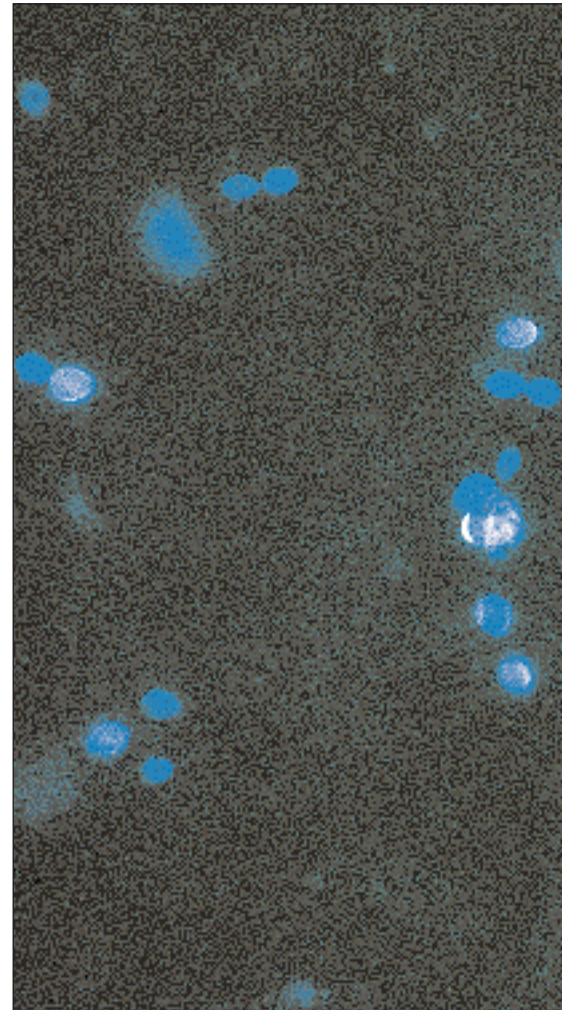


Fluorescensfärgade
Candida albicans-jästceller
i direktpreparat.



Framsteg inom mykosdiagnostiken

Nya test påvisar Candida-infektioner

Invasiva svampinfektioner har blivit vanligare, särskilt hos immunosupprimerade patienter. Nu finns nya tekniker att detektera djupa svampinfektioner, även om ännu inget enskilt test pålitligt diagnostiserar disseminerad candidos. Tyngdpunkten i diagnostiken ligger på Candida albicans, som är vårt vanligaste agens vid dessa tillstånd. Skillnaden mellan svampar och bakterier har stor betydelse för såväl diagnostik som behandling av svampinfektioner.

Den kliniska mykologin är äldre än bakteriologin. Redan 1846 skrev den sedermera förste professorn i pediatrik i Sverige, Alfred Berg, »Om torsk hos barn» och visade mikroskopiskt att beläggningen på munslemhinnan bestod

av svampceller [1]. Först omkring 1860 kom Pasteurs pionjärarbeten, där sambandet mellan bakterier och infektioner påvisades.

En viktig orsak till att mykologin föregick bakteriologin ligger i att svamparna är större än bakterier och lättare kan ses i mikroskop. Detta biologiska faktum påverkar fortfarande diagnostiken på så sätt att mikroskopiska direktprov från patienten och svampens morfologi utgör väsentliga delar av mykologidiagnostiken (Faktaruta 1).

Ändrat infektionspanorama

Svampinfektioner har alltid varit mindre vanliga än bakterieinfektioner. Under det senaste decenniet har emellertid invasiva svampinfektioner blivit vanligare, särskilt hos immunosupprimerade patienter [2]. Den cytostatikabehandling som ges bl a vid leukemi och i samband med transplantation har vanligen generell effekt på tillväxande celler. Detta drabbar förutom maligna celler även granulocytbildningen och celler på slemhinnorna (t ex i tunntarmen), som normalt delar sig ofta. Försvaret mot våra vanliga mikrober på slemhinnorna försvagas alltså på flera nivåer. Endogena infektioner orsakade av op-

portunistiska mikrober från matsmältningsskanalen eller luftvägarna kan då ge upphov till livshotande, disseminerade infektioner.

Utvecklingen av antibakteriella antibiotika har förbättrat skyddet mot bakterieinfektioner. Detta har lett till att patienter ofta kan motstå bakterieinfektioner trots ytterligt bristfälligt immunförsvar. Både endogena Candida-infektioner från matsmältningsskanalen och exogena Aspergillus-infektioner i luftvägarna blir då allvarliga risker.

