

IMUNOCHEMICKÁ A MIKROBIOLOGICKÁ *IN VITRO* DIAGNOSTIKA KANDIDOVÝCH INFEKCIÍ

RUŽENA PILIŠIOVÁ a EMA PAULOVIČOVÁ

Chemický ústav SAV, Centrum Glykomiky, Oddelenie imunochémie glykokonjugátov, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
 ruzena.pilisiova@savba.sk, ema.paulovicova@savba.sk

Došlo 23.10.13, prijaté 13.11.13.

Kľúčové slová: *Candida albicans*, kandidóza, *in vitro* diagnostika

Obsah

1. Úvod
2. Úloha bunkovej steny a jej dominantných štruktúr v patomechanizme kandidóz
3. Úloha kandidových glykánov v humorálnej imunite
4. Imunochemické a mikrobiologické metódy v *in vitro* laboratórnej diagnostike
 - 4.1. Priama mikroskopia
 - 4.2. Kultivácia
 - 4.3. Test tvorby kľúčiacich hýf
 - 4.4. Sérologické metódy
 - 4.5. Detekcia manánu
 - 4.6. Detekcia (1-3)- β -D-glukánu
 - 4.7. Rekombinantné antigény pre diagnostiku invazívnych kandidóz
 - 4.8. Detekcia anti-kandidových protilátok
5. Záver

Úvod

V posledných desaťročiach sa incidencia kvasinkových infekcií spôsobených *Candida albicans* a ďalšími humánnymi oportúnnymi kvasinkovými druhmi patogénov výrazne zvýšila. Predispozičné faktory mykózy sú rôznorodé: zahrňujú nadmerné užívanie širokospektrálnych antibiotík, prispievajúce k incidencii rezistencie; imunosupresiu vyvolanú terapiou onkologických ochorení, transplantáciou orgánov a kostnej drene; progresiu HIV infekcie do AIDS. Používanie katétrov a protéz, spolu s závažnými chirurgickými zákrokmi prispievajú taktiež k rozšíreniu týchto infekcií^{1–4}. V súčasnosti sa viaceré non-*Candida albicans* kandidové druhy objavili ako klinicky významné patogény. U dlhodobo ležiacich hospitalizovaných osôb s ťažkou poruchou imunitného systému sa pozoroval vzostup incidencie ochorení spôsobených týmito druhmi. Naj-

častejšie sa vyskytujú *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a *C. dubliniensis*. Non-*Candida albicans* spp. sú spájané s obdobným spektrom mukokutánných a systémových infekcií ako *C. albicans* a sú dôležitými faktormi nozokomiálnych infekcií. Primárne imunodeficitné stavy ako DiGeorge syndróm, hyper IgE syndróm, deficity tvorby IL12, IL23 a IL17 sa spájajú s incidenciou mukokutánnej formy kandidózy⁵. Vaginálna kandidóza postihuje približne 75 % všetkých žien aspoň raz počas ich života a približne u polovice z nich sa objaví ďalšia epizóda kandidovej vulvovaginitídy a približne u 5 % prípadov sa bude rozvíjať rekurentná kandidová vulvovaginitída⁶. Mortalita v prípade systémovej kandidózy je cca 75 % (cit.^{7,8}). *Candida spp.* sú príčinou približne 85 % všetkých nozokomiálnych mykóz^{9,10}, pričom úmrtnosť sa udáva od 50 do 60 % (cit.⁹).

Invazívnosť kandid je spojená s trojstupňovým mechanizmom: (i) adhézia k epitelu hostiteľského organizmu a sekrécia proteináz, (ii) tvorba výpučkov blastosporami, rozvoj mycélia resp. hýf a (iii) invázia do epitelu. Charakteristiky spojené s fenotypovým prepnutím, dimorfizmom, adhéziou a sekréciou enzýmov by mohli vysvetliť mechanizmus, ktorým sa pôvodne komenzálna kvasinka môže stať oportúnnym patogénom, vrátane prepnutia medzi saprofytickým a patogénnym správaním^{11,12}.

