoformans

Informații-cheie

- Este un agent patogen fungic oportunist. Criptococoza, infecție cauzată de această specie, este dobândită pe cale respiratorie atunci când aceasta este inhalată din mediu.
- Mortalitatea în criptococoza cerebrală este ridicată, în ciuda terapiei antifungice.
- Deși ghidurile de tratament al criptococozelor sunt bine stabilite pentru grupurile cu risc major (pacienți cu HIV), antifungicele recomandate nu sunt disponibile în multe țări. Pentru grupurile de risc non-HIV, nu există recomandări clare de tratament.

Prezentare generală

Cryptococcus neoformans este un fung patogen distribuit la nivel global în diferite medii (sol, lemn în descompunere). După inhalarea din mediu, *C. neoformans* poate infecta inițial plămâni, dar se poate răspândi și în sistemul nervos central (meningită criptococică) și în sânge (criptococemie).

Acest fung nu se transmite de la om la om, iar factori de risc pentru boala criptococică invazivă sunt 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% până la 6%, îndeosebi la pacienții cu infecție HIV. Durata spitalizării la pacienții cu infecție cu *C. neoformans* variază de la 18 până 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 orbirea.

Cryptococcus gattii

Informații-cheie

- Este un agent patogen fungic distribuit la nivel global, mai frecvent în zonele tropicale și subtropicale, deși se poate adapta la diferite condiții climatice.
- Infecția invazivă cauzată de această specie pune viața în pericol, mortalitatea variind între 10% și 25%. Unui risc mai mare sunt expuse persoanele imunocompromis.

- Ghiduri de tratament pentru infecția cu *C. gattii* există, dar medicamentele-cheie sunt frecvent indisponibile în țările cu venituri mici sau medii. Rezistența speciei la antifungice rămâne scăzută,

Prezentare generală

Cryptococcus gattii este un fung patogen răspândit pe larg în mediul înconjurător (sol, anumiți copaci etc.) din zonele tropicale și subtropicale.

Infectarea omului are loc după inhalarea sporilor care ajung inițial în plămâni, dar pot pătrunde și în sistemul nervos central (meningită criptococică), în sânge (criptococemie) și în alte părți ale corpului. Nu se transmite de la om la om.

Criptococoza invazivă cauzată de *C. gattii* afectează, de obicei, pacienții imunocompetenți (spre deosebire de *C. neoformans*). Factorii de risc sunt boala cronică, vârsta 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 o mortalitate raportată de 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 15-21%, respectiv.

C. gattii a fost depistat în 11-33% din infecțiile criptococice, distribuția variind în funcție de tipurile moleculare. Incidența anuală generală este scăzută, deși unele zone (și populații) endemice au rate mai mari și apar focare noi.

Pneumocystis jirovecii

Informații-cheie

- Este un agent fungic patogen oportunist care se transmite de la om la om prin aer.
- Pneumonia cu *P. jirovecii* pune viața în pericol, cu o mortalitate substanțială, dar foarte variabilă.
- Tratamentul pneumoniei cu *P. jirovecii* este bine stabilit, dar antifungicele recomandate nu sunt disponibile în multe țări.

Prezentare generală

Pneumocystis jirovecii este un fung patogen oportunist, distribuit la nivel global. Pneumonia cu acest fung (PPJ) se transmite de la om la om prin aer, iar purtători ai agentului patogen pot fi persoane sănătoase, de obicei asimptomatice.

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

PPJ este o boală foarte gravă, mortalitatea variind de la 0% până la 100%. Durata spitalizării pacienților cu PPJ variază între 0-123 de zile (media fiind de 6,6-30 de zile). Complicațiile includ insuficiența respiratoare, insuficiența organului transplantat pe termen lung și insuficiența renală.

Histoplasma spp.

Informații-cheie

- Speciile din genul *Histoplasma* spp. sunt agenți patogeni distribuiți la nivel global care provoacă histoplasmoză.
- Speciile din genul *Histoplasma* spp. au potențialul de a produce focare.
- Histoplasmoza diseminată este o boală care pune viața în pericol, mortalitatea la pacienții cu HIV fiind cuprinsă între 21% și 53%. Mai afectați de histoplasmoza diseminată sunt pacienții cu imunosupresie.
- Tratamentul histoplasmozei diseminate este posibil, RAM rămâne moderată, dar puțin studiată.

Prezentare generală

Speciile din genul *Histoplasma* spp. sunt fungi dimorfi distribuiți la nivel global care trăiesc ca mușcari în diferite medii (sol și excremente de păsări și de lilieci) și ca o formă asemănătoare levurilor la temperatura corpului uman.

Histoplasmoza afectează, în principal, plămânii, dar se poate extinde și la sistemul nervos central, sânge și alte părți ale corpului. Nu se poate transmite de la om la om.

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

Rata mortalității prin histoplasmoză la copiii poate ajunge la 2,7%. Durata șederii în spital este de aproximativ 5-7 zile la adulți și copii, cu o variabilitate în limite mari, la pacienții cu meningită fungică spitalizarea medie fiind de o lună. Incidența complicațiilor și a sechelelor este necunoscută.

Mucorales

Informații-cheie

- *Mucorales* reunește mai multe specii de fungi din diferite genuri distribuite la nivel global și care provoacă un spectru larg de infecții numite mucormicoze.
- Mucormicozele afectează, în special, pacienții imunocompromiși, precum și cei cu diabet zaharat slab controlat și cu traumatisme, în special leziuni ale pielii și ale țesuturilor moi.
- Mucormicoza invazivă este o boală care pune viața în pericol, mortalitatea fiind ridicată. În prezent sunt disponibile tratamente ale mucormicozelor precum intervenții chirurgicale și preparate antifungice.

Prezentare generală

Mucorales este un ordin de fungi patogeni distribuiți la nivel global. Cele mai cunoscute sunt speciile din genurile *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Lichthiemia* spp. /ș.a. Infectarea omului are loc după inhalarea sporilor, care pătrund mai întâi în

plămânilor și în sinusuri, răspândindu-se apoi la nivelul ochilor, sistemului nervos central și tractului gastrointestinal. Invazia fungică a corpului se poate produce și prin rupturi ale pielii, după arsuri sau alte leziuni traumatice.

Agentul cauzal al eumicetomului

Informații-cheie

- Eumicetomul este o infecție profundă a țesuturilor asociată cu dizabilități semnificative. Poate fi cauzată de diverși agenți patogeni fungici care pătrund în organism prin leziuni ale pielii.
- Incidența globală a eumicetomului nu este cunoscută și pare să aibă o variabilitate geografică semnificativă. Mai afectată este populația săracă din țările cu venituri mici și medii.
- 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 fungi prezenți în sol și în apă, și care pătrund în organism prin pielea lezată. Agenții cauzali sunt speciile din genurile *Madurella* spp., *Acremonium* spp. și *Fusarium* spp., precum și speciile *Falciformispora senegalensis*, *Curvularia lunata*, *Scedosporium afectat* orium spp., *Zopfia rosatii*., deși datele microbiologice sunt limitate.

Eumicetomul afectează, în special, persoanele cu venituri mici, cu multe complicații și cu sechele. Până la 60-80% dintre pacienții cu eumicetom raportează un impact semnificativ asupra vieții lor de zi cu zi, rata de amputație ajungând până la 39%.

Prevenirea eumicetomului 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. este un gen de fungi filamentoși distribuiți la nivel global în diferite medii și care pot infecta oamenii provocând boala fuzarioza.
- Fuzarioza invazivă este o boală infecțioasă care pune viața în pericol, mortalitatea variind între 43% și 67%.
- Tratamentul fuzariozei este dificil din cauza rezistenței intrinseci a agentului patogen la multe dintre preparatele antifungice disponibile în prezent.

Prezentare generală

Fusarium spp. este un gen de fungi patogeni mai răspândiți în regiunile tropicale, predominant în sol, în materie organică descompusă și pe plante. Aceste specii

pot provoca boli invazive (fuzarioza invazivă), în principal ale sistemului respirator și ale ochilor (keratită), dar se pot disemina și în sistemul nervos central, precum și în alte organe. La baza fungemiei speciilor de *Fusarium* stă capacitatea 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 posttransplant de celule stem hematopoietice (HSCT). Factori de risc pentru fuzarioza invazivă sunt leucemia mieloidă acută, HSCT alogenă, reactivarea citomegalovirusului și prezența leziunilor cutanate pozitive cu *Fusarium* spp.

Ratele de mortalitate (timp de 30 de zile) în fuzarioza invazivă variază între 43% și 67%, fiind mai înaltă 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%), provocând rareori pierderea vederii.

Scedosporium spp.

Informații-cheie

- Speciile din genul *Scedosporium* spp. sunt agenți patogeni fungici distribuiți la nivel global în diferite medii și care pot infecta oamenii cu dezvoltarea de scedosporioză.
- Scedosporioza invazivă este o boală infecțioasă care pune viața în pericol, cu rate de mortalități de 42-46%.
- Tratamentul scedosporiozei invazive este amenințat de ratele ridicate ale RAM.

Prezentare generală

Scedosporium spp. este un gen de fungi patogeni oportuniști distribuiți la nivel global și care pot produce infecție invazivă (scedosporioza invazivă), în principal a sistemului respirator, dar și la nivelul sângelui, sistemului nervos central și a altor organe, precum și infecții sistemice, care pot fi mortale. Printre factorii de risc pentru scedosporioză se numără prezența malignității, HSCT și a infecțiilor severe. Ratele de mortalitate sunt de până la 42-46% la adulți și copii, un studiu recent efectuat în Franța raportând rate mai scăzute ale mortalității (mortalitate la 30 de zile de 9%, mortalitate la 3 luni de 19%).

Durata spitalizării în scedosporioză, complicațiile și sechelele sunt necunoscute din lipsa de date, tendințele din ultimii zece ani fiind stabile.

În prezent nu este disponibil niciun vaccin contra scedosporiozei, iar datele privind măsurile preventive lipsesc.

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

Rezistența antifungică a agenților patogeni ai scedosporiozei este mare, valori de interpretare farmacologice lipsind. Sensibilitatea redusă la Amphotericinum B*, itraconazol, Isavuconazolium* și echinocandine este frecventă. Voriconazolium este cel mai activ antifungic împotriva acestor specii de fungi.

Lomentospora prolificans

Informații-cheie

- 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, mortalitatea variind de la 50% până la 71% la adulți și 50% la copiii imunocompromiși.
- Tratamentul lomentosporiozei invazive 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 (lomentosporioză invazivă) la nivelul sistemului respirator, sângelui, sistemului nervos central și a altor organe, precum și infecții sistemice, de obicei mortale. Lomentosporioza invazivă este o infecție nosocomială gravă care afectează, în special, pacienții grav bolnavi și imunocompromiși, îndeosebi pe cei cu cancer. Mortalitatea în lomentosporioza invazivă variază între 50% și 71% la adulți și 50% la copiii imunocompromiși. Durata îngrijirii pacientului cu lomentosporioză, complicațiile și sechelele sunt necunoscute din lipsă de studii.

* Produsele marcate cu asterix nu sunt înregistrate în Nomenclatorul de stat al medicamentelor, fiind incluse în ghid conform recomandărilor EUCAST

Coccidioides spp.

Informații-cheie

- Speciile din genul *Coccidioides* spp. sunt unii dintre cei mai virulenți agenți patogeni fungici care provoacă coccidioidomicoză. Aceasta este dobândită pe cale respiratorie atunci când fungii sunt inhalați din mediu.
- Coccidioidomicoza invazivă pune viața în pericol, mai ales la pacienții vulnerabili, dar poate infecta și persoane sănătoase.
- Tratamentul coccidioidomicozei invazive este bine stabilit, fiind însă periclitat de ratele ridicate ale RAM.

Prezentare generală

Coccidioides este un gen de fungi dimorfi patogeni răspândiți în America de Nord și de Sud ca mucegaiuri în diferite medii. După inhalare, celulele fungice afectează inițial plămânii, dar se pot extinde la sistemul nervos central, sânge, oase și alte părți ale corpului. Nu a fost descrisă transmiterea agentului patogen de la om la om.

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

Coccidioidomicoza invazivă este o boală foarte gravă, cu rata mortalității cuprinsă între 2% și 13%, mai mare la pacienții vulnerabili. Durata spitalizării la pacienții cu infecția cauzată de *Coccidioides* spp. variază de la trei-șapte zile până la 22,7 zile în meningita coccidioidă.

Talaromyces marneffeii

Informații-cheie

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

Prezentare generală

Talaromyces marneffeii este un fung dimorf patogen endemic în Asia de Sud-Est și în unele regiuni din China. Populează diferite medii (sol, lemn în descompunere etc.), infectarea omului producându-se după inhalarea sporilor. Talaromicoza afectează plămânii, dar se poate extinde și la sistemul nervos central, la fluxul sangvin și alte părți ale organismului. Transmiterea agentului patogen al talaromicozei de la om la om nu a fost consemnată.

Talaromicoza invazivă afectează, în special, pacienții gravi și imunocompromiși, cum ar fi cei cu HIV (factorul de risc fiind numărul scăzut de CD4), pacienții cu cancer sau cu transplant de organe.

Talaromicoza invazivă este o boală gravă, mortalitatea variind între 12-21% la adulții cu infecție HIV. Durata spitalizării la pacienții cu infecții cu *T. marneffeii* este de aproximativ 27 de zile. Infectarea cu *T. marneffeii* generează un șir de complicații, inclusiv insuficiență respiratorie, cașexie.

Paracoccidioides spp.

Informații-cheie

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

Prezentare generală

Speciile de *Paracoccidioides* spp. sunt fungi dimorfi patogeni endemici în America Centrală și de Sud care trăiesc în diferite medii. Ratele globale de incidență anuală a acestor specii nu pot fi evaluate din lipsa de studii. Tendințele din ultimii zece ani sunt stabile.

Infectarea omului are loc după pătrunderea sporilor sub piele. Paracoccidioidomicoza afectează, în principal, plămânii, membranele mucoase și pielea, dar se poate extinde și la ganglionii limfatici, și la alte organe ale sistemului reticuloendotelial. Majoritatea persoanelor infectate cu specii de *Paracoccidioides* spp. nu dezvoltă niciodată simptome. Transmitere acestor agenți patogeni de la om la om nu a fost înregistrată. actorii de risc includ vârsta >40 de ani și sexul masculin.

Paracoccidioidomicoza este o boală gravă. Mortalitatea variază de la 3% până la 23%, în special la pacienții cu HIV, iar durata spitalizării pacienților infectați nu a putut fi evaluată din lipsă de date. Complicațiile generate de infecția cu *Paracoccidioides* spp. și de tratamentul acesteia includ rezervă suprarenală scăzută și limfedem.



Biosiguranța, cerințe specifice laboratorului de diagnostic microbiologic/micologic

Fiecare laborator microbiologic care prelucrează 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, ce trebuie întotdeauna respectate la prelucrarea probele suspecte la prezența agenților fungici, impun ca laboratorul microbiologic/micologic să funcționeze cu circuit în sens unic (separarea în timp și spațiu a circulației probelor pentru evitarea contaminărilor încrucișate), iar accesul în incinta laboratorului să fie limitat sau controlat.

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 de la pacienți cu suspecție 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 laboratorului.

