

Metody identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida*. Część II. Techniki molekularne

Sebastian Gnat

z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Drożdżaki z rodzaju *Candida* są drobnoustrojami oportunistycznymi, zdolnymi do wywoływania zarówno infekcji powierzchniowych, jak i układowych (1). Szybka diagnostyka jest kluczowym etapem postępowania klinicznego, gdyż umożliwia jak najszybsze podjęcie właściwego leczenia decydującego o przeżyciu pacjenta. Obecnie za ponad 90% zakażeń odpowiedzialnych jest pięć gatunków *Candida*, tj. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* (2, 3, 4). Obserwuje się ciągły wzrost udziału zakażeń wywołanych przez drożdżaki należące do grupy gatunków non-*albicans Candida* (NAC; 5). Obecnie rutynowymi metodami diagnostycznymi zakażeń grzybami drożdżopodobnymi w laboratoriach klinicznych są metody hodowlane, a identyfikacja gatunkowa przeprowadzana jest w oparciu o wyniki testów biochemicznych (6, 7). Podstawową wadą tych metod jest długi czas analizy wynoszący nawet pięć dni (8). W związku z tym, że różne gatunki grzybów z rodzaju *Candida* wykazują odmienną wrażliwość na niektóre leki, np. wręcz powszechnie notowana jest oporność gatunków *C. glabrata* i *C. krusei* na flukonazol, to rodzaj terapii w dużej mierze zależy od gatunku wywołującego infekcję (9, 10, 11). Szczególnie w przypadku zakażeń krwi szybka identyfikacja gatunkowa często decyduje o przeżyciu pacjenta. W porównaniu z metodami fenotypowymi dużo szybszym sposobem identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida* jest zastosowanie metod molekularnych, zwłaszcza opartych o amplifikację kwasów nukleinowych (12).

Methods for species identification of genus *Candida* fungi. Part II. Molecular techniques.

Gnat S., Sub-Department of Microbiology, Institute of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

A rapid and accurate identification of the *Candida* is crucial for clinical treatment of local and systemic candidiasis. Premature diagnosis of invasive fungal infections is problematic because most clinical signs are non-specific and cultures are often negative or become positive too late for the initiation of effective antifungal therapy. Therefore, studies have been performed to improve molecular techniques for the diagnosis of candidiasis. Today, molecular strategies, such as PCR and non-PCR based methods are used to complement conventional laboratory approach. They provide accurate results in much short time of 1.5–3 h. Given the high accuracy and time saving with molecular typing techniques it is likely that most of these methods could improve routine clinical laboratory identification of *Candida* yeast species. However, further studies are needed for standardization of such procedures. This article presents an overview and discussion on molecular identification methods in the context of their application for the diagnosis of *Candida* fungi. Particular attention has been focused on the advantages and limitations of the indicated methods and the possibilities of their implementation for routine use in clinical laboratories.

Keywords: *Candida*, identification, molecular techniques, MALDI-TOF MS.

Metody identyfikacji molekularnej stały się popularne ze względu na ich wysoką dokładność, czułość, czyli niski odsetek wyników fałszywie dodatnich i specyficzność, określoną jako niski odsetek

wyników fałszywie ujemnych, w identyfikacji i różnicowaniu *C. albicans* od innych gatunków *Candida* (1, 13). Opisano szczegółowo kilka technik identyfikacji molekularnej i różnicowania gatunków w obrębie rodzaju *Candida*, zarówno z zastosowaniem metod opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), w ujęciu klasycznym i w czasie rzeczywistym (woryginale real-time), jak i technik molekularnych nieopartych na PCR. W tym artykule przedstawiony jest przegląd i omówienie tych metod identyfikacji w kontekście zastosowania w diagnostyce grzybów z rodzaju *Candida*. Szczególna uwaga została skupiona na zaletach i ograniczeniach wskazanych metod oraz możliwościach implementowania do rutynowego stosowania w laboratoriach klinicznych.

Metody oparte na PCR

Pojawienie się reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) miało fundamentalne znaczenie dla technologii testów molekularnych do identyfikacji mikroorganizmów, nie tylko gatunków klasyfikowanych w rodzaju *Candida* (14). Metody te opierają się na amplifikacji i wykrywaniu kwasu nukleinowego drobnoustrojów ze specyficznością, która umożliwia odróżnienie DNA patogenu od materiału genetycznego gospodarza (14, 15, 16, 17), nawet bezpośrednio w próbkach klinicznych

(18, 19). Ponadto metoda ta jest bardzo elastyczna, co pozwala na wprowadzanie szeregu modyfikacji, umożliwiających jej zastosowanie w szerokiej gamie różnorodnych próbek. Popularnymi odmianami są multipleks PCR, zagnieżdżony PCR i PCR w czasie rzeczywistym (20–25), które są opisane bardziej szczegółowo poniżej (tab. 1).

Klasyczny PCR

Podstawowym zadaniem podczas projektowania układu diagnostycznego opartego o klasyczny PCR jest wybór odpowiednich sekwencji, stanowiących cele diagnostyczne, do których będą hybrydować startery oligonukleotydowe (26). Stosowane są dwie strategie. Jedna z nich polega na wyborze sekwencji specyficznych gatunkowo, co oznacza, że produkty reakcji PCR będą uzyskiwane jedynie w przypadku obecności DNA konkretnego gatunku grzybów *Candida* w badanej próbce (18, 27, 28, 29). W tym podejściu wybrane cele molekularne muszą stanowić zakonserwowane ewolucyjnie sekwencje, o niewielkim zróżnicowaniu genetycznym w obrębie gatunku, aby możliwe było otrzymanie pozytywnych wyników dla wszystkich szczepów sklasyfikowanych w tym samym gatunku (29, 30). Z drugiej strony sekwencje te nie mogą prezentować wysokiego stopnia

Tabela 1. Przykładowe metody PCR do identyfikacji drożdżaków z rodzaju *Candida* i ich cele molekularne

