

Tadeja Matos¹

Povzročitelji endemskih mikoz

Agents of Endemic Mycoses

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikoze-etilogija, endemije, blastomikoza, histoplazmoza, parakokcidiomikoza, kokcidiomikoza

Med najpomembnejše povzročitelje endemskih mikoz, za katerimi zbolevalo tudi zdravi posamezniki z normalnim imunskim odgovorom, sodijo *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* in *Coccidioides immitis*. Za vse naštetih gliv je značilen temperaturni dimorfizem. Najdemo jih na omejenih geografskih področjih sveta in za okužbami z njimi zbolevalo ljudi, ki stalno ali začasno živijo na teh področjih. Ker je naravna ekološka niša večine povzročiteljev endemskih mikoz prst, za okužbami z njimi zbolevalo zlasti kmetje in tisti, ki so zaradi drugih dejavnosti blizu zemlje ali prahu, kjer se nahajajo infektivne oblike gliv. V Evropi so opisani le posamični primeri avtohtone histoplazmoze, sicer pa okužbe s povzročitelji endemskih mikoz v Evropi odkrivamo izključno pri ljudeh, ki prihajajo z znanih endemskih področij. V članku so opisane glavne značilnosti povzročiteljev, epidemiologija in patogeneza okužb, najznačilnejše klinične manifestacije bolezni, mikrobiološka diagnostika in zdravljenje.

ABSTRACT

KEY WORDS: mycoses-etiology, endemic diseases, blastomycosis, histoplasmosis, paracoccidiomycosis, coccidiomycosis

The most important agents of endemic mycoses that can cause disease in healthy hosts are *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Coccidioides immitis*. They occupy specific ecologic and geographic niches and exhibit temperature dimorphism. As these fungi are soil-based, people engaged in agriculture or recreational and work activities that expose them to disrupted soil are at the highest risk of infection. In Europe, only sporadic cases of autochthonic histoplasmosis were reported, but otherwise cases of endemic mycoses were reported only in patients from known endemic sites. This article discusses the characteristics of infectious agents causing endemic mycoses, along with their epidemiology and pathogenesis, as well as clinical manifestations, microbiological diagnostics and treatment of endemic mycoses.

¹ Asist. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

UVOD

Med klasične povzročitelje endemskih mikoz – blastomikoze, histoplazmoze, parakokcidioidomikoze in kokcidioidomikoze – sodijo glive, ki povzročajo bolezni na omejenih geografskih področjih sveta (tabela 1). Iz Evrope so opisani le posamični avtohtoni primeri histoplazmoze (1). Zaradi vedno večjega obsega potovanj pa te okužbe pridobivajo pomen tudi v evropskem prostoru.

V literaturi najdemo vedno več primerov endemskih okužb zlasti pri ljudeh, ki so imunsko oslabljeni – najpogosteje gre za bolnike, okužene s HIV, in imajo v anamnezi potovanja na endemska področja. Na te okužbe pa moramo pomisliti tudi pri vseh tistih, ki so kakorkoli drugače povezani s temi področji: turisti, begunci, imigranti, posvojeni otroci, transplantiranci, ki potujejo, in tudi takšni, ki bi lahko prejeli okužen organ.

Glive, ki povzročajo histoplazmozo in kokcidioidomikozo, najdemo v prsti, zlasti v pomešani s ptičjimi iztrebki in iztrebki podgan. Naravna ekološka niša povzročiteljev drugih dveh sistemskih mikoz, blastomikoze in parakokcidioidomikoze, še ni natančno opredeljena, čeprav tudi za ti dve menijo, da je to naverjetneje prst, zlasti v nabrežinah rek in jezer.

Do okužbe v večini primerov pride z vdihovanjem konidijev v pljuča. Prekuženost prebivalstva na endemskih področjih je visoka, ob izpostavitvi konidijem gliv razvije bolezensko simptomatiko majhen delež ljudi (manj kot 10%), ta delež je lahko bistveno višji (50–100%) ob epidemijah bolezni, ki se razvijejo, če so ljudje izpostavljeni velikemu številu konidijev.

Bolezniški znaki se kažejo najpogosteje s prizadetostjo pljuč, v redkih primerih se okužba razširi tudi v druge organe.

Povzročitelji vseh štirih sistemskih mikoz so glive, ki imajo izražen temperaturni dimorfizem. To pomeni, da v naravi ali pri temperaturi inkubacije okoli 25 °C rastejo v obliki plesni, v gostitelju oz. pri temperaturi inkubacije 37 °C pa se preoblikujejo v obliko kvasovk.

BLASTOMIKOZA

• mikroorganizmu

Naravno okolje *Blastomyces dermatitidis* je zemlja. Dlje časa preživi v toplih, vlažnih in kislih tleh, ki vsebujejo veliko dušika in organskih sestavin. Daleč največ primerov blastomikoze je opisano iz Severne Amerike (ZDA in Kanada), posebno na področjih ob velikih rekah in jezerih (2). Bolezen je endemska tudi v delih Afrike (3). Posamezni avtohtoni primeri so opisani iz Srednje in Južne Amerike, Indije in Srednjega vzhoda (tabela 1) (4).

B. dermatitidis je dimorfna gliva. Raste na standardnih mikoloških gojiščih, kot je gojišče po Sabouraudu (SABA). Pri sobni temperaturi v enem do treh tednih zraste v obliki bele do rjavkasto obarvane, puhasto rastoče plesni. Hruškasto oblikovani konidiji (3–5 µm) nastajajo na vrhu konidiofor, ki izhajajo iz dolgih močno septiranih in razvejanih hif. Tvorijo lahko tudi večje klamidospore, premera 7–18 µm. Do konverzije v kvasno obliko pride ob ugodnih hranilnih pogojih pri temperaturi inkubacije 37 °C. Kolonije kvasovk so nagubane, smetanasto do svetlo rjavo obarvane. Mikroskopsko rastejo v obliki večjedenih (8–12 jeder) okroglih kvasovk (8–15 µm)

Tabela 1. Geografska razširjenost povzročiteljev endemskih mikoz.

Mikoza	Histoplazmoza	Kokcidioidomikoza	Blastomikoza	Parakokcidioidomikoza
Povzročitelj	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> <i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	<i>Coccidioides immitis</i> <i>C. posadasii</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Geografska razširjenost	Doline rek Ohio, Missouri, Mississippi; Srednja in Južna Amerika, Avstralija, vzhodna Azija (Indija, Malezija) osrednja Afrika (var. <i>duboisii</i>)	JZ predeli ZDA, deli Srednje Amerike (Honduras, Gvatemala, Mehika) in Južne Amerike (Argentina, Venezuela, Paragvaj, Bolivija in Kolumbija)	Doline rek Mississippi, Ohio, St. Lawrence; JV deli ZDA; Kanada, Afrika, Srednja in Južna Amerika	Srednja in Južna Amerika (Brazilija, Venezuela, Kolumbija)

z debelo steno, iz katerih brsti navadno posamezen brst. Ta je z materinsko kvasno celico povezan s široko bazo. Hčerinska celica raste do velikosti materinske, preden se od nje popolnoma odcepi. V tkivu se kvasovke lahko nahajajo v makrofagih ali izven njih (4, 5).

Epidemiologija in patogeneza

Vdihovanje konidijev ali spor *B. dermatitidis* vodi do širokega spektra kliničnih slik. Okužba pogosto poteka subklinično, pri večini, ki zbolijo, pa se bolezen kaže v gripi podobni okužbi s prehodno prizadetostjo pljuč, v redkejših primerih se razvije kronična pljučna bolezen ali se okužba celo razširi (6, 7). Poleg pljuč so pri diseminiranih oblikah okužbe najpogostejše prizadeti koža, kosti in genitourinarni trakt. Opisani so sporadični primeri vdora mikroorganizma preko poškodovane kože. Epidemije se lahko pojavijo pri ljudeh, ki se zadržujejo bodisi zaradi opravljanja poklica ali rekreativno ob rekah in jezerih, kjer se v prsti nahaja ta gliva (8, 9). Pogostejše zbolevalo odrasli kot otroci, pogostejše moški kot ženske. Ni značilen oportunistični patogen, vendar za težje potekajočimi oblikami okužbe zbolevalo posamezniki s prizadeto celično posredovano imunostjo (4, 9).