Plăcile inoculate se vor închide și se vor așeza cu capacul în jos pentru evitarea deschiderii accidentale și contaminării mediului. Incubarea plăcilor se va face în termostate cu umidificatoare (preferabil). În cazul utilizării mediilor de cultură re-partizate 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.*) se va efectua în hote de protecție biologică clasa III. Plăcile cu astfel de culturi se etanșează obligator cu bandă adezivă sau sigilată cu parafilm 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.

Nu se recomandă încărcarea excesivă a spațiului de lucru, pentru a nu împiedica circuitul fluxului de aer, și mișcările excesive din jurul hotei care îi perturbă fluxul. Persoana care lucrează la hotă trebuie să efectueze mișcări lente. Pentru a reduce numărul intrărilor/ieșirilor, trebuie puse la îndemână toate cele necesare, iar obiectele pentru activitatea sub hotă trebuie dislocate 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.

În cazul incidentelor sau 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 ca să acopere genunchii, rezistent la lichide.

Echipamentul de protecție, cu care se lucrează în zonele de lucru cu risc biologic, după utilizare se va păstra într-o zonă amenajată cu spații (dulapuri), separat de hainele și lucrurile personale.

Este interzis de a purta halatele cu care se lucrează în laborator în afara zonei de lucru, cum ar fi sala de odihnă.

De fiecare dată când se lucrează cu probe biologice, se vor purta mănuși. La finalizarea lucrului, acestea se vor scoate respectând regulile, pentru a se evita contaminarea mâinilor, și se vor arunca în recipiente speciale. După îndepărtarea mănușilor, mâinile se igienizează.

În vederea stabilirii necesității protecției respiratorii, trebuie evaluate riscurile biologice, în special în timpul procedurilor care se efectuează în afara hotei de biosiguranță și a celor 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 prosopul se îndepărtează. Pe toată durata înlăturării incidentului sau accidentului, se vor purta mănuși de protecție.

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

Spectrul de activitate antifungică (fungicidă și fungistatică) a preparatelor dezinfectante este destul de limitat. Pentru decontaminare, se vor folosi preparatele înregistrate în RM și introduse în Registrul Național al produselor biocide respectând concentrația, timpul de contact recomandat de producător și termenul de valabilitate.



Cerințe pentru probe, tehnici de preexaminare

Generalități:

1. Prelevarea probelor în condiții de asepsie și plasarea lor în recipiente sterile și etanșe.
2. Transportarea specimenului la laborator în termen de 2 ore.
3. Transportarea rapidă este esențială pentru a asigura supraviețuirea și izolarea microorganismelor pretențioase și pentru a preveni dezvoltarea excesivă a bacteriilor mai rezistente la factori de mediu.
4. Asigurarea prelucrării probelor în termen de 2 ore de la primire. Dacă procesarea va fi întârziată, probele se incubează (sânge, măduvă osoasă, LCR sau material de leziune profundă) la 37°C sau la 35°C, dacă nu este disponibil un incubator de 37 °C). Probele potențial contaminate cu microbiota bacteriană (de ex., aspirații transtraheale, aspirații ale urechii interne) se refrigerază la 4°C.

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. Specimene precum sputa și țesuturile sunt examinate pentru orice semne evidente de purulență, de sânge sau de necroză/cazeoasă, zonele respective fiind selectate pentru microscopie și cultură.

Probele trimise la laborator, pe lângă informațiile demografice, trebuie să fie însoțite și de următoarele date:

- Sursa și/sau locul anatomic de recoltare;
- Cum și când a fost recolectată;
- Cum a fost transportată;
- Cum a fost păstrat specimenul în laborator după primire.

Comunicarea de către clinician a detaliilor zonei de reședință a pacientului, a istoricului călătoriei, a contactului cu animalele și a terapiei anterioare cu preparate antibacteriene, antifungice sau imunosupresoare poate ghida laboratorul către procesarea probei pentru un anumit patogen fungic. Întrucât astfel de informații se obțin cu greu de la medicul care transmite specimenul, toată informația necesară se va nota în formularul de trimitere/solicitare pe suport de hârtie sau în formă electronică.

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

1. Specimene colectate din surse considerate sterile:
 - LCR
 - sânge
 - măduvă osoasă
 - țesut chirurgical
 - fluide corporale
 - urină din cateter

2. Specimene obținute din surse considerate nesterile:
 - spută
 - aspirat traheal
 - lavajul și periajul bronhiilor (LBA, PBA)
 - urină 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, deși sunt inferioare probelor de țesut sau de lichid, 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

Specimene necorespunzătoare sunt considerate cele ce includ material primit în fixativ, urină de 24 de ore, specimene primite în recipiente cu scurgeri și cu material insuficient. În aceste cazuri, laboratorul trebuie să solicite recoltarea unui alt specimen, dacă este posibil.

TEHNICI DE PREEXAMINARE

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 la 1:10 până la de 1:20 (sânge-bulion), fiind necesar minim 5,0 ml de sânge pentru fiecare flacon de cultură. Flaconul de cultură bifazică este menținut cu aerisire și 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 tulbure, este imperativ de efectuat din conținutul flaconului frotiu Gram pentru a detecta elementele fungice. Culturile trebuie incubate la 30°C și menținute timp de patru săptămâni (pentru toți fungii).

Tehnica filtrului cu membrană

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

Sistem izolator de centrifugare-liză

Sistemul Wampole Izolator îmbunătățește în mod semnificativ recuperarea fungilor din sânge. Izolatorul utilizează un tub care conține componente ce lizează leucocitele, eritrocitele și inactivează complementul plasmatic și anumite antibiotice. Odată lezate, celulele eliberează microorganismele conținute, iar etapa de centrifugare asigură concentrarea microorganismelor în proba de sânge. Acest concentrat este apoi inoculat pe suprafața mediilor de cultură adecvate. Pentru fiecare tub sunt necesari zece mililitri de sânge, iar culturile trebuie incubate la 30°C și menținute timp de patru săptămâni.

Sisteme automatizate (hemoculturi)

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

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

- Se centrifughează cantități > de 2 ml.
- Până la 0,5 ml de specimen pot fi inoculate prin striere pe fiecare tip de mediu.
- Urina poate fi inoculată și striată cu o ansă calibrată, dacă se dorește cuantificarea.
- 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 de măduvă osoasă

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

4. Periaj bronșic

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

5. Probe respiratoare

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 precum Pancreatin, Sputolysin sau prin sonicare și 1,4-ditiotreitol. Este recomandată și 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

Mai multe bucăți de țesut se mărunțesc și se pun pe fiecare placă cu mediu, iar dacă se suspectează contaminarea bacteriană poate fi inclus și mediu inhibitor. Suprafața se zgârie și se încorporează o porțiune de țesut în zgârietură (această metodă oferă un gradient de tensiune a oxigenului, care facilitează inițierea creșterii fungice).



Particularitățile 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 de mortalitate la om, provocând un spectru divers de boli clinice, de la infecții superficiale și ale mucoaselor până la boli invazive asociate cu candidemie și implicarea metastatică a organelor.

Candidemia este a treia sau a patra cea mai frecventă cauză de infecții ale fluxului sangvin asociate asistenței medicale. Printre agenții patogeni ai candidemiei și a altor 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% de mortalitate atribuibilă, fiind 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. Astfel, 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.

Cateterele venoase centrale sunt, de obicei, legate de candidemie, dar nu sunt întotdeauna sursa, în special în rândul pacienților neutropenici la care sistemul gastrointestinal este o sursă comună. Managementul precaut al CVC-ului specific pacientului este critic în gestionarea 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.

Agenții patogeni ai candidozei, infecției micotice primare sau secundare, sunt speciile din genul *Candida* și din alte genuri înrudite (*Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Pichia* etc). Manifestările clinice ale candidozei pot fi acute, subacute sau cronice până la episodice. În proces pot fi implicate: cavitatea bucală, esofagul, pielea, scalpul, vaginul, degetele, unghiile, bronhiile, plămâni, tractul gastrointestinal. Infecția poate deveni sistemică, cauzând sepsis (candidemie), endocardită și meningită.

La indivizii sănătoși, infecțiile cu *Candida* afectează funcțiile barierei epiteliale și, de obicei, apar la toate grupele de vârstă, dar cel mai frecvent la nou-născuți și la vârstnici. Deseori aceste infecții 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 trebuie privită ca un contaminant, ci ca un indiciu de evaluare a infecției metastatice.

Candidoza invazivă este o infecție sistemică cu *Candida*, în prezența sau absența candidemiei, de exemplu infecția osteoarticulară și candidoza hepatosplenică. Candidemia este cea mai frecventă manifestare a candidozei invazive.

Factorii de risc asociați candidozei mucocutanate, invazive sau sistemice, sunt:

- 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 trei 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 cu 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. Printre principalii factori de virulență se numără:

- Moleculile de suprafață care permit aderența microorganismului la alte structuri (celule umane, matrice extracelulară, dispozitive protetice).
- Proteaze acide și fosfolipaze care asigură 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 două sindroame primare: candidemia și candidoza diseminată (infecție a organelor cu *Candida* spp.). Infecțiile profunde ale organelor induse de speciile de *Candida* sunt, în general, 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, al patrulea cel mai frecvent microorganism izolat în hemoculturi. Infecția cu *Candida* este considerată o infecție asociată asistenței medicale. În istoricul pacientului cu candidemie se constată:

- Câteva zile de febră care nu răspunde la antibiotice 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:

- 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:

- Candidoză legată de cateterul intravascular. Această entitate răspunde, de obicei, prompt la îndepărtarea cateterului și la tratamentul antifungic.
- Tromboflebită supurativă asociată cu cateterismul venos central prelungit. Tromboflebita supurativă se manifestă cu febră și cu candidemie persistentă, în ciuda terapiei antifungice adecvate și a îndepărtării cateterului. Se pot dezvolta sepsisul și șocul 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 (rezultat al inoculării directe în timpul intervenției chirurgicale) sau endogenă (indusă de diseminarea hematogenă). Endocardita cauzată de *Candida* spp. este asociată cu patru factori de risc principali, inclusiv consumul intravenos de droguri (asociată frecvent cu *C. parapsilosis*), chimioterapia, proteze valvulare (aproximativ 50% din cazuri) și utilizarea prelungită a cateterelor venoase centrale.

Examenul fizic relevă o gamă largă de manifestări, inclusiv febră care nu răspunde la antibiotice, hipotensiune arterială, șoc, suflu nou sau în schimbare și embolii septice vaste ale organelor.

Candidoză diseminată

Această formă de candidoză este asociată frecvent cu infecții profunde și multiple ale organelor sau poate implica infecția unui singur organ. Din păcate, hemocul-

turile sunt negative la 40-60% dintre pacienții cu candidoză diseminată. Istoricul unui pacient cu candidoză diseminată prezumtivă relevă o febră care nu răspunde la antibiotice cu spectru larg și rezultate negative din hemocultură. Examenul fizic evidențiază febră (poate fi singurul simptom) declanșată de un agent etiologic necunoscut, sepsis asociat și șoc septic.

Candidoza hepatosplenica (candidoză sistemică cronică)

Candidoza hepatosplenică, 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 antibiotice cu spectru larg;
- Durere în hipocondrul drept;
- Dureri abdominale și distensiune;
- Icter (rar).

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

Candidoza renală

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

Constatările la examenul fizic sunt, în general, ne semnificative, diagnosticul stabilindu-se pe baza analizei generale a urinei și a biopsiei renale. De cele mai multe ori, afecțiunea este diagnosticată la necropsie.

Infecții ale sistemului nervos central induse de specii de *Candida*

Infecțiile sistemului nervos central (SNC) induse de specii de *Candida* sunt rare și dificil de diagnosticat. Se disting două forme primare de infecție: exogenă și endogenă. Infecția exogenă rezultă din infecția postoperatorie, traumatisme, puncție lombară sau plasarea șunturilor. Infecția endogenă este consecința diseminării hematogene, cu implicarea 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 determinate de specii de *Candida* sunt frecvent întâlnite la pacienții cu internări prelungite în terapie intensivă.

Spectrul infecțiilor SNC include:

- Meningită;
- Vasculită granulomatoasă;
- Cerebrită difuză cu microabcese;
- Aneurisme micotice;
- Febră care nu răspunde la antibiotice cu spectru larg;
- Stare mentală alterată.

La examenul fizic se constată următoarele:

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

Artrită, osteomielită, costocondrită și miozită cauzate de *Candida* spp.

Infecțiile musculoscheletice 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 cel observat în infecțiile bacteriene.

Infecția poate fi exogenă sau endogenă. Infecția exogenă este rezultatul inoculării directe a microorganismelor, cum ar fi infecția postoperatorie sau traumatismele. Cele mai frecvente localizări sunt următoarele:

- Coastele și oasele membrelor inferioare (pacienți < 20 ani);
- Coloana vertebrală și abcesul paraspinal (la vârsta adultă);
- Oasele plate (orice grup de vârstă);
- Sternul, 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, evidențiindu-se sensibilitate în zona afectată, eritem și deformare osoasă, ocazional în asocieră 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 debutează ca o sinovită supurată. Un procent mare de cazuri evoluează spre osteomielită. Artrita cauzată de *Candida* după înlocuirea articulațiilor se întâlnește rar.

Osteomielita generată de *Candida* are originea fie exogenă, fie endogenă. Infecția exogenă este rezultatul inoculării directe a microorganismelor după intervenții chirurgicale, traumatisme sau injecții cu steroizi. Forma endogenă este o complicație a candidemiei sau a candidozei diseminate. În cele mai multe cazuri, ca urmare a diseminării hematogene, sunt implicate discurile vertebrale și infecția progresează frecvent spre discită cu extindere contiguă în corpul vertebrelor. Alte oase afectate pot fi: oasele mâinii, femurul, scapula și humerusul proximal.

Costocondrita este o formă necomună de infecție și se prezintă prin două moduri de infecție. Costocondrita candidozică este, de obicei, rezultatul răspândirii hematogene a infecției sau a inoculării directe în timpul intervenției chirurgicale (sternotomie mediană). Costocondrita este frecvent asociată cu durere localizată în zona afectată.

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

Miocardită-pericardită cauzată de specii de *Candida*

Această infecție este, de obicei, rezultatul răspândirii hematogene directe a agentului patogen în asociere cu candidemie și mai rar a extinderii directe a acestuia din stern sau din esofag. Miocardita-pericardita apare sub formă de abcese difuze răspândite în întregul miocard, fiind înconjurate de țesut cardiac normal. La pacienții cu candidoză diseminată, rata miocarditei-pericarditei este de 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;
- distensiune abdominală;
- durere abdominală de intensitate variabilă;
- greață, vome;
- 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*

Această formă a colecistitei este mai puțin frecventă, fiind asociată mai des cu colangita bacteriană și colangita ascendentă. În general, colecistita candidozică este diagnosticată în momentul intervenției chirurgicale, când este posibilă obținerea culturii.

4. Descrierea speciilor de *Candida* spp.

Candidoza reprezintă o infecție cauzată de specii din genul *Candida*, predominant fiind *Candida albicans*. Speciile de *Candida* sunt levuri omniprezente care cel mai des afectează oamenii, fiind considerate adevărați agenți patogeni oportuniști care exploatează progresele tehnologice pentru a invada fluxul sangvin și țesuturile profunde. În prezent, speciile de *Candida* afectează țesuturile în mod normal rezistente la invazie.

Speciile din genul *Candida* se caracterizează prin celule de formă diferită, de la globuloasă până la alungită. Pseudohifele și ocazional hifele adevărate pot fi, de

asemenea, prezente. Pigmentarea coloniilor lipsește, formează blastospori. Se reproduc prin înmugurire multilaterală cu bază îngustă. Reproducerea sexuală nu este caracteristică. Glucoza poate fi fermentată, nitrații se asimilează și nu sintetizează compuși asemănători amidonului.