Metoda	Cel molekularny	Identyfikowane gatunki	Piśmiennictwo
Klasyczny PCR	geny kodujące proteazy aspartylowe	<i>C. albicans</i>	Flahaut i wsp., 1998 (26)
	gen aktyny (ACT1)	<i>Candida</i> spp.	Kan, 1993 (27)
	gen Hsp90 (kodujący białko szoku cieplnego)	<i>C. albicans</i>	Crampin i Matthews, 1993 (29)
	sekwencje telomerowe mitochondrialnego DNA	<i>C. parapsilosis</i>	Nosek i wsp., 2002 (28)
Złożony PCR	gen topoizomerazy II	wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Kanbe i wsp., 2002 (18)
	ITS1/ITS2	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> i <i>C. albicans</i>	Luo i Mitchell, 2002 (30)
Multipleks PCR	ITS1/ITS2/5,8S rDNA	wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Fujita i wsp., 2002 (31)
	ITS1 i ITS2	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. lusitanae</i> i <i>C. dubliniensis</i>	Carvalho i wsp., 2007 (37)
	ITS1 i 5.8S rDNA	<i>C. glabrata</i> , <i>C. nivariensis</i> i <i>C. bracarensis</i>	Romeo i wsp., 2009 (38)
	MP65	identyfikacja rodzajowa	Arancia i wsp., 2009 (39)
Nested PCR	gen demetylazy lanosterolowej (L1A1)	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	Burgener Kairuz i wsp., 1994 (32)
PCR-RFLP (MspI)	ITS1/ITS2/5,8S rDNA	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> i <i>C. tropicalis</i>	Mousavi i wsp., 2007 (24)
PCR połączony z elektroforezą kapilarną	ITS1/ITS2	wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Chen i wsp., 2001 (21)
PCR EIA (Enzyme Immunoassay)	ITS 2	wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Elie i wsp., 1998 (21)
Sekwencjonowanie produktów PCR	18S rRNA	wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Gharizadeh i wsp., 2004 (22)
Real-time PCR	TaqMan	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> i <i>C. ortopsilosis</i>	Souza i wsp., 2012 (33)
	TaqMan	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. kefyr</i> i <i>C. glabrata</i>	Guiver i wsp., 2001 (45)
Złożony real-time PCR	gen Rnazy P	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> i <i>C. albicans</i>	Innings i wsp., 2007 (36)

podobieństwa pomiędzy różnymi gatunkami drożdży *Candida*, w przeciwnym wypadku można uzyskać wyniki fałszywie pozytywne (28, 31, 32). Druga strategia polega na detekcji sekwencji, które wykazują specyficzność dla wszystkich gatunków sklasyfikowanych w rodzaju *Candida*. Stopień podobieństwa tych sekwencji pomiędzy gatunkami powinien być bardzo wysoki, dochodzący do 100% (24, 26). Takie podejście służy wyłącznie do detekcji drożdży z rodzaju *Candida* w materiale klinicznym, bez wykonania identyfikacji gatunkowej patogenu (32). Na podkreślenie zasługuje niski próg wykrywalności patogenu z zastosowaniem technik opartych o klasyczny PCR, nawet kilkakrotnie przewyższający miarę jtk/ml (liczba jednostek tworzących kolonię), którą stosuje się w kontekście badań hodowlanych (26). Dzięki temu stosowanie metod opartych o PCR pozwala uniknąć wyników fałszywie negatywnych, co jest jedną z przyczyn, które wskazują na ich przewagę w diagnostyce mikrobiologicznej (29, 31, 33).

Multipleks PCR

Ostatnie badania sugerują, że multipleksowa reakcja PCR jest bardziej czuła i specyficzna w szybkiej identyfikacji najpopularniejszych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* (30, 31, 34, 35). W tej technice stosowane są łącznie różne startery ukierunkowane na cele molekularne umożliwiające identyfikację odrębnych gatunków w jednej próbce PCR (35, 36). Stanowi to z perspektywy klinicznej zaletę metody. Najczęściej pojawiający się problem stanowi możliwość hybrydyzacji pomiędzy różnymi sekwencjami starterów. Carvalho i wsp. (37) opisali strategię multipleksowego PCR, umożliwiającą identyfikację ośmiu istotnych klinicznie gatunków grzybów z rodzaju *Candida*, a mianowicie *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* i *C. dubliniensis* (ryc. 1). Multipleksowa reakcja PCR została oparta na amplifikacji dwóch fragmentów w obrębie regionów ITS1 (Internal Transcribed Spacer) i ITS2. Startery zastosowane w jednej reakcji obejmują: dwa startery specyficzne dla całego rodzaju *Candida* i osiem starterów specyficznych. Według autorów, dzięki takiemu podejściu udało się zidentyfikować gatunkowo 231 izolatów bezpośrednio z próbek, co świadczy o wysokiej przydatności tej metody w laboratoriach klinicznych. Należy również podkreślić, że ta stosunkowo prosta metoda jest bardzo specyficzna i czuła. Jej próg wykrywalności wynosi ok. 2 komórek na ml, a całą procedurę można wykonać w ciągu 5 godz. Co więcej, metoda umożliwia różnicowanie poszczególnych gatunków *Candida* w zakażeniach mieszanych.

Romeo i wsp. (38) przetestowali protokół multipleksowego PCR, który wykorzystuje tylko cztery startery specyficzne względem regionu ITS1 i sekwencji 5.8S rDNA. Zaproponowana technika umożliwia identyfikację *C. glabrata*, *C. nivariensis* i *C. braccarensis*. Za pomocą tego protokołu autorzy byli w stanie zidentyfikować 81 izolatów klinicznych ze 100% czułością (brak wyników fałszywie ujemnych) i 100% swoistością (brak wyników fałszywie dodatnich). Natomiast

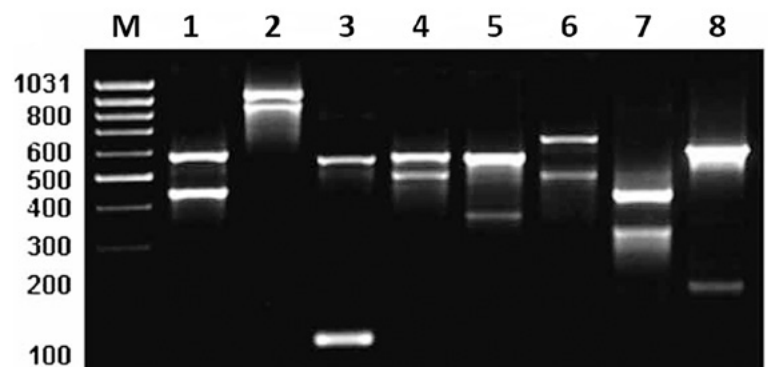
Arancia i wsp. (39) zaobserwowali, że multipleks PCR przy użyciu różnych par starterów specyficznych względem genu MP65, kodującego mannoproteiny, umożliwił identyfikację grzybów z rodzaju *Candida* ze 100% wiarygodnością, a jednocześnie nie odnotowano, aby uzyskiwane były wyniki fałszywie pozytywne dla izolatów należących do innych rodzajów grzybów. Ponadto autorzy stwierdzili, że potrzebne są dalsze badania nad możliwością identyfikacji *Candida* bezpośrednio z próbek pobranych od pacjentów z inwazyjną kandydozą.