2. Úloha bunkovej steny a jej dominantných štruktúr v patomechanizme kandidóz

Bunková stena predstavuje komplexnú štruktúru zodpovednú za primárnu interakciu s hostiteľom, je zodpovedná za expresiu antigénov, adhéziu a intercelulárne interakcie¹³. Bunková stena a jej komponenty participujú nielen pri morfogenetických zmenách, ale aj pri reakciách podmienených morfológiou. Zloženie a architektúra bunkovej steny je rôznorodá a varíruje s morfológickou formou. Štúdie o zložení bunkovej steny a jej architektúre počas dimorfného prepnutia poskytujú dôležité informácie, ktoré by mohli prispieť k diagnostike kandidózy. Anti-*C. albicans* bunková imunita sa zameriava na povrchové antigény, interagujúce v procese adhézie kvasinky na cieľové hostiteľské bunky, predovšetkým na úlohu štruktúrnej variability antigénov pri maskovaní kvasinky pred fagocytmi a pri potlačení anti-kandidovej imunitnej odpovede hostiteľa^{14,15}.

Pre pochopenie vzájomných interakcií hostiteľa a kvasinky je potrebné štúdium: (i) komponentov, ktoré vyvolávajú resp. modulujú imunitnú odpoveď hostiteľa, (ii) ich expresie počas rastu kandidy a počas morfogenezy *in vitro* a *in vivo*, (iii) imunoregulačných mechanizmov protektívnej a neprotektívnej antifungálnej odpovede. Roz-

poznávanie kvasiniek hosťiteľskými bunkami je založené na viacerých zložkách bunkovej steny, predovšetkým glykánoch, ktoré predstavujú cca 90 % bunkovej steny.

Hlavné glykány sú: (i) β -1,3-D-glukány, (ii) β -1,6-D-glukány, (iii) chitín a (iv) manán^{13,14,16,17}. Nedávno bol popísaný aj manoproteín- β -D-glukánový komplex bunkovej steny¹⁸.

Manán sa nachádza ako súčasť manoproteínu alebo fosfolipomanánu vo vonkajšej vrstve bunkovej steny ako α - a β -forma resp. v kombinácii. Štúdium expresie povrchových glykánov bunkovej steny prietokovou cytometriou ukázalo, že podiel β -manozidov manoproteínov resp. fosfolipomanánov je zvýšený v stacionárnej fáze rastu, ich prítomnosť v manáne nie je ovplyvnená morfológiou¹⁹. Hlavné sacharidové zložky manoproteínu predstavujú: *N*-glykozylovaný polysacharid a *O*-glykozylované oligosacharidy. Ich význam sa preukázal pri virulencii a v interakciách kvasinky s hosťiteľom. V prípade mukokutánnej a systémovej kandidózy sú manoproteíny a manány hlavnými induktormi imunitnej odpovede hosťiteľa, humorálnej aj bunkovej zložky prirodzenej a adaptívnej anti-kandidovej imunity^{16,20}.

Manány vykazujú výraznú antigenicitu, dominujúcu protilátkovú odpoveď a sérologickú špecifickosť^{21,22}. Štrukturálne a imunochemické analýzy manánových epitopov odhalili vzťahy medzi imunobiologickou účinnosťou a štruktúrou²³.

Sérologické klasifikácie Tsuchiya a spol.²⁴ na základe antigénnej analýzy 7 druhov rodu *Candida* založenej na aglutinácii polyklónovým anti-faktorovým sérom, umožnili charakterizovanie antigénnych faktorov (1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b a 34), špecifických pre medicínsky významné kvasinky rodu *Candida*. Ďalšie štúdie kandidových manánov rozšírili vedomosti o štruktúrálnej analýze epitopov týchto druhovo-špecifických antigénnych faktorov^{19,21}. Rozdiely v štruktúre sprevádzané zmenami rôznych imunobiologických aktivít zodpovedajú prevažne rôznej dĺžke a vetveniu manooligosacharidov a väzbovej anomérii^{25–27}.