Antalet svamparter har beräknats till minst 60 000. Av dessa har något hundratal beskrivits kunna vara humanpatogena, de flesta endast vid enstaka tillfällen hos gravt immundefekta patienter. Mer etablerade som patogener är endast några tiotal.

Svampar som släktingar

Tidigare betraktades våra vanliga (äkta) bakterier som tämligen nära släktingar till svampar, eventuellt som fylogenetiskt förstadium. Detta stämmer inte när utvecklingskedjan analyseras med modern DNA-teknik (Figur 1) [3]. Nukleotidsekvenserna i ribosomrelaterat DNA (rDNA), vilka är starkt konserverade, visar att svampar är mycket nära

Författare

BJÖRN PETRINI

docent, överläkare, avdelningen för klinisk mikrobiologi, Karolinska institutet och sjukhuset, Stockholm

BERTIL CHRISTENSSON

docent, överläkare, institutionen för infektionssjukdomar, Universitetssjukhuset i Lund

ERJA CHRYSSANTHOU

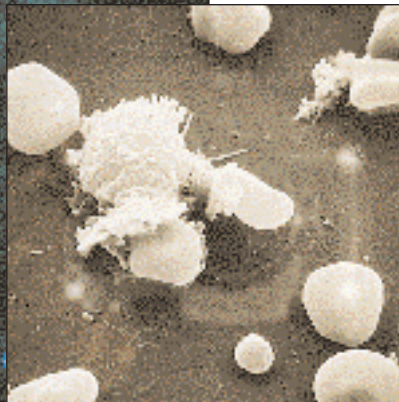
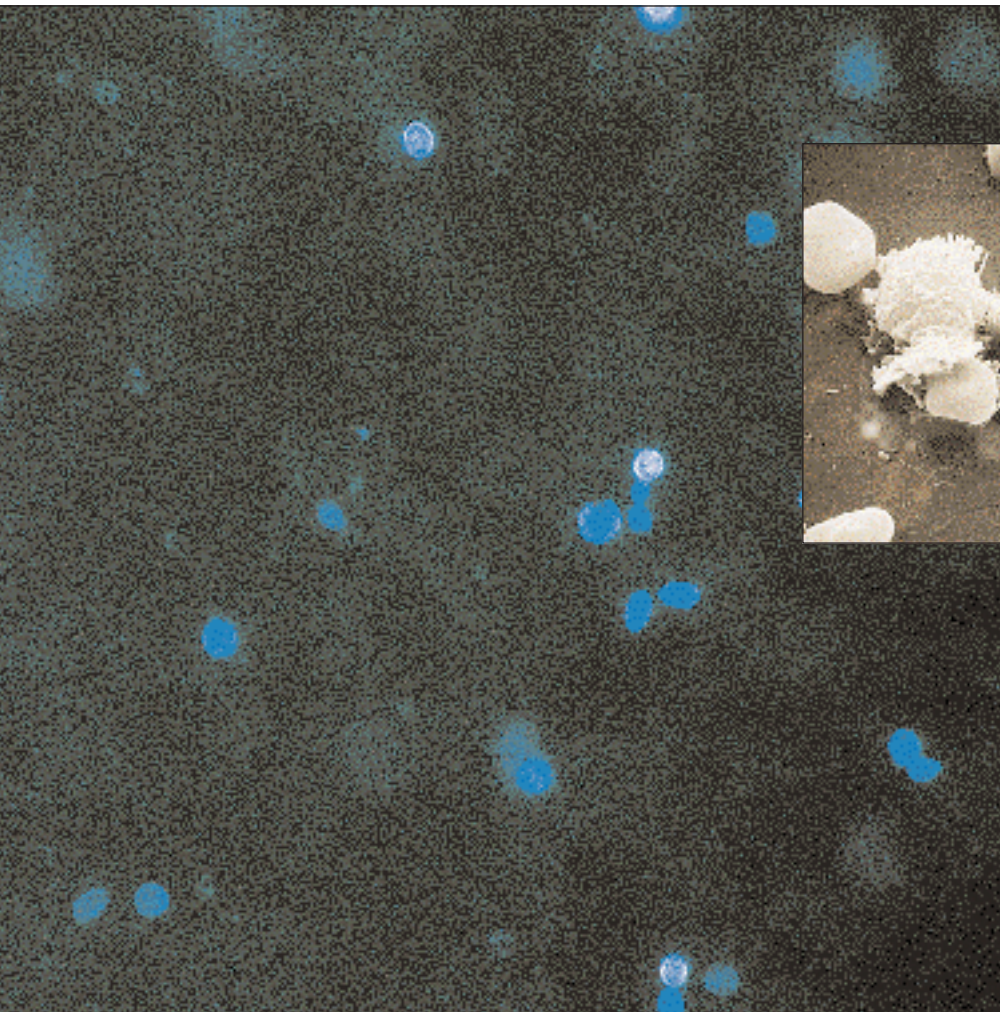
lic med sci, avdelningen för klinisk mikrobiologi, Karolinska institutet och sjukhuset, Stockholm