Nested PCR

Technika zagnieżdżonego PCR została zaadaptowana do stosowania w identyfikacji grzybów z rodzaju *Candida* przez Bounoux i wsp. (40) i Kanbe i wsp. (18). W technice stosowane są dwa zestawy starterów do specyficznej amplifikacji DNA *Candida* spp., w dwóch kolejnych seriach PCR, co znacznie poprawia specyficzność i czułość identyfikacji.

Startery stosowane w pierwszej serii, tzw. zewnętrzne startery, celują w większy region do amplifikacji, czyli dłuższy fragment DNA. W drugiej serii PCR następuje amplifikacja sekwencji docelowej na matrycy produktu z poprzedniej reakcji (32). Nested PCR jest uważany za bardzo specyficzną technikę, ponieważ jeśli niewłaściwy fragment PCR został zamplifikowany w pierwszej serii, istnieje bardzo małe prawdopodobieństwo, że region zostanie ponownie zamplifikowany przez drugą parę starterów. Można zauważyć, że jeśli drugi zestaw starterów jest starannie zaprojektowany tak, aby zapobiec hybrydyzacji pomiędzy starterami, mieszanie starterów można stosować wspólnie w jednej serii PCR, aby zmniejszyć koszty analizy (41).

Wyniki uzyskane w doświadczalnym zakażeniu królików wykazały, że czułość zagnieżdżonej reakcji PCR w diagnostyce kandydozy ogólnoustrojowej była wyższa w próbkach surowicy niż w pełnej krwi (40). Swoistość *in vitro* reakcji PCR wynosiła 100% w pięciu kolejnych powtórzeniach. Kanbe i wsp. (18) stwierdzili, że zagnieżdżona reakcja PCR miała nieco niższą czułość niż klasyczny PCR z użyciem starterów specyficznych względem genu rRNA.



Ryc. 1. Elektroforegram agarozowy uzyskany z multipleks PCR do identyfikacji ośmiu gatunków *Candida* (37). M: marker molekularny, 1: *C. albicans*, 2: *C. glabrata*, 3: *C. krusei*, 4: *C. tropicalis*, 5: *C. parapsilosis*, 6: *C. guilliermondii*, 7: *C. lusitaniae*, 8: *C. dubliniensis*

Real time PCR

PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR) jest wariantem standardowej techniki PCR, która umożliwia ilościowe oznaczenie amplifikowanego DNA w czasie rzeczywistym w każdym cyklu PCR (14). Istnieje kilka metod detekcji produktów amplifikacji PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu barwników fluorescencyjnych, które można podzielić na dwie główne klasy, w zależności od typu związku fluorescencyjnego. Pierwszą odmianą jest monitorowanie PCR za pomocą znakowanych sond, które specyficznie hybridują z nowo utworzonymi cząsteczkami amplikonu, drugą stanowi bezpośrednie barwienie nowo utworzonych dwuniciowych cząsteczek DNA za pomocą takich barwników, jak SYBR Green I, BEBO lub LC Green (14). Według Trtkova i Raclavsky (14) użycie sond zwiększa specyficzność PCR, ponieważ dodatkowa homologia sekwencji między amplikonem a sondą jest niezbędna do wzbudzenia fluorescencji. Badania ostatnich lat sugeruje jednak, że monitorowanie PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu różnych technologii wykazuje podobną specyficzność (42–44).

Opracowano procedury PCR w czasie rzeczywistym w celu identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida*. Należy do nich przede wszystkim test TaqMan (Perkin-Elmer Corp., Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), którego główną zaletą jest umożliwienie szybkiej identyfikacji kilku istotnych gatunków *Candida*, w tym *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* i *C. glabrata* (33, 45–47). Metoda ta pozwala na analizę próbek średnio w 4 godz. Guiver i wsp. (45) zastosowali TaqMan PCR do szybkiej identyfikacji izolatów klinicznych *Candida* i wykazali 100% swoistość identyfikacji gatunkowej. Podobnie Shin i wsp. (48) wykazali, że fluorescencyjne sondy specyficzne dla gatunku wykryły i prawidłowo zidentyfikowały 95,1% gatunków drożdży *Candida*, m. in. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. parapsilosis*, bez fałszywych wyników pozytywnych. Autorzy ci wskazują ponadto, że czas analizy określony na 4–5 godz. jest realnie oszacowany (45, 48). Poza identyfikacją gatunków techniką TaqMan zastosowano również do analizy ekspresji genów w biofilmach tworzonych przez grzyby z rodzaju *Candida* i porównania ich profilu transkrypcyjnego w odniesieniu do komórek mikroorganizmów bytujących poza biofilmem (44).

Maaroufi i wsp. (49) opisali test PCR w czasie rzeczywistym z sondą TaqMan do ilościowego oznaczenia rybosomalnego DNA (rDNA) *C. albicans* w próbkach krwi. Badacze ci stwierdzili, że w porównaniu z wynikami posiewu krwi czułość i swoistość tego testu była zdecydowanie wyższa, wynosząca odpowiednio 100 i 97%. Natomiast negatywna wartość predykcyjna techniki z sondą TaqMan wynosiła 100% (49, 50).