β -Glukány sú hlavnou zložkou bunkových stien, β -(1,3)-viazaný lineárny hlavný reťazec často s β -(1,6)-vetvenými bočnými reťazcami sa skladá z opakujúcich sa jednotiek anhydroglukóz²⁸. Zloženie a architektúra bunkovej steny je rôznorodá a varíruje s morfológickou formou. Štúdie o zložení bunkovej steny a jej architektúre počas dimorfného prepnutia poskytujú dôležité informácie, ktoré by mohli prispieť k diagnostike kandidózy. Glukány z kvasiniek majú priemernú M_w nad 10^6 Da, zatiaľ čo M_w myceliálneho glukánu je mierne vyššia²⁹. Expozícia glykánov na bunkovom povrchu sa mení s fungálnym morfológiom, štúdie s Dectin-1 ukázali, že β -D-glukán, zvyčajne maskovaný vrstvou manoproteínu, je počas počiatočnej tvorby výpučkov prítomný na bunkovom povrchu v podobe diskretnej nesúvislej vrstvy³⁰. Hoci pomer β -(1,6)-D-glukánu a β -(1,3)-D-glukánov je podobný u oboch morfológických foriem, β -(1,3)-väzby sú dominantné v počiatočnej fáze germinácie. NMR štúdie β -(1,3)-D-glukánu blastospór a hýfovej formy *C. albicans* zistili rozdiely vo vetvení bočných reťazcov na redukujúcom konci²⁸.

3. Úloha kandidových glykánov v humorálnej imunitě

Viaceré obranné mechanizmy sa podieľajú na neutralizácii virulencie kvasiniek. Ich komplexná spolupráca predpokladá: (i) inhibíciu adhézie mikroorganizmov, (ii) inhibíciu tvorby výpučkov, (iii) opsonizáciu a (iv) priamu kandidacidnú aktivitu^{20,31}. Synteticky pripravené oligosacharidy mimikujúce štruktúru kandidových antigénnych faktorov^{32–34} predstavujú model pre *in vivo* a *ex vivo* imunologické štúdie^{35,36}. Syntetické oligosacharidy na báze glukánu predstavujú ďalší možný model. Krátke redukujúce a lineárne oligo- β -(1,3)-glukány stimulujú fagocytovú aktivitu granulocytov a makrofágov a tiež sekréciu IL-1 β (cit.³⁷). Anti- β -glukánové protilátky zamerané špeciálne proti β -(1,3)-glukánom sú kandidacidné, na rozdiel od protilátok voči β -(1,6)-glukánom³⁸.

Štúdiu β -(1,2)-viazaných manopyranozylových jednotiek ukázalo, že tieto sekvencie pôsobia ako adhezíny v adhezii kandidy na bunky epitelov a endotelov a indukujú protektívne protilátky^{25,39,40}.

α -(1,2)- a β -(1,2)-viazané oligomanozidy sprostredkovávajú adhéziu blastospór *C. albicans* na ľudské enterocyty⁴¹. Úloha anti-kandidových špecifických protilátok v obrane hosťiteľa bola predmetom viacerých výskumov^{40,42}. Preukázalo sa, že špecifickosť kandidových epitopov je dôležitým určujúcim faktorom účinnosti protilátok pri imunitnej ochrane. Experimentálne štúdie na myšiach i.v. imunizovaných manoproteínmi enkapsulovanými v lipozómoch zistili indukciu protektívnej protilátkovej odpovede vedúcu k ochrane voči progresii kandidózy. Protektívna účinnosť protilátok je ovplyvnená množstvom, epitopovou špecifickosťou, protilátkovým izotypom a idiotypom a schopnosťou rýchlo a efektívne viazať komplement k povrchu kandid^{43,44}. Ochranné protilátky proti kvasinkovým antigénom by mohli byť potenciálne užitočné pri adjuvantnej terapii mykotických infekcií, ako bolo ukázané najmä pre IgM a IgG3 izotypové protilátky proti β -(1,2)-mannotrióze⁴⁴. Sekrečné IgA reaguje so skupinou stresových manoproteínov lokalizovaných na povrchu bunkovej steny, inhibujú adhéziu *C. albicans* na HEp-2 bunky a bunky ľudského bukálneho epitelu, ďalej inhibujú germináciu *C. albicans* a vykazujú priamu kandidacidnú aktivitu^{45,46}. *In vitro* sérologická diagnostika je založená na detekcii cirkulujúcich antigénov bunkovej steny *C. albicans*, prevažne β -D-glukánov a α -D-manánov^{47,48}. Simultánna detekcia β - a α -manooligosacharidov bola použitá na potvrdenie mananémie počas systémovej kandidózy u ľudí⁴⁹.