Klinične oblike okužbe

Pljučna blastomikoza

Po inkubacijski dobi štirih do šestih tednov se pri polovici ljudi, ki so bili izpostavljeni sporam *B. dermatitidis*, razvije akutna pljučna okužba. Kaže se z utrujenostjo, mialgijami, artralgijami, produktivnim kašljem, povišano telesno temperaturo, plevritično bolečino in izgubo telesne teže. Rentgenski znaki so neznačilni. Večina sicer zdravih ljudi po nekaj tednih ozdravi brez zdravljenja. Pri nekaterih se bolezen po nekaj mesecih ponovi na drugem mestu, pri drugih preide akutna oblika v kronično ali diseminirano okužbo (10).

Kožna blastomikoza

Kožna blastomikoza je najpogostejša izvenpljučna manifestacija okužbe. Ob diseminaciji okužbe je koža prizadeta kar v 70 %. Čeprav prizadetost kože običajno sovпада s pljučno prizadetostjo, pa se lahko pojavlja tudi samo-

stojno. Spremembe na koži so dveh oblik, obe sta lahko prisotni pri istem bolniku. Prve se kažejo v obliki nebolečih izbočenih bradavičastih lezij z nepravilnimi robovi, običajno so na izpostavljenih delih telesa in spominjajo na ploščatocelični karcinom. Druga oblika kožnih sprememb so površinske razjede, ki so rahlo dvignjene, s centralnim krhkim granulacijskim tkivom, rahlo lahko krvavijo. Razjede se lahko pojavijo tudi na sluznicah nosu, ust in žrela.

Blastomikoza skeleta

Osteomielitis se razvije pri tretjini bolnikov z diseminirano okužbo. Najpogostejše so prizadeta vretenca, rebra in dolge kosti. Lezije lahko dolgo časa ostanejo asimptomatske, dokler se vnetni proces ne razširi na sosednje sklepe in v mehka tkiva, kjer se razvijejo abscesi in fistule.

Druge oblike diseminirane okužbe

Prostata, epididimis in testisi so prizadeti pri 15–35 % moških z diseminirano okužbo. Razen pri imunsko oslabljenih bolnikih je centralni živčni sistem (CŽS) prizadet le izjemoma, v obliki kroničnega meningitisa, abscesov v hrbtenjači in možganih.

Imunsko oslabljeni, zlasti tisti z okrnjeno celično posredovano imunostjo, imajo običajno težji potek okužbe, pogoste so ponovitve. Umrljivost je bistveno višja (30–40 %) kot pri imunsko kompetentnih ljudeh. Pri bolnikih z aidsom se običajno razvije diseminirana okužba, ko imajo število CD4 T-limfocitov zmanjšano pod 200/μl. Kožne lezije so pri teh bolnikih manj pogoste kot pri imunsko kompetentnih, do 40 % bolnikov z aidsom ima ob razširitvi prizadet CŽS (11).

Mikrobiološka diagnostika

Mikroskopiranje

V neposrednih razmazih vzorcev (sputum, aspirat traheje, bronhoalveolarna lavaža – BAL, punktati abscesov, likvor, bioptični vzorci pljuč in kože), pripravljenih z 10 % KOH in barvanih s fluorescentnim barvilom (ang. *calcoufluor white*, CFW), opazujemo velike kvasne celice z debelo steno. Brstijo z enim brstom, ki iz matične celice izhaja z značilno

široko bazo. Podobno sliko dobimo tudi v citoloških in histoloških preparatih. Neznačilne oblike *B. dermatitidis* se lahko zamenjajo z nebrstečimi celicami *P. brasiliensis*, *H. capsulaum* var. *duboisii* in nekapsuliranim *Cryptococcus neoformans* (5).

Osamitev

Klinične vzorce zasejemo na poševno gojišče SABA ali BHI (ang. *brain heart infusion*) z dodanimi antibiotiki in jih inkubiramo vsaj 4 tedne pri temperaturi 25–30 °C. Kolonije *B. dermatitidis* zrastejo običajno v enem tednu. Pri zasejanju sumljivega materiala in delu z micelijsko obliko glive je treba upoštevati predpisane varnostne ukrepe zaradi možnosti okužbe laboratorijskih delavcev. Identifikacijo potrdimo z dokazom konverzije v kvasovko, z ekstrakcijo in dokazom specifičnega antigena A s komercialno pripravljenimi serološkimi reagenti ali s specifično DNA-sondo. Za dokaz konverzije v kvasno obliko, micelijsko kulturo prenesemo na novo BHI-gojišče in inkubiramo pri 37 °C. Osamitev kvasne oblike neposredno iz vzorca je manj občutljiva kot osamitev v micelijski obliki. *B. dermatitidis* v kvasni obliki je občutljiva na cikloheksimid in kloramfenikol, zato teh antibiotikov ne smemo dodajati gojišču za kultivacijo pri 37 °C. *B. dermatitidis* se preoblikuje v kvasno obliko običajno v dveh do treh dneh, vendar nekateri izolati za to potrebujejo tudi do štiri tedne (5).

Serološki testi

Pri diagnostiki blastomikoze imajo serološki testi, reakcija vezave komplementa (RVK) in encimsko imunski testi (EIA) zaradi nizke občutljivosti in specifičnosti omejeno uporabnost. Od omenjenih se je za najbolj specifičnega izkazal imunodifuzijski test (ID), vendar so tudi pri tem dobili lažno negativne rezultate pri 10 % bolnikov z razširjeno okužbo in pri več kot 60 % bolnikov z lokalizirano okužbo. Ob sumu na akutno obliko okužbe in negativnem rezultatu serološkega testa je treba testiranje ponoviti po treh do štirih tednih. Pozitivna reakcija z ID-testom je diagnostično pomembna (4, 12).

Zdravljenje

Vse bolnike z aktivno boleznijo je treba zdraviti. Zdravljenje je dolgotrajno. Pri lažje poteka-jočih okužbah pljuč je zdravilo izbora itrakonazol. Priporočen odmerek je 200–400 mg/dan v obliki peroralne suspenzije. Alternativno zdravilo je flukonazol v odmerkih 200–400 mg/dan. Zdravljenje traja 6 mesecev. Za bolnike, ki imajo težji potek pljučne blastomikoze, in za diseminirane okužbe, zlasti za tiste s prizadetostjo centralnega živčnega sistema, je zdravilo izbora amfotericin B (0,7–1,0 mg/kg/dan do skupnega odmerka 1,5 mg), ki ga lahko v poteku zdravljenja nadomesti eden od azolov (13, 14).

HISTOPLAZMOZA

O mikroorganizmu

Naravno okolje *Histoplasma capsulatum* je zemlja. Najpogostejše so jo osamili iz prsti, bogate z iztrebki ptičev (piščanci, škorci) in netopirjev. Iztrebki ptičev služijo kot hrano že prisotnim *H. capsulatum* v zemlji, medtem ko so netopirji lahko nosilci te glive in jo z iztrebki lahko širijo daleč od izvornega mesta (15). Najpomembnejši endemski področji sta dolini rek Mississipi in Ohio v ZDA, izolirali pa so jo tudi iz številnih drugih geografskih področij (tabela 1). V 20-letnem obdobju (1984–2004) je bila histoplazmoza diagnosticirana v Evropi pri 72 bolnikih, okuženih s HIV. Le 7 (9,7 %) od teh je bilo opredeljenih kot avtohtoni primer (štirje iz Italije, dva iz Španije in eden iz Nemčije), ostali bolniki so imeli anamnestično podatke o potovanjih ali so izvirali z endemskih področij (1).