Alternatywnie do testu PCR w czasie rzeczywistym i sondą TaqMan stosowana jest technika z wykorzystaniem urządzenia LightCycler® (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy), w którym wymuszony ruch powietrza wraz ze szklanymi kapilarami służy do szybkiego ogrzewania i chłodzenia komory

reakcyjnej (51). Jak dotąd tylko kilka raportów (52, 53, 54, 55, 56) opisało zastosowanie urządzenia LightCycler® do wykrywania, identyfikacji lub oznaczania ilościowego gatunków drożdży *Candida* w kontekście laboratorium klinicznego, ta metoda wydaje się jednak mieć potencjał do szybkiej diagnostyki kandydoz (17, 57). Wykazano, że metoda LightCycler® PCR jest użyteczna do szybkiego badania przesiewowego izolatów *C. albicans* (51, 53) i ilościowego określania ekspresji genów lekooporności u tych mikroorganizmów (51). Selvarangan i wsp. (56) zaobserwowali, że sześć gatunków z rodzaju *Candida*, tj. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. lusitanae* w PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu urządzenia LightCycler® zostało zidentyfikowanych ze 100% czułością i 100% swoistością. Schabereiter-Gurtner i wsp. (19) również zaproponowali metodę LightCycler® real time PCR do wykrywania i identyfikacji *C. dubliniensis*. Technologia ta jest obiecująca, ponieważ można określić ilość grzybów w próbkach klinicznych, a analizy amplifikacyjne i postamplifikacyjne przeprowadzane są w zamkniętych szklanych kapilarach, co minimalizuje ryzyko przeniesienia zanieczyszczeń (47, 54). Dodatkową zaletą jest możliwość wykonania całej analizy w ciągu 7 godz. (53). Diagnostyka z użyciem tej techniki wymaga jednak specjalistycznego sprzętu i materiałów, które znacznie podnoszą koszty badań. Dunyach i wsp. (57) rozszerzyli metodę LightCycler® real time PCR tak, aby umożliwić szybkie wykrywanie i identyfikację gatunków *Candida* bezpośrednio w ludzkiej surowicy. W tej metodzie skuteczna okazała się tylko jedna para starterów, a identyfikacja była możliwa dla pięciu gatunków *Candida*. Inny test zaproponowali Zhou i wsp. (58), którzy – bazując na modelu amplifikacji toczonego się koła (RCA, Rolling Circle Amplification) – wykorzystali PCR w czasie rzeczywistym do identyfikacji klinicznie ważnych gatunków *Candida*, *Aspergillus* i *Scedosporium*. Test był szybki, umożliwiał analizę w ok. 2 godz., i specyficzny, zapewniając 100% zgodności z identyfikacją fenotypową i wynikami sekwencjonowania ITS.

Deak i wsp. (59) opracowali ekonomiczną, multipleksowaną i specyficzną platformę molekularną Luminex do identyfikacji gatunków *Candida*. Badanie było pierwszym, w którym przetestowano użyteczność panelu sond *Candida* przy użyciu platformy Luminex na dużej liczbie próbek krwi, w tym także dla drobnoustrojów niezidentyfikowanych innymi metodami, a pochodzących z objawowo zdiagnozowanych kandydemii. Autorzy otrzymali 1182 izolatów *Candida* spp., z których test Luminex pozwolił prawidłowo zidentyfikować 1170 izolatów, dla których dostępne były sondy. Pozostałe 12 izolatów (1%), które dały wyniki negatywne, stanowiły gatunki, dla których nie zaprojektowano sond. Wyniki te pokazały, że test Luminex może stanowić alternatywę dla metod referencyjnych, ponieważ jest szybki, zapewnia prawidłową identyfikację gatunkową i jest łatwy w wykonaniu dla użytkownika.

Natomiast Muir i wsp. (60) opisali test do wykrywania DNA grzybów i identyfikacji gatunkowej najbardziej istotnych klinicznie inwazyjnych grzybów

chorobotwórczych za pomocą sond oligonukleotydo- wych z grupami aktywnymi elektrochemicznie i elektro- dów półprzewodnikowych. Autorzy wyznaczyli sondę specyficzną wobec patogenów grzybiczych, obejmującą region genu 18S rRNA, która umożliwiła detekcję wszystkich grzybów niezależnie od przynależności systematycznej oraz sondy specyficzne dla gatunku zaprojektowane na bazie sekwencji regionu ITS2, do identyfikacji gatunków sklasyfikowanych w rodzaju *Candida*. Wyniki wykazały, że metoda była specy- ficzna dla dziewięciu istotnych klinicznie gatunków *Candida*, a granica wykrywalności sond specyficz- nych dla gatunku wynosiła ~1 równoważnika genu- mu. Autorzy nie podali procentowej czułości i swo- istości tego konkretnego testu elektrochemicznego.

Wyniki innego badania sugerują również, że PCR w czasie rzeczywistym może być odpowiedni do po- miaru efektów działania środków przeciwgrzybiczych wobec dojrzałych biofilmów *C. albicans* (42, 61). Auto- rzy stwierdzili, że ten test molekularny był wysoce dokładny w szerokim zakresie gęstości upakowania komórek grzyba w złożonych układach biologicznych zawierających obok drobnoustrojów elementy im- munologiczne lub komórki błony śluzowej i był od- powiedni do oceny żywotności biofilmu grzyba (42).

Metody molekularne nieoparte na PCR

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z son- dami oligonukleotydoowymi znakowanymi fluore- sceiną została uznana za odpowiedni sposób iden- tyfikacji drożdży bez potrzeby uzyskiwania czystej kultury. Zastosowanie sond peptydowych kwasu nu- kleinowego (PNA, peptide nucleic acid) łączy ich wy- sokie powinowactwo z zaletami celowania w ściśle ustrukturyzowany region rRNA, a w konsekwen- cji zwiększa potencjał tej metody (14). Test *Candi- da* PNA FISH wykazał bardzo wysoką czułość i swo- istość. Zaletą technologii PNA FISH jest to, że można ją przeprowadzić bezpośrednio z próbek klinicznych, m.in. z butelek z dodatnimi posiewami krwi, a anali- zy identyfikacyjne są precyzyjne, dzięki zastosowa- niu sond PNA o wysokim stopniu swoistości gatun- kowej. W tym kontekście Shepard i wsp. (62) ocenili zastosowanie testu PNA FISH do identyfikacji *C. albicans* i *C. glabrata* z posiewów krwi, które były do- datnie dla drożdży. Czułość wykrywania dla *C. albi- cans* i *C. glabrata* wyniosła odpowiednio 98,7 i 100%, a swoistość dla obu gatunków została oszacowana na 100%. Wyniki badania potwierdziły bardzo wysoką precyzję i użyteczność testu do szybkiej, jednocze- snej identyfikacji *C. albicans* i *C. glabrata*. Ponadto, sondy można dodawać bezpośrednio do rozmazów wykonanych z krwi i hybrydyzować przez 90 minut (63). Metoda ta umożliwia również dokładną iden- tyfikację klinicznych izolatów drożdży przy użyciu dwóch technik: cytometrii przepływowej i mikrosko- pii fluorescencyjnej. Czułość metody PNA FISH zosta- ła oszacowana jako co najmniej tak samo wysoka jak większości testów opartych na PCR. Co więcej, dzięki prostemu protokołowi technicznemu z wyłączeniem

ekstrakcji DNA, cała analiza PNA FISH wymaga jedy- nie 2,5 godz. od uzyskania pozytywnego wyniku po- siewu krwi na obecność drożdży *Candida* (14, 63, 64).