4. Imunochemické a mikrobiologické metódy v *in vitro* laboratórnej diagnostike

Imunitná anti-kandidová odpoveď sa zameriava predovšetkým na povrchové komponenty bunkovej steny kvasiniek, predovšetkým glykány, ktoré predstavujú cca

90 % bunkovej steny. Terčové glykány sú: (i) β -1,3-D-glukány, (ii) β -1,6-D-glukány, (iii) chitín, (iv) manoproteíny resp. (v) manoproteín- β -glukánový komplex (len *C. utilis*). Laboratórne *in vitro* postupy sú zamerané na kvantitatívnu detekciu týchto celulárnych komponentov a v ďalšom na sledovanie ich kinetiky v prípade monitorovania cieľenej terapie.

Klinicko-laboratórna diagnostika kandidóz okrem klasických mikrobiologických metód využíva aj metódy sérologickej imunodiagnostiky, zameranej na detekciu kandidových antigénov a anti-kandidových protilátok v rôznych biologických tekutinách, ako je sérum, sliny, cervikálny sekret, bronchoalveolárna lavážna tekutina, likvor, pleurálny výpotok a i.

4.1. Priama mikroskopia

Priama mikroskopia rôznych biologických vzoriek (stery, moč, spútum, bronchoalveolárna laváž, výpotky, likvor) je najrýchlejšou metódou včasnej diagnostiky kandidových ochorení a je možné na základe morfológie bunkových štruktúr orientačne predikovať etiologické agens. Rýchlosť vyšetrenia predstavuje výraznú výhodu, ale relatívne nízka citlivosť vyšetrenia (nižšia ako pri kultivácii) predstavuje možnosť falošnej negativity, čo znamená, že negatívne mikroskopické vyšetrenie biologickej vzorky nevyučuje možnú fungálnu infekciu.

4.2. Kultivácia

Kultivácia biologických vzoriek umožňuje identifikáciu patogénov a určenie citlivosti izolovaného pôvodcu na antimykotiká. Nevýhodou tejto diagnostiky je pomalší rast kvasiniek, takže sa dokazujú až v priebehu niekoľkých dní. Pri kultivačnom vyšetrení je dôležitým aspektom aj prediktívna hodnota dôkazu mykotického patogénu. Detekcia kvasiniek zo sterilných materiálov, ako sú hemokultúry, likvor a bioptické vzorky má veľmi vysokú prediktívnu hodnotu. Pozitívne kultivácie kvasiniek z nesterilných miest (bronchoalveolárna lavážna tekutina, spútum, moč a i.) majú podstatne nižšiu prediktívnu hodnotu a významne závisia od toho, či ide o kvantitatívne signifikantný nález, od typu mykotického agens, od charakteru vyšetřovaného materiálu a ako aj závažnosti imunodeficitu pacienta. Na izoláciu, diferenciaciu a určenie počtu rôznych druhov kandid, je možné použiť aj tzv. ChromAgar™ Candida test, ktorý je založený na odlišnom zafarbení kolónii do 48 h (najčastejšie izolované *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) v závislosti na druhu kandid. Kvasinku *C. glabrata* je možné identifikovať podľa tvaru malých kolónii a dôkaze asimilácie trehalózy do 2 h (cit.⁵⁰).

4.3. Test tvorby klíčiacych hýf

Test tvorby klíčiacych hýf je založený na rozlíšení zárodočných klíčiacych hýf (germ tubes) od púčikov. Hlavný rozdiel je v absencii konstriekcie, ktorá sa nachádza na púčiku, ktorý sa oddeľuje do materskej bunky. Zárodočné

klíčiace hýfy (germ tubes) sa vytvárajú len za určitých špecifických podmienok: pri 35 °C v prítomnosti séra alebo albumínu po 2–3 h (*C. albicans* je v tomto teste pozitívna)⁵⁰.