H. capsulatum je dimorfna gliva. Za človeka sta pomembni dve različici, var. *capsulatum* in var. *duboisii*. *H. capsulatum* v naravi raste v obliki plesni, v človeku in živalih oz. se pri temperaturi inkubacije 37 °C preoblikuje v kvasno obliko. Raste na običajnih mikoloških gojiščih. Kolonije na SABA pri temperaturi inkubacije 25 °C so počasi rastoče, bele ali rjavo rumene barve, opisane so tudi kolonije z rdečim pigmentom, površina je kompaktna, spominja na jelenjo kožo, ozadje kolonij je obarvano blede kremasto. Poznan je tudi trd tip kolonij, gladke ali brada-

vičaste površine. Mikroskopsko so značilni okrogli, enocelični makrokonidiji, premera 8–15 µm, z drobnimi žarkasto izhajajočimi brsti, nabrekli nam ali tuberkli. Makrokonidiji izvirajo iz hialinih, nediferenciranih konidiofor. Mikrokonidiji so infektivni delci. Površina je gladka, so okrogli do ovalnih oblik, premera 2–4 µm, izvirajo iz kratkih razvejitev ali neposredno iz hif. Afriška različica var. *duboisii* se od var. *capsulatum* razlikuje le v kvasni obliki. Mikrokonidiji so pri var. *duboisii* večji, premera 8–15 µm in imajo debelejšo celično steno.

Histoplasma capsulatum na BHI-gojišču z ovčjo krvjo, inkubirana pri 37 °C, raste kot gladka, vlažna, bela kvasovka. Mikroskopsko so vidne brsteče celice, blastokonidiji, velikosti 3–4 × 2–3 µm. V tkivu se nahajajo lahko prost, pogosto tudi znotraj makrofagov (4).

Epidemiologija in patogeneza

Histoplazmoza je znotrajcelična okužba retikuloendotelijskega sistema, do katere pride z vdihovanjem konidijev glive *H. capsulatum*. Konidiji dosežejo alveole in intersticijsko tkivo pljuč, tu jih fagocitirajo makrofagi in levkociti. Preko limfe dosežejo lokalne bezgavke, ki se zaradi vnetnega procesa povečajo. Značilen odgovor tkiva na okužbo s *Histoplasma capsulatum* je nastanek kazeoznih in nekazeoznih granulomov, v katerih se lahko kopiči kalcij. Po ozdravitvi ostanejo na mestih vnetja brazgotinske kalcifikacije. Granulome poleg nekroze sestavljajo še makrofagi in pretežno limfociti T. Verjetno igrajo pomembno vlogo pri zadrževanju rasti in širjenja glive. Nastanek granulomov je zlasti značilna pri okužbah, ki se same pozdravijo. Pri progresivnih, razširjenih oblikah histoplazmoze dobro omejenih granulomov običajno ni, v histoloških preparatih so v teh primerih prisotni številni makrofagi in redki limfociti.

Inkubacijska doba, ki je ocenjena iz primerov epidemij ob množični izpostavljenosti masi konidijev, je 1–3 tedne, v primerih ponovne okužbe se ta skrajša na 4–7 dni. Približno 95 % histoplazmoze poteka neopazno ali je potek bolezni blag. 5 % okuženih razvije prehodno pljučno okužbo, ki lahko pri nekaterih napreduje v kronično progresivno pljučno obliko. Pri redkih se razvije težko potekajoča diseminirana bolezen (16). Teža bolezni je

do neke mere povezana s trajanjem in intenzitetto izpostavljenosti povzročitelju. Večina histoplazmoze se večinoma pojavlja posamično, opisanih pa je tudi več epidemij (4, 15). Večina opisanih epidemij se je zgodila ob izpostavljenosti mestom z visoko koncentracijo konidijev v zemlji in hkratno aktivnostjo na tistem prostoru, kot so razna gradbena dela, izkopavanje prsti, jamarstvo itd. Osebe z določenimi osnovnimi boleznimi imajo večje tveganje za nastanek težjih oblik okužbe. Kronična pljučna histoplazmoza je pogostejša pri ljudeh z že obstoječimi pljučnimi boleznimi, kot je na primer emfizem. Diseminirane oblike bolezni so pogostejše pri osebah z okrnjeno, celično posredovano imunostjo (okuženi s HIV, transplantirani, bolniki s hematološkimi malignimi boleznimi, bolniki, ki prejemaajo kortikosteroide in druga imunosupresivna zdravila). Za bolnike z aidsom, ki živijo na endemskih področjih, je histoplazmoza pomembna oportunistična okužba. Na začetku epidemije aidsa je na endemskih področjih ZDA za to okužbo zbolelo okoli 5 % teh bolnikov. Incidenca histoplazmoze pa se je pri tej skupini bistveno zmanjšala po uvedbi učinkovitejših kombinacij antiretrovirusnih zdravil, vključno z visoko aktivnim antiretrovirusnim zdravljenjem (ang. *highly active antiretroviral therapy*, HAART) (16).

Klinične oblike okužbe

Akutna pljučna histoplazmoza

Manj kot 5 % ljudi, ki so izpostavljeni *H. capsulatum* na endemskih področjih, zbolijo za simptomatsko okužbo. Ta delež je lahko precej večji (več 10 %) ob epidemiji histoplazmoze, do katere pride ob masivni izpostavljenosti sporam povzročitelja. Akutna pljučna histoplazmoza se običajno kaže s številnimi nespecifičnimi znaki okužbe, ki spominjajo na gripo. Povišana telesna temperatura, glavobol, mialgije, nepreduktiven kašelj, plevritična bolečina, izguba apetita in utrujenost so najpogostejši simptomi okužbe. Pri posameznikih se lahko razvije aseptični artritis, artralgie in eritema nodosum in multiforme. Večina sicer zdravih ljudi okreva po nekaj tednih brez zdravljenja, vendar jih utrujenost in šibkost lahko spremljata še nekaj mesecev (16).

Kronična pljučna histoplazmoza

Je počasi potekajoča bolezen, ki običajno nastane pri osebah s kronično obstruktivno pljučno boleznijo. Na začetku se kaže kot prehodna segmentna pljučnica, ki se lahko pozdravi brez zdravljenja, pogostejše pa napreduje v fibrozo z nastankom kavitacij, ki lahko prizadene pomemben del pljučnega tkiva in nezdravljena vodi v progresivno pljučno odpoved. Najpogostejši simptom pri bolnikih s kronično fibrozo in kavitacijami je produktiven kašelj, pri tretjini bolnikov se pojavljajo hemoptize. Kašelj lahko spremlja povišana telesna temperatura, prsna bolečina, utrujenost in izguba telesne teže.

Diseminirana histoplazmoza

Hematogena diseminacija okužbe se razvije pri večini bolnikov v prvih dveh tednih po okužbi, ko še ni razvit specifični obrambni sistem gostitelja. V večini primerov je okužba neprogresivna in vodi le do nastanka kalcificiranih granulomov v jetrih in vranici. Večje tveganje za diseminacijo imajo bolniki z okrnjeno T-celično posredovano imunostjo. Spekter kliničnih slik diseminirane okužbe je širok, poteka kot akutna bolezen, ki se v nekaj tednih lahko konča smrtno (otroci, imunosuprimirani) ali kot kronična bolezen, ki lahko prizadane več organskih sistemov. Pri imunsko normalnih posameznikih ima bolezen kroničen potek. Najpogostejše so prizadeta jetra, vranica in nadledvična žleza, v več kot polovici primerov so opisane ulceracije na sluznici ustne votline, žrela in spolovil. Kožne spremembe so redke. ČŽS je prizadet v približno 10% in se kaže v obliki kroničnega meningitisa.