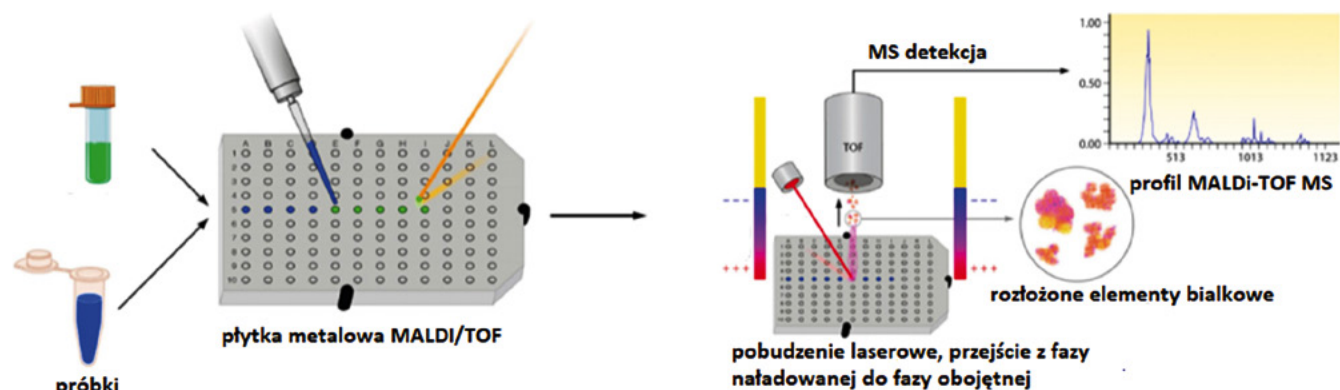
Piroliza i spektrometria (PyMS)

Spektrometria mas jest techniką stosowaną od koń- ca XIX wieku, jednak do identyfikacji drobnoustrojów zastosowano ją po raz pierwszy w latach 70. XX wie- ku (65). Timmins i wsp. (66) opisali szczegółowo dla grzybów z rodzaju *Candida* dwa odmienne podejścia z wykorzystaniem spektroskopii mas, tj. procedurę analizy obejmującą połączenie pirolizy ze spektrometrią masową (PyMS, pyrolysis-mass spectrometry) oraz spektroskopię w podczerwieni z transfor- macją Fouriera (FT-IR, Fourier transform-infrared spectroscopy). PyMS obejmuje termiczną degradację złożonego materiału (takiego jak bakterie lub grzyby) w próżni metodą pirolizy punktu Curie. Powoduje to rozszczepienie cząsteczek w ich najsłabszych punk- tach i utworzenie mniejszych, lotnych fragmentów zwanych pirolizatami. Następnie przy użyciu spek- trometru masowego składniki pirolizatu są oddzie- lane na podstawie ich stosunków masy do ładunku (m/z) w celu wytworzenia widma masowego piro- lizy, które można wykorzystać jako chemiczny od- cisk palca złożonego materiału przeznaczonego do analizy. PyMS jest stosunkowo dobrze ugruntowa- ny w mikrobiologii do charakteryzowania bakterii. W szczególności, technika ta okazała się skuteczna w porównaniu międzyszczepowym mikroorgani- zmów ważnych z medycznego punktu widzenia (66). W przeciwieństwie do pomiaru siły wiązań cząste- czek w PyMS, spektroskopia FT-IR mierzy drgania grup funkcyjnych i silnie polarne wiązania, takie jak rozciąganie O-H. Tak więc uzyskiwane w tej meto- dzie „odciski palców” składają się z cech wibracyj- nych wszystkich składników komórki, tj. DNA, RNA, białek oraz składników błony i ściany komórkowej (67). FT-IR umożliwia chemiczne rozróżnianie nie- naruszonych komórek drobnoustrojów bez ich niszczenia i wytwarza złożone biochemiczne odciski palców, które są powtarzalne i odrębne dla różnych bakterii i grzybów.

Timmins i wsp. (66) wykorzystali obydwie metody do analizy tej samej grupy 29 klinicznych i referen- cyjnych izolatów grzybów z rodzaju *Candida*. Szczep- te zostały zidentyfikowane konwencjonalnymi me- todami, jako należące do jednego z trzech gatunków, tj. *Candida albicans*, *C. dubliniensis* i *C. stellatoidea* (ga- tunek blisko spokrewniony z *C. albicans*). W obydwu metodach wszystkie izolaty kliniczne zostały pra- widłowo zidentyfikowane. Niewątpliwą zaletą tych technik jest szybkość analizy, która wynosi zwykle 2 min dla PyMS i 10 s dla FT-IR, bez wliczania czasu na przygotowanie próbek.

Jonizacja laserem wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu i spektrometrią masową (MALDI-TOF MS)

Rozwój spektrometrii masowej w diagnostyce mikro- biologicznej jest przypisywany opracowaniu technik



Ryc. 2. Schematyczny przebieg analizy MALDI-TOF MS

jonizacji MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry), które umożliwiają kompleksową analizę panelu białkowego mikroorganizmów (65, 68). Technika MALDI-TOF MS okazała się szybką, niezawodną i opłacalną alternatywą dla metod fenotypowych i opartych na PCR w identyfikacji grzybów, stając się stopniowo coraz powszechniej dostępnym narzędziem w laboratoriach mikrobiologii klinicznej (69, 70). Metoda ta polega na generowaniu „białkowych odcisków palców” mikroorganizmów, które są porównywane z widmami referencyjnymi dostępnymi w bibliotekach spektralnych opracowywanych przez producentów urządzeń (69; ryc. 2). W metodzie MALDI-TOF MS wykrywane są białka w zakresie mas od 2 do 20 kDa, które reprezentują głównie białka rybosomalne oraz białka metabolizmu podstawowego (65).