Ďalšie diagnosticko-biochemické testy sú založené na schopnosti utilizovať uhlíkové substráty (ako zdroj uhlíka) ako napr. Vitek (bioMérieux Vitek, Hazelwood, Missouri, USA), Api ID 32C (bioMérieux, Lyon, France), Api 20C AUX (bioMérieux, France), Yeast Star (CLARC Laboratories, Heerlen, The Netherlands), Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, France), RapID Yeast Plus system (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Georgia, USA) a Api Candida (bioMérieux, France) (cit.⁵¹).

4.4. Sérologické metódy

Sérologické metódy sú metódy s významnou špecifickosťou, citlivosťou, presnosťou a správnosťou. Sérodiagnostika je zameraná najmä na dôkaz glykánových antigénov a anti-kandidových protilátok. Najčastejšie sa využívajú enzýmové heterogénne analýzy – ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

4.5. Detekcia manánu

Aktuálne je detekcia cirkulujúcich antigénov založená na kvantifikácii sérovej hladiny manánu. Diagnostika je komerčne dostupná od Bio-Rad Labs., Platelia® *Candida* Ag test a od Serion/Virion, Serion ELISA antigen *Candida*, špecifická diagnostika je vysoká (90–100 %), problémom je však nízka citlivosť (41–53 %). Vzhľadom na tranzitný výskyt mananémie sú potrebné opakované odbery pre jednoznačný dôkaz séropozitivity. Platelia® *Candida* Ag test využíva monoklónovú protilátku proti α -manopentaóze v *C. albicans* manáne, vykazuje 75% citlivosť a 97% špecifickosť. Vzhľadom k variabilnému zastúpeniu α - a β -viazaných manopyranozylových jednotiek v komplexnej molekule manánu je táto diagnostika nedostačujúca. Komplexnejší prístup k diagnostike tranzitnej mananémie zohľadňujúci aj štrukturálne odlišnosti epitopov použila fy Unitica Ltd. v diagnostike Unimedi *Candida* mono-test, založenej na detekcii α - a β -manozidov. Táto metóda má citlivosť 82 % v porovnaní s 75 % deklarovanými v Platelia teste.

4.6. Detekcia (1-3)- β -D-glukánu

(1-3)- β -D-Glukán predstavuje jednu z majoritných zložiek bunkovej steny kvasiniek a jeho sérodiagnostika vykazuje citlivosť 95 % a špecifickosť 84 %. Komerčne je dostupná enzýmová diagnostika Fungitec-G test (Scikagaku Corp., Japan) a Fungitell™ (Associates of Cape Cod., Inc. USA) založené na aktivácii koagulačnej kaskády *Tachypleus tridentalis*. Pre tento polysacharid je typické jeho uvoľňovanie len počas rastu kvasiniek, na jeho detekciu je teda potrebná nielen angioin vazivita, ale aj viabilita kandidového agens. Diagnostickou nevýhodou je

jeho charakter „panfungálneho markeru“ bez druhej špecifickosti. Na základe séropozitivity teda nie je možné určiť etiologické agens. Pre posilnenie jeho diagnostickej výpovednej hodnoty sa doporučuje kombinácia s iným sérologickým markerom napr. anti-kandidovými protilátkami. Ďalším obmedzením je jeho prechodná séropozitivita v závislosti od rastového štádia kvasinky, nakoľko β -D-glukán je exponovaný na bunkovom povrchu len v prípade kvasinkovej formy rastu a tvorby výpučkov²⁹. Detekcia solubilného a viazaného Dectin-1, vzorkového receptora pre β -D-glukán je ďalšou možnosťou cielenej sérodiagnostiky⁵².

4.7. Rekombinantné antigény pre diagnostiku invazívnych kandidóz

V súčasnej dobe sa začínajú využívať v diagnostike invazívnych kandidóz aj rekombinantné kandidové antigény, napr. stanovenie protilátkovej odpovede voči rekombinantným proteinovým faktorom virulentnosti, ako sú enoláza, sekretorické aspartylóvé proteínázy a pod. Testuje sa aj stanovenie špecifickej protilátkovej odpovede voči kandidovým antigénom, exprimovaných výlučne hýfovou morfoformou ako napr. anti-Hyr1, anti-Ecel, anti-Als3 a anti-Hwpl (cit.⁵³).