Otroci in imunsko oslabljeni bolniki imajo bistveno težji potek diseminirane okužbe. Pri bolnikih z aidsom se diseminirana okužba razvije pri večini, ko je število CD4 T-limfocitov znižano pod 75/μl. Simptomi okužbe so nespecifični, povišana telesna temperatura, izguba telesne teže, povečana jetra in vranica, pancitopenija, makulopapulozni eritematozni kožni izpuščaj, prizadetost ČŽS v smislu meningitisa in žariščnih nevroloških izpadov. Pri 10–20% bolnikov z aidsom se ob razširitvi razvije klinična slika septičnega šoka z vročino, hipotenzijo, jetrno, ledvično in respiratorno odpovedjo in diseminirano intravasku-

laro koagulacijo. Smrtnost te oblike je zelo visoka.

Afriška histoplazmoza

Bolezen, ki jo povzroča var. *duboisii*, se precej razlikuje od histoplazmoze, ki jo povzroča var. *capsulatum*. Potek bolezni običajno ni težak, najpogostejše so prizadeti koža in kosti. Spremembe na koži se kažejo v obliki papularnih ali nodularnih lezij, ki so napogostejše lokalizirane na obrazu in trupu. Osteomielitis se razvije pri tretjini bolnikov, najpogostejše so prizadeta vretenca, rebra in kosti lobanje. Spremembe običajno niso boleče. Vnetje se s kosti lahko razširi na sosednja mehka tkiva in sklepe. Če bolezen diseminira, so najpogostejše prizadeta jetra in vranica. Nezdravljena okužba se konča s smrtjo v nekaj tednih ali mesecih (16).

Mikrobiološka diagnostika

Mikroskopiranje

Pri bolnikih s sumom na akutno histoplazmozo je smiselno čimprejšnji histopatološki pregled biopsijskih vzorcev tkiv (razmazi kostnega mozga, kri, biopsi jeter, sprememb na koži in sluznicah) (17). Fiksiran preparat z metanolom barvamo po Wrightu ali po Giemsi. Kvasovke se prikazujejo kot ovalne celice, velikosti 2–4 μm, z velikimi vakuolami in polmesečasto oblikovano rdeče obarvano protoplazmo. Brsti so z matično celico povezani z ozko bazo. Kvasovke so lahko nakopičene v makrofagih in monocitih ali prisotne prosto v tkivu (17, 18). Okužbe z nekaterimi drugimi glivami imajo lahko podoben mikroskopski izgled, *Penicillium marneffei*, atipične majhne celice *B. dermatitidis* in majhne neinkapsulirane celice *C. neoformans* (16). V vzorcih iz dihal lahko zelo redko prikažemo glivne celice. Celice *H. capsulatum* var. *duboisii*, ki povzroča afriško histoplazmozo, so v mikroskopskih preparatih večje (10–15 μm) in imajo debelejšo celično steno kot var. *capsulatum*. Značilna je tudi izrazita brazgotina na matični celici, od koder je izšel brst, česar se pri *H. capsulatum* var. *capsulatum* ne vidi.

Osamitev

Diagnozo potrdimo z osamitvijo povzročitelja. *H. capsulatum* lahko osamimo iz krvi, spu-

tuma, BAL-a, kostnega mozga, punktatov abscesov, tkiv in drugih vzorcev. Za osamitev iz krvi se je metoda lize s centrifugiranjem (Isolator) izkazala za občutljivejšo od klasičnih avtomatiziranih sistemov (19). Hemokulture postanejo v povprečju pozitivne šele po 7–10-dnevni inkubaciji. Za ostale vzorce velja, da je treba material inkubirati 4–6 tednov do izdaje negativnega izvida. Najprimernejša gojišča za primarno osamitev *H. capsulatum* so BHI z ovčjo krvjo, IMA (ang. *inhibitory mold agar*), SABA in SABHI (ang. *Sabouraud-Brain-Heart-Infusion*). Za osamitev iz urina, sputuma in gnoja naštetim gojiščem dodajamo še antibiotike. Vzorci krvi in aspirati kostnega mozga se nanesejo na gojišča brez dodanih antibiotikov. Osamitev v tekočih gojiščih je manj uspešna. Nacepljena gojišča s kliničnimi vzorci inkubiramo pri 25–30 °C najmanj 4–6 tednov. Na primarnih ploščah (BHI z ovčjo krvjo, SABHI) se po nekaj tednih razvije zračni micelij. Na hifah se tvori dva tipa konidijev, mikrokonidiji in značilni makrokonidiji z radialnimi tuberkli, vendar sami po sebi ne zadoščajo za dokončno diagnozo (17). Značilnih makrokonidijev na primarnih ploščah običajno ne moremo prikazati, jih je pa veliko v subkulturi. Osamitev iz kliničnega materiala je najverjetnejša pri bolnikih z diseminirano obliko okužbe, kronično kavitaro pljučno histoplazmozo in akutno pljučno histoplazmozo po masivni izpostavljenosti povzročitelja. Pri drugih oblikah, kot so blage do zmerne oblike akutne pljučne histoplazmoze, granulomatozni mediastinitis, mediastinalna fibroza in kronični meningitis, ostajajo kulture običajno negativne (4, 17). Zaradi nevarnosti okužbe laboratorijskih delavcev z micelijsko obliko glive je potrebno, da pri zasajanju sumljivega materiala in delu z micelijsko obliko kulture upoštevamo ustrezne varnostne ukrepe. Včasih je težko ločiti med micelijsko obliko kolonij *H. capsulatum* in *B. dermatitidis* ter *Chrysosporium*. Identifikacijo potrdimo s konverzijo micelijske v kvasno obliko, z inkubacijo pri 37 °C, kar lahko traja 3–6 tednov. Za konverzijo se najpogosteje uporablja gojišči BHI z ovčjo krvjo in BGC (ang. *Blood-Glucose-Cystein*). Dolgotrajen postopek konverzije nadomešča komercialno dostopna kemiluminiscentna DNA sonda (Gen-Probe system, San Diego,

ZDA), s katero pridemo do identifikacije že v 4 urah (20).

Serološki testi

Serološki testi so pogosto dobri za diagnozo različnih oblik histoplazmoze. Najpogosteje se uporabljata metodi ID in RVK. Kot antigen se uporablja histoplazmin, ki je topni filtrat micelijske faze *H. capsulatum*. Vsebuje dva antigena, ki sta po svoji sestavi glikoproteina; H-antigen, proti kateremu se tvorijo protitelesa v akutni fazi okužbe, in M-antigen, proti kateremu nastajajo protitelesa v vseh fazah bolezni (4). Ob pozitivnem testu lahko dobimo dve precipitacijski črti. H-črta je specifična za akutno pljučno histoplazmozo, vendar se pojavlja le v 10–15 % primerov. M-črta je prisotna pri 75 % primerov akutne histoplazmoze, pozitivna ostane lahko še nekaj mesecev po okužbi. Lažno negativne rezultate lahko dobimo pri zelo imunsko oslabljenih bolnikih z diseminirano histoplazmozo. RVK-metoda je bolj občutljiva, vendar manj specifična kot ID. Pozitivna postane 2–6 tednov po okužbi. RVK-titri 1:32 ali več oz. štirikratni porast titra parnih serumskih vzorcev kažejo, da gre pri bolniku za aktivno okužbo. Pri RVK lahko pride zaradi nespecifičnosti metode do navzkrižnih reakcij pri bolnikih z blastomikozo ali s kokcidiodomikozo pa tudi drugih granulomatoznih boleznih, tuberkulozi, sarkoidozi in limfomih (21). Titri so običajno nižji 1:8–1:32, žal pa se lahko rezultati tudi prekrivajo.

V diagnostične namene se uporablja tudi detekcija antigenov, ki jih lahko dokažemo v urinu, krvi, likvorju in bronhoalveolarnem izpisku (BAL). Antigene v urinu dokažemo 14 dni po izpostavitvi okužbi pri akutni pljučni histoplazmozi. Najbolj uporaben je ta test za diagnozo diseminirane okužbe bolnikov z aidsom. Antigene *H. capsulatum* pri teh bolnikih v urinu dokažemo v 95 % in v krvi v 86 % (22). Z merjenjem nivoja antigenov v urinu lahko spremljamo odziv na zdravljenje in eventualen pojav ponovitve bolezni (23, 24).