Spanu i wsp. (70) ocenili wiarygodność systemu MALDI BioTyper firmy Bruker Daltonic (Bruker Daltonics, Bremen, Niemcy) w identyfikacji drożdży na poziomie gatunku bezpośrednio z butelek do posiewów krwi. Ten system był w stanie zidentyfikować *Candida* spp. z wysoką czułością w zakresie od 95,9% dla *C. albicans* do 86,5% dla gatunków innych niż *C. albicans*. Ponadto, wszystkie ujemne próbki krwi dały również wyniki ujemne w MALDI-TOF MS (swoistość, 100%). Na uwagę zasługuje również krótki czas analizy oscylujący w okolicach 30 min. Na podstawie tych wyników Spanu i wsp. (70) doszli do wniosku, że system Bruker BioTyper jest jedną z bardziej obiecujących alternatyw w celu przyspieszenia dokładnej identyfikacji izolatów klinicznych grzybów z rodzaju *Candida* na poziomie gatunku. W przypadkach, w których oryginalna baza danych nie zawierała widm referencyjnych dla niektórych określonych mikroorganizmów, profile MALDI-TOF można dodać ręcznie do biblioteki w celu ponownej oceny wszystkich uzyskanych widm (71). Następnie podawany jest wynik MALDI-TOF z wartością wiarygodności identyfikacji za pomocą określonego współczynnika. W badaniu Dhiman i wsp. (69) technika MALDI-TOF MS według procedury Bruker Daltonics (Brema, Niemcy) dała 96,3 i 84,5% dokładnych identyfikacji na poziomie gatunku (współczynnik wiarygodności $\geq 1,8$) dla 138 powszechnych i 103 archiwalnych szczepów drożdży. Wykazano również, że technika jest w stanie skutecznie odróżnić *C. albicans* od *C. dubliniensis* (69).

Na rynku dostępne są obecnie trzy różne platformy identyfikacji MALDI-TOF MS, przystosowane do rutynowej identyfikacji grzybów: MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy), VitekMS (BioMerieux, Craaponne, Francja) i Andromas (Andromas SAS, Paryż, Francja). Dodatkowo, czwarta platforma produkowana przez Axima@Saramis, która została pierwotnie opracowana przez Anagnostec (Poczdami, Niemcy), jest również wyposażona w oprzyrządowanie Vitek MS do analizy widm. Systemy te różnią się przede wszystkim sposobem przetwarzania widm, algorytmami stosowanymi do tworzenia profilu białkowego oraz używanymi do porównywania i wyrażania podobieństwa między badanym widmem a widmami referencyjnymi (65).

Podsumowanie

W laboratoriach klinicznych do diagnostyki mykologicznej, zwłaszcza w podejrzeniu kandydozy, zazwyczaj wybierane są techniki fenotypowe ze względu na wysoką dostępność, stosunkowo niski koszt i brak konieczności posiadania zaawansowanego sprzętu do innych analiz. Metody te są jednak pracochłonne, czasochłonne i prezentują niższą wiarygodność w identyfikacji szerokiego spektrum gatunków grzybów z rodzaju *Candida*, porównując do technik opartych o analizy molekularne. Mając na uwadze te ograniczenia konwencjonalnych metod, opracowano szereg metod molekularnych, zarówno opartych na PCR, jak i niezależnych od tego narzędzia. Obecnie są one stosowane raczej jako uzupełnienie metod konwencjonalnych aniżeli metody pierwszego wyboru. Niewątpliwie zapewniają dokładniejsze wyniki w znacznie krótszym czasie wynoszącym ok. 1,5–3 godz. Szybki postęp technologiczny jaki obserwowany jest w rozwoju technik diagnostycznych, prawdopodobnie przyczyni się do ich upowszechnienia w laboratoriach klinicznych w najbliższych latach. Zadaniem specjalistów zajmujących się mykologią medyczną są dalsze badania w celu standaryzacji technicznej takich procedur identyfikacyjnych.

Piśmiennictwo

1. Staniszevska M., Bondaryk M., Kowalska M., Magda U., Łuka M., Ochal Z., Kurzątkowski W.: Patogeneza i leczenie zakażeń *Candida* spp. *Postep Mikrobiol.* 2014, 53, 229–240.

2. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyla M.: A global view on fungal infections in humans and animals: infections caused by dimorphic fungi and dermatophytoses. Published online 2021.
3. Gnat S., Łagowski D.: Zakażenia grzybicze u koni. Część III. Grzybice głębokie i układowe. *Życie Wet.* 2021, **96**, 430–439.
4. Gnat S., Łagowski D.: Zakażenia grzybicze u koni. Część I. Dermatomykozy i keratomykozy. *Życie Wet.* 2021, **96**, 260–267.
5. Sadeghi G., Ebrahimi-Rad M., Mousavi S.F., Shams-Ghahfarokhi M., Razzaghi-Abyaneh M.: Emergence of non- *Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *J. Mycol. Med.* 2018, **28**, 51–58.
6. Liu Y., Huang X., Yi X., He Y., Mylonakis E., Xi L.: Detection of *Talaromyces marneffei* from Fresh Tissue of an Inhalational Murine Pulmonary Model Using Nested PCR. Eugenin EA, ed. *PLoS One*. 2016, **11**, e0149634.
7. Xiao J., Xu G., de Hoog S., Qiao J., Fang H., Li Y.: Oral Prevalence of *Candida* Species in Patients Undergoing Systemic Glucocorticoid Therapy and the Antifungal Sensitivity of the Isolates. *Infect. Drug Resist.* 2020, **Volume 13**, 2601–2607.
8. Clancy C.J., Nguyen M.H.: Diagnosing Invasive Candidiasis. Kraft CS, ed. *J. Clin. Microbiol.* 2018, **56**.
9. Dhasarathan P., AlSalhi M.S., Devanesan S., Subbiah J., Ranjitsingh A.J.A., Binsalah M., Alfuraydi A.A.: Drug resistance in *Candida albicans* isolates and related changes in the structural domain of Mdr1 protein. *J. Infect Public Health.* 2021, **14**, 1848–1853.
10. Hassan Y., Chew S.Y., Than L.T.L.: *Candida glabrata*: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. *J. Fungi.* 2021, **7**, 667.
11. Kotey F.C., Dayie N.T., Tetteh-Uarcoo P.B., Donkor E.S.: *Candida* Bloodstream Infections: Changes in Epidemiology and Increase in Drug Resistance. *Infect. Dis. Res. Treat.* 2021, **14**, 117863372110269.
12. Carolus H., Jacobs S., Lobo Romero C., Deparis Q., Cuomo C.A., Meis J.F., Van Dijkck P.: Diagnostic Allele-Specific PCR for the Identification of *Candida auris* Clades. *J. Fungi.* 2021, **7**, 754.
13. Neppelenbroek K., Campanha N., Spolidorio D., Spolidorio L., Seo R., Pavarina A.: Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* 2006, **12**, 242–253.
14. Trtkova J., Raclavsky V.: Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed. Pap.* 2006, **150**, 51–61.
15. White P.L., Williams D.W., Kuriyama T., Samad S.A., Lewis M.A.O., Barnes R.A.: Detection of *Candida* in Concentrated Oral Rinse Cultures by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 2101–2107.
16. Williams D.W., Wilson M.J., Lewis M.A., Potts A.J.: Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 2476–2479.
17. Fricke S., Fricke C., Schimmelpfennig C., Oelkrug C., Schönfelder U., Blatz R., Zilch C., Faber S., Hilger N., Ruhnke M., Rodloff A.C.: A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species. *J. Appl. Microbiol.* 2010, **109**, 1150–1158.
18. Kanbe T., Horii T., Arishima T., Ozeki M., Kikuchi A.: PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast.* 2002, **19**, 973–989.
19. Schabereiter-Gurtner C., Selitsch B., Manfred L., Rotter A., Hirschl M., Willinger B.: Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**, 906–914.
20. Avni T., Leibovici L., Paul M.: PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**, 665–670.
21. Chen Y.-C., Eisner J.D., Kattar M.M., Rassouliyan-Barrett S.L., Lafe K., Bui U., Limaye A.P., Co-okson B.T.: Polymorphic Internal Transcribed Spacer Region 1 DNA Sequences Identify Medically Important Yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 4042–4051.
22. Gharizadeh B., Norberg E., Loeffler J., Jalal S., Tollemaier J., Einsele H., Klingspor L., Nyren P.: Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing™ technology. Identifizierung medizinisch wichtiger Pilze mittels Pyrosequencing™-Technik. *Mycoses.* 2004, **47**, 29–33.
23. Elie C.M., Lott T.J., Reiss E., Morrison C.J.: Rapid Identification of *Candida* Species with Species-Specific DNA Probes. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 3260–3265.
24. Mousavi S.A.A., Khalesi E., Bonjar G.H.S., Aghighi S., Sharifi F., Aram F.: Rapid molecular diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Bio-technology.* 2007, **6**, 583–587.
25. Sandini S., Stringaro A., Arancia S., Colone M., Mondello F., Murtas S., Girolamo A., Mastrangelo N., De Bernardis F.: The MP65 gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* 2011, **11**, 106.
26. Flahaut M., Sanglard D., Monod M., Bille J., Rossier M.: Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Samples by DNA Amplification of Common Regions from *C. albicans* -Secreted Aspartic Proteinase Genes. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 395–401.
27. Kan V.L.: Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Candidemia. *J. Infect. Dis.* 1993, **168**, 779–783.
28. Nosek J., Tomáška L., Ryčovská A., Fukuhara H.: Mitochondrial Telomeres as Molecular Markers for Identification of the Opportunistic Yeast Pathogen *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 1283–1289.
29. Crampin A.C., Matthews R.C.: Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J. Med. Microbiol.* 1993, **39**, 233–238.
30. Luo G., Mitchell T.G.: Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 2860–2865.
31. Fujita S.-I., Senda Y., Nakaguchi S., Hashimoto T.: Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 3617–3622.
32. Burgener-Kairuz P., Zuber J., Jaunin P., Buchman T., J.B., Rossier M.: Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A) gene fragment. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **32**, 1902–1907.
33. Souza A.C.R., Ferreira R.C., Goncalves S.S., Quindos G., Eraso E., Bizerra F.C., Briones M.R.S., Colombo A.L.: Accurate Identification of *Candida parapsilosis* (Sensu Lato) by Use of Mitochondrial DNA and Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2012, **50**, 2310–2314.
34. Lau A., Sorrell T.C., Chen S., Stanley K., Iredell J., Halliday C.: Multiplex Tandem PCR: a Novel Platform for Rapid Detection and Identification of Fungal Pathogens from Blood Culture Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46**, 3021–3027.
35. Iwen P.C., Freifeld A.G., Bruening T.A., Hinrichs S.H.: Use of a Panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Pathogens in a Commercial Blood Culture System. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 2292–2293.
36. Innings A., Ullberg M., Johansson A., Rubin C., Noreus N., Isaksson M., Herrmann B.: Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**, 874–880.
37. Carvalho A., Costa-De-Oliveira S., Martins M.L., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Ludovico P.,



Katalog produktów Elanco dla zwierząt gospodarskich Polska



Aby uzyskać dostęp i pobrać
katalog produktów Elanco
dla zwierząt gospodarskich
zeskanuj kod QR