LARS EDEBO

professor, överläkare, avdelningen för klinisk bakteriologi, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg

LENNART LARSSON

docent, institutionen för mikrobiologi, Universitetssjukhuset i Lund.



Elektronmikroskopisk bild av Candida-celler.
Förstoring ca $4 \times 10 \mu\text{m}$.

besläktade med djur. Svampceller har också i likhet med animala celler organeller som mitokondrier och endoplasmiskt retikel hos djur (Figur 2). Den nära släktskapen till djur kan ligga bakom det faktum att det har visat sig svårt att hitta bra antimykotika med hög selektiv toxicitet mot svampar.

Den moderna svamptaxonomi ansluter sig i huvudsak till den klassiska indelningen, som baseras på svamparnas sexuella stadier (Figur 2). Den viktigaste gruppen från medicinsk synpunkt är askomyceterna, vilka i det teleomorfa (sexuella) stadiet bildar sporsäckar (asci). De flesta askomyceter förökar sig huvudsakligen genom knoppning, en process som skapat rikliga, för olika arter karakteristiska, morfologiska strukturer.

Pneumocystis är ett släkte tidigt i den fylogenetiska utvecklingen som förr klassificerades som protozo, men som med DNA-analys visats vara en svamp. Man har ännu inte lyckats odla svampen i laboratoriet, men smittämnet förekommer i naturen och sprids huvudsakligen genom luften, även om spridning från infekterade människor också har visats [4, 5].

Släktet *Saccharomyces* – som om-

fattar bl a bagerijäst, öljäst och vinjäst – bildar i sitt teleomorfa stadium vanligen 4–8 askosporer i varje sporsäck. Hittar man inget sexuellt stadium kallas motsvarande svampar *Candida*, varav den vanligaste arten är *C. albicans*. Den förekommer normalt i tarmfloran hos de flesta människor, varifrån den kan orsa-

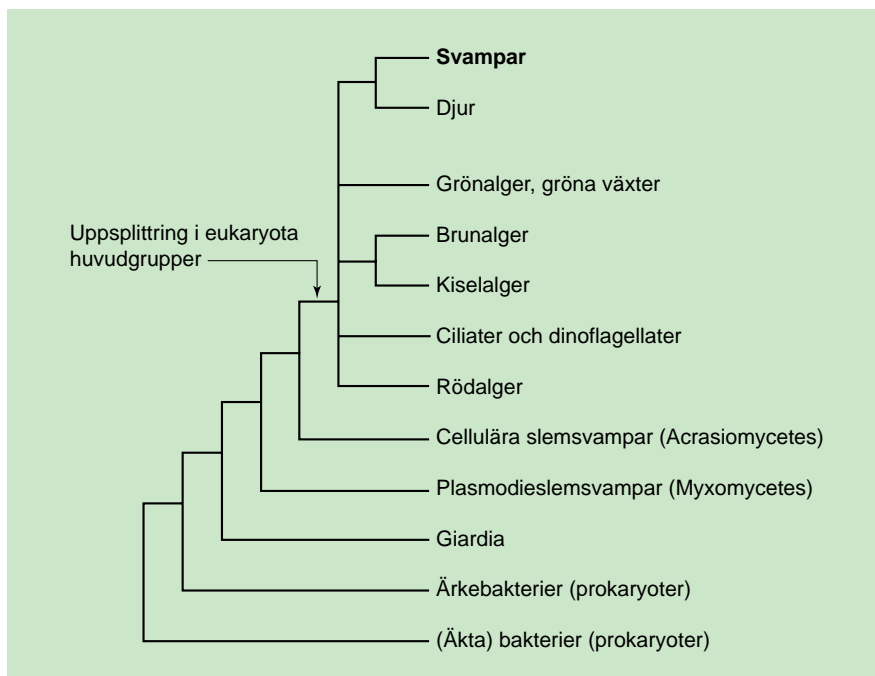
ka endogena, opportunistiska infektioner i t ex urinvägar, vagina och fuktiga hudveck. Den kan också genom tarmväggen nå blodbanan och spridas till njurar, till retikuloendoteliala systemet (lever, benmärg, mjälte) och till övriga delar av kroppen.

Även *Aspergillus*, *Penicillium* och

FAKTARUTA 1

Jämförelse mellan svampar och bakterier

	Svampar	Bakterier
Cellvolym (μm^3)	>20	Ca 1
Förökning	Knoppning och andra oregelbundna former	Binär delning
Kärna	Eukaryot	Prokaryot
Cytoplasma	Mitokondrier (M), endoplasmiskt retikel (ER)	Ursprung till M; ER saknas
Cytoplasmamembran	Ergosterol	Ej steroler
Cellvägg	Glukan, mannan, kitin	Peptidoglukan
Dimorfism	Hos många arter	Ej
Kemoterapi	Flucytosin, polyener, azoler	β -laktamer, kinoloner m fl
Släktskap med djur-/rDNA	Nära	Avlägset



Figur 1. Utvecklingen av biologiska huvudgrupper (efter Taylor 1995).

dermatofytterna hör till askomyceterna. *Aspergillus fumigatus* är det vanligaste möglet vid invasiva mykoser. Svampens huvudsakliga tillväxt sker i naturen genom nedbrytning av växtmaterial, varifrån sporer sprids vida omkring genom luften. Smittan är alltså vanligen exogen, och infektionsrisken ökar i anslutning till ombyggnader, om byggdamm tillåts spridas till känsliga patienter.

Diagnostiska hjälpmedel vid disseminerad candidos

Disseminerad *Candida*-infektion är en allvarlig komplikation bl a hos granulocytopena patienter. Den kliniska diagnostiken är svår och erhålls ofta indirekt antingen genom att andra orsaker till feber utesluts eller vid terapivikt efter behandling med antibakteriella antibiotika. Rutindiagnostiken på laboratoriet är fortfarande baserad på direktmikroskopi (biopsier), odling och antigen-test. Tidigt insättande av antimykotika är angeläget för att minska mortaliteten i disseminerad candidos.

Översiktsodlingar är värdefulla för att se om patienten är koloniserad med jästsvamp; vid negativa odlingar är risken för disseminerad candidos liten. Upp till 70 procent men oftare under 50 procent av blododlingar är positiva vid disseminerad candidos om tillräckligt stor blodvolym (>30 ml) tas [6]. Isolering av svampen ger möjlighet till typning och resistensbestämning.

Histopatologi och odlingar från biopsier har hög diagnostisk träffsäkerhet, men många önskvärda biopsier kan ej tas på grund av blödningsrisken hos

svårt sjuka patienter. Därför behövs snabba diagnostiska test som kan ge positivt resultat även hos candidospatienter med negativa blododlingar.

Att påvisa antigen och antikroppar

Påvisande av *Candida*-antigen i serum har prövats med viss framgång, men sensitiviteten hos t ex mannanantigen varierar mellan 30 och 50 procent, medan specificiteten är över 95 procent. Ett kommersiellt test finns tillgängligt (Pastorex, Sanofi Diagnostics; förs av ILS Laboratories Scandinavia AB). Även andra *Candida*-antigener har an-

vänts diagnostiskt, t ex 47 kD-antigenet som är en nedbrytningsprodukt av »heat shock protein» 96, samt 48 kD-enolasantigen [7].

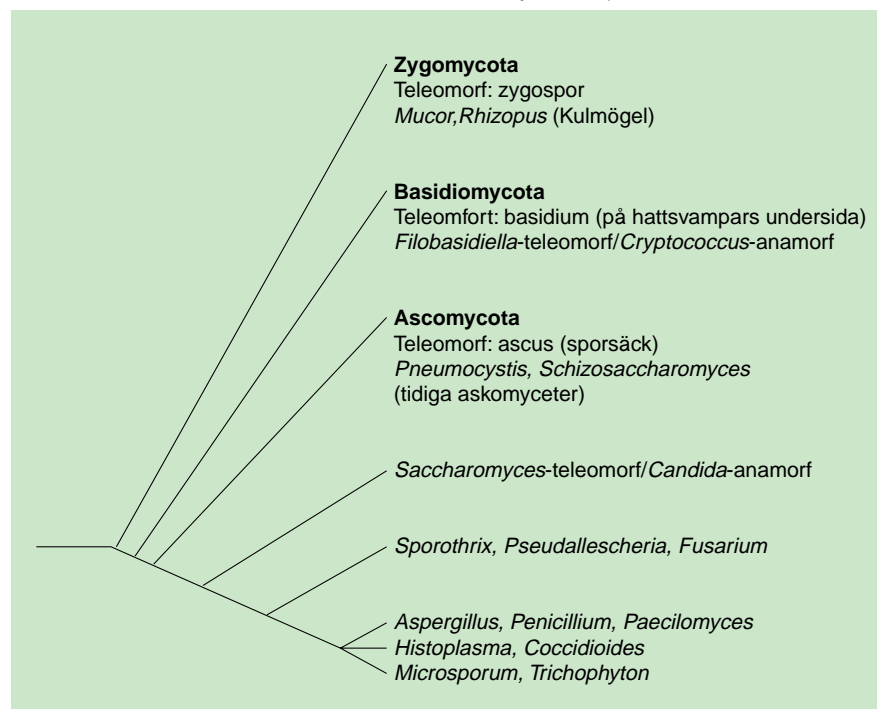
Antikroppar ger begränsad information vid disseminerad candidos. Dock kan man hos immunkompetenta patienter med långvarigare djup candidos finna antikroppar mot cytoplasmatiska *Candida*-antigener som är av diagnostiskt värde. Antikroppar mot hela *Candida*-cellen är inte specifika för djup infektion.

Betaglukan från svampceller kan påvisas vid invasiv mykos

Betaglukan finns i alla svampars cellvägg – dock inte i animala celler – och kan detekteras i serum vid djup svampinfektion [8]. Det betyder att man har ett test på svampinfektion utan artspecifikation, vilket alltså inte gör någon skillnad mellan jästsvamp (som *Candida*) eller mögel (som *Aspergillus*). Kryptokocker, som ju räknas till jästsvamparna, tycks dock, möjligen på grund av sin omfångsrika kapsel, inte alltid ge upphov till förhöjda värden av betaglukan ens vid disseminerad infektion [9]. Metoden ger alltså ingen artdiagnos, men däremot en tydlig fingervisning om att behandling mot svampinfektion bör inledas.

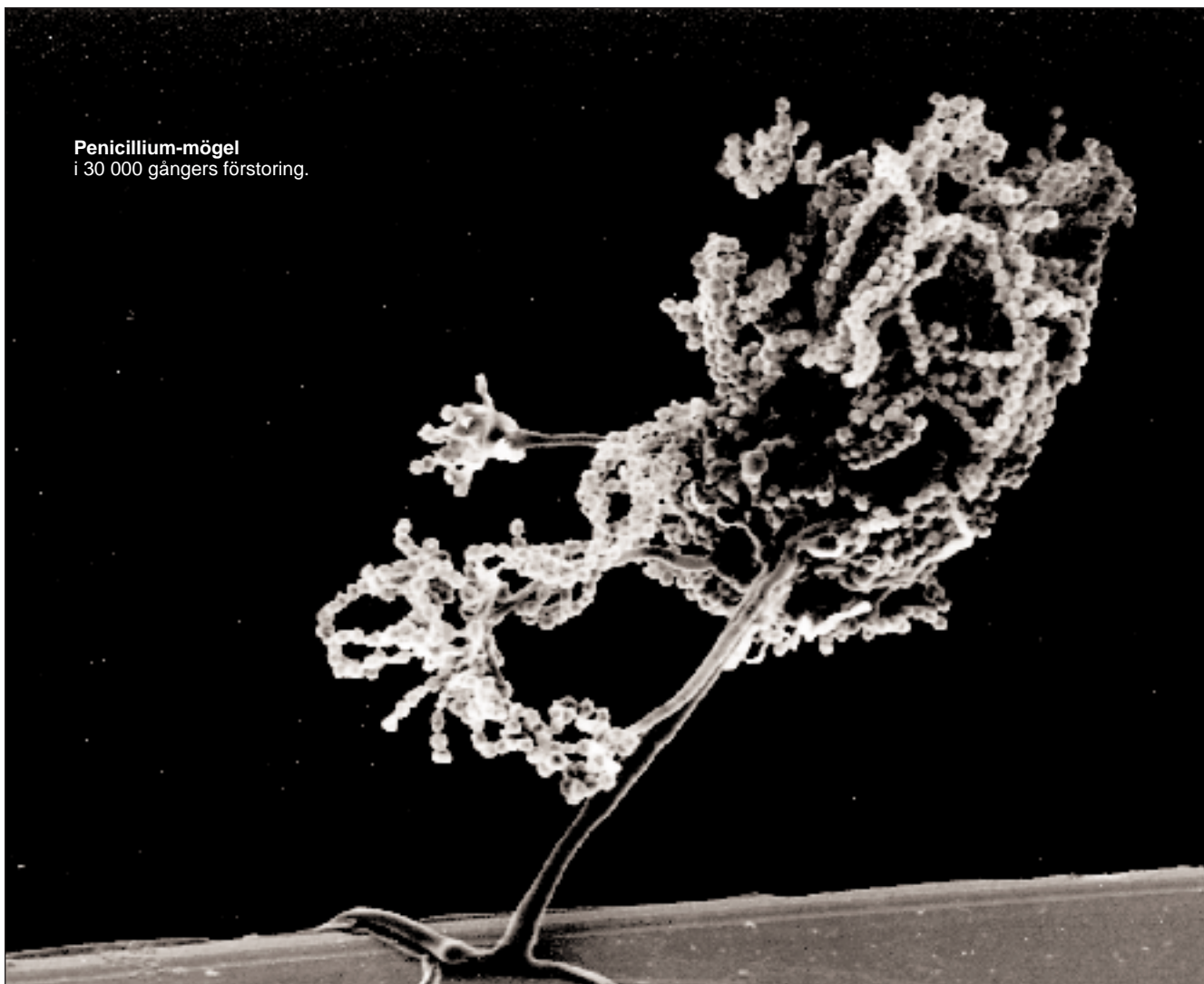
Svårigheten består i praktiken i att det rör sig om minimala mängder betaglukan som skall påvisas, vilket kräver ett mycket känsligt test. Mängderna är så små att risken för kontaminering med exogent betaglukan från glas, plast och reagenslösningar är stor. Principen för

Figur 2. Utvecklingen av svampar (efter Taylor 1995).



Penicillium-mögel
i 30 000 gångers förstoring.

FOTO: KJELLOLOF HEDLUND



att påvisa betaglukan liknar den vid limulustest för bakteriellt endotoxin. Man har utvecklat ett betaglukanspecifikt test som aktiverar ett koagulationsenzym från hästskokrabban *Tachypleus tridentatus*, vilket i sin tur hydrolyserar ett kromogent substrat.

Obayashi undersökte halten av betaglukan i plasma från 202 patienter där man tagit rutinblododlingar på grund av feber [8]. Friska kontrollpersoner hade värden under 10 pg/ml. Vid 37 av 41 obduktionsverifierade eller mikrobiologiskt konfirmerade svampinfektioner hade patienterna positiva betaglukantest. Om gränsen för positivitet sattes vid 20 pg/ml fick man en sensitivitet på 90 procent. Ingen av de 59 episoderna av icke-svampinfektion, som tumörfeber eller kollagen sjukdom, uppvisade positiva värden (specificitet 100 procent). Infektionerna orsakades av såväl *Candida* som *Aspergillus* och *Trichosporon*. Plasmaglukannivåerna var signifikant högre vid obduktionsverifierade mykoser och fungemier än vid andra mikrobiologiskt eller kliniskt verifierade svampinfektioner (medianvärden 280 respektive 32).

Det är snarare en fördel än en nackdel att glukantestet detekterar infektioner orsakade av olika svamparter. Det har nämligen inte funnits test som reagerar för bl a *Trichosporon* och *Fusarium*, som internationellt tycks bli allt vanligare agens vid opportunistiska svampinfektioner. Även andra mer ovanliga svamparter kan åstadkomma opportunistisk djup infektion hos immunsupprimerade patienter, varvid glukantestet sannolikt ger utslag.

Bestämning av betaglukan är ett känsligt test, specifikt för invasiv svampinfektion, som har potential att förbättra diagnostiken, särskilt hos immunsupprimerade patienter. Än så länge är dock reagenserna dyra. Med modifierad teknik kan detta eller liknande test komma i bruk inom kort och bli en del av den rutindiagnostiska arsenalen. Ett kommersiellt testkit finns på marknaden (Gluspey GS-6, Seikagaku Corp, Tokyo; förs av Labkemi, Stockholm).

Candida-PCR i serum

PCR, polymeraskedjereaktionen, är en teknik för specifik amplifiering av

mål-DNA från t ex jästsvamp. PCR-baserad diagnostik för påvisning av *Candida*-DNA kan användas som komplement till odling och antigen-test. Sedan 1990 har ett fåtal studier om amplifiering av *Candida*-DNA från kliniska prov publicerats.

Buchman och medarbetare var de första att utveckla en PCR-metod för påvisande av *Candida*-DNA isolerat från helblod [10]. Detektionsnivån låg på 120 *Candida*-celler per ml; testet var positivt i blod från tre kirurgiska patienter, varav två hade positiv blododling för *Candida*.

De flesta publicerade extraktionsmetoderna för *Candida*-DNA från helblod är tidskrävande och måste utföras i flera steg. Möjligheten att »naket» DNA kvarstår i serum kan utnyttjas för en snabbare extraktion. Från 11 av 14 patienter (79 procent) med candidemi kunde Kan [11] amplifiera en aktin-gensekvens från *C albicans* med PCR i serum.

Diagnostiken vid djupa *Candida*-infektioner har förbättrats med en »nestad» PCR-teknik med yttre primerpar från Buchmans arbete. Målsättningen

var att utveckla en metod för att påvisa Candida-DNA i serum i stället för i helblod. Metoden är specifik för *C albicans* och reagerar inte för andra kliniskt relevanta Candida-arter. Känslighet är 1 pg Candida-DNA [12].

Med denna metodik gjordes en försöksserie i djurmodell. Grupper av möss bestrålades för att inducera immunsuppression, samt injicerades med olika doser av *C albicans*-celler intravenöst. Serum analyserades med PCR som fungerade bra i denna djurmodell. PCR var också användbar för att detektera Candida-DNA i vävnader.

I en retrospektiv studie analyserades sera från patienter med candidemi. PCR och blododling visade likvärdig känslighet (11/17 sera var PCR-positiva, 15/17 var blododlingspositiva). Blod för odling respektive PCR var inte tagna samtidigt, vilket kan förklara en del av de negativa PCR-resultaten.

I en annan grupp av transplantationspatienter med negativa blododlingar men obduktionsverifierad djup Candida-infektion var PCR i serum taget före döden positiv i fem av sju fall. Det finns inga kommersiella Candida-PCR-test, men metoden används i begränsad skala vid avdelningen för klinisk mikrobiologi, Karolinska sjukhuset i Stockholm.

D-arabinitol diagnostisk markör vid invasiv candidos

De flesta Candida-arter bildar metabolen D-arabinitol, en sockeralkohol, såväl in vitro som in vivo [13]. Hos friska människor är såväl D- som L-arabinitol normalt förekommande i bl a serum och urin. Med gaskromatografi/masspektrometri har förhöjda värden av D-arabinitol tidigare påvisats i serum hos patienter med invasiv candidos [14].

Metoden har dock fått mycket begränsad användning, då masspektrometri ansetts vara en alltför komplicerad och dyrbar teknik för rutindiagnostik.

En gaskromatografisk metod har nyligen utvecklats som bygger på beräkning av kvoten D-arabinitol/L-arabinitol [15]. Friska personer har normalt en kvot på ca 2 i såväl serum som urin. Patienter med mukokutan candidos eller kolonisation i urinvägarna har normala kvoter. Eftersom de absoluta koncentrationerna av de två arabinitolisomererna är ca 60 gånger högre i urin än i serum, mäts D-arabinitol/L-arabinitolkvoten just i urin för att därmed slippa använda den betydligt mer selektiva masspektrometriska detektionstekniken. Fördelarna är att kvoten inte påverkas av njurfunktionen, metoden är enkel, snabb och reproducerbar och analysiden kortare än en timme.

Metoden lämpar sig för rutinbruk

och kräver endast tillgång till en gaskromatograf med elektronfångardetektor samt en kiral kolonn för separation av de bägge arabinitolisomererna. Endast 15 µl urin krävs för analys; en droppe urin på ett filterpapper kan vid behov med fördel sändas till laboratoriet brevlädes.

I en nyligen avslutad prospektiv studie av invasiv candidos hos neutropena barn med cancer [16] rapporterades förhöjda arabinitolkvoter hos alla barn med säkerställd infektion, och dessutom hos omkring hälften av de barn som fick empirisk svampbehandling på klinisk misstanke om invasiv svampinfektion. Diagnosen kunde ställas i genomsnitt två veckor tidigare än med konventionell diagnostik.

Eftersom tidigt insatt svampbehandling ökar överlevnaden hos patienter med dessa potentiellt livshotande infektioner, samtidigt som empirisk behandling på felaktiga grunder är både kostsam och kan vara förenad med allvarliga biverkningar, bör arabinitolkvoten i urin bestämmas regelbundet två till tre gånger per vecka hos alla riskpatienter. Metoden används sedan 1995 i rutindiagnostiken vid mikrobiologiska laboratoriet i Lund.