Genul este foarte polifiletic, deoarece cuprinde specii mitosporice lipsite de caracteristici distinctive speciale. În urma unor revizuirii taxonomice, mai multe specii din genul *Candida* au fost trecute în alte genuri. În special, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*), *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*), *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefir*), *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 de *Candida* sunt agenți etiologici ai infecțiilor fungice, în special *Candida albicans*, urmată de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* și *Pichia kudriavzevii*. Aceste cinci specii provoacă peste 95% din infecțiile fungice umane. Pe lângă aceste cinci specii, sunt omniprezente și apar în mod natural la oameni și alte specii din acest gen.

Semnificative din punct de vedere medical sunt următoarele specii de *Candida*:

- *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 kefir* (< 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 cu candidoză invazivă.

Candida albicans este un comensal al membranelor mucoase și al tractului gastrointestinal, cel mai frecvent agent patogen fungic oportunist al oamenilor și cel mai frecvent izolat din hemoculturi. Deși face parte din flora gastrointestinală normală, *C. albicans* are capacitatea de a coloniza aproape toate țesuturile și organele umane, provocând infecții grave și invazive.

Fiind o specie polimorfă, *C. albicans* se poate dezvolta sub formă de celule levurice, pseudohife și hife, acest dimorfism fiind necesar pentru o virulență deplină. Datorită adaptabilității largi, specia poate dezvolta rezistență în urma unei expunerii prelungite la antifungice. Formarea de biofilme, care diminuează accesibilitatea antifungicelor, selecția de mutații spontane care cresc expresia sau scad sensibilitatea țintei, anomaliile cromozomiale, supraexpresia pompelor de eflux

multidrog și capacitatea de a ocoli apărarea imunitară a gazdei sunt câțiva dintre factorii care pot contribui la toleranța și rezistența la antifungice a *C. albicans*.

***Candida glabrata* complex**

Recent, *Candida glabrata* a fost recunoscută ca un complex de trei specii: *C. glabrata*, *C. bracarensis* și *C. nivariensis*. Aceste trei specii nu pot fi distinse din punct de vedere fenotipic, fiind identificate prin metode moleculare sau MALDI-TOF MS.

Candida glabrata, deși este una dintre cele mai comune specii de levuri de pe suprafața corpului, adesea este izolată incidental de pe piele și din urină. Specia este o cauză „oportunistă” atât a infecțiilor superficiale, cât și a celor sistemice, în special la pacienții imunocompromiși, izolată de la pacienții cu sepsis, pielonefrită, infecții pulmonare, cu endocardită și hiperalimentare. În prezent, specialiștii acordă o atenție deosebită *C. glabrata* ca urmare a creșterii incidenței acesteia la nivel mondial, asocierii cu rezistența la Fluconazolum de până la 20% din probele clinice și a sensibilității globale scăzute la alți azoli și poliene.

Candida parapsilosis a fost recunoscută ca un complex din patru specii: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* și *Lodderomyces elongisporus*. Aceste patru specii nu pot fi distinse, recurgându-se la 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 cateterelor venoase centrale și pe alte dispozitive implantate medical, amenințând astfel pacienții care au fost supuși unor intervenții medicale invazive. *C. parapsilosis* se dezvoltă rapid și 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 de 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 rezistență și 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, fiind și o parte a florei mucocutanate umane, izolată din materii fecale, creveți, chefir și sol. Specia este capabilă să producă pseudohife, biofilme rezistente și este foarte aderentă la celulele epiteliale și endoteliale. Conform datelor recente, *C. tropicalis* este rezistentă la medicamentele antifungice precum 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 saline, contribuind la exprimarea factorilor de virulență *in vitro* și la rezistența antifungică.

Candida krusei este o ascomicetă diploidă, care habitează pe membrana mucoasă a persoanelor sănătoase. Levura poate provoca infecții care pun în pericol viața indivizilor imunocompromiși, cu malignitate hematologică și a celor care folosesc profilaxia azolică prelungită. Specia prezintă interes prin rezistența intrinsecă la Ketoconazolum și Fluconazolum; și sensibilitate scăzută la toate celelalte antifungice, inclusiv Itraconazolum 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 prin sensibilitatea redusă la Amphotericinum B* și a capacității sale de a dobândi rapid rezistență la echinocandine.

Candida guilliermondii face parte din microbiota fungică normală a pielii și a mucoaselor umane. În cea mai mare parte a lumii, este un izolat neobișnuit al cărui comportament ca fung de mediu, saprofit uman și agent de infecții grave a fost evidențiat de-a lungul anilor. 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, un complex eterogen din punct de vedere genetic, cuprinde mai multe specii, dintre care trei 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 carophila*).

Incidența candidemiei cauzate de *C. guilliermondii* variază între 1% și 3%, în funcție de localizarea geografică, iar 95% sunt generate de *C. guilliermondii* sensu stricto. Din cauza sensibilității scăzute intrinseci la azoli și la echinocandine, tratamentul fungemiei cu *C. guilliermondii* reprezintă o provocare din ce în ce mai mare.

Candida lusitanae este un microorganism dimorf care produce celule levurice ovoidale, elipsoidale sau alungite, asemănătoare altor specii precum *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. lusitanae* nu este capabilă să dezvolte hife adevărate, ci doar pseudohife, care sunt o blastoconidie cu un tub de înmugurire îngustat între conidie și primul compartiment al tubului germinativ emergent. Dimorfismul acestui microorganism a fost legat de rezistența fungică la Amphotericinum B*. Plasticitatea morfologică a speciei oferă posibilitatea ca o celulă-ficică să supraviețuiască apărării imunitare a gazdei. Pe CHROMagar, coloniile generează o culoare roz spre purpurie, ceea ce permite diferențierea lor de coloniile speciei *C. tropicalis*, deoarece ambele specii sunt similare din punct de vedere morfologic.

În calitate de agent patogen, *C. 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* atrage atenția, unele izolate fiind rezistente la Amphotericinum B* și Fluconazolum. Dintre infecțiile provocate de speciile 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 genitourinară la pacienții ambulatori.

Candida dubliniensis, levură pozitivă pentru clamidospori și tuburi germinative și foarte strâns înrudită cu *C. albicans*, a fost descoperită în 1995 și recuperată, în principal, din cavitatea bucală a persoanelor infectate cu HIV și a pacienților cu SIDA din locații geografice foarte răspândite.

Candida auris este un fung emergent multidrog rezistent care provoacă infecții invazive. Descriș pentru prima dată în 2009 în Japonia, de atunci au fost înregistrate infecții și focare cauzate de *C. auris* în spitale din mai multe țări. Dificultatea de identificare a acestui fung, rezistența la mai multe medicamente, ratele mari de mortalitate asociate și supraviețuirea pe termen lung pe suprafețele din mediu, permit acestui fung să fie deosebit de problematic în mediul clinic. În multe țări, *C. auris* este acum o infecție care trebuie notificată conform reglementărilor de sănătate publică.

Candida haemuloni este în prezent considerată 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, *C. haemuloni* fiind 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 la 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 patru 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 patru 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 două săptămâni. Durata incubării de

patru săptămâni a fost contestată, deoarece puține culturi pozitive noi se dezvoltă în a patra săptămână. Însă s-a observat că culturile pozitive, semnificative din punct de vedere clinic, uneori devin vizibile în a patra săptămână, sugerând astfel necesitatea de a păstra această perioadă de incubație.

În zonele endemice, cu agenți patogeni dimorfi sistemici, trebuie luată în considerare incubarea timp de cinci 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, este necesară diferențierea între levuri și formele filamentoase (mucegaiuri) care pot necesita examinare microscopică. Se utilizează frotiu umed sau colorat cu lactofenol coton bleu (LPCB, anexa 5). Dacă izolatul sugerează o actinomicetă, se examinează cu colorația Gram și colorația acido-rezistentă modificată.

Mai multe caracteristici-cheie ale unor fungi pot fi obținute din culturi primare. Pentru levuri, acestea includ prezența unei capsule, caracteristicile de înmușurire (unice, 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. Când sunt observate levuri, setul de medii pentru subcultură trebuie 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 culturile primare

Medii cromogene

Mediile cromogene conțin substraturi enzimatică legate de compuși cromogeni. La scindarea de către enzime specifice, substraturile cromogene se colorează. Acțiunea diferitor enzime produse de speciile de levuri are ca rezultat o variație de culori, utilă pentru identificarea prezumtivă a unor levuri. Acest tip de mediu este potrivit pentru *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis* și *Trichosporon* spp. Mediul

cromogen nu este însă unica soluție pentru o identificare definitivă a levurilor. Pentru a inhiba contaminarea bacteriană a probelor primare, mediul conține clo-ramfenicol. Grupul de levuri identificat pe mediu cromogen poate varia în funcție de 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.

Procedeu

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

Pentru respectarea temperaturii și duratei de incubație, se vor 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 prezumtiv incorectă a unor specii de *Candida*.

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

Nu se utilizează colonii 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 permit doar identificarea prezumtivă până la patru-cinci 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 patru-cinci specii pentru a determina variația de culoare care poate apărea. Respectarea strictă a condițiilor de incubație ale producătorului este imperativă. Reactivitatea enzimatică este sensibilă la temperatură. Înainte de a efectua acest test, este necesar de a consulta instrucțiunile producătorului.

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

5.2 Identificarea 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 managementul medical al unor

situații clinice (de ex., candidoza intertriginoasă cauzată de *C.albicans*), dar insuficient 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 *C. dubliniensis* prezintă rezultate pozitive atât la tubul germinativ, cât și pentru enzimele β -galactozaminidază și L-prolin aminopeptidază.

Rezultatele obținute cu un test prezumtiv trebuie să fie în concordanță cu alte informații referitoare la levuri (culoarea coloniei și morfologia celulară) și la 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, iar unele teste, precum cele de screening pentru *C. albicans*, necesită colonii multiple în pregătirea inoculului și, prin urmare, culturile mixte vor furniza rezultate eronate.

Tabelul 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> (levuri bazidiomicete)
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 <i>in situ</i> 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*.

Procedeu:

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 incubații prelungite pot dezvolta tuburi germinative 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 preparatul la putere mare pentru prezența sau absența tuburilor germinative. 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 cinci tuburi germinative înainte de a declara izolatul pozitiv.

La microscopie, producția de tuburi germinative de către celule este prezumtivă pentru *C. albicans* și *C. dubliniensis* (Fig. 1, Fig. 2a).

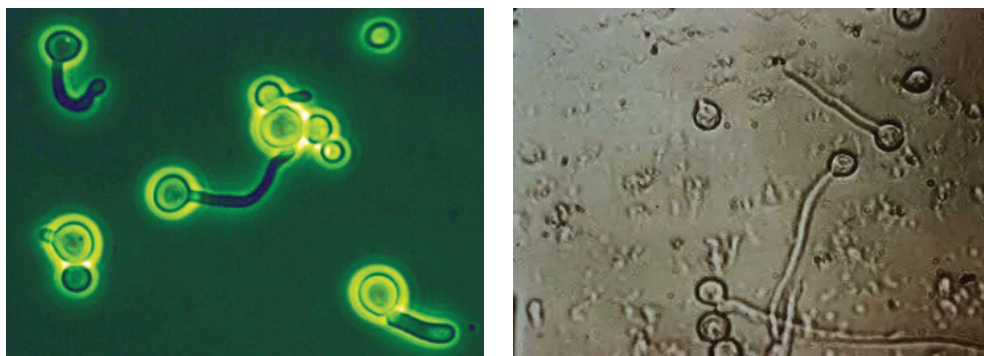


Fig. 1. Producerea de tuburi germinative de către *Candida albicans*, baza de tuburi germinative pozitive nu va avea constricții

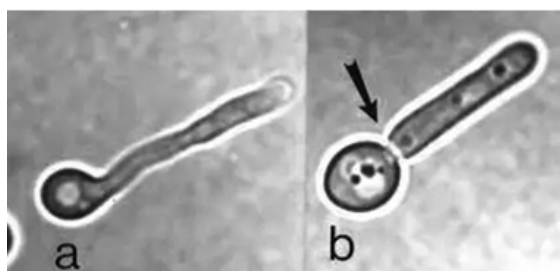


Fig. 2. Tub germinativ:
a) *C. albicans* și
b) *C. tropicalis* (pseudohife)

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 pseudogerminative, sunt mai frecvente la *C. tropicalis* (Fig. 2b). Izolatele de *C. tropicalis* vor fi identificate greșit ca fiind *C. albicans* până când cercetările de laborator vor face distincția între tuburile germinative reale și cele pseudo germinative.

5.2.2 Teste cu enzime preformate

Atunci când este crescută pe medii adecvate, *C. albicans* produce două exoenzime: L-prolin aminopeptidaza și β -galactozaminidaza. Detectarea acestor enzime cu un disc impregnat cu substrat cuplat cu cromogen, timp de secunde sau minute, permite identificarea prezumtivă a *C. albicans*. Sunt disponibile și kituri comerciale *C. albicans* screen (Remel; Murex) care utilizează discul impregnat. Identificarea prezumtivă a *C. albicans* bazată pe una dintre cele două enzime preformate menționate prezintă un nivel inacceptabil de scăzut al 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, din urină, din secreții vaginale și din 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 germinative în testul tubului germinativ, deși sunt prezente puține tuburi germinative 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 cu testul rapid de asimilare a trehalozei pentru a obține identificarea prezumtivă a speciilor comune asociate cu infecțiile fluxului sangvin (Fig. 3).

Procedeu:

- 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 o 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 o picătură de NaOH de 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 o picătură de reactiv cinamaldehydă. Dezvoltarea unei culori de la roz la roșu, timp de un minut se consideră un rezultat pozitiv. Lipsa culorii sau o culoare ușor galbenă este un test negativ.

Rezultate

Dezvoltarea unei culori galbene distincte la adăugarea de NaOH de 0,3% este un test pozitiv pentru β -galactozaminidază. Lipsa culorii galbene nu indică absența enzimei. Dezvoltarea unei culori roșii timp de un minut după adăugarea reactivului cinamaldehydă este un test pozitiv pentru L-prolin aminopeptidază.