Zdravljenje

Specifično protiglivično zdravljenje ni vedno indicirano pri akutni lokalizirani pljučni

histoplazmozi, saj pride v večini primerov do zamejitve in spontane ozdravitve. Zdravilo izbora za zdravljenje lažjih oblik akutne pljučne histoplazmoze je itraconazol, v obliki peroralnega zdravila in priporočenem odmerku 200 mg 3-krat/dan 3 dni, nato 1–2-krat/dan 6–12 tednov. Bolniki z resnejšo klinično sliko in difuznejšo prizadetostjo pljuč se najprej zdravijo z amfotericinom B (0,7–1,0 mg/kg/dan) ali liposomalnim amfotericinom B (3–5 mg/kg/dan) 1–2 tedna in kasneje nadaljujejo zdravljenje z itraconazolom, 200 mg 3-krat/dan 3 dni, nato 2-krat/dan še 12 tednov. Včasih se temu zdravljenju dodajajo še kortikosteroidi (metilprednizolon 0,5–1,0 mg/kg/dan, 1–2 tedna) (14, 24).

Z antimikotiki je treba zdraviti tudi vse oblike kronične pljučne histoplazmoze in vse oblike diseminirane histoplazmoze, tudi v primeru, če je dokazano le eno žarišče. Zdravilo izbora je itraconazol v odmerku 200 mg 3-krat/dan 3 dni, nato 1–2-krat/dan vsaj 12 mesecev, nekateri priporočajo celo 18–24 mesecev (14, 25). Vorikonazol se daje v primerih slabega odgovora na zdravljenje z itraconazolom ali v primerih pojava težkih stranskih učinkov, zlasti nefrotoksičnosti, ob zdravljenju z amfotericinom B. Njegovo učinkovitost pa bo treba ovrednotiti še v večjih kliničnih študijah (26). Ehinokandini za zdravljenje histoplazmoze niso primerni (17).

PARAKOKCIDIOIDOMIKOZA

O mikroorganizmu

Glivo *Paracoccidioides brasiliensis* so nekajkrat osamili iz prsti, vendar njena ekološka niša še ni natančno opredeljena. Najbolj značilna je njena geografska omejenost. Nahaja se v Srednji in Južni Ameriki na področjih tropskega in subtropskega deževnega gozda (tabela 1). Največ primerov parakokcidioidomikoze izhaja iz Brazilije, Venezuele in Kolumbije (27–29). *P. brasiliensis* je temperaturno dimorfna gliva. V naravi in pri sobni temperaturi inkubacije na obogatenih gojiščih raste v obliki plesni. Po 20–30 dneh inkubacije pri 25 °C zraste običajno v obliki gladkih, ploščatih kolonij s posameznimi šopi zračnega micelija, kolonije so lahko tudi puhaste, nagubane ali žametaste, bele do svetlo rjave barve. Mikroskopsko tvorijo tanke septirane hife z redkimi terminalnimi

in interkalarnimi klamidiosporami. Konidije tvori le v okolju s pomanjkljivo sestavo hranil, v obliki artrokonidijev ali mikrokonidijev, premera manj kot 5 µm. Konidiji se v tkivu ali pri ustrezni sestavi hranil in pri temperaturi inkubacije okoli 37 °C v 10–15 dneh preoblikujejo v velike okrogle celice, premera 4–30 µm. Iz njih žarkasto brstijo številni brsti z ozko bazo, ki obkrožajo materino celico (4, 30).

Epidemiologija in patogeneza

Okužba se razvije po vdihovanju spor *P. brasiliensis*. Inkubacijska doba ni znana. Parakokcidioidomikoza je redka pri otrocih, simptomatska oblika je najpogostejša pri odrasli populaciji nad 30 let. Pogostejše zbolevali so moški kot ženske (15 : 1) (31). Med dejavniki tveganja za okužbo sta opisana alkoholizem in kajenje (4, 27). Pljuča so primarno mesto okužbe, preko limfnih žil se gliva razširi v regionalne bezgavke. Glede na pozitivne kožne teste populacije na endemskih področjih sklepajo, da velik delež ljudi preboli okužbo asimptomatsko.

Klinične oblike okužbe

Ločimo lahko dve obliki bolezni. Akutno (subakutno) obliko bolezni, ki je značilna za mlajšo populacijo, in kronično, za katero zbolevali so odrasli. Večina odraslih s simptomatsko okužbo zboli za kronično progresivno pljučno obliko (več kot 90 % obolelih). Kaže se v obliki produktivnega kašlja, bolečin v prsih, z izgubo telesne teže, utrujenostjo, s težkim dihanjem in povišano telesno temperaturo. Bolezen lahko traja več tednov ali mesecev. Na rentgenski sliki so vidni številni bilateralni intersticijski infiltrati in v polovici primerov povečane bezgavke v hilusih. Če bolezen ni zdravljena, napreduje v pljučno fibrozo s kavitacijami. Pri približno 20 % simptomatskih bolnikov pride do razsoja okužbe v sluznico, kožo in druge organe. Bolezen je počasi napredujoča, najpogostejše so prizadete sluznice nosu in ust ter koža obraza. Boleče, infiltrirane in ulcerirane lezije lahko napredujejo več mesecev ali celo let. Ob diseminirani okužbi je lahko prizadet praktično katerikoli organ. Opisane so nodularne lezije tankega in debelega črevesja, granulomi v jetrih, lezije v kosteh in sklepah, hematogen endoftal-

mitis, možganski granulomi in meningoencefalitis. Večina bolnikov odgovori na protiglivično zdravljenje, vendar so ponovitve pogoste. Otroci, mladostniki in imunsko oslabljeni pogosteje razvijejo akutno diseminirano obliko okužbe (okoli 3–5 % obolenih), katere glavna manifestacija je povečanje površinskih in visceralnih bezgavk. Ta oblika okužbe ima slabo napoved. Pri latentni okužbi ostane gliva v mirujoči obliki, najpogosteje v bezgavkah, lahko tudi več let. Ob reaktivaciji se razvije kronična pljučna oblika okužbe in prizadetost kože in sluznic (27, 31).

Mikrobiološka diagnostika

Mikroskopiranje

Neposredni mikroskopski pregled vsebine punktata bezgavk, sputuma, BAL-a, biotičnih vzorcev kože in sluznic lahko že v večini primerov privede do pravilne diagnoze bolezni. Za povzročitelja so značilne velike okrogle celice s številnimi perifernimi brsti. Lepše so vidne, če jih obarvamo s CFW, modrilom (ang. *lactophenol cotton blue*) ali po Gramu (4). V histoloških preparatih vzorcev, odvzetih pri biopsiji, se lahko prikažejo tipične brsteče kvasne celice. Priporočajo barvanje po Gomori-ju, HE&E (ang. *hematoxylin – eosin*) in PAS (ang. *periodic acid Schiff*).

Osamitev

Diagnozo potrdimo z osamitvijo povzročitelja v kulturi. Material zasejemo na SABA ali, še bolje, na YEA (ang. *yeast extract agar*), ki mu dodamo antibiotike in cikloheksimid. Po inkubaciji 2–4 tednov pri temperaturi 25–30 °C zraste micelijska oblika, ki redko sporulira. Konverzijo v kvasno obliko dokažemo s subkultivacijo na BHI ali na Kelleyjevem gojišču, ki ga inkubiramo pri 37 °C vsaj štiri tedne. Kolonije so nagubane, v začetni fazi so poleg kvasnih oblik v kulturi prisotni tudi micelijski fragmenti. Konverzija v kvasno obliko poteka počasi (običajno 10–15 dni) (4, 32).

Serološki testi

Serološka diagnostika z detekcijo protiteles je pomembna za diagnostiko parakokcidioidomikoze. Najenostavnejša metoda je ID, ki pokaže cirkulirajoča protitelesa v več kot 90 %

primerov. Test je tudi visoko specifičen in omogoča postavitev diagnoze, vendar samo ta test ne zadošča, saj je lahko pozitiven še več let po uspešno pozdravljeni okužbi. Uporablja se tudi metode RVK in ELISA, žal pa ni komercialno dostopnih testov (4). Pomemben razvoj v diagnostiki so prinesla monoklonska protitelesa, tako pri detekciji specifičnih protiteles, ki se vežejo na specifične antigenske determinante, kakor tudi za detekcijo antigenov, ki jih dokažemo pri približno 60 % bolnikov, vključno s tistimi, ki so imunsko oslabljeni. Titer antigena korelira s potekom bolezni in je dober pokazatelj uspešnosti zdravljenja (27, 30).

Zdravljenje

Bolniki s parakokcidioidomikozo potrebujejo dolgotrajno protiglivično zdravljenje. Napoved je dobra, vendar je treba bolnike še dolgo po končanem zdravljenju kontrolirati, saj so ponovitve bolezni pogoste. Zdravilo izbora je oralni itrakonazol v odmerku 200 mg/dan, ki ga bolniki prejemajo 6 mesecev. Kasnejše ponovitve zdravijo z dodatkom itrakonazola. Tudi oralni ketokonazol je približno enako učinkovit kot itrakonazol, vendar ga bolniki težje prenašajo, priporočen odmerek je 400 mg/dan, 6–18 mesecev. Amfotericin B (0,4–0,5 mg/kg/dan, do skupnega odmerka 1,5–2,5 mg) ostaja zdravilo izbora za težke in neodzivne oblike parakokcidioidomikoze na zgoraj navedena zdravila. Zdravljenje se nadaljuje z azoli ali s sulfonamidi (14).

Napoved poteka bolezni je odvisna od začetnega stadija, v katerem se je bolnik začel zdraviti. Kožne lezije se pozdravijo po nekaj tednih zdravljenja, regresija sprememb v bezgavkah poteka počasneje. Zdravljenje prizadetih notranjih organov poteka s fibrozo in tvorbo granulomov, ki ostajajo trajen vir za kasnejše ponovitve bolezni (27).

KOKCIDIIDOMIKOZA

O mikroorganizmu

Naravno okolje *Coccidioides immitis* je prst na endemskih geografskih področjih, za katere so značilna vroča poletja z malo padavin, mile zime in alkalna prst. V Severni Ameriki so to osrednja in južna Kalifornija, južna Arizona,

južni del Nove Mehike, zahodni deli Teksasa, endemska področja segajo še južneje, v puščavske regije Srednje in Južne Amerike (tabela 1). Z molekularnimi analizami so dokazali, da se izolati iz Kalifornije razlikujejo od izolatov iz drugih regij, zato so predlagali, da se prvotno ime ohrani za izolate iz Kalifornije, ostale pa so poimenovali *Coccidioides posadasii*. Obe vrsti povzročata identično klinično sliko in se ju s klasičnimi mikološkimi preiskavami ne da ločiti med seboj (33).

C. immitis je dimorfna gliva. V naravi raste kot plesen, ki se fragmentira v enocelične strukture, ki jih imenujemo artrospore ali artrokonidiji (3–6 µm). Širijo se po zraku, so močno infektivni in odporni na številne zunanje vplive. Artrospore se pojavijo v kulturi po petih do desetih dneh inkubacije. V okolju preživijo več let. Na običajnih mikoloških gojiščih, na primer na SABA, so kolonije lahko zelo raznolike. Zrastejo običajno že po nekaj dneh inkubacije. Relief je lahko puhast, prašnat, granularen, gladek ali celo naguban, rob kolonij je gladek ali naguban. Barva kolonij je običajno bela, vendar tudi tu opažamo za to vrsto značilno raznolikost, opisane so sive, vijolične, rjavkaste, cimeteaste in rumene barve. Ozadje kolonij je rumene do rjave barve. V tkivu se artrospore preoblikujejo v velike, okrogle, debelostene sferule (10–100 µm), ki vsebujejo številne endospore (2–4 µm). Z rastjo sferule počni in iz nje se sprostito endospore, ki se naprej razvijajo v nove sferule. Parazitska oblika *C. immitis* se razvije iz saprofitske na posebnih za to pripravljenih gojiščih, ki omogočajo konverzijo. Čeprav konverzija ni popolnoma temperaturno odvisna, so ugotovili, da temperatura inkubacije med 37 in 40 °C pospeši konverzijo. Poleg posebno strukturiranega gojišča so ugotovili, da na konverzijo ugodno vpliva tudi pribitek CO₂ (10–20 %) v atmosferi. Do nje pride običajno po treh do petih dneh inkubacije (4, 34, 35).

Epidemiologija in patogeneza

Endemska področja, kjer se v prsti nahajajo artrokonidiji *C. immitis*, so dobro opredeljena. Z epidemiološkimi študijami so potrdili, da ima na teh področjih do 50 % odraslega prebivalstva pozitivno kožno reakcijo na antigene *C. immitis*. Inhalacija prahu z artrokonidiji je najpogostejši način okužbe. Okužba

pušča trajno imunost. Dejavniki tveganja za okužbo so povezani z vremenskimi razmerami okolja in z imunskim stanjem gostitelja. Okoljske študije so pokazale, da večina mikroorganizmov v zgornjih plasteh prsti v najbolj vročih delih poletja, ko prst doseže 60 °C in več, propade. V globini micelij ostane vitalen, posebno v bližini prebivališč glodalcev, saj menijo, da so njihovi izločki pomembni za razmnoževanje glive. V deževni dobi se *C. immitis* razmnoži in ponovno naseli zgornje plasti prsti. Ko se prst posuši, se artrospore z vetrom ali raznimi aktivnostmi (kmetovanje, gradbeno dela, arheološka izkopavanja) dvigajo v zrak in s prahom dosežejo dihala ljudi. Večje zbolevanje je povezano z daljšo in intenzivnejšo izpostavljenostjo artrokonidijem. Dovzetnost za primarno okužbo s *C. immitis* je enaka ne glede na raso, spol ali starost, vendar pa je potek simptomatskih okužb težji pri črnih, aziatih in Filipincih ter pri nosečnicah v zadnjem trimesečju nosečnosti. Pri teh skupinah je večji tudi delež diseminiranih oblik bolezni. Do slednje prihaja štirikrat pogostejše pri odraslih moških kot pri ženskah. Za težjimi oblikami zbolevaljo tudi vsi z okrnjeno celično posredovano imunostjo (33, 36).

Klinične oblike okužbe

Po vdihovanju artrokonidijev se lahko razvijejo različne klinične slike, od prehodne pljučnice, ki se pozdravi brez zdravljenja, do kronične pljučne okužbe ali diseminirane oblike bolezni, ki ogroža življenje bolnika. Večina ljudi okužbo preboli brez simptomatike.

Akutna pljučna kokcidioidomikoza

Med imunsko kompetentnimi približno 40 % ljudi zboli za akutno respiratorno boleznijo, ki se razvije 1–3 tedne po okužbi. Najpogostejši simptomi so povišana telesna temperatura, plevritična bolečina, suh ali produktiven kašelj. Spremljajo jih nespecifični simptomi, podobni gripi, kot so mialgije, artralgije, utrujenost, glavobol in slabši apetit. V prvih dneh bolezni se pri polovici zbolelih pojavi eritematozni kožni izpuščaj po trupu in okončinah. Dlje časa trajajoč izpuščaj in težji potek je tipa eritema nodosum ali eritema multiforme, pojavlja se pri 5 % zbolelih, pogostejše pri ženskah. Oba tipa izpuščaja izzvenita po nekaj

tednih. V eni tretjini primerov jih spremljajo artalgije enega ali več sklepov. Skupek teh simptomov so včasih poimenovali puščavski revmatizem. Na rentgenski sliki akutne pljučne kokcidioidomikoze lahko vidimo eno ali več področij zgostitve tkiva zaradi pneumonitisa s povečanimi hilusnimi bezgavkami ali brez in manjši plevralni izliv. V hemogramu je rahlo povečano število levkocitov, značilen je porast eozinofilcev, delež le-teh je lahko povečan tudi do 25 %. Kožni test postane pozitiven 2–21 dni po pojavu prvih kliničnih znakov bolezni. Akutna pljučna bolezen lahko napreduje v hitro napredujočo diseminirano obliko, ki se lahko konča tudi s smrtnim izidom. Nekateri bolniki ostanejo težko bolni več mesecev, s povišano telesno temperaturo, produktivnim kašljem, prsno bolečino in splošno oslabeledostjo. Smrt je lahko posledica bodisi pljučne prizadetosti ali diseminacije. Težji potek bolezni je običajnejši pri imunsko oslabljenih bolnikih. HIV-pozitivni bolniki, zlasti tisti z zelo nizkim številom CD4 T-limfocitov (manj kot 50/μl), imajo pogosto difuzno prizadetost pljuč, v obliki difuznih retikulonodularnih infiltratov, smrtnost je okoli 70 % (33).

Kronična pljučna kokcidioidomikoza

Približno pri 5–10 % okuženih ostanejo znaki pljučne kokcidioidomikoze dlje časa. Pri nekaterih se oblikujejo solidna žarišča, pogostejše kavitacije, ki običajno izginejo v dveh letih. Večina je asimptomatskih, v 25 % se pojavijo hemoptize (33). V žariščih so pogosto še vitalne glivne celice.

Diseminirana kokcidioidomikoza

Pri manj kot 1 % okuženih posameznikov se razvije diseminirana oblika bolezni. Ta progresivno potekajoča bolezen se razvije običajno 3–12 mesecev po začetni okužbi, lahko pa tudi mnogo kasneje, v obliki reaktivacije prikrita okužbe, ob padcu imunske sposobnosti organizma. Diseminirana oblika okužbe se pogosto razvije pri bolnikih z aidsom in bolnikih po transplantacijah čvrstih organov. Potek okužbe je lahko fulminanten in se nezdravljena že v nekaj tednih konča s smrtnim izidom ali pa okužba poteka v obliki kronične prizadetosti. Najpogostejše so prizadeti koža, kosti, sklepi in meninge. Kožne spre-

membe pogosto spremljajo diseminirano bolezen. Lahko so posamezne ali jih je več, kažejo se v obliki verukoznih papul ali eritematoznih plakov in vozličev. Osteomielitis se pojavlja pri 40 % ljudi z diseminirano okužbo, prizadeta so vretenca, rebra, kosti lobanje in konci dolgih kosti. Vnetje se lahko razširi na sklepe, v obliki artritisa, in na sosednja mehka tkiva, razvijejo se podkožni abscesi. Od sklepov so najpogostejše prizadeti gležnji in kolena. Meningitis se razvije pri 30–50 % diseminiranih oblik okužbe in je najresnejši zaplet kokcidioidomikoze. Potek je prikrit, s kroničnim glavobolom in mentalnimi spremembami v obliki zaspanosti in zmedenosti (33, 34, 37).

Mikrobiološka diagnostika

Pomembno je, da pošiljatelj, ki sumijo na kokcidioidomikozo, ta sum sporočijo laboratoriju, da ti zagotovijo pravilne postopke dela z vzorci in izolati, saj je gliva v micelijski obliki visoko infektivna in za laboratorijske delavce med povzročitelji sistemskih mikoz najbolj nevarna.

Mikroskopiranje

Neposredni mikroskopski preparat kliničnih vzorcev, obdelan s KOH in barvan s CFW (sputum in drugi vzorci spodnjih dihal, sklepna tekočina, punktati abscesov, likvor, bioptični vzorci tkiv), lahko potrdi diagnozo, če v preparatu najdemo značilne debelostene sferule z endosporami. Neposredni mikroskopski preparat je manj občutljiv kot histološko pripravljene preparati, barvani s PAS, z GMS (ang. *Grocott methenamin silver*) ali s H&E. Še nezrele sferule in proste endospore lahko zamenjamo z nebrstečimi celicami *B. dermatitidis* ali *C. neoformans* (4, 33).

Osamitev

Zaradi velike nevarnosti okužb z micelijsko obliko glive za laboratorijske delavce je potrebno, da pri zasajanju sumljivega materiala ravnamo posebej pazljivo. Priporočajo, da naj se material cepi na poševna trdna gojišča in ne v petrijevke. Primerna gojišča za primarno osamitev so SABA, BHI in krvni agar. Pri vzorcih iz kožnih lezij se gojiščem dodajajo antibiotiki in cikloheksimid. Rast lahko opazujemo že po 3–5 dneh inkubacije pri 25–30 °C. Pred mikroskopskim pregledom kulturo glive pre-

lijemo z 1 % formaldehidom, ki naj deluje nekaj ur, s tem uničimo glivo in preprečimo laboratorijske okužbe. Precepljanje artrospor je treba izvajati v biološko varni komori razreda II. ob upoštevanju varnostnih ukrepov 3. stopnje (ang. *biosafety level 3*, BSF-3) (4, 35, 38). Ob pozitivnem izvidu neposrednega mikroskopskega preparata ali pozitivni serokonverziji identifikacija micelijske oblike s konverzijo ali drugimi metodami ni potrebna. V nasprotnem primeru je za potrditev identifikacije na razpolago metoda izbora za rod specifična DNA-sonda (ACCUPROBE, GenProbe, San Diego, ZDA) (35). Druga metoda je potrditev eksoantigena z imunodifuzijo. Konverzija artrokonidijev v sferule pa se izvaja le v referenčnih laboratorijih (38).

Serološki testi

Serološki testi so pomembni za diagnostiko in spremljanje zdravljenja kokcidioidomikoze. V kliničnih laboratorijih so v uporabi trije testi, EIA, imuno-ID in RVK (35). Zadnji naveden je pomemben zaradi zgodovinskih razlogov in je še vedno standard za dokazovanje okužbe mening. Bolj občutljiva ob slednjega sta EIA in ID, z njima dokazujemo prisotnosti IG-M in Ig-G. Za dokazovanje nedavne okužbe določamo Ig-M, ki jih lahko dokažemo 1–3 tedne po pojavu simptomov in izginejo pri ljudeh z akutno pljučno kokcidioidomikozo po nekaj mesecih. IgG se pojavi šele 4–12 tednov po okužbi in ostanejo pozitivna še nekaj mesecev. Titer protiteles korelira s klinično sliko bolezni. Občutljivost ID se giblje med 77 in 90 %. Dostopen je tudi komercialno pripravljen test, ki poleg antigena kokcidioidina vsebuje še pozitivne kontrolne serume in reakcijsko ploščico. Negativni serološki testi okužbe ne izključujejo okužbe, saj je občutljivost najboljčlovejšega testa (EIA) ocenjena na 83 %. Možne so navzkrižne reakcije z antigeni povzročiteljev histoplazme in blastomikoze (33, 35).

Zdravljenje

Potek bolezni je pri večini okuženih (95 %) lahek, okužba se pozdravi brez specifičnega protiglivčnega zdravljenja. Kljub vsemu je treba bolnike, pri katerih se je razvila slika akutne pljučne kokcidioidomikoze in niso potrebovali zdravljenja, spremljati še 1–2 leti

zaradi možnosti razvoja pljučnih ali izvenpljučnih zapletov, ki jih je treba zdraviti. Zdraviti je treba tudi vse s progresivno pljučno boleznijo ali diseminirano okužbo. Skupine, ki zahtevajo zdravljenje, so otroci, nosečnice v tretjem tromesečju nosečnosti, okuženi s HIV, bolniki po transplantacijah čvrstih organov, bolniki na visokodoznem kortikostereoidnem zdravljenju in skupine z večjim tveganjem za težji potek bolezni. Zdravilo izbora je amfotericin B v odmerku 0,6–1 mg/kg/dan 7 dni, nato 0,8 mg/kg vsak drugi dan ali liposomalni amfotericin B 3–5 mg/kg 7 dni, intravenozno, do kliničnega izboljšanja. Oba se v poteku zdravljenja nadomesti s flukonazolom ali z itraconazolom. Skupno trajanje zdravljenja naj ne bi bilo krajše od 12 mesecev. Milejše oblike bolezni se začnejo zdraviti že takoj z enim od slednjih dveh. Priporočeni dnevni odmerki za itraconazol so 200 mg peroralne raztopine 2-krat/dan in za flukonazol 400 mg *per os* 4-krat/dan, 3–12 mesecev. Za imunsko oslabiljene priporočajo dosmrtno/vseživljenjsko preventivno zdravljenje (14, 33, 35).

BIOLOŠKA VARNOST PRI DELU Z DIMORFNIMI GLIVAMI

Opisane so laboratorijske okužbe imunsko kompetentnih posameznikov z glivami *Coccidioides* spp., *H. capsulatum* in *B. dermatitidis*. Do teh je prišlo ob izpostavljenosti sporam gliv, ki so bile prisotne bodisi v okoljskem materialu (prst) ali v kulturah micelijske oblike gliv. Že minimalno odpiranje plošč je dovolj za okužbo, saj pride ob tem do sproščanja ogromnega števila spor, ki je veliko večje od koncentracije spor v endemskem okolju (38). Poročajo, da je kar 90 % laboratorijskih okužb s *Coccidioides* spp. vodilo do razvoja klinične slike (38). Zato je potrebno, da se vsi postopki s sporulirajočimi kulturami *Coccidioides* spp. in *H. capsulatum* ter iz okoljskega materiala, za katerega sumimo, da vsebuje spore teh gliv, izvajajo v biološko varnih komorah razreda II. ob upoštevanju varnostnih ukrepov 3. stopnje. Za rokovanje s kliničnim materialom priporočajo upoštevanje varnostnih ukrepov 2. stopnje (ang. *biosafety level-2*, BSF-2). Laboratorijska okužba s *P. brasiliensis* do sedaj še ni bila opisana (4). Standardi za varno delov v laboratorijih so dostopni na spletu <http://www.cdc.gov/od/sap>.

LITERATURA

1. Antinori S, Magni C, Nebuloni M, et al. Histoplasmosis among human immunodeficiency virus-infected people in Europe: report of 4 cases and review of the literature. *Medicine* 2006; 85: 22–36.
2. Proctor ME, Klein BS, Jones JM, et al. Cluster of pulmonary blastomycosis in a rural community: Evidence for multiple high-risk environmental foci following a sustained period of diminished precipitation. *Mycopathologia* 2002; 153: 113–20.
3. Baily GG, Robertson VJ, Neill P, et al. Blastomycosis in Africa: Clinical features, diagnosis and treatment. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 1005–8.
4. Brandt ME, Warnock DW. Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides, and Other Dimorphic Fungi Causing Systemic Mycoses. In: Murray PR, Baron EL, Jorgensen JH, et al, eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007. p. 1857–73.
5. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Blastomycosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. *Medical Mycology*. 1st ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger; 1992. p. 248–79.
6. Cockerill III FR, Roberts GD, Rosenblatt JE, et al. Epidemic of pulmonary blastomycosis (Nanekagan fever) in Wisconsin canoeists. *Chest* 1984; 86: 688–92.
7. Armstrong CW, Jenkins SR, Kaufman L, et al. Common source outbreak of blastomycosis in hunters and their dogs. *J Infect Dis* 1987; 155: 568–70.
8. Klein BS, Vergeront JM, Weeks RJ, et al. Isolation of Blastomyces dermatitidis in soil associated with a large outbreak of blastomycosis in Wisconsin. *N Engl J Med* 1986; 314: 529–34.
9. Klein BS, Vergeront JM, DiSalvo AF, et al. Two outbreaks of blastomycosis along rivers in Wisconsin: Isolation of Blastomyces dermatitidis from riverbank soil and evidence of its transmission along waterways. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1333–8.
10. Bradsher RW. Pulmonary blastomycosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29 (2): 174–81.
11. Bradsher RW, Stanley W, Chapman PG, et al. Blastomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17 (1): 21–40.
12. Richardson MD, Warnock DW. Blastomycosis. In: Richardson MD, Warnock DW, eds. *Fungal infection: Diagnosis and Management*. 3th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd; 2003. p. 241–9.
13. Chapman SW. Blastomyces dermatitidis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2005. p. 3026–40.
14. Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, et al. *The Sanford Guide to antimicrobial therapy* 2008. 38th ed. Sperryville, ZDA: Antimicrobial therapy Inc; 2008.
15. Deepe GS. Histoplasma capsulatum. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2005. p. 3012–26.
16. Richardson MD, Warnock DW. Histoplasmosis. In: Richardson MD, Warnock DW, eds. *Fungal infection: Diagnosis and Management*. 3th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd; 2003. p. 264–79.
17. Kauffman CA. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20 (1): 115–32.
18. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. *Medical Mycology*. 1st ed. Philadelphia London: Lea & Febiger; 1992. p. 464–513.
19. Paya CV, Roberts GD, Cockerill III FR. Transient fungemia in acute pulmonary histoplasmosis: detection by new blood-culturing techniques. *J Infect Dis* 1987; 156: 313–5.
20. Stockman L, Clark KA, Hunt JM, et al. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, and Histoplasma capsulatum. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 845–50.
21. Wheat LJ, French MLV, Kamel S, et al. Tewari. Evaluation of cross-reactions in Histoplasma capsulatum serologic tests. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 493–9.
22. Wheat LJ, Kauffman CA. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin N Am* 2003; 17: 1–19.
23. Wheat LJ, Cloud G, Johnson PC, et al. Clearance of fungal burden during treatment of disseminated histoplasmosis with liposomal amphotericin B versus itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2354–7.
24. Wheat LJ, Connolly P, Haddad N, et al. Antigen clearance during treatment of disseminated histoplasmosis with itraconazole versus fluconazole in patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 248–50.
25. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2007; 45 (7): 807–25.
26. Freifeld A, Proia L, Andes D, et al. Voriconazole use for endemic fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (4): 1648–51.
27. Richardson MD, Warnock DW. Paracoccidioidomycosis. In: Richardson MD, Warnock DW, eds. *Fungal infection: Diagnosis and Management*. 3th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd; 2003. p. 280–7.
28. Calle D, Rosero S, Orozco LC, et al. Paracoccidioidomycosis in Colombia: An ecological study. *Epidemiol Infect* 2001; 126: 309–15.
29. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: How far from solving the riddle? *Med Mycol* 2001; 39: 232–41.

30. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: un Update. Clin Microbiol Rev 1993; 6 (2): 89–117.
31. Restrepo A, Tobon AM. Paracoccidioides brasiliensis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practica of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2005. p. 3062–8.
32. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Paracoccidioidomycosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. Medical Mycology. 1st ed. Philadelphia London: Lea & Febiger; 1992. p. 594–619.
33. Richardson MD, Warnock DW. Coccidioidomycosis. In: Richardson MD, Warnock DW, eds. Fungal infection: Diagnosis and Management. 3th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd; 2003. p. 249–63.
34. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Coccidioidomycosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. Medical Mycology. 1st ed. Philadelphia London: Lea & Febiger; 1992. p. 356–96.
35. Saubolle MA. Laboratory Aspects in Diagnosis of Coccidioidomycosis. Ann N Y Acad Sci 2007; 1111: 301–14.
36. Galgiani J. Coccidioides Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practica of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2005. p. 3041–51.
37. Laniado-Laborin R. Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in Mexico. Rev Iberoam Micol 2007; 24: 249–58.
38. Sutton DA. Diagnosis of Coccidioidomycosis by Culture: Safety Considerations, Traditional Methods, and Susceptibility Testing. Ann N Y Acad Sci 2007; 1111: 315–25.

Prispelo 23. 3. 2009