Det finns ännu inget enskilt test som pålitligt diagnostiserar disseminerad candidos. Man kan följa högriskpatienter med övervakningsodlingar och arabinitolkvot. Odling från biopsier (med direktpreparat) och blod kompletterad med Candida-PCR kan verifiera djup candidos. Betaglukan kan vara ett kraftfullt test för definitiv diagnos av djup svampinfektion. Antikroppstest har begränsat värde, särskilt hos immunsupprimerade individer. Tillgängliga antigen-test är okänsliga, men specifika.

Snabba, känsliga och specifika metoder för mykologisk diagnostik bör utvecklas för att minimera behovet av empirisk svampterapi på patienter med misstänkt djup mykos.

Referenser

1. Berg FT. Om torsk hos barn. Stockholm: L J Hjerta, 1846.
2. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection. Diagnosis and management. London: Blackwell, 1993.
3. Taylor JW. Molecular phylogenetic classification of fungi. Arch Med Res 1995; 26: 307-14.
4. Cailliez JC, Séguéy N, Denis CM, Alionat EM, Mazars E, Polonelli L et al. Pneumocystis carinii: an atypical fungal microorganism. J Med Vet Mycol 1996; 34: 227-39.
5. Wakefield AE. Detection of DNA sequences identical to Pneumocystis carinii in samples of ambient air. J Eukaryot Microbiol 1994; 41: 116 S.
6. Kiehn TE, Wong B, Edward FF, Armstrong D. Comparative recovery of bacteria and yeasts from lysis-centrifugation and a con-

ventional blood culture system. J Clin Microbiol 1983; 18: 300-4.

7. Matthews RC. Comparative assessment of the detection of candidal antigens as a diagnostic tool. J Med Vet Mycol 1996; 34: 1-10.
8. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Gota H, Yusuoka A, Iwasaki H et al. Plasma (1-3)-β-D-glucan measurement in the diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet 1995; 345: 17-20.
9. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishakawa N et al. Plasma (1-3)-β-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis and cryptococcosis. J Clin Microbiol 1995; 33: 3115-8.
10. Buchman TG, Rossier M, Merz W, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of Candida albicans by in vitro amplification of a fungus-specific gene. Surgery 1990; 108: 338-47.
11. Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. J Infect Dis 1993; 168: 779-83.
12. Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Löfdahl S. Detection of Candida albicans DNA in serum by polymerase chain reaction. Scand J Infect Dis 1994; 26: 479-85.
13. Bernard EM, Christiansen KJ, Tsang S, Kiehn TE, Armstrong D. Rate of arabinitol production by pathogenic yeast species. J Clin Microbiol 1981; 14: 189-94.
14. Roboz J, Kappatos DC, Holland JF. Role of individual serum pentitol concentrations in the diagnosis of disseminated visceral candidiasis. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 708-14.
15. Larsson L, Pehrson C, Weibe T, Christensson B. Gas chromatographic determination of D-arabinitol/L-arabinitol ratios in urine: a potential method for diagnosis of disseminated candidiasis. J Clin Microbiol 1994; 32: 1855-9.
16. Christensson B, Wiebe T, Pehrson C, Larsson L. Diagnosis of invasive candidiasis in neutropenic children with cancer by determination of D-arabinitol/L-arabinitol ratios in urine. J Clin Microbiol 1997; 35: 636-40.

Summary

Advances in the detection of fungal infection; new tests for Candida infection

Björn Petrini, Bertil Christensson, Erja Chryssanthou, Lars Edebo, Lennart Larsson
Läkartidningen 1998; 95: 738-42.

New techniques for the detection of deep fungal infections are reviewed with a focus on *Candida albicans*, the species most frequently isolated. The introduction provides an outline of the similarities and differences between bacteria and fungi on one hand and animal cells on the other, which are important to bear in mind in the detection and treatment of deep fungal infections.

In addition to cultures of biopsy material, blood, and mucous membranes (colonisation), serum tests for such fungal constituents as antigens or β-glucan, the PCR technique for the detection of fungal DNA, and a test for the D-/L-arabinitol ratio in urine, are all valuable approaches. As yet, no single laboratory test is available that reliably detects disseminated candidosis. Rapid, sensitive, and specific methods for mycological diagnosis need to be developed to minimise the necessity of resorting to empirical therapy when deep mycosis is suspected.

Correspondence: Björn Petrini, MD, Dept of Clinical Microbiology, Karolinska sjukhuset, S-171 76 Stockholm.