Interpretarea rezultatelor

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

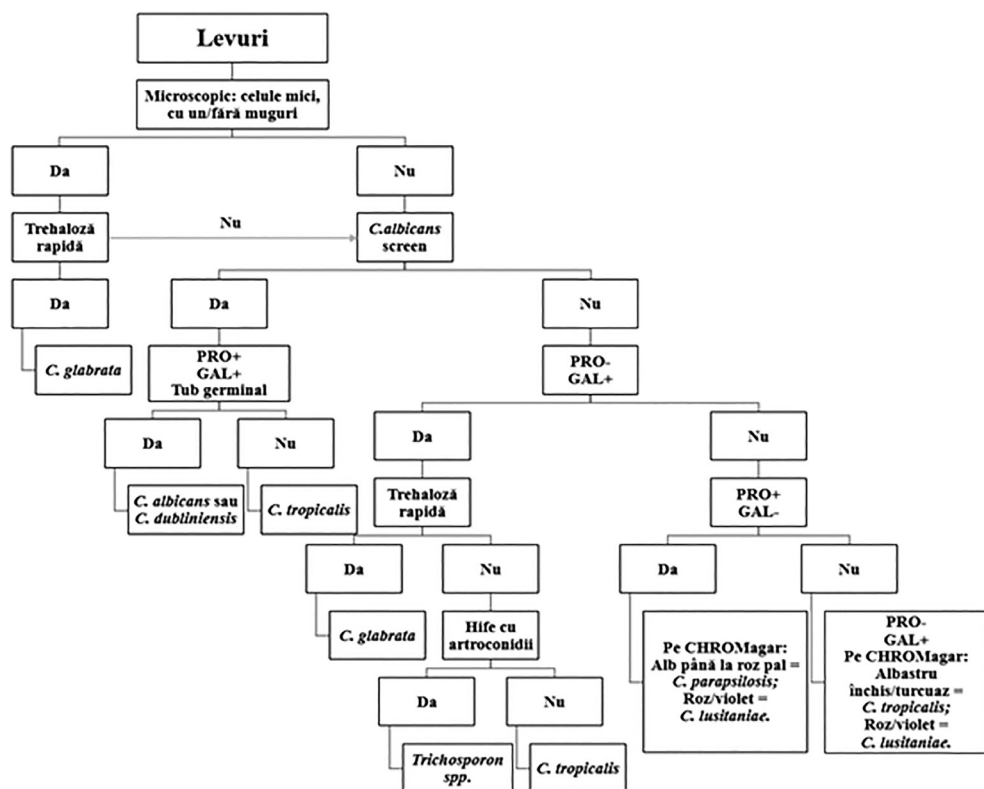


Fig. 3. Identificarea celor mai frecvente specii de *Candida*, importante din punct de vedere clinic, izolate din specimene sterile. Algoritmul presupune că a fost inclus ca mediul primar CHROMagar *Candida*

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 func-

ție de densitatea sa endemică. Pentru diferențiere între *C. albicans* și *C. dubliniensis* se folosește 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 levuriformi ascomiceți. Ureaza descompune ureea cu formare de amoniac și de 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, este necesar de a efectua un test definitiv al ureazei (de ex., agar cu uree înclinată).

Procedura 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 de ore.

Rezultate:

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

Activitatea ureazei la diferite specii:

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

* Variabil, în funcție 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 negative la utilizarea tubului germinativ și care nu au pseudohife, microscopic sunt mici (comparativ cu *C. albicans*) și pot fi *C. glabrata*, iar acest test rapid oferă o identificare prezumtivă.

Pentru a identifica prezumtiv *C. glabrata* sunt disponibile teste comerciale care evaluează în mod specific asimilarea sau fermentarea trehalozei (de ex., Hardy Diagnostics Trehalose Fermentation cu Durham Tube și Remel Yeast Fermentation Broth cu Durham Tube). Ca și în cazul testului cu bulion, incubația are loc la 42°C, deoarece aceasta oferă o selectivitate mai bună pentru *C. glabrata* față de alte specii.

Procedeu:

- a) Tuburile necesare pentru testare (depozitate la 2-8 °C), se lasă 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) Tuburile se monitorizează timp de 3 ore pentru o schimbare a culorii în galben.

Notă. Incubarea mai mult de 3 ore poate duce la rezultate fals pozitive. În cazul testelor comerciale, se respectă instrucțiunile producătorului.

Rezultate:

- a) Test pozitiv: o schimbare de culoare în galben în 3 ore de la incubație.
- b) Test negativ: culoare albastră, albastră-verzuie sau verde după 3 ore de incubație.

5.2.5 Control de calitate

a) Testul tub germinativ

Când se efectuează testul, trebuie incluse de fiecare dată următoarele tulpini de referință:

1. Tub germinativ pozitiv, *C. albicans* ATCC 14053;
2. Tub germinativ 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-galactozaminidază și L-prolina aminopeptidază) 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 reactiv, 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, pentru complicarea și prelungirea perioadei 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. ce pot fi utilizate doar pentru a identifica speciile din bazele de date respective, identificând uneori greșit fungi care nu sunt reprezentativi.

5.3.2 Identificare moleculară

Sensibilitatea 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 metodelor PCR. De fapt, hemoculturile ar trebui să fie pozitive în marea majoritate a infecțiilor active ale fluxului sangvin 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 prin oferirea de rezultat tardiv (timpul mediu până la pozitivitate – 2-3 zile, variind de la una la ≥ 7 zile) și de faptul că pot deveni pozitive relativ târziu în cursul bolii.

Culturile de țesuturi sau de 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 șase fungi (*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 fungi din flacoanele de hemocultură pozitivă și de 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 a regiunii D1/D2 a subunității ribozomale mari.

Întrucât echipamentele necesare pentru secvențiere nu sunt disponibile pe scară largă în laboratoarele de microbiologie, a fost dezvoltată 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 lor în 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 electroforeză pentru a separa fragmentele de ADN. Modelul benzilor de fragmente este apoi comparat pentru similitudine 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 ai levurilor care nu se rezolvă cu ajutorul electroforezei pe gel convențional. Metoda este diferită de alte metode de extragere a ADN-ului, deoarece celulele levurice sunt expuse la enzimele de digestie a peretelui celular și sunt lezate în timp ce sunt immobilizate în interiorul unor blocuri de agaroză. Cromozomii în acest caz rămân intacti și nu sunt fragmentați de acțiuni mecanice, ca și în caz de pipetare sau de vortexare.

Tehnica PCR a devenit un instrument puternic pentru identificarea speciilor, deoarece necesită mai puțin timp 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 (sondelor), iar produsele amplificate sunt separate prin electroforeză sau se determină secvența lor de acid nucleic. Au fost concepuți primeri care recunosc secvențe comune tuturor fungilor, 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 imunodeprimăte, dar testele au avut rezultate bune la pacienții cu neutropenie și cu 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 fost, de obicei, 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 este testul combinat cu Ag mannan/Ac antimannan, aprobat pentru utilizare în Europa (Platelia *Candida* Ag și Ab; Bio-Rad). Într-o metaanaliză a 14 studii, sensibilitatea/specificitatea pentru diagnosticul candidozei invazive a Ag mannan și IgG antimannan individual a fost de 58%/93% și, respectiv, 59%/83%. Valorile pentru testul combinat au fost de 83% și de 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 gestionarea candidozei invazive este neclar.

5.4.2 Detectarea β-D-glucanului

β-D-glucanul este un component al peretelui celular al speciilor din genurile *Candida*, *Aspergillus*, a speciei *Pneumocystis jirovecii* și a multor altele specii de 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 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 câteva 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 metaanalitice 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 precum 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, pozitivitatea falsă rămânând o limitare semnificativă dacă factorii enumerați sunt comuni în populația testată.

Rolul testării β -D-glucanului, pe alte probe decât ser, 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 a antigenului, anticorpiilor 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, făcând posibilă o terapie antifungică țintită. Pentru a realiza pe deplin beneficiile combinării testelor de cultură și non-cultură, 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. Procedeu

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

- a) Se va urmări insertul tehnic pentru pași specifici.
- b) Se prepară un frotiu din cultura fungică și se fixează pe lama de testare.

După adăugare, amestecul de sonde este lăsat să hibridizeze la secvențele țintă, după care lamelele sunt spălate. Frotiul este apoi examinat la microscopul cu fluorescență.

2. Rezultate:

- a) Pentru *C. albicans*/*C. glabrata*, testul PNA FISH: *C. albicans* prezintă fluorescență verde, iar *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, iar *C. tropicalis* - fluorescență galbenă.

6. Interpretarea rezultatelor

Unele teste descrise anterior sunt menite să ofere informații preliminare sau prezumtive (funghi filamentoși, levuri 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 folosind criteriile similare cu cele utilizate în bacteriologie pentru a decide semnificația clinică. La abordarea cuantificării bacteriologice pentru levuri s-a constatat 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 zece ori spațiul ocupat de același număr de bacterii. Drept urmare, 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 aspergilozelor umane sunt cauzate de *Aspergillus fumigatus* și de *Aspergillus niger*, mai rar de *Aspergillus flavus* și de *Aspergillus clavatus*.

Aspergiloza invazivă (AI) reprezintă o afecțiune gravă care poate afecta pacienții hematologici/oncologici și apare fie ca o infecție primară, fie ca o infecție secundară, care se dezvoltă pe parcursul tratamentului și poate deveni rezistentă la terapia antifungică. Pentru AI este caracteristică 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. AI are o mortalitate ridicată (30-60%) și au apărut noi grupuri de pacienți cu risc.

Repertoriul extins de tratamente pentru afecțiuni maligne hematologice și oncologice, cum ar fi ibrutinib 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, expunând pacienții la un risc crescut de AI și de alte infecții fungice invazive (IFI).

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

2. Aspecte clinice/epidemiologia

Epidemiologia AI în hematologie și în oncologie. Factori de risc

Printre pacienții cu malignități hematologice, incidența tuturor infecțiilor fungice invazive este cea mai mare la pacienții cu leucemie mieloidă acută, constituind 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 situația.

Speciile de *Aspergillus* reprezintă cea mai mare proporție din infecțiile invazive cu mucegai, 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, malignitatea activă, chimioterapia cu doze mari, corticoterapia, feritina crescută, AI anterioară și în transplanturile alogene, donator necorespunzător sau înrudit, boala greșă-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 tratament mai mult de trei linii, prezintă un risc crescut de infecții fungice invazive, în timp ce medicamentele imunomodulatoare sau inhibitorii de proteazom nu au crescut acest risc. Avansarea bolii poate afecta sistemul imunitar, contribuind astfel la imunosupresie și la creșterea riscului 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 ibrutinibul, alături de alți inhibitori ai tirozin kinazei Bruton, inhibitori ai punctelor de control imunitar, inhibitori ai janus kinazei și celu-

le CART modificate genetic. Utilizarea ibrutinibului este asociată cu un risc crescut de infecții fungice invazive, apărute timpuriu după începerea tratamentului și cu rate relativ ridicate de infecții ale sistemului nervos central, în special în cazul limfomului cerebral primar. Riscul de infecții fungice invazive după terapia cu celule CART CD19 este asociat și cu tratamentele anterioare, cu sindromul de eliberare de citokine care necesită administrare de steroizi sau de tocilizumab, precum și cu neutropenia prelungită.

Interacțiunile farmacocinetice cu agenții antifungici, inhibitori ai CYP3A4, sunt importante de luat în considerare atunci când se utilizează medicamente noi, cum ar fi venetoclax și ibrutinib. 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*. Acest risc este mai crescut printre pacienții cu transplanturi pulmonare și mai scăzut printre beneficiarii de transplant renal.

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.

Pacienții din unitățile de terapie intensivă, chiar dacă nu sunt considerați în mod obișnuit „imunodeprimați”, 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 lipsa unui diagnostic clinic și radiologic clasic, precum și a lipsei factorilor de risc tradiționali conform definițiilor EORTC/MSGERC pentru infecții fungice invazive.

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

3. Diagnosticul de laborator al aspergilozei invazive

Recomandări

- Examinarea histopatologică și cultura fungică 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 citohistologică (recomandare puternică, dovezi de nivel II).
- Pentru a diferenția *Aspergillus fumigatus* sensu stricto (în sens strict sau în forma 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-ului 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, considerată „standarul de aur”, este necesară pentru a clasifica o persoană ca având AI pulmonară dovedită și alte tipuri de AI asociate cu țesuturile, iar cultura de *Aspergillus* spp. dintr-o zonă sterilă susține un diagnostic de AI dovedită.

Caracteristicile-cheie ale acestor teste și recomandările privind efectuarea lor sunt prezentate 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 citohistologică.

Cultura de *Aspergillus* spp., în special din zone nesterile, ar trebui să fie o prioritate pentru clinicieni, deoarece poate ajuta la diagnosticarea unei posibile infecții invazive cu *Aspergillus*, transformând un caz posibil de AI într-un caz probabil de AI, în funcție de caracteristicile gazdei, radiologice și clinice relevante. Cultura poate furniza și un izolat util pentru identificarea speciei și testarea sensibilității la medicamente (pentru metodele comune de identificare, consultați anexa 4). 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-ului (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 scot în evidență structurile fungilor. Putem suspecta prezența aspergilozei examinând morfologia structurilor fungice. Suspectăm infecții cu *Aspergillus* dacă structurile fungice au hife înguste, regular septate și ramificate dihotomic (Fig. 4). În cazul fungilor filamentoși din ordinul *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.

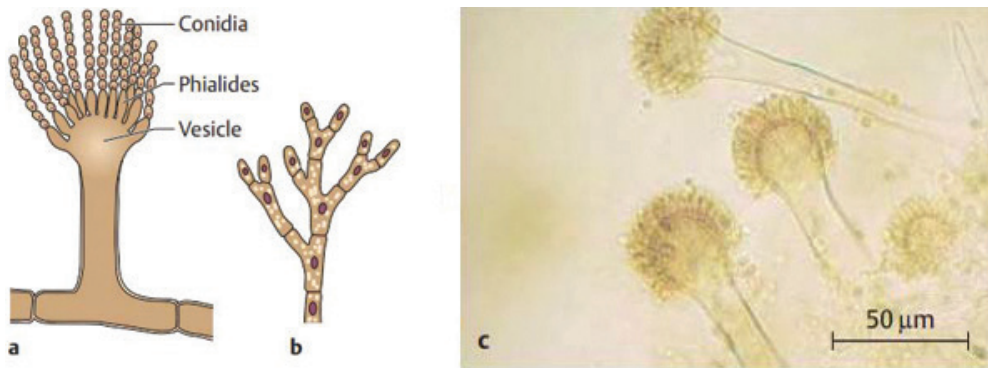


Fig. 4. *Aspergillus fumigatus*: (a) un conidiofor cu conidii (2-5 µm), (b) hife în formă de Y, septate (1.5-8 µm), (c) preparat nativ; conidiile au căzut.

Cultură fungică

Cultivarea are o sensibilitate redusă în cazul aspergilozei, iar izolarea permite testarea sensibilității. O izolare pozitivă din probele respiratorii indică aspergiloză invazivă sau poate fi doar un indicator al unei colonizări (de obicei după transplant pulmonar și în bolile pulmonare cronice). Odată ce fungii sunt izolați, se identifică prin: examinarea morfologiei, metode moleculare și spectrometrie de masă. Interpretarea datelor depinde de tabloul clinic al pacientului, de statutul său imun etc.