4.8. Detekcia anti-kandidových protilátok

Špecifická protilátková odpoveď a detekcia anti-kandidových izotypových protilátok u pacientov s kandidovou infekciou je jedným z diferenciálne diagnostických kritérií. Toto vyšetrenie má nižšiu citlivosť (53 až 65 %) v porovnaní s relatívne vysokou citlivosťou v prípade diagnostiky antigenémie, naopak špecifickosť je porovnateľná až vyššia, predstavuje 86–98 %. Klinicko-diagnostická hodnota vyšetrenia anti-kandidových protilátok je limitovaná aj u imunokompromitovaných jedincov, u ktorých je možný výskyt falošne negatívnych hodnôt. Tieto obmedzenia môžu byť riešené výberom citlivejších diagnostických metód a vhodnejších antigénov. Nevýhodou konvenčných sérologických testov na detekciu anti-kandidových protilátok je použitie antigénnych extraktov, obsahujúcich množstvo nedefinovaných antigénov. Tieto extrakty vykazujú výrazne krížové reaktivity (napr. aj s baktériami), nie je možné jednoznačné odlíšenie kolonizácie od infekcie a chýba štandardizácia konkrétnych antigénov. Príkladom je imunodiagnostika Bio-Rad založená na testovaní protilátok proti somatickému, celulárnemu antigénu (z mladej myceliálnej populácie po 3dňovej kultivácii pri 30 °C) a metabolickému antigénu (z 10dňovej kultúry pri 30 °C). Nevýhodou je aj nižšia citlivosť imunoelektroforetickej metódy v porovnaní s ELISA metódou. Diagnostika fy Serion/Virion: Serion ELISA classic for IgG/IgM/IgA proti *Candida albicans* taktiež používa komplexný antigén, zložený z cytoplazmatických zložiek a z malého množstva zložiek bunkovej steny. Nevýhodou bunkových lyzátov a zmesných antigénov je ich neštandardné zloženie a nemožnosť charakterizácie konkrétnej

antigén-špecifickej protilátkovej odpovede.

Detekciu anti-kandidových protilátok na úrovni kandidového manánového antigénu deklaruje Platelia™ Candida Ab (Bio-Rad). Vzájomná kombinácia sérologickej detekcie anti-manánových protilátok a manánu zvýši sensitivitu vyšetrenia na 80 % a špecifickosť na 93 %.

5. Záver

Celkovo je možné konštatovať, že v súčasnosti neexistuje komplexná „na mieru šitá“ imunodiagnostika antigenémie a špecifickej anti-kandidovej humorálnej odpovede založená na presne definovaných antigénnych štruktúrach s ohľadom na ich druhové špecifiká, ako sú štruktúrne odlišnosti molekuly glykánu, linearita resp. vetvenie bočných oligosacharidových reťazcov, zastúpenie α - a β -väzieb, ktoré sú podmienené kvasinkovým druhom a morfológickými variáciami v rámci dimorfnej tranzície. Zohľadnenie týchto faktorov a naviac použitie definovaných štruktúr reprezentujúcich proteínové a sacharidové antigénne faktory a faktory virulentnosti patogénnych kandid pre diferenciálne-diagnostické účely by predstavovalo modernú sofistikovanú *in vitro* sérodiagnostiku kandidóz aj s možnosťou monitorovania špecifickej terapie.

Pri navrhovaní takejto *in vitro* imunodiagnostiky je potrebné riešiť aj voľbu dostatočne citlivej, presnej, správnej a špecifickej analytickej metódy (ELISA, PCR, microarray a i.) vhodnej pre rutinnú klinicko-laboratórnu prax.

LITERATÚRA

- Adiguzel N., Karakurt Z., Gungor G., Yazicioglu M., Acarturk E., Soğukpinar O., Baran R.: *Tuberks* 58, 35 (2010).
- Richter S. S., Galask R. P., Messer S. A., Hollis R. J., Diekema D. J., Pfaller M. A.: *J. Clin. Microbiol.* 43, 2155 (2005).
- Angiolella L., Stringaro A. R., De Bernardis F., Posteraro B., Bonito M., Toccaceli L., Torosantucci A., Colone M., Sanguinetti M., Cassone A., Palamara A. T.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 927 (2008).
- Wenzel R. P.: *Clin. Infect. Dis.* 45, 85 (2007).
- Vinh D. C.: *Lancet* 11, 780 (2011).
- Ferrer J.: *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 71, 21 (2000).
- Alonso-Valle H., Acha O., Garcia-Palomo J.D., Farinas-Alvarez C., Fernandez-Mazarrasa C., Farinas M. C.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 254 (2003).
- Pappas P. G., Rex J. H., Lee J., Hamill R. J., Larsen R. A., Powderly W., Kauffman C. A., Hyslop N., Mangino J. E., Chapman S., Horowitz Ch. S., Edwards J. E., William E., Dismukes W. E.: *Clin. Infect. Dis.* 37, 634 (2003).
- Edmond M. B., Wallace S. E., McClish D. K., Pfaller M. A., Jones R. N., Wenzel R. P.: *Clin. Infect. Dis.* 29, 239 (1999).
- Schelenz S., Gransden W. R.: *Mycoses* 46, 390 (2003).
- Calderone R. A., Fonzi W. A.: *Trends Microbiol.* 9, 327 (2001).