- Rodrigues F.: Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med. Mycol.* 2007, **45**, 619–627.
38. Romeo O., Scordino F., Pernice I., Lo Passo C., Criseo G.: A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida braccarenensis*. *J. Microbiol. Methods.* 2009, **79**, 117–120.
 39. Arancia S., Sandini S., Cassone A., De Bernardis F.: Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in PCR methods for the identification of five medically important *Candida* species. *Mol. Cell. Probes.* 2009, **23**, 218–226.
 40. Bougnoux M.-E., Dupont C., Mateo J., Saulnier P., Faivre V., Payen D., Nicolas-Chanoine M.-H.: Serum Is More Suitable than Whole Blood for Diagnosis of Systemic Candidiasis by Nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 925–930.
 41. Neppelenbroek K., Seó R., Urban V., Silva S., Dovigo L., Jorge J., Campanha N.: Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* 2014, **20**, 329–344.
 42. Xie Z., Thompson A., Kashleva H., Dongari-Bagtzoglou A.: A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *Candida albicans* biofilms. *BMC Microbiol.* 2011, **11**, 93.
 43. Nett J.E., Brooks E.G., Cabezas-Olcoz J., Sanchez H., Zarnowski R., Marchillo K., Andes D.R.: Rat Indwelling Urinary Catheter Model of *Candida albicans* Biofilm Infection. Depepe GS, ed. *Infect Immun.* 2014, **82**, 4931–4940.
 44. Nett J.E., Marchillo K., Spiegel C.A., Andes D.R.: Development and Validation of an In Vivo *Candida albicans* Biofilm Denture Model. *Infect Immun.* 2010, **78**, 3650–3659.
 45. Guiver M., Levi K., Oppenheim B.: Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J. Clin. Pathol.* 2001, 362–366.
 46. Seo S.C., Ji Y.G., Yoo Y., Kwon M.H., Choung J.T.: Submicron fungal fragments as another indoor biocontaminant in elementary schools. *Environ Sci. Process Impacts.* 2015, **17**, 1164–1172.
 47. Yeo S.F., Wong B.: Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, **15**, 465–484.
 48. Shin J.H., Nolte F.S., Holloway B.P., Morrison C.J.: Rapid Identification of up to Three *Candida* Species in a Single Reaction Tube by a 5' Exonuclease Assay Using Fluorescent DNA Probes. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 165–170.
 49. Maaroufi Y., Heymans C., De Bruyne J.-M., Duchateau V., Rodriguez-Villalobos H., Aoun M., Crokaert F.: Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Blood Samples by Using a TaqMan-Based PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 3293–3298.
 50. Maaroufi Y., De Bruyne J.-M., Duchateau V., Georgala A., Crokaert F.: Early Detection and Identification of Commonly Encountered *Candida* Species from Simulated Blood Cultures by Using a Real-Time PCR-Based Assay. *J. Mol. Diagnostics.* 2004, **6**, 108–114.
 51. Frade J.P., Warnock D.W., Arthington-Skaggs B.A.: Rapid Quantification of Drug Resistance Gene Expression in *Candida albicans* by Reverse Transcriptase LightCycler PCR and Fluorescent Probe Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 2085–2093.
 52. Loeffler J., Hagemeyer L., Hebart H., Henke N., Schumacher U.: Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clin. Chem.* 2000, **46**, 631–635.
 53. Loeffler J., Hebart H., Magga S.: Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* 2000, **38**, 207–212.
 54. Loeffler J., Henke N., Hebart H.: Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 586–590.
 55. Okeke C., Tsuboi R., Ogawa H.: Quantification of *Candida albicans* actin mRNA by the LightCycler system as a means of assessing viability in a model of cutaneous candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 3491–3494.
 56. Selvarangan R., Bui U., Limaye A.P., Cookson B.T.: Rapid Identification of Commonly Encountered *Candida* Species Directly from Blood Culture Bottles. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 5660–5664.
 57. Dunyach C., Bertout S., Phelipeau C., Drakulovski P., Reynes J., Mallié M.: Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler® real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* 2008, **60**, 263–271.
 58. Zhou X., Kong F., Sorrell T., Wang H., Duan Y., Chen S.: Practical method for detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. by use of rolling-circle amplification. *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46**, 2423–2427.
 59. Deak E., Etienne K., Lockhart S., Gade L., Chiller T., Balajee S.: Utility of a Luminex-based assay for multiplexed, rapid species identification of *Candida* isolates from an ongoing candidemia surveillance. *Can. J. Microbiol.* 2010, **56**, 348–351.
 60. Muir A., Jenkins A., Forrest G., Clarkson J., Wheals A.: Rapid electrochemical identification of pathogenic *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* 2009, **58**, 1182–1189.
 61. Chen W., Qin Z.: Development of a gene cloning system in a fast-growing and moderately thermophilic *Streptomyces* species and heterologous expression of *Streptomyces* antibiotic biosynthetic gene clusters. *BMC Microbiol.* 2011, **11**, 243.
 62. Shepard J.R., Addison R.M., Alexander B.D., Della-Latta P., Gherina M., Haase G., Hall G., Johnson J.K., Merz W.G., Peltroche-Llacsahuanga H., Stender H., Venezia R.A., Wilson D., Procop G.W., Wu F., Fiandaca M.J.: Multicenter Evaluation of the *Candida albicans* / *Candida glabrata* Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization Method for Simultaneous Dual-Color Identification of *C. albicans* and *C. glabrata* Directly from Blood Culture Bottles. *J. Clin. Microbiol.* 2008, **46**, 50–55.
 63. Alexander B.D., Pfaller M.A.: Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clin. Infect Dis.* 2006, **43**, S15–S27.
 64. Lischewski A., Kretschmar M., Hof H., Amann R., Hacker J., Morschhäuser J.O.A.C.H.I.M.: Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1997, **35**, 2943–2948.
 65. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A.: Application of the MALDI-TOF MS technique for identification of dermatophytes. *Postępy Mikrobiol - Adv. Microbiol.* 2020, **59**, 315–324.
 66. Timmins E.M., Howell S.A., Alsberg B.K., Noble W.C., Goodacre R.: Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 367–374.
 67. Helm D., Labischinski H., Schallehn G., Naumann D.: Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Microbiology.* 1991, **137**, 69–79.
 68. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M., Osińska M., Sawicki M.: Detection and identification of dermatophytes based on currently available methods – a comparative study. *J. Appl. Microbiol.* 2021, **130**, 278–291.
 69. Dhiman N., Hall L., Wohlfiel S.L., Buckwalter S.P., Wengenack N.L.: Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**, 1614–1616.
 70. Spanu T., Posteraro B., Fiori B., D'Inzeo T., Campoli S., Ruggeri A., Tumbarello M., Canu G., Treccarichi E.M., Parisi G., Tronci M., Sanguinetti M., Fadda G.: Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2012, **50**, 176–179.
 71. Jensen R.H., Arendrup M.C.: *Candida palmioleophila*: Characterization of a Previously Overlooked Pathogen and Its Unique Susceptibility Profile in Comparison with Five Related Species. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**, 549–556.

Dr hab. Sebastian Gnat prof. uczelni,
e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl