

Pregled | Review



1,3-B-D-glukan u dijagnostici invazivnih gljivnih infekcija – prva iskustva u Hrvatskoj

1,3-B-D-glucan in invasive fungal infection diagnostics – first Croatian experience

Sanja Pleško¹✉, Milivoj Novak², Ernest Bilić², Violeta Rezo Vranješ¹, Jakša Babel⁴, Robert Baronica⁵, Ivana Mareković¹¹ Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb² Odjel za pedijatrijsku intenzivnu medicinu, Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb³ Zavod za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica, Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb⁴ Zavod za intenzivnu medicinu, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb⁵ Odjel za anesteziologiju i intenzivno liječenje kirurških i uroloških bolesnika, Zavod za anesteziologiju i intenzivnu medicinu, Klinika za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb**Deskriptori**

INVAZIVNE GLJIVIČNE INFEKCIJE – dijagnoza, farmakoterapija; PROTUGLJIVIČNI LIJEKOVI – terapijska primjena; BETA-GLUKANI – u krvi; BIOMARKERI – u krvi; OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST; HRVATSKA

SAŽETAK. Invazivne gljivne infekcije (IGI) važan su problem suvremene medicine. Razlog tomu jesu rastući broj imunokompromitiranih bolesnika te visoke stope morbiditeta i mortaliteta zbog ovih infekcija. Pravodobno postavljena dijagnoza IGI-ja od presudne je važnosti jer odgađanje primjene antifungalne terapije utječe na ishod liječenja bolesnika. Kultivacija kao konvencionalna dijagnostička metoda ima nisku osjetljivost, dugo traje i nalaže uzimanje invazivnog uzorka. Zbog toga se posljednjih dvadesetak godina radi ranije i osjetljivije dijagnostike istražuju i primjenjuju fungalni biomarkeri. 1,3-β-D-glukan (BDG) fungalni je biomarker odrediv u serumu bolesnika kojim se može dokazati prisutnost ovih gljivnih patogena: *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium*, *Coccidioides immitis*, *Fusarium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Trichosporon* spp., *Sporothrix schenckii*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Pneumocystis jirovecii*. Zbog niske razine odnosno nepostojanja BDG-a u staničnoj stijenci ovim se testom ne mogu dokazati vrste roda *Cryptococcus* spp. i reda *Mucorales*. Visoka negativna prediktivna vrijednost BDG-a u slučaju negativne vrijednosti može se iskoristiti za donošenje odluke o prekidu antifungalne terapije i biti dio strategije upravljanja primjenom antifungalnih lijekova u jedinicama intenzivnog liječenja. Kod hematoloških bolesnika BDG se može primjenjivati radi probira i u sklopu dijagnostičke obrade pri sumnji na IGI. Pouzdanost testa kod pojedinog bolesnika veća je u slučaju dvaju ili više uzastopno pozitivnih rezultata. Utjecaj antifungalne profilakse na rezultate testa BDG-a još je nejasan. Kinetiku BDG-a za sada je teško korelirati s kliničkim ishodom. Pedijatrijskim bolesnicima još nisu definirane granične vrijednosti za interpretaciju vrijednosti BDG-a iako su o tome objavljena brojna istraživanja. Trenutačno vrijedeće smjernice i dalje ne preporučuju primjenu ovoga fungalnog biomarkera kao rutinskoga dijagnostičkog testa u djece, premda može poslužiti u određenim situacijama uzimajući u obzir njegova ograničenja. BDG kao fungalni biomarker važan je napredak u dijagnostici IGI-ja te uz istodobnu primjenu ostalih dijagnostičkih metoda, ispravnu interpretaciju i racionalnu primjenu može pomoći ranijem i uspješnijem postavljanju dijagnoze i liječenju bolesnika s IGI-jem.

Descriptors

INVASIVE FUNGAL INFECTIONS – diagnosis, drug therapy; ANTIFUNGAL AGENTS – therapeutic use; BETA-GLUCANS – blood; BIOMARKERS – blood; SENSITIVITY AND SPECIFICITY; CROATIA

SUMMARY. Invasive fungal infections (IFI) are an important problem of modern medicine. The reason is growing population of immunocompromised patients and high morbidity and mortality of these infections. Timely diagnosed IFI is of utmost importance because the delay of antifungal treatment has impact on treatment outcome. Cultivation as a conventional diagnostic method has low sensitivity, long duration and demands obtaining invasive samples. Therefore, in the last two decades fungal biomarkers are investigated for earlier and more sensitive diagnostics. 1,3-β-D-glucan (BDG) is a fungal biomarker in patients' sera that enables detection of the following fungal pathogens: *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium*, *Coccidioides immitis*, *Fusarium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Trichosporon* spp., *Sporothrix schenckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pneumocystis jirovecii*. Low level and absence of BDG in the cell wall unables the detection of *Cryptococcus* spp. and order *Mucorales* with this test. High negative predictive value of BDG can be used when deciding to stop antifungal treatment and be a part of strategy for antifungal stewardship in intensive care units. In hematological patients BDG can be used as a screening method or as a part of diagnostic work-up when IFI is suspected. Reliability of test result is higher when two or more consecutive samples are positive. Influence of antifungal prophylaxis on BDG test results is still unclear. BDG kinetics and its relation to clinical outcome are still investigated. For pediatric population cut-off values for interpretation are still not defined, although many studies have been published investigating this issue. Although still not recommended by pediatric guidelines, this test can help in certain situations having in mind its limitations. BDG as a fungal marker represents the significant progress in IFI diagnostics. With simultaneous application of other diagnostic methods, exact interpretation and rational use, it can help earlier and more successful diagnostics and treatment of IFI.

✉ Adresa za dopisivanje:Dr. sc. S. Pleško, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb, e-mail: sanja.plesko@kbc-zagreb.hr

Primljeno 19. listopada 2018., prihvaćeno 4. ožujka 2019.

Značenje invazivnih gljivnih infekcija i izazovi u mikrobiološkoj dijagnostici

Napredak na području transplantacije organa, liječenja hematoloških i ostalih malignih bolesti, intenzivne skrbi, neonatologije te raznih drugih područja medicine uzrok je rastućeg broja imunokompromitiranih bolesnika s povišenim rizikom od razvoja invazivnih gljivnih infekcija (IGI). Unatoč otkrivanju novih antifungalnih lijekova stope morbiditeta i mortaliteta zbog ovih infekcija i dalje su visoke.^{1,2} Značenje ovog problema jasnije se može definirati usporedbom mortaliteta uzrokovanog IGI-jem s mortalitetom zbog drugih bolesti koje su javnozdravstveni problem. U 2015. godini mortalitet povezan s IGI-jem, zbog kojeg je umrlo više od 1,660.000 bolesnika, bio je podjednak onomu kod tuberkuloze te trostruko viši nego kod malarije. Procjenjuje se da se na godinu u svijetu zabilježi oko 700.000 slučajeva invazivne kandidoze (IK), oko 250.000 slučajeva invazivne aspergiloze (IA), oko 500.000 slučajeva pneumonija uzrokovanih s *Pneumocystis jirovecii* te više od 10.000 slučajeva mukormikoze. Spoznaje o globalnoj incidenciji još su nepotpune jer nema sustavnog praćenja i obveze prijavljivanja ovih infekcija, njihova se važnost često zanemaruje, a dijagnostičke metode, osobito kultura, nisu savršene.³

Pravodobno postavljena dijagnoza IGI-ja od presudne je važnosti jer odgađanje primjene antifungalne terapije utječe na ishod liječenja bolesnika.⁴ Izazovna je činjenica da se zlatnim standardom smatra dokaz invazije tkiva gljivom u kulturi i/ili histopatološkim pregledom. Radi toga je potrebno uzeti invazivni uzorak (bioptat, bronhoalveolarni lavat – BAL), što je zbog često ugrožena stanja bolesnika teško izvedivo, a dodatni su problemi niska osjetljivost i trajanje kulture. Kultura iz uzoraka donjega respiratornog sustava kod IA-e ima osjetljivost 45 – 60%, a hemokulture u otkrivanju kandidemije oko 50%. Zbog toga se radi ranije i osjetljivije dijagnostike IGI-ja posljednjih dvadesetak godina istražuje i sve više primjenjuje određivanje fungalnih biomarkera za koje je dovoljan neinvazivni uzorak (serum).^{5,6}

Princip testa

Nekad se na staničnu stijenku kvasaca i plijesni gledalo kao na stabilnu strukturu koja daje potporu gljivnoj stanici. Nedavne studije pokazale su da je gljivna stanična stijenka vrlo dinamična struktura koja se permanentno mijenja i ovisno o vanjskim uvjetima omogućava zadržavanje strukture i stabilnosti mikroorganizma, kao i invaziju tkiva. Najvažniji sastavni dijelovi stanične stijenke jesu polisaharidi od kojih su najviše zastupljeni različiti oblici glukana. Glukan je dio stanične stijenke većine klinički važnih gljiva kao što su *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. i *Pneu-*

mocystis jirovecii, ali svakako treba spomenuti izuzetke bez glukana kao što su *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. i ostale vrste iz reda *Mucorales*, *Blastomyces dermatitidis* i *Cryptococcus* spp.⁷

Nakon ugradnje u gljivnu staničnu stijenku jedan od glukana, 1,3-β-D-glukan (BDG) obično je u netopljivoj formi, no u kontaktu s krvi i drugim tjelesnim tekućinama pretvara se u topljivi oblik koji ima sposobnost imunomodulacije, npr., inhibicije leukocitne fagocitoze.^{8,9}

Test za detekciju BDG-a nastao je iz LAL-testa (engl. *Limulus ameobocyte lysate*) koji se od sedamdesetih godina 20. stoljeća rabi za detekciju pirogena (lipopolisaharida) u farmaceutskim proizvodima. Za proizvodnju reagensa potrebnih za izvođenje testa rabi se krv potkovičastog raka – *Limulus polyphemus*. Test se temelji na činjenici da krv potkovičastog raka sadržava mobilne amebocite koji su po svojoj funkciji analogni fagocitima. Mobilni amebociti sadržavaju faktor C koji je po svojoj funkciji zimogen serinske proteaze i odgovoran je za pokretanje kaskade zgrušavanja.⁷

Krajem šezdesetih godina 20. stoljeća u jednome je istraživanju dokumentirano da BDG koji je istraživan kao imunomodulator također pokreće kaskadu zgrušavanja, ali uz zimogen serinske proteaze nazvan faktor G. Nakon ovog otkrića slijedila su brojna istraživanja koja su se bavila mogućom ulogom testa za dokaz BDG-a u dijagnostici IGI-ja.^{10,11}

Današnji testovi za određivanje vrijednosti BDG-a izvode se na uzorcima seruma bolesnika. U procesu proizvodnje reagensa faktor C se uklanja kako bi se smanjila mogućnost lažno pozitivne reakcije uzrokovane prisutnošću lipopolisaharida u serumu. U posljednje vrijeme pojavljuju se inačice ovog testa za dokaz BDG-a iz seruma, no reagensi potječu iz azijskoga potkovičastog raka (*Tachypleus tridentatus*).¹²

Test je tehnički vrlo zahtjevan i osjetljiv na moguću kontaminaciju zbog obilja BDG-a u okolišu te nalaže posebne uvjete, iskustvo i pažnju pri izvođenju. Prema uputi proizvođača, test se izvodi u mikrotitarskim pločicama i očitava se u spektrofotometru s inkubacijom na 37 °C tijekom 40 minuta. Rezultati se dobivaju analizom krivulje koja prikazuje kinetiku reakcije. Prema uputi proizvođača, negativan rezultat jesu vrijednosti od 0,0 do 59,9 pg/mL. Graničan rezultat jesu vrijednosti od 60,0 do 79,9 pg/mL koje govore u prilog mogućem IGI-ju i tada se preporučuju ponovno uzimanje krvi i ponavljanje pretrage. Pozitivan rezultat jesu vrijednosti iznad 80,0 pg/mL, što ne znači da bolesnik ima IGI, već za potvrdu dijagnoze treba uzeti u obzir i druge kliničke nalaze (Fungitell® Assay, Associates of Cape Cod Inc., SAD).

Testom BDG-a može se dokazati prisutnost ovih gljivnih patogena: *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Acre-*

monium, *Coccidioides immitis*, *Fusarium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Trichosporon* spp., *Sporothrix schenckii*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Pneumocystis jirovecii*.

Ovim testom ne mogu se dokazati vrste gljiva s vrlo niskom razinom BDG-a kao što su one roda *Cryptococcus* spp. Ne mogu se dokazati ni pripadnici reda *Mucorales* kao što su *Absidia* spp., *Mucor* spp. i *Rhizopus* spp. koji uopće nemaju BDG. Ovim se testom vjerojatno ne mogu dokazati *Blastomyces dermatitidis* koje imaju malo BDG-a.

Lažno pozitivne vrijednosti BDG-a moguće su kod bolesnika na hemodijalizi zbog upotrebe dijaliznih membrana proizvedenih od celuloze, čiji je sastavni dio BDG.¹³ U novije vrijeme na tržištu su se pojavile sintetske membrane za dijalizatore, a istraživanja utječaja polisulfonskih membrana na vrijednosti BDG-a u serumima bolesnika pokazala su da one ne utječu na vrijednosti BDG-a kao celulozne membrane.¹⁴

Lažno pozitivne vrijednosti BDG-a može izazvati primjena albumina i imunoglobulina, budući da se njihovi pripravci dobivaju filtriranjem kroz celulozne filtre.¹⁵ Studija koja je pratila dinamiku serumskog BDG-a nakon primjene intravenskih imunoglobulina u 22 pedijatrijska bolesnika s hematološkom bolesti dokumentirala je lažno pozitivne vrijednosti BDG-a kod većine bolesnika s intravenskom primjenom imunoglobulina. Povišene vrijednosti mogu se detektirati i više od dva tjedna nakon primjene imunoglobulina, no vrijednosti se normaliziraju nakon tri tjedna.¹⁶ Na temelju našeg iskustva upotrebu ovog testa kod bolesnika na terapiji albuminom i imunoglobulinom ne bi trebalo shvatiti kao kontraindikaciju za njegovu primjenu. Upravo ti bolesnici često imaju rizik od razvoja IGI-ja te se moguća vrijednost ovog testa krije u praćenju vrijednosti BDG-a i dijagnostičko-terapijskoj intervenciji pri porastu njegovih vrijednosti.

Lažno visoke vrijednosti BDG-a zabilježene su kod bolesnika nakon kirurškog zahvata zbog kontakta s gazama ili spužvicama koje sadržavaju BDG. Opisana je znatna razlika pri uporabi različitih vrsta gaza ovisno o materijalu od kojeg su napravljene. Gaze napravljene od liocela podrijetlom od celuloze drvene pulpe vjerojatno ne uzrokuju lažno pozitivne vrijednosti. Veoma važan bio bi razvoj gaza koje ne bi uzrokovale lažno povišene vrijednosti BDG-a u serumu.¹⁷

Lažno pozitivne vrijednosti mogu uzrokovati i istodobna bakterijemija te neki lijekovi.⁷

Lažno negativne vrijednosti mogu biti posljedica lipemičnih i hemoliziranih uzoraka krvi, kao i infekcija uzrokovanih gljivama bez znatnih količina BDG-a kao što su mukormicete, kriptokoki i *Blastomyces dermatitidis*.⁷

Primjena 1,3- β -D-glukana kod hematoloških bolesnika

Prema smjernicama EORTC/MSG-a (engl. *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group*), određivanje BDG-a jedan je od mikoloških kriterija za postavljanje dijagnoze vjerojatnog IGI-ja.¹⁸ Smjernice ECIL-3 (engl. *European Conference on Infections in Leukemia*) za upotrebu ovog testa navode preporuku BII (umjereni dokazi za upotrebu) kod visokorizičnih hematoloških bolesnika (bolesnici s akutnom leukemijom i produženom neutropenijom nakon indukcije/konsolidacije ili alogene transplantacije krvotvornih matičnih stanica).¹⁹ U ovoj populaciji bolesnika razlikuju se dva pristupa pri primjeni BDG-a: primjena radi probira i u sklopu dijagnostičke obrade pri sumnji na IGI.

Probir s pomoću fungalnih biomarkera strategija je kod koje pozitivan rezultat testa potiče rano provođenje dodatne dijagnostičke obrade i ranu primjenu antifungalne terapije prije negoli je bolest uznapredovala. Osobitost određivanja BDG-a nalazi se u činjenici da može pomoći u otkrivanju ne samo IA-e već i IK te ostalih IGI-ja. Pouzdanost testa kod pojedinog bolesnika veća je u slučaju dvaju ili više uzastopno pozitivnih rezultata. Vremenski razmak u kojem je potrebno uzimati uzastopne uzorke seruma za određivanje BDG-a radi probira nije definiran.¹² Primjenjivost BDG-a u probiru hematoloških bolesnika pokazali su Lamoth i suradnici metaanalizom u kojoj je osjetljivost BDG-a bila 62% u slučaju vjerojatnog IGI-ja kod jednoga pozitivnog uzorka seruma i 50% uz dva pozitivna uzorka. Specifičnost se povećala s 91 na 99% kada su bila pozitivna dva uzorka seruma, a ne samo jedan. U kliničkoj praksi to bi značilo da kod dvaju uzastopno testiranih uzoraka seruma negativni rezultat BDG-a ne isključuje IGI, dok dva pozitivna uzorka upućuju na veliku vjerojatnost da se radi o IGI-ju.²⁰

Uzastopno određivanje galaktomanana u serumu svaka tri do četiri dana ima visoku osjetljivost i negativnu prediktivnu vrijednost za otkrivanje IA-e, ali se ne preporučuje kod bolesnika na profilaksi antifungicima djelotvornima protiv plijesni.²¹ Utjecaj antifungalne profilakse na rezultate testa BDG-a još je nejasan.^{22,23} Neka istraživanja govore u prilog tomu da vrijednost ovog testa nije upitna ni kod bolesnika na antifungalnoj profilaksi. Novija među njima objašnjavaju i patogenezu ove prednosti BDG-a, pri čemu ulogu ima farmakokinetika posakonazola upotrijebljenog u profilaksi koja uvjetuje razlike u kinetici galaktomanana i BDG-a. Zbog svoje lipofilne molekule posakonazol se nakuplja u staničnim membranama gljiva gdje mu je i ciljno mjesto djelovanja, dovodeći do promje-

ne integriteta stanične stijenke i oslobađanja njezinih sastavnih komponenata među kojima je i BDG te, posljedično, njegovih viših razina u serumu. Istodobno inhibirajući proliferaciju hifa *Aspergillus* spp., profilaktički primijenjeni posakonazol uvjetuje niže serumske razine galaktomanana. Na tome se temelji pretpostavka da bi kod bolesnika s vrlo visokim rizikom od IGI-ja i na profilaksi posakonazolom serijskim određivanjem BDG-a uz prepoznavanje ranih radioloških znakova IA-e kliničari mogli posumnjati na dijagnozu IA-e prije pojave znaka *halo* i porasta vrijednosti galaktomanana te tako spriječiti napredovanje bolesti do njezina angioinvasivnog oblika.^{18,24}

Pri primjeni BDG-a u dijagnostičke svrhe zbog sumnje na IGI kod nehematoloških bolesnika visoka negativna prediktivna vrijednost ovog testa omogućuje donošenje odluke o prestanku ili nezapočinjanju antifungalne terapije. Kod hematoloških bolesnika negativne rezultate treba tumačiti oprezno zbog već navedene 61%-tne osjetljivosti u slučaju samo jednoga pozitivnog uzorka seruma.^{20,23}

Iako neka istraživanja pokazuju da snižavanje vrijednosti BDG-a tijekom liječenja može biti pokazatelj povoljnoga terapijskog odgovora kod bolesnika s IGI-jem, kinetiku BDG-a zasad je teško korelirati s kliničkim ishodom. BDG može ostati pozitivan nakon povoljnoga kliničkog odgovora i odgovarajućeg trajanja liječenja. Stoga se ukidanje antifungalnog liječenja treba temeljiti na smjernicama i kliničkoj procjeni, a ne na negativnom rezultatu BDG-a. S druge strane, perzistentno visoke ili rastuće razine BDG-a za vrijeme antifungalne terapije trebaju pobuditi sumnju na neodgovarajući terapijski odgovor. Neka istraživanja pokazuju i moguću povezanost između visokih početnih vrijednosti BDG-a i nepovoljnoga terapijskog odgovora ili mortaliteta kod bolesnika s IK. Bilo koje novo povišenje razine BDG-a nakon što je postao negativan može upozoravati na novi IGI ili relaps prethodnoga i ne treba ga smatrati samo nevažnom fluktuacijom povezanom s prethodnom epizodom bolesti.^{23,25}

U nekoliko je istraživanja evaluirana primjena BDG-a kod djece na kemoterapiji zbog malignih bolesti ili nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica te su nađene velike razlike u specifičnosti, osjetljivosti, pozitivnoj prediktivnoj vrijednosti (PPV) i negativnoj prediktivnoj vrijednosti (NPV) tog testa u ovoj populaciji bolesnika.^{26,27,28} Zbog nedovoljno podataka o primjeni BDG-a kod djece i potrebe da se tek validiraju specifične granične vrijednosti za pedijatrijsku populaciju trenutačno vrijedeće smjernice još ne preporučuju primjenu ovoga fungalnog biomarkera kao rutinskoga dijagnostičkog testa, premda može poslužiti u određenim situacijama uzimajući u obzir njegova ograničenja.^{6,23,29,30}

Primjena 1,3-β-D-glukana kod bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja

U jedinicama intenzivnog liječenja 80% IGI-ja uzrokovano je *Candidom* spp. Odgođena primjena odgovarajuće antifungalne terapije povezana je s povišenom stopom mortaliteta.²¹ Za suočavanje s ovim problemom danas se rabe različite strategije kao što su profilaktička primjena antifungika, empirijska terapija na temelju prisutnih rizičnih čimbenika te preemptivna terapija temeljena na rezultatima fungalnih biomarkera.³¹

Više studija pokazalo je da većina bolesnika kojima je život ugrožen i hospitalizirani su u jedinici intenzivnog liječenja s dokazanim ili vjerojatnim IGI-jem ima povišene vrijednosti BDG-a prije početka kliničkih simptoma ili radioloških znakova bolesti te prije pozitivnih rezultata mikološke kultivacije. Postotak bolesnika kod kojih se bilježe povišene vrijednosti BDG-a prije pojave simptoma varira od 64 do 87%, a varira i broj dana od detekcije povišene vrijednosti BDG-a do pozitivnog nalaza kulture krvi, biopata ili BAL-a koji može biti u rasponu od 1 do 10 dana.⁵

Procjenjuje se da oko dvije trećine bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja koji primaju antifungalnu terapiju nemaju znakova IGI-ja. Prekomjerna primjena antifungika ne samo što povisuje troškove liječenja nego bolesnika izlaže nepotrebnim nuspojavama i dovodi do mogućeg razvoja rezistencije.³² Visoki NPV BDG-a u slučaju negativne vrijednosti može se iskoristiti za donošenje odluke o prekidu antifungalne terapije i biti dio strategije upravljanja primjenom antifungalnih lijekova u jedinicama intenzivnog liječenja.³³ Istraživanja u kojima su analizirani troškovi liječenja pokazala su da se oni mogu znatno sniziti skraćivanjem trajanja terapije na temelju primjene BDG-a.^{32,34} Istraživanja kod bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja pokazala su NPV od 98,7% te pozitivitet jedan do tri dana prije hemokulture kod IK.³² Potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdilo koliki broj uzastopnih uzoraka seruma treba testirati kako bi se definirali bolesnici kod kojih je sigurno prekinuti primjenu antifungika. Nucci i suradnici u svojem su istraživanju testirali uzorke seruma tri dana uzastopce, počevši od dana uvođenja antifungalne terapije. U određenog broja bolesnika pozitivan rezultat dobiven je tek kod drugog odnosno trećeg uzorka seruma pa bi, da je testiran samo jedan uzorak seruma, kod tih bolesnika terapija bila neopravdano prekinuta.³⁵

Primjena 1,3-β-D-glukana kod pedijatrijskih bolesnika

Pedijatrijskim bolesnicima još nisu definirane granične vrijednosti za interpretaciju vrijednosti BDG-a. Oni su vrlo heterogena skupina bolesnika s različitim

čimbenicima rizika, no zajednički svim skupinama pedijatrijskih bolesnika jesu znatan morbiditet i mortalitet od IGI-ja i teškoće u dijagnostici.

Neonatalna populacija

Candida spp. može biti iznimno važan uzročnik infekcija u neonatalnoj jedinici intenzivnog liječenja i zbog učestalosti i zbog posljedica koje