12. Romani L., v knihe : *Candida and Candidiasis* (Calderone R. A. a Clancy C. J., ed.), 2. vyd., kap. 2. ASM Press, Washington D.C. 2002.
13. Masuoka J.: *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 281 (2004).
14. Mendes-Giannini M. J., Soares C. P., da Silva J. L., Andreotti P. F.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45, 383 (2005).
15. Zipfel P. F., Skerka C., Kupka D., Luo S.: *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 423 (2011).
16. Chaffin W. L., Lopez-Ribot J. L., Casanova M., Gosalbo D., Martinez J. P.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 130 (1998).
17. Tzianabos A. O.: *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 523 (2000).
18. Kurihara K., Shingo Y., Miura N. N., Horie S., Usui Y., Adachi Y., Yadomae T., Ohno N.: *Biol. Pharm. Bull.* 26, 233 (2003).
19. Martinez-Esparza M., Sarazin A., Jouy N., Poulain D., Jouault T.: *J. Immunol. Methods* 314, 90 (2006).
20. Casadevall A.: *Infect. Immun.* 63, 4211 (1995).
21. Suzuki S., v knihe: *Fungal cells in biodefense mechanism* (Suzuki S., Suzuki M., ed.) str. 1. Saigon Publishing, Tokyo 1997.
22. Hasenclever H. F., Mitchell W. O.: *J. Bacteriol.* 82, 570 (1961).
23. Fukazawa Y., Kagaya K., Suzuki M., Shinoda T., v knihe: *Fungal cells in biodefense mechanism* (Suzuki S., Suzuki M., ed.) str. 16. Saigon Publishing, Tokyo 1997.
24. Tsuchiya T., Fukazawa Y., Taguchi M., Nakase T., Shinoda T.: *Mycopathol. Mycol. Appl.* 53, 77 (1974).
25. Fradin C., Jouault T., Mallet A., Mallet J.M., Camus D., Sinaÿ P., Poulain D.: *J. Leukocyte Biol.* 60, 81 (1996).
26. Jacquinet P. M., Plancke Y., Sendid B., Strecker G., Poulain D.: *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 131 (1998).
27. Suzuki S.: *Curr. Top. Med. Mycol.* 8, 57 (1997).
28. Lowman D. W., Ferguson D. A., Williams D. L.: *Carbohydr. Res.* 338, 1491 (2003).
29. Goodridge H. S., Wolf A. J., Underhill D. M.: *Immunol. Rev.* 230, 38 (2009).
30. Sullivan P. A., Yin C. Y., Molloy C., Templeton M. D., Shepherd M. G.: *Can. J. Microbiol.* 29, 1514 (1983).
31. Moragues M. D., Omaetxebarria M. J., Elgueabal N., Sevilla M. J., Conti S., Polonelli L., Pontón J.: *Infect. Immun.* 71, 5273 (2003).
32. Karelin A. A., Tsvetkov I. E., Kogan G., Bystritsky S., Nifantiev N. E.: *Bioorg. Khim.* 33, 119 (2007).
33. Karelin A. A., Tsvetkov Y. E., Paulovicova L., Bystricky S., Paulovicova E., Nifantiev N. E.: *Carbohydr. Res.* 344, 29 (2009).
34. Karelin A. A., Tsvetkov Y. E., Paulovicova L., Bystricky S., Paulovicova E., Nifantiev N. E.: *Carbohydr. Res.* 345, 1283 (2010).
35. Paulovicova L., Bystricky S., Paulovicova E., Karelin A. A., Tsvetkov Y. E., Nifantiev N. E.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58, 307 (2010).
36. Paulovicova L., Paulovicova E., Karelin A. A., Tsvetkov Y. E., Nifantiev N. E., Bystricky S.: *Int. Immunopharmacol.* 14, 179 (2012).
37. Jamois F., Ferrieres V., Guegan J. P., Yvin J. C., Plusquellec D., Vetvicka V.: *Glycobiology* 15, 393 (2005).
38. Polonelli L., Magliani W., Conti S., Bracci L., Lozzi L., Neri P., Adriani D., De Bernardis F., Cassone A.: *Infect. Immun.* 71, 6205 (2003).
39. Fradin C., Poulain D., Jouault T.: *Infect. Immun.* 68, 4391 (2000).
40. Poulain D., Slomianny C., Jouault T., Gomez J. M., Trinel P. A.: *Infect. Immun.* 70, 4323 (2002).
41. Dalle F., Jouault T., Trinel P. A., Esnault J., Mallet J. M., d'Athis P., Poulain D., Bonnin A.: *Infect. Immun.* 71, 7061 (2003).
42. Cutler J. E.: *Curr. Mol. Med.* 5, 383 (2005).
43. Han Y., Kozel T. R., Zhang M. X., MacGill R. S., Carroll M. C., Cutler J. E.: *J. Immunol.* 167, 1550 (2001).
44. Han Y. W., Shi W., Huang G. T., Kinder H. S., Park N. H., Kuramitsu H., Genco R. J.: *Infect. Immun.* 68, 3140 (2000).
45. Maza J. L., Elgueabal N., Prado C., Ellacuria J., Soler I., Ponton J.: *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.* 94, 589 (2002).
46. San Millan R., Elgueabal N., Regulez P., Moragues M. D., Quindos G., Ponton J.: *Microbiology* 146, 2105 (2000).
47. Dotan N., Altstock R. T., Schwarz M., Dukler A.: *Lupus* 15, 442 (2006).
48. Lain A., Elgueabal N., Moragues M. D., Garcia-Ruiz J. C., del Palacio A., Ponton J.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8, 315 (2008).
49. Sendid B., Jouault T., Coudriau R., Camus D., Odds F., Tabouret M., Poulain D.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 164 (2004).
50. Fenn J. P.: *Labmed* 38, 178 (2007).
51. Verweij P. E., Breuker I. M., Rijs A. J., Meis J. F. G. M.: *J. Clin. Pathol.* 52, 271 (1999).
52. Graham L. M., Tsoni S. V., Willment J. A., Williams D. L., Taylor P. R., Gordon S., Dennehy K., Brown G. D.: *J. Immunol. Methods* 314, 164 (2006).
53. Láin A., Elgueabal N., Amutio E., de Larrinoa I. F., Moragues M. D., Pontón J.: *Clin. Dev. Immunol.* 2008, 1 (2008).

R. Pilišiová and E. Paulovičová (*Center for Glycomics, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **In vitro Immunochemical and Microbiological Diagnostics of Candidiasis**

Due to the growing incidence of systemic and superficial candida infections, targeted laboratory diagnostic methods are investigated. The available serologic and microbiological methods are summarized. The pros and cons of relevant serologic methods with respect to their sensitivity to and specificity of candida antigens or anti-candida antibodies are stressed.