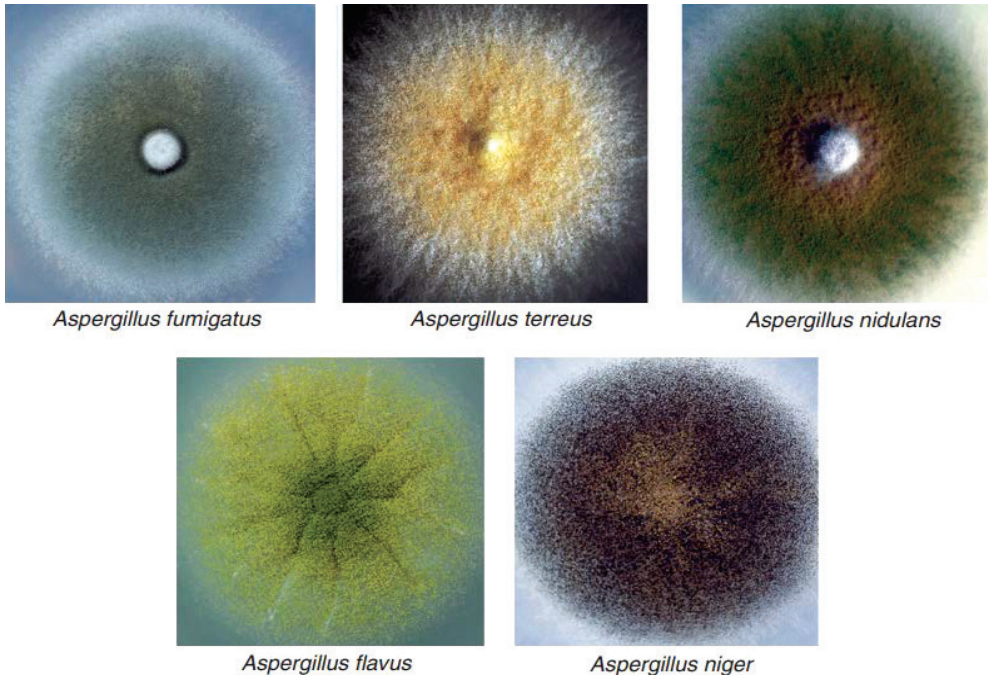


Fig. 5. Principalele specii patogene de *Aspergillus* - *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. flavus* și *A. niger* - au fost inoculate pe agar Czapek-Dox și cultivate la 37 °C

Czapek-Dox agar este un mediu de cultură frecvent utilizat pentru cultivarea fungilor, în special pentru speciile de *Aspergillus*. Destinația principală a acestui mediu este obținerea de conidii sau de spori pentru a facilita identificarea speciei.

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

Galactomannan - antigen fungic

Antigenul galactomannan este o componentă a peretelui celular al speciilor de *Aspergillus spp.* și se extinde în jurul lui dacă țesutul este invadat. Acesta poate fi detectat cu ajutorul testului imunoenzimatic ce poate fi efectuat din ser sau din probe bronhoscopice. Antigenul GM apare înaintea semnelor radiologice și clinice ale aspergilozei invazive, de aceea este folosit ca test de screening la pacienții neutropenici hematooncologici, care nu sunt sub profilaxie fungică. În cazul fungilor strâns legați de *Aspergillus spp.*, cum ar fi *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, pot apărea și reacții încrucișate.

RT-PCR - diagnostic molecular

Această metodă este deja validată, standardizată și inclusă în ghidurile internaționale de diagnostic al aspergilozei, spre deosebire de PCR pentru candidoză. RT-PCR este la fel de fiabil ca testele GM și β -DG, dar are și un avantaj: în probele LBA se detectează mai bine *Aspergillus* decât GM, care ar putea fi confundat cu alți fungi, de aceea este mai utilă în scopuri diagnostice.

C. Criptococoza

1. Generalități

Genul *Cryptococcus* cuprinde mai mult de 50 de specii, dintre care doar *Cryptococcus neoformans* și *Cryptococcus gattii* sunt considerate principalii agenți patogeni ai omului. Anterior, au fost identificate două variante ale speciei *C. neoformans* - var. *neoformans* și var. *gattii*. În prezent, pe baza elucidării secvențelor genomice, *C. neoformans* și *C. gattii* sunt considerate două specii distincte cu cinci serotipuri bazate pe specificitatea antigenică a capsulei polizaharidice; 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 porumbei. 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, inclusiv la 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, criptococomă). Un studiu epidemiologic din 2016 a relevat că *C. 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, rezultatelor testelor biochimice și a capacității 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 pe fecalele aviare bogate în creatinină. O altă caracteristică biochimică utilă a *C. neoformans*, care o deosebește de tulpinile nepatogene, este capacitatea de a produce melanină. Enzima fungică fenol-oxidaza acționează asupra anumitor substraturi (de exemplu, dihidroxifenilalanina, acid cafeic) pentru a produce melanina.

Contractarea levirii *C. neoformans* poate duce la colonizarea inofensivă a căilor respiratorii, la meningită sau la boli diseminate, în special la persoanele imunocompromise.

Criptococoza reprezintă o infecție fungică majoră care pune viața în pericol la pacienții cu infecția HIV, de asemenea poate 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 infecțiile cu *Cryptococcus spp.* au fost înregistrate la pacienții cu SIDA. În ultimii câțiva ani, datorită introducerii terapiei antiretrovirale foarte active, rata criptococozei a scăzut semnificativ în țările dezvoltate, cu o creștere a acesteia la pacienții HIV negativi. În rândul persoanelor care nu au acces la terapia antiretrovirală din țările în curs de dezvoltare, această infecție este o cauză majoră de mortalitate. În fiecare an, în Africa Subsahariană sunt raportate un milion de cazuri de criptococoză, 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, anual fiind raportate aproximativ un milion de cazuri de meningită criptococică.

Pacienții cu imunodeficiență mediată de celule T prezintă cel mai mare risc de infecții criptococice. Alți factori predispozanți (de ex., transplantul de organe, utilizarea corticosteroizilor sau a altor medicamente imunosupresoare) sunt frecvent raportați de sine stătător sau în asocieră cu alți factori de risc. Au fost înregistrate cazuri și la pacienți aparent sănătoși cu posibile erori de imunitate (de ex., o singură genă în axa IL-12/IFN γ). 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 criptococoză pulmonară la pacienții imunocompetenți:

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

Simptomele clinice în criptococoză 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;
- Temperatură 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, cu afazie și cu mișcări coreoatetozice.

După infecția pulmonară și a SNC, următoarele organe cel mai frecvent implicate în criptococoză sunt pielea, prostata și cavitatea medulară a oaselor.

Manifestările cutanate (10-15% din cazuri) în criptococoză sunt următoarele:

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

Alte forme mai puțin frecvente de criptococoză:

- Nevrită optică sau endoftalmită;
- Miocardită;
- Corioretinită;
- Hepatită;
- Peritonită;
- Pielonefrită;
- Necroză medulară a rinichilor;
- Abces renal;
- Miozită;
- Implicarea suprarenalelor.

4. Diagnosticul de laborator

Examenul la pacienții cu suspiciune de criptococoză include următoarele:

- Leziuni cutanate: biopsie cu microscopie și cultură fungică;
- 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 de spută, chiar dacă patologia renală sau pulmonară nu este evidentă clinic;
- La bolnavii cu SIDA, cu pneumonie criptococică, cu cultură din lavaj bronhoalveolar.

Examenul microscopic direct

Preparatul extemporaneu colorat cu tuș de India (anexa 5), folosit ca instrument de diagnostic rapid și ieftin, se bazează pe vizualizarea directă a capsulei criptococilor din fluidele corporale, în special din 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 la 30% până la 50% la pacienții non-HIV.

Prezența celulelor levuriforme de 4-6 μm cu un halou clar în jur (grosimea capsulei: de la un μm până la 30 μm) indică prezența criptococilor. Rezultatele fals negative, posibile în cazul capsulei subțiri, 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 pentru detectarea levurei în probele de țesut decât tehnica cu tuș de India. 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 șapte zile în cazul terapiei antifungice) pe majoritatea mediilor (de ex., agar dextroză Sabouraud) la temperatura de 25-30 °C sau de 35-37 °C. Mediile care conțin cicloheximidă nu sunt utilizate pentru cultivarea *C. neoformans*, deoarece este sensibilă la acest preparat. Pot fi utilizate și 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* care produce feniloxidază capabilă să oxideze acidul cafeic (din extractul de 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. 6 b, c). Această particularitate este utilă pentru cultivarea *C. neoformans* din prelevate contaminate sau colonizate de *Candida* spp. Unele tulpini de *C. neoformans* și non-*neoformans* nu produc feniloxidază și nu formează 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. Pentru detectarea levurilor în hemo-cultură poate fi mai sensibilă metoda de liză-centrifugare. Culturile negative cu examinări microscopice pozitive (preparatul cu tuș de India) pot fi explicate prin prezența criptococilor neviabili după terapie.

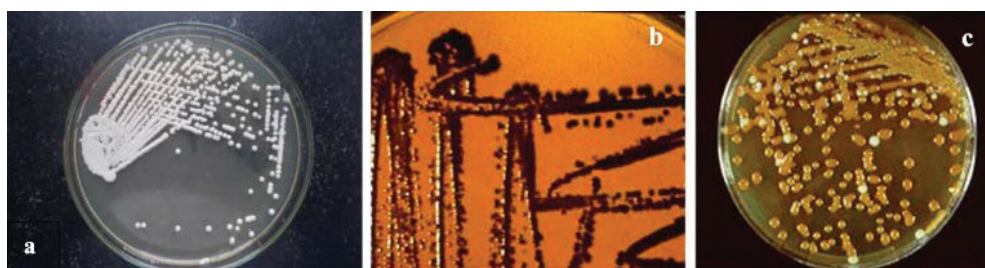


Fig. 6. a) Colonii mucoide de *C. neoformans* pe SDA; b) *C. neoformans* - colonii de culoare maro-neagră pe geloza cu semințe de Niger; c) *Cryptococcus laurentii*/*Saccharomyces cerevisiae*/*E. coli* - colonii nepigmentate pe geloza cu semințe de Niger

Profilurile biochimice nu arată nicio fermentație, producere de urează și nicio asimilare de nitrat, iar 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 în 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 în 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 (în prezența factorului reumatoid, reacției încrucișate cu antigenul *Trichosporon* spp. și speciilor nepatogene de *Cryptococcus*), cât și fals negative (în caz de fenomenul prozon, în absența utilizării pronazei, în infecții precoce).

FDA a aprobat un test de flux lateral (LFA) pentru detectarea semicantitativă rapidă (≤ 15 minute) a antigenului polizaharidic în ser sau în 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: anticorpii serici pot fi detectați prin reacția de aglutinare și de 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*. Există puține date despre utilizarea testelor PCR în detectarea speciilor *Cryptococcus* în scopuri de diagnostic.

Diferențierea speciilor de *Cryptococcus*

Diagnosticul de laborator al *C. gatti* nu diferă de cea a *C. neoformans*. Diagnosticul speciilor de *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. gatti*:

- 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 mediului. *C. gatti* 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 de 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*). 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 în practica de rutină nu este necesar să se cunoască 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, 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 de meningită 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, din plasmă sau din sânge integral.

Prevenire și screening

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

Recomandări

În cazul în care testul de determinare a antigenului criptococic este pozitiv, terapia antifungică 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 evaluate cu atenție, pentru semne și simptome de meningită, și supuse puncției lombare, dacă este posibil, cu examinarea LCR.

Atunci când testele de screening nu sunt disponibile, profilaxia primară cu Fluconazol trebuie administrată adulților și adolescenților cu HIV 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 criptococică. Această strategie combinată este asociată cu o mortalitate semnificativ redusă.

D. *Pneumocystis jirovecii*

1. Generalități

Pneumocystis jirovecii (anterior *Pneumocystis carinii*), un fung unicelular ubicitar, cu un ciclu de viață complex, se găsește la nivelul tractului respirator al multor mamifere și al oamenilor, iar conform estimărilor 60% din populație este infectată cu acest fung 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. Călea de transmitere a microorganismului nu este încă foarte clar stabilită, cea mai plauzibilă fiind transmiterea aerogenă.

După inhalare, microorganismul aderă la pneumocitele de tip I de la nivelul 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.

2. 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 de Est 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 luau imunosupresoare după transplant de organ solid. Abia în anul 1981, când infecția a fost depistată la un grup de utilizatori de droguri intravenoase și care nu prezentau o cauză cunoscută de imunosupresie, apare noțiunea de SIDA (corelată la scurt timp cu infecția HIV), iar numărul de cazuri de PPJ a crescut considerabil.

Odată cu introducerea tratamentelor și a profilaxiei infecției HIV la persoanele imunodeprimare, 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 infecția cu *P. jirovecii*:

- 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 nehematologice, inclusiv cu tumori solide și limfoame;
- persoanele cu malnutriție severă.

3. Aspecte clinice ale infecției cu *Pneumocytis 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 cazuri rare, 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.

4. Diagnostic de laborator

Lavajul bronhoalveolar

Actualmente, cel mai indicat prelevat pentru diagnosticul pneumoniei pneumocistice este LBA, considerat proba respiratorie de cea mai înaltă calitate, însă lipsa unei tehnici de recoltare standardizate poate influența calitatea testului. Bronhoscopia, efectuată după obținerea rezultatului negativ al investigării sputei induse, permite stabilirea diagnosticului în 51% din cazuri.

Limitări în aplicarea acestei proceduri invazive sunt costul ridicat, riscul mare pentru pacient și imposibilitatea aplicării în cazul pacienților cu boală pulmonară severă.

Sputa

Pentru a dezvolta tehnici mai puțin invazive în vederea obținerii probelor pentru testarea la prezența *P. jirovecii* au fost făcute mai multe încercări. Conform unei metaanalize, 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. În zonele cu prevalență ridicată și cazuri de suspiciune mare de pneumonie pneumocistică, trebuie efectuată 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. Există și dezavantaje teoretice, cum ar fi gradul crescut de inhibare a *P. jirovecii* din cauza secrețiilor faringiene și a incapacității 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 cu LBA, PCR al 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.

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 imunoenzimatică (ELISA) pentru detectarea anticorpilor și antigenelor asociate cu *P. jirovecii*.

P. jirovecii este extrem de dificil de cultivat, fiind 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 a 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 până la 100%, iar specificitatea de la 82 până 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)

La pacienții cu și fără HIV, PCR s-a dovedit a fi mai sensibilă pentru detectarea *P. jirovecii* decât metoda microscopică. Trei metaanalize 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. Sensibilitatea și specificitatea 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 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, precum și în probe bronșice cu sensibilitate și specificitate de 100%. Deși aplicațiile sunt vaste, datele sunt limitate și în prezent metoda nu este recomandată 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, ELISA IgM anti-*P. jirovecii* are o sensibilitate de 100% și o specificitate de 81% la testarea probelor

de ser. Răspunsul imun, fiind variabil în funcție de natura stării de imunodepresie, poate afecta sensibilitatea acestui test la anumite categorii de pacienți. Studiile anterioare au arătat modificări ale răspunsului imun la pacienții cu HIV, cu antecedente de transplant, cu 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 a biomarkerilor

Componenta (1,3)-Beta D-Glucan (BG) este un constituent al peretelui celular în forma de viață ascunsă 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 metaanaliză, 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 HIV negativi. Cu toate acestea, BG a fost doar în 75%, 84% și 86% specific pentru pneumonia pneumocistică, deoarece poate să fie pozitiv și în alte infecții fungice, la pacienții cu endotoxemie gramnegativă, 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, iar rezultatul negativ este suficient pentru a exclude diagnosticul de pneumonie pneumocistică, iar dezavantajul constă în faptul 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 aproape în toate țesuturile, nivelurile serice fiind 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 de 63% la pacienții HIV negativi, indicând faptul că acest marker poate fi util numai la detectarea pneumoniei pneumocistice la pacienții HIV pozitivi.

Alți antigeni, cum ar fi KL-6 și S-adenozil-metionina, 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 bronșiolare. Nivelurile serice de KL-6 sunt crescute la pacienții cu pneumonie pneumocistică, dar acest marker are specificitate scăzută ca urmare a creșterii sale în boala pulmonară interstițială și în alte boli infecțioase. S-adenozil-metionina (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 din grupa de control.

În ceea ce privește diagnosticul clinic, trebuie menționat faptul 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 de O₂ în sângele periferic. Modificările sunt mai grave în pneumonia cu *P. jirovecii* 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, legioneloză, tuberculoza sau infecția cu *Mycobacterium avium* complex. De aceea, un rol important în stabilirea diagnosticului îl are și anamneza pacientului, care poate fi îndeajuns de sugestivă pentru suspectarea pneumoniei cu *P. jirovecii*.

Odată suspectată, PPJ poate fi confirmată de anumite modificări în rezultatele 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 cu semne și cu simptome respiratorii. Modificările tipice induse de *P. jirovecii* pe radiografie sunt reprezentate de infiltrate perihilare sau interstițiale difuze. În cazurile în care pe radiografie apar modificări nespecifice sau aspectul pulmonar este normal (în aproximativ 1/3 din cazuri) 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 difuziune 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;
- Legioneloză;
- Tuberculoză;
- 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 imun incapabil de a face față agresiunilor fungice, cum este cazul pacienților imuno-compromiși, al celor cu infecție HIV/SIDA sau al pacienților care au suferit recent un transplant de organ.

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

În mediu, *H. capsulatum* se găsește în formă inactivă, însă poate deveni agresiv când pătrunde în organismul uman, unde găsește un mediu favorabil de multiplicare. Majoritatea indivizilor cu histoplasmoză rămân asimptomatici pentru o perioadă foarte lungă. Manifestarea, bolii este un semn că rezistența macroorganismului este scăzută sau că persoana a fost în contact cu o cantitatea foarte mare de fungi.

Organismul uman 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 se poate opune unei astfel de infecții. În cazul în care organismul se opune activ infecției, răspândirea acesteia întârzie cu una-două săptămâni.

Răspunsul sistemic imun și inflamator este adesea foarte complex și implică o cascadă de reacții generale ce presupun activarea citokinelor proinflamatoare, interleukinelor, macrofagelor. Sistemul imun competent poate limita semnificativ infecția. Astfel, în doar trei-șase 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 patogen în copilărie. Acești fungi 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 dejecțiile lilieciilor. Păsările și liliecii nu sunt infectați și nu prezintă manifestări clinice, ei fiind doar purtători de fungi. *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 inhalați de către oameni. În SUA, timp de 20 de ani, în zona unui șantier de construcții, s-au înregistrat aproximativ 700 de cazuri noi de histoplasmoză.

3. Aspecte clinice

Manifestările clinice ale histoplasmozei depinde de 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, răspândindu-se pe cale hematogenă și generând manifestări extrapulmonare.

Histoplasmoza nu este limitată strict la poarta de intrare, deoarece germenele are factori de patogenitate care îi permit să se extindă și la alte organe și sisteme. Totuși, histoplasmoza diseminată este rar întâlnită la adulții imunocompetenți, atacând mai frecvent pacienții cu afecțiuni ale sistemului imun, cu afectarea sistemului nervos central, a ficatului, a splinei, a ochiului, determinând și 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 cu simptome pot să dezvolte pericardită acută care poate declanșa, la rândul său, 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 unul 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 a gurii, hipotensiune arterială.

Granulomatoza mediastinală se caracterizează prin apariția unor adenopatii toracice mari, uneori cu cavități intraparenchimotoase, ce pot determina un sindrom de compresiune 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. Diagnosticul de laborator

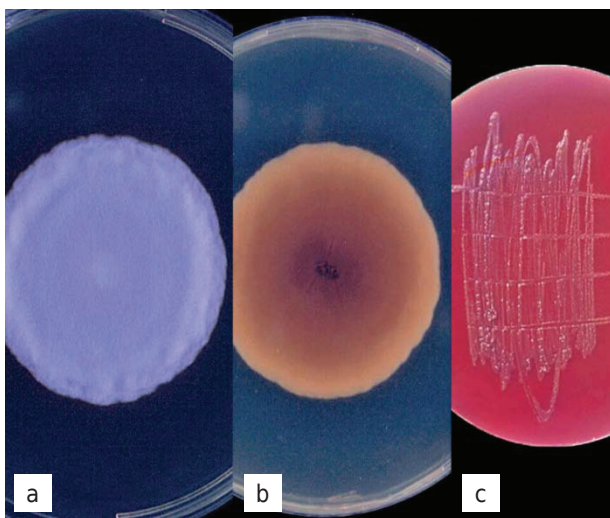
Metodele convenționale de diagnostic sunt încă utilizate pe scară largă pentru diagnosticul histoplasmozei. Diagnosticul se bazează pe izolarea fungilor în cultură sau vizualizarea levurilor intracelulare în țesuturi sau în alte probe clinice. Astfel, în pofida limitărilor cunoscute, aceste metode sunt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

Metoda culturală

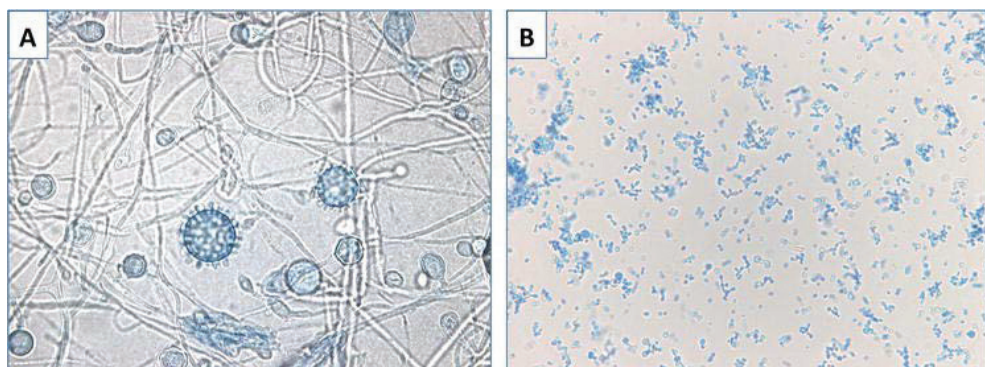
Izolarea *H. capsulatum* pe medii de cultură este standardul de aur pentru diagnosticul histoplasmozei. Recuperarea levurii prin cultură din probe clinice (hemocultură, lavaj bronhoalveolar etc.) este recunoscută drept criteriu de definire a histoplasmozei dovedite conform definițiilor consensuale ale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

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

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 macroconidii tuberculate tipice ușor de identificat (Fig. 8A). Alte specii, precum *Sepedonium* spp. izolat din obiectele de mediu, considerat un contaminant de laborator, produc structuri similare. Colonii levurice umede, moi și cremoase poate produce și *H. capsulatum* atunci când este cultivată la 37°C pe anumite medii (agar infuzie creier-cord cu sânge de berbec, Fig. 7 c). La 37°C (temperatura corpului uman), are loc o conversiune din faza micelară la forma de levură, care este 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. 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**



**Fig. 8. Preparate ale formelor filamentoase și levurice de *H. capsulatum*.
 (A) Cultura la 30°C prezintă macroconidii tuberculate (mărire 63x);
 (B) Cultura la 37°C 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, metoda culturală este utilă în histoplasmoza pulmonară diseminată și cronică, deși sensibilitatea variază de la 50 până la 85%.

Principalul impediment al metodei de cultură este timpul îndelungat de cultivare necesar pentru a obține cultura pură și necesitatea confirmării suplimentare prin alte metode a examinării microscopice a micetelor crescute. Identificarea moleculară este un instrument eficient 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 (levurică și filamentoasă), reducând astfel timpul de răspuns și riscul de manipulare a culturii.

Deoarece limitările menționate 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 cu 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 sunt fagocitate de macrofage, levurile ar putea fi găsite formând grupuri, ceea ce facilitează diagnosticul. Cu toate acestea, mai mulți fungi pot fi confundați microscopic cu *H. capsulatum*, cum ar fi, *Blastomyces dermatitidis*, endosporii de *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 în biopsia măduvei osoase la pacienții cu histoplasmoză diseminată. Specificitatea scăzută și nevoia

de personal calificat pentru a realiza un diagnostic prezumtiv sunt principalele limitări ale acestei tehnici.

Detectarea antigenelor

Detectarea antigenelor *H. capsulatum* în probele clinice a reprezentat un progres în diagnosticul precoce al histoplasmozei și de aproape 20 de ani este inclusă în criteriile EORTC/ MSGERC pentru diagnosticul infecțiilor fungice invazive. Antigenul polizaharidic *H. capsulatum* poate fi detectat atât în probele de ser, cât și de urină cu valoare diagnostică similară, fiind 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, iar unele studii indică capacitatea acestora de a monitoriza răspunsul la tratament.

În ultimii ani, tot mai mult sunt utilizate testele imunocromatografice. Aceste teste sunt ușor de utilizat, rezultatul este rapid (mai puțin de o oră) și necesită echipamente de laborator minime, ceea ce facilitează implementarea lor în țările cu venituri mici și medii. Deși au fost testate doar pe probe de ser de la pacienții cu SIDA, performanța lor de diagnostic este promițătoare (sensibilitate de 96%, specificitate de 90%). Cauza rezultatelor fals pozitive și negative este reactivitatea încrucișată cu alte micete endemice ale tratamentului cu antibiotice, fiind necesară o etapă pretratament care prelungește timpul de obținere a rezultatelor.

Detectarea anticorpilor

Principalele avantaje ale testelor de detectare a anticorpilor sunt probele minim invazive și obținerea de rezultate atunci când cultura este încă negativă, reducând astfel necesitatea de manipulare a fungilor potențial infecțioși. Tehnicile serologice precum fixarea complementului sau imunodifuziunea 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), iar sensibilitatea lor în histoplasmoza pulmonară acută și subacută este de 95%.

La pacienții imunodeprimați, din cauza titrurilor scăzute sau absente de anticorpi, sensibilitatea acestor teste este foarte limitată. O metaanaliză recentă a descris valori de sensibilitate și de specificitate de 58% și, respectiv, 100%, în probe de la pacienții cu HIV. Anticorpii specifici apar într-un interval de două-șase săptămâni de la expunere și au o valoare limitată în diagnosticul histoplasmozei acute, însă pot fi importanți în formele cronice. Interpretarea rezultatelor serologice ar putea fi dificilă și din cauza că seropozitivitatea rămâne mult timp după boală.

În pofida limitărilor descrise, testele de detectare a anticorpilor sunt încă considerate instrumente de diagnosticare valoroase și care 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, pentru diagnosticul histoplasmozei fiind disponibile mai puțin teste PCR.

Avantaje ale acestor teste sunt simplitatea, specificitatea înaltă și timpul scurt de obținere a răspunsului. PCR (qPCR) permite determinarea în timp real a sarcinii fungice la pacienți prin utilizarea coloranților nespecifici de legare a ADN-ului sau a sondelor marcate fluorescent.

Tehnica dată are și 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 în prezent nu sunt comercializate. 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 de 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 primerii universali pot permite detectarea oricărui 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 proiectate pentru a amplifica ADN-ul țintă. La implementarea acestei tehnici pentru diagnosticul molecular al histoplasmozei s-au obținut rezultate excelente. Eficiența ridicată, sensibilitatea, specificitatea și rentabilitatea acestor teste le fac candidate bune pentru a fi implementate în rutina de diagnosticare a laboratoarelor cu resurse limitate.

Diagnosticul de meningită provocată de *H. capsulatum* este adesea dificil de stabilit, iar examinarea LCR pune în evidență pleocitoză limfocitară, nivel crescut de proteine și scăzut de glucoză. Preparatele sunt, de obicei, negative, iar culturile din LCR sunt pozitive într-un număr foarte mic de cazuri. Într-un studiu recent privind histoplasmoza SNC, care a inclus pacienți cu infecție HIV, culturile din LCR au fost pozitive doar la 38% dintre pacienți. Antigenul *H. capsulatum* poate fi detectat în LCR în mai multe cazuri, iar anticorpii împotriva *H. capsulatum* 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 *H. capsulatum* 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 în vederea stabilirii unei terapii antifungice prompte și, în consecință, reducerea ratelor de morbiditate și de mortalitate ale acestei infecții.

a) Timp lung de răspuns

b) Timp scurt de răspuns

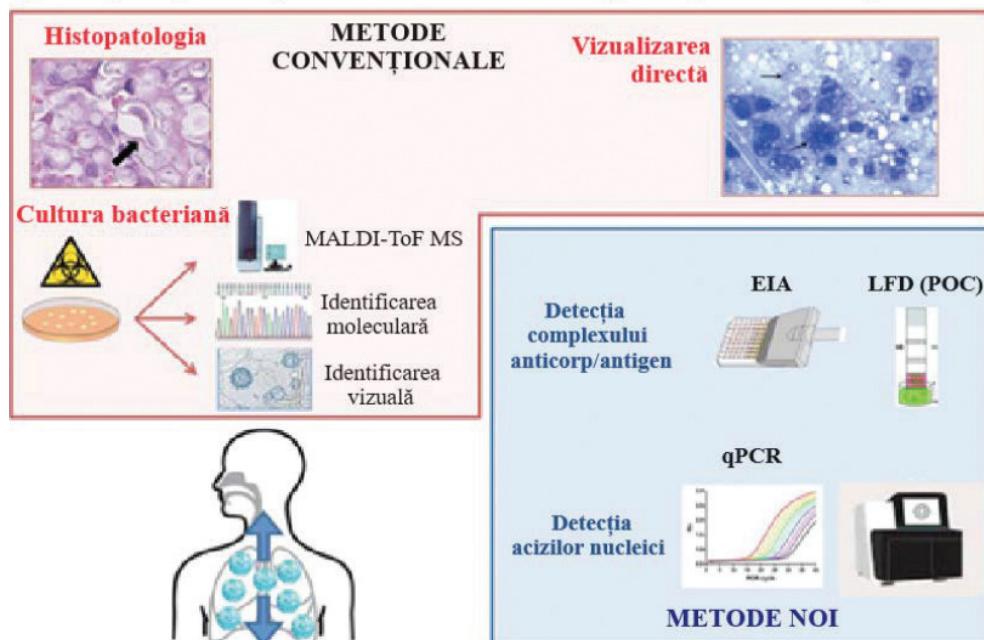


Fig. 9. Algoritm de diagnostic al histoplasmozei disponibil în prezent:
a) Timp lung de răspuns cu efectuarea preparatului histopatologic care prezintă levuri de *H. capsulatum*; b) Timp scurt de răspuns cu vizualizarea directă a citologiei de aspirație cu ac fin care pune în evidență levuri intra- și 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*. Cele mai multe microorganisme implicate în infecțiile umane fac parte din genul *Rhizopus*. Genurile importante din punct de vedere medical, care provoacă mucormicoza sistemică, sunt *Mucor*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces*, *Lichtheimia*, *Saksenaea*, *Rhizomucor*, *Cokeromyces* și *Mortierella* (Fig. 10). Reprezentanții acestor genuri sunt fungi primitivi, cu creștere rapidă, terestre, în mare parte saprofite, cu o distribuție cosmopolită. Din cele circa 665 de specii descrise, doar câteva provoacă infecții la om și la animale.

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.

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

2. Factorii de risc

Condițiile imunocompromițătoare 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 sporit includ pacienții cu transplant de organe, cu cancer, în special cei neutropenici și 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 reumatoidale). Unui risc crescut sunt expuși pacienții cu cancer hematologic care prezintă infecții oportuniste cu citomegalovirus și boala grefă contra gazdă. 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 speciile de *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, nesterile sunt asociate cu mucormicoza cutanată. 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 mucormicoză.

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

3. Fiziopatologia

Mucorales sunt fungi omniprezenți care se găsesc în mod obișnuit în sol și în materia în descompunere, iar speciile de *Rhizopus* pot fi găsite în pâinea mucegăită. Principala cale de infectare este inhalarea conidiilor, alte căi posibile fiind ingestia și inocularea traumatică. Ingestia duce la afecțiuni gastrointestinale și apare, în principal, în rândul pacienților malnutriți, dar poate apărea și după ingerarea de substanțe nenutritive.

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); sporii ajunși în plămâni induc boala pulmonară, când sunt ingerați apare forma gastrointestinală a mucormicozei, iar când traversează bariera tegumentară se dezvoltă boala cutanată.

Factorul de virulență implicat în patogeniza *Mucorales* este permeaza de mare afinitate pentru fier (FTR1), ceea ce permite supraviețuirea acestor specii în medii sărace în fier. Proteina de acoperire a sporilor (Cot H), prezentă pe suprafața *Mucorales*, afectează apărarea gazdei, iar factorul de ADP-ribosilare facilitează creșterea *Mucorales*. Neutrofilele sunt principala apărare a gazdei împotriva acestor fungi, de aceea persoanele cu neutropenie sau disfuncție a neutrofilelor (diabet, utilizarea de steroizi) prezintă cel mai mare risc de a dezvolta boala. La pacienții cu SIDA au fost raportate puține cazuri de mucormicoză, 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 deregla bariera endotelială, ceea ce duce la creșterea virulenței fungice. Expunerea la Voriconazolum printr-un mecanism necunoscut și nu datorită presiunii selective, duce la dezvoltarea mucormicozei invazive.

4. Epidemiologia

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

Incidența mucormicozei pare să fie în creștere ca urmare a sporirii numărului de persoane imunocompromise. Există, de asemenea, tot mai multe rapoarte de apariție a mucormicozei în contextul profilaxiei antifungice sau al tratamentului (de ex., Voriconazolum, echinocandine) care este eficient împotriva majorității fungilor, precum *Aspergillus*, dar nu și împotriva mucormicozei. Îmbunătățirea diagnosticului timpuriu prin intermediul unor modalități precum MALDI-TOF, PCR și secvențierea ARNr 18s indică faptul 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, în special în Asia și în 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 estimativ de 140 de cazuri la un milion de locuitori, ceea ce reprezintă o prevalență de aproximativ 80 de ori mai mare decât cea din țările dezvoltate. Începând cu mai 2021, ca urmare

a valului de mucormicoză asociată cu COVID-19 și a directivei guvernului indian, în mai multe state din India mucormicoza este o boală cu declarare obligatorie, ceea ce va permite o mai bună înțelegere a poverii bolii, a caracteristicilor populației, a factorilor de risc, a spectrului clinic și a rezultatelor tratamentului acestor pacienți.

Tendențele actuale indică faptul că mai predispuși la mucormicoză sunt persoanele cu diabet preexistent, cele care administrează corticosteroizi sistemici și persoanele cu COVID-19, cât și cele care se recuperează din această boală.

Transmiterea mucormicozei

Mucormicoza nu este contagioasă, nu se răspândește prin contact de la o persoană la alta. Agenții patogeni ai mucormicozei 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, spatule din lemn, lenjerie de spital, camere cu presiune negativă, scurgerile de apă, filtrarea deficitară a aerului, dispozitivele medicale nesterile și construcția clădirilor.

Cel mai frecvent sunt afectate sinusurile sau plămânii, după inhalarea sporilor fungici din mediul înconjurător, de unde infecția se poate răspândi la creier și ochi. Boala poate apărea și pe piele, după ce o tăietură, o arsură sau alt tip de leziune a pielii se infectează.

5. Aspecte clinice

În funcție de localizarea anatomică, mucormicoza poate fi clasificată în una din cele șase forme: (1) rinocerebrală, (2) pulmonară, (3) cutanată, (4) gastrointestinală, (5) diseminată și (6) cu prezentări neobișnuite. Manifestările mucormicozei depind de localizare.

Forma rinocerebrală

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

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

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

Proptoza, ptoza, chemoza și oftalmoplegiile indică o extensiune 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, frecvent apare cu afectarea concomitentă a sinusurilor.

Examenul pulmonar poate evidenția scăderea sunetelor respiratorii și raluri. Ocazional, adiacent bolii parenchimatose de bază poate apărea celulita peretelui toracic, 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. Această formă a mucormicozei poate fi primară și secundară.

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

Mucormicoza cutanată secundară este rezultatul răspândirii hematogene a agentului patogen și debutează prin dezvoltarea unor leziuni dureroase, eritematoase ce progresează într-o ulcerăție necrotică.

Forma gastrointestinală

Mucormicoza gastrointestinală afectează, de obicei, persoanele cu subnutriție gravă sau 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. Infecția poate interesa 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.

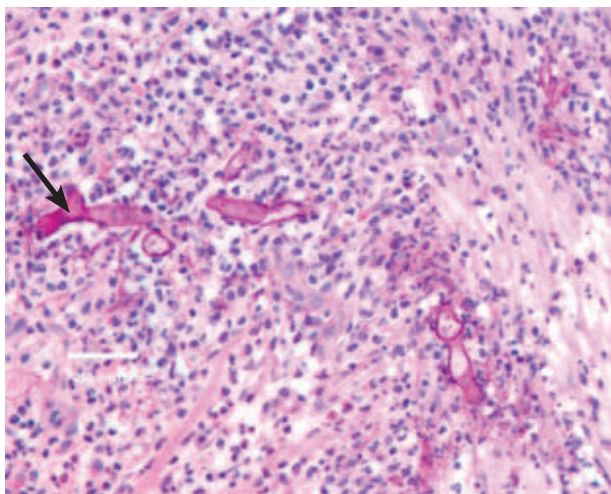


Fig. 11. Elemente fungice compatibile cu Mucorales în peretele jejunului. Colorație Diastase-periodic acid-Schiff

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, iar în dializa peritoneală continuă ambulatorie a fost descrisă peritonita.

Alte forme ale mucormicozei care includ sistemul nervos central

Afectarea sistemului nervos central, fiind una din cele mai frecvente cauze ale formei diseminate a mucormicozei, 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.

6. Diagnosticul de laborator

Generalități

Diagnosticul în timp util, primordial în cazurile de mucormicoză, necesită o cultură pozitivă și modificări histopatologice, însă în anumite cazuri, în care cultura nu poate fi disponibilă sau rezultatele pot fi negative; diagnosticul se realizează 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 Micologie Medicală (ECMM) a stabilit o abordare diagnostică bazată pe simptome și pe factorii de risc subiacenți conform căreia:

- la pacienții 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 sau PCR multiplex (18s, ITS, 28s sau ADN ribozomal);
- la pacienții cu durere facială, sinuzită 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 ribozomal).;
- la pacienții cu antecedente de traumatisme și de manifestări cutanate trebuie obținută o biopsie a leziunii și trimisă pentru histopatologie, pentru cultură cu test de sensibilitate și de 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 care a provocat mucormicoza.

Pentru a evalua dacă există neutropenie, trebuie obținută o enumerare completă a celulelor sangvine. Un panel chimic, care include glicemia, bicarbonatul și electroliții, este util pentru a monitoriza homeostaza și a corecta acidoza. Un studiu al gazelor din sângele arterial poate ajuta la determinarea gradului de acidoză și poate ghida terapia corectivă. Pot fi indicate teste pentru a evalua prezența supraîncărcării cu fier în funcție de 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 fermitate obținerea unei culturi a specimenului pentru a identifica microorganismul. Culturile trebuie incubate la 25-30°C și la 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). Absența pereților încrucișați face ca fluidele din hifă să se scurgă liber, iar ca rezultat, 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 în anexa 5).

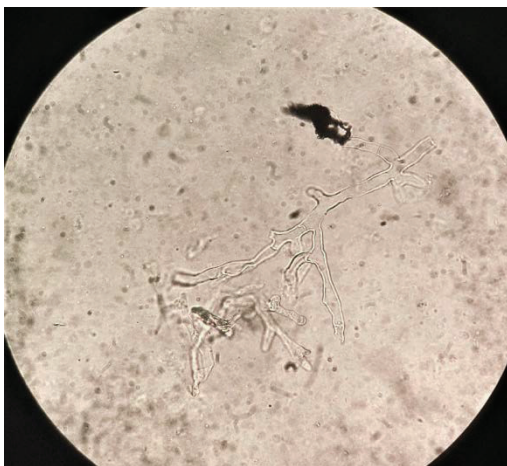


Fig. 12. Montajul umed cu KOH prezintă hife caracteristice largi, neseptate, în formă de panglică, cu ramificații în unghi larg sau drept (*Mucorales*)

Metoda culturală permite identificarea agentului patogen la nivel de gen și de specie. Majoritatea speciilor de *Mucorales* importante din punct de vedere medical sunt termotolerante și pot crește rapid la 35-37°C, practic pe orice mediu carbohidrat, coloniile apărând în 24-48 de ore. Acestea se dezvoltă și pe SDA cu antibiotice la ambele temperaturi: de 25°C și de 35-37°C. Identificarea speciilor se bazează pe morfologia coloniei, morfologia microscopică și pe temperatura de creștere.

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 pofida demonstrării directe a fungilor, deoarece în timpul manipulării/procesării biopsiei, toată citoplasma se scurge și microorganismul pierde vitalitatea. Prin urmare, pentru izolare ar trebui să se utilizeze medii de îmbogățire.

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 foarte viguroasă, de aceea unele dintre ele sunt numite „ridicători de capac”, deoarece apasă de jos pe capacul cutiei Petri (Fig. 13, 14). Coloniile mai vechi sunt de culoare crem sau gri-maronie. Hifele la speciile de *Mucor*, în comparație cu *Rhizopus*, nu au rizoizi sau stoloni.

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 zigospor.

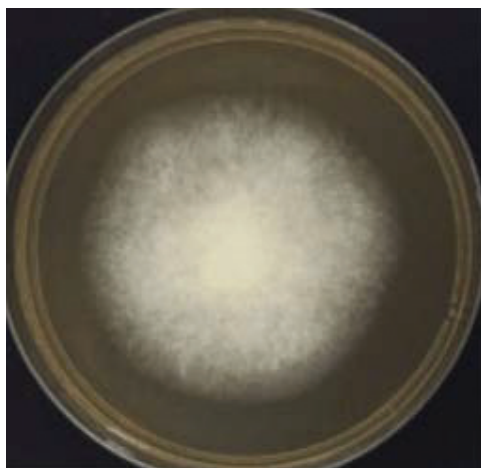


Fig. 13. *Mucor* pe Sabouraud dextrose agar

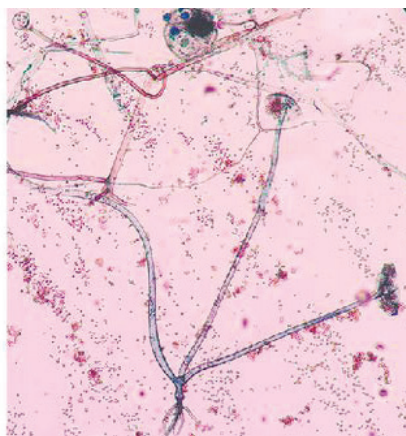
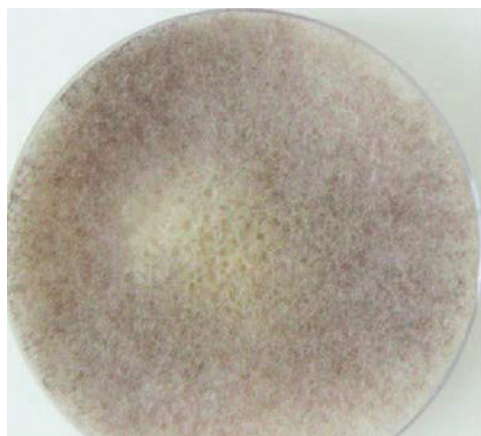


Fig. 14. *Rhizopus* pe SDA și tease montare (Lactophenol cotton blue, ×100)

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).

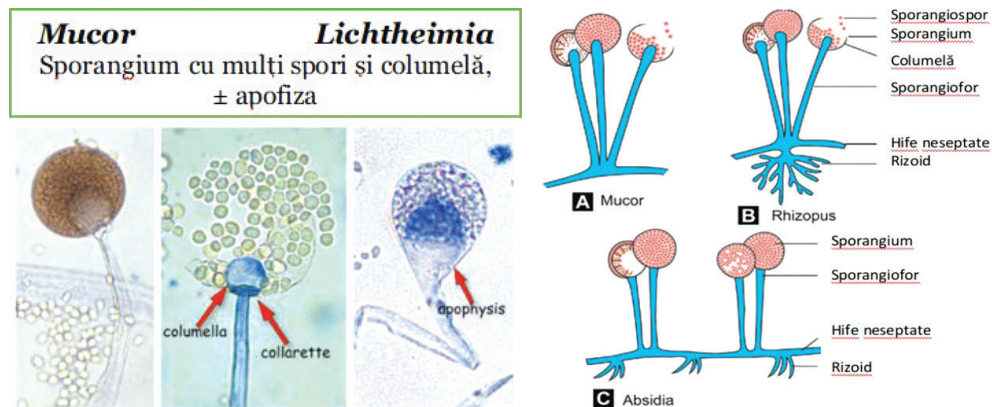


Fig. 15. Reprezentarea microscopică a Mucorales

Majoritatea izolatelor sunt heterotalice, adică lipsesc zigosporii și identificarea se bazează, în principal, pe morfologia sporangiului ce 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 cu utilizarea unei picături de alcool 95% ca agent de umezire pentru a reduce bulele de aer.

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

Metode generale de preparare și de colorare a coloniilor de fungi filamentoși

- Frotiu umed cu Tween 20
- Montare cu bandă adezivă
- "Tease" montarea (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 prelucrat cu parafină, deoarece formalina deteriorează ADN-ul. A fost descrisă utilizarea testelor qPCR pentru detectarea ADN-ului circulant al 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 nouă zile, cu cel puțin două 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 de LBA.

Secvențierea ARN-ului ribozomal 18s oferă o identificare la nivel de gen, chiar dacă deteriorarea țesutului împiedică dezvoltarea fungilor, iar 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. Pentru a institui prompt un tratament chirurgical și medical pentru infecție, ar trebui efectuată o evaluare histologică rapidă a unei secțiuni de țesut congelat.

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 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

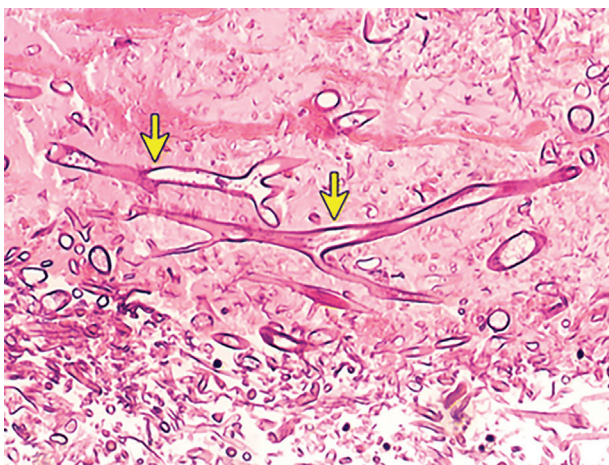


Fig. 16. Fotomicrografia hifelor *Mucor*. Se vizualizează hife largi (săgeți), asemănătoare unor panglici, cu o lățime de 7-15 μm (colorație cu hematoxină-eozină; mărire originală, x 600). Hifele nu au septuri regulate și sunt pauciseptate, au ramificații neregulate cu unghiuri largi

consecințele caracteristice ale procesului infecțios. Astfel, se observă adesea infiltrarea neutrofilelor, invazia vaselor și infarctul tisular sau o reacție granulomatoasă.

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 Fluconazolum, Voriconazolum și echinocandine.

7. Tratamentul și prevenția

Tratamentul mucormicozei

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

Alte considerente importante în tratamentul medical al mucormicozei 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 glucocorticosteroidilor și altor medicamente imunosupresoare.
- Întreruperea tratamentului cu Deferoxaminum* care poate fi înlocuit cu agenți chelatori de hidroxipiridină.

Tratamentul de 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, ceea ce presupune o abordare multidisciplinară în cadrul unei instituții medicale.

Amphotericinum B* liposomală, medicamentul de elecție în caz de mucormicoză, trebuie administrat cât mai precoce. Alte antifungice, cum ar fi posaconazolul sau Isavuconazolul*, de asemenea, au manifestat eficiență în tratamentul mucormicozei.

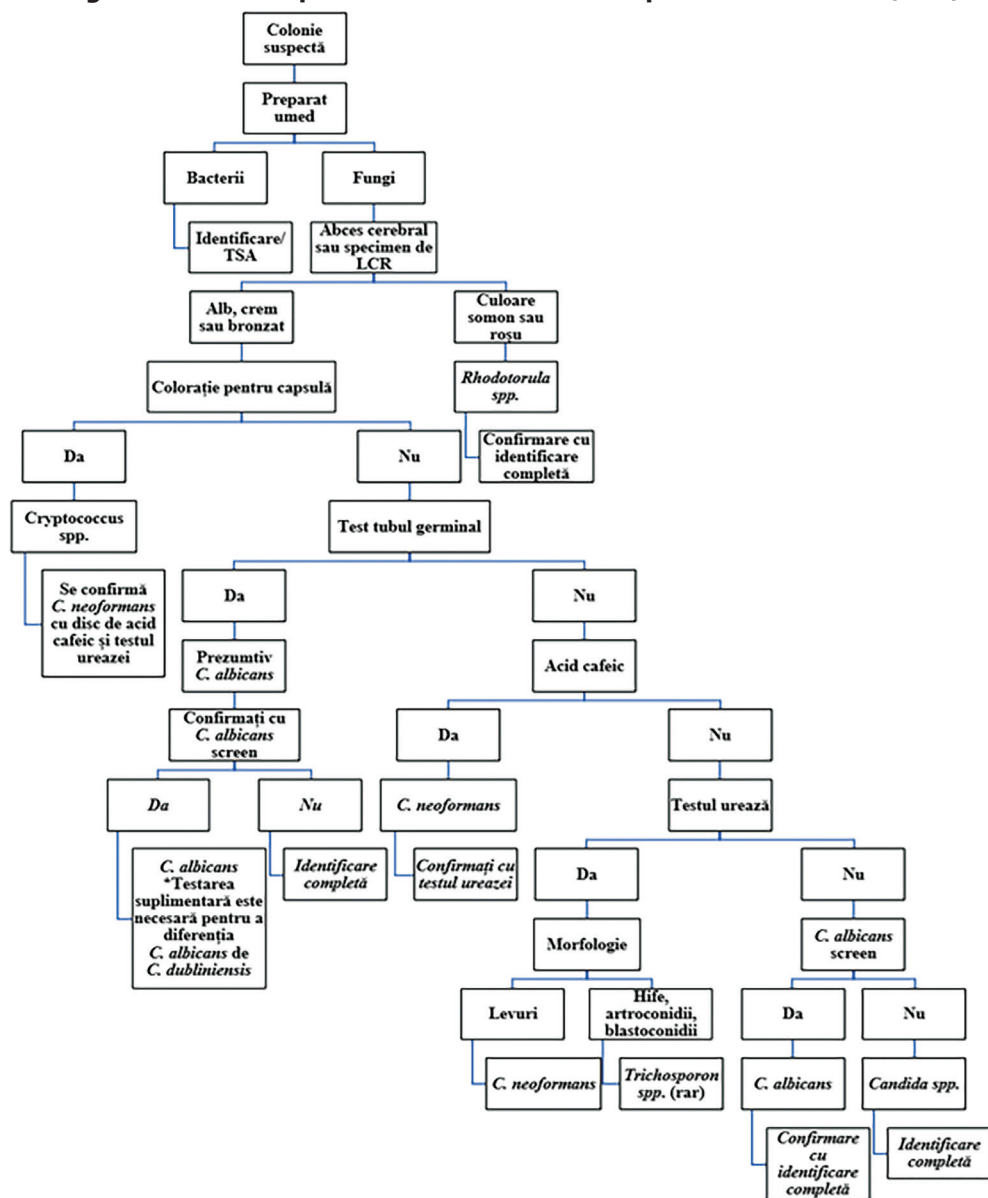
Prognosticul general depinde de mai mulți factori, inclusiv de rapiditatea diagnosticului, a tratamentului, de locul infecției, precum și de afecțiunile subiacente ale pacientului și de gradul de imunosupresie. Mortalitatea generală a cazurilor este de aproximativ 50%. Plasarea pacienților cu neutropenie 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:

- un control mai bun al glicemiei la cei cu diabet;
- utilizarea adecvată a corticosteroizilor 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 (bandaj, 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 timp de un 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, ibrutinib) • Adăugarea explicită a transplanturilor de organe solide
AI probabilă	<p>Constatări imagistice sugestive pentru AI pulmonară</p> <p><i>Aspergillus galactomannan</i></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 BA 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, eșantioane consecutive; sau eșantioane 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”)
AI confirmată	Diagnosticare moleculară (secvențierea ADN-ului)	<ul style="list-style-type: none"> • când hifele fungice sunt observate într-un eșantion 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).

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 șapte 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 două săptămâni.

**Recomandări pentru examinarea specimenelor clinice prin
histopatologie, microscopie, cultură și
identificarea speciilor de *Aspergillus* 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°). Colorația GMS are capacitatea de a elimina fondul celular și de a evidenția în mod specific elementele de hifă ale <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 la 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 fungi. Anticorpus 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

Abordare sau test de diagnostic	Detaliile metodei	SoR	QoE	Performanța testului și observații
Microscopia specimenelor clinice proaspete (de exemplu, LBA)	Aplicarea coloranților fluorescenți Calcofluor white™ sau Uvitex 2B sau Blancophor™.	A	II	Investigație esențială. Nu este specifică 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 fungii din clasa <i>Mucorales</i> pot prezenta un aspect pauciseptat și ramificat în unghi de 90°, 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 monitorizate timp de până la trei 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
Izolarea primară din materiale nesterile (de exemplu, spută, aspirate respiratorii).	Cultivarea și identificarea <i>Aspergillus</i> , se recomandă utilizarea de 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-ului.

Tehnici de colorare/vizualizare a fungilor

1. Examinarea coloniilor levurice/fungi 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 Tween 80 de 0,05%.
2. Cu o ansă, se atinge suprafața coloniei suspecte și se colectează material fungic, apoi materialul se agită ușor în picătura de Tween.
3. Deasupra picăturii se aplică o lamela și se examinează la microscop.

2. Tehnica LPCB (Lactophenol cotton blue)

LPCB este o tehnică excelentă pentru examinarea materialului fungic. Fenolul distruge fungii, iar acidul lactic sporește conservarea. Cotonul bleu (china) colorează chitina și celuloza.

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) Picătura se acoperă cu o lamela și se examinează la microscop.

Dacă se vizualizează fungi filamentoși (mucegaiuri) 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, fiind 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 și microorganismele vor apărea ca puncte strălucitoare pe un fundal întunecat.

Procedura:

- LCR se centrifughează timp de cinci-zece minute.
- Se îndepărtează supernatantul, după care se amestecă sedimentul.

- Se transferă o picătură de sediment pe o lamă și 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 celulele 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.

Interpretarea rezultatelor

Test pozitiv: levuri capsulate

Test negativ: levuri necapsulate

Martor pozitiv: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045

Martor negativ: *Candida albicans* ATCC 10231.

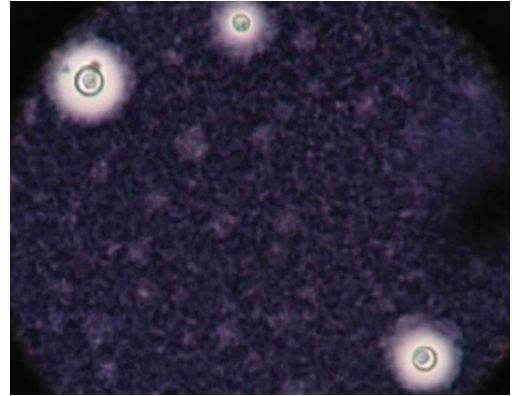


Fig. 1. *C. neoformans* în preparatul cu tuș de India

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 KOH de 10%.
- 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. Această tehnică folosește amalgam de crom-mercur de 2%. O picătură mică de LCR este plasată pe o lamă curată din sticlă la care se

adaugă o picătură mică de amalgam de crom-mercur de 2%, după care se amestecă cu LCR și 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 mărimi 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 exterioră, care anterior s-au pus în evidență doar prin microscopie electronică (stratul luminos al capsulei, cel fibrilar și zona de lumină) și corpusculii interni corespunzători diferitor 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.

Această pregătire simplă, ieftină și de încredere este propusă pentru evaluarea probelor de LCR suspectate că conțin *C. neoformans*.

5. Montarea de frotiu cu KOH

Procedul KOH (hidroxid de potasiu) este utilizat pentru a examina speciemenle în vederea depistării levurilor. KOH servește ca agent enzimatic care descompune resturile dintr-un specimen, cum ar fi celulele epiteliale și cele sangvine albe, pentru a vizualiza levurile sau pseudohifele.

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

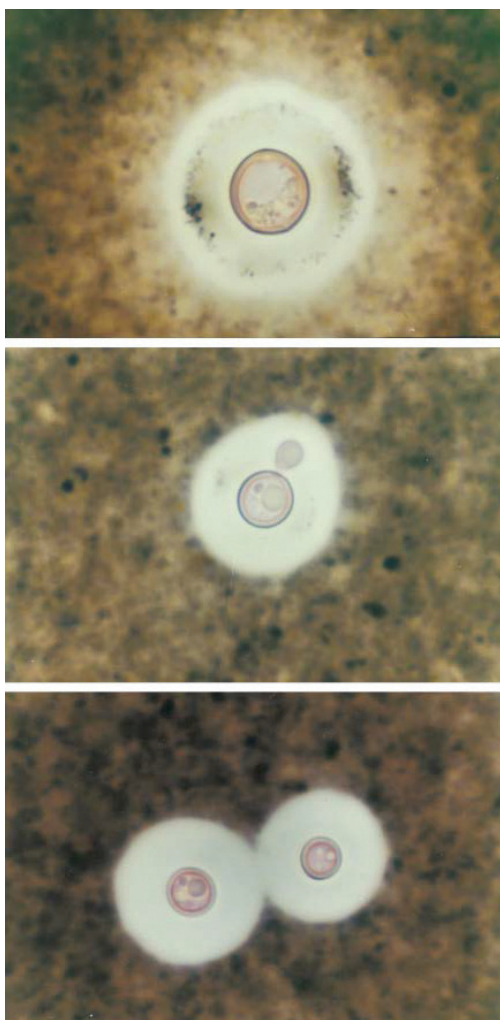


Fig. 2. Structurile externe și interne ale *C. neoformans* în preparatul cu tuș de India modificat. Mărire x 1.000

Procedeu:

1. Pe o lamă se depune o picătură de soluție de KOH (10 μ l) de 10%.
2. În picătură se transferă specimenul (bucăți mici/o picătură de specimen lichid) și se acoperă cu o lamelă. Lama se așează într-o cutie 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. Preparatul 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 cântărită într-un vas de sticlă cu capac;
- se adaugă 50 ml de apă distilată și se agită până când substanța chimică se dizolvă complet. Se adaugă apă distilată până volumul 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 doi ani.

ATENȚIE: hidroxidul de potasiu este un produs chimic foarte coroziv, de aceea trebuie manipulat cu mare grijă, iar flaconul trebuie 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. Banda adezivă 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.

Procedeu:

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 fungilor cu ajutorul pensei.
3. Banda este apoi aplicată pe lamă cu zona care a fost în contact cu fungii în partea de sus. Se aplică încă o picătură de lactofenol coton bleu.
4. Peste bandă se pune o lamela pentru a îndepărta orice bule de aer. Astfel se asigură ca fungii filamentoși să fie 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 prezente. Izolatele cu sporulare slabă pot necesita prepararea mai multor montări.

Procedeu:

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 picătura de alcool. Fungii sunt îndepărtați 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 peste fungi 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 fungilor filamentoși să crească dintr-un bloc de agar pe suprafața de sticlă a unei lame sau a unei lamele de acoperire, unde caracteristicile fungilor pot fi vizualizate fără perturbări minime.

Agarul selectat ar trebui să inducă producția maximă de spori a grupului de fungi 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*) *marneffe*, deoarece riscul de infecție este prea mare.

Procedeu:

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 trebuie 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 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, 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 fungilor 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 dermatofitelor 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 conversiunea mucegaiurii-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 fungii saprofiți.	SDA cu cloramfenicol și cicloheximidă va inhiba unii agenți patogeni fungici. Bacteriile rezistente la cloramfenicol vor crește pe acest mediu
IMA(Inhibitory Mold Agar)/ IMAA	Mediu selectiv îmbogățit	Conține cloramfenicol (IMA). IMAA are și gentamicină.
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)	Mediu selectiv pentru fungi dimorfi	De adăugat la suprafață hidroxid de amoniu concentrat
Agar de porumb cu Tween 80		
Agar de orez cu Tween 80		
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)	

Mediu	Utilizare	Remarci
Dermatophyte test mediu	Recuperare selectivă și identificarea prezumtivă a dermatofiților	Dermatofiții schimbă mediul din roz spre roșu. Bacteriile și fungii saprofiți schimbă mediul în galben. Atenție: unii non-dermatofiți pot schimba mediul 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> spp.	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 fungi 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 filamentoși sau contaminare cu alte tipuri de fungi sau bacterii, un inocul în dungi a creșterii fungice va ajuta separarea de contaminanți pentru subcultura ulterioară în vederea obținerii de 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, fungii filamentoși ar trebui să fie subcultați 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 incubați 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 fungilor.

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 fungilor la temperatura mai scăzută. *Aspergillus fumigatus* este singurul *Aspergillus* spp. care va tolera temperaturi de 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 mucormicetelor arată că *Rhizomucor pusillus* va tolera 50-55°C, iar *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 mulți fungi, inclusiv *Aspergillus* și fungii filamentoși *Mucorales*: *Rhizopus*, *Lictheimia* (*Absidia*) și *Mucor*, sunt sensibili la aceasta. Includerea cicloheximidei în agarurile utilizate pentru izolarea dermatofiților este utilă, deoarece majoritatea speciilor de dermatofiți și unii dintre agenții patogeni primari dimorfi, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* și *Sporothrix schenckii*, sunt rezistente la acest agent antimicrobian. Se inoculează plăci 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 microorganismul este rezistent și foarte redusă sau lipsă pe placa de cicloheximidă dacă microorganismul este sensibil.

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. Osherov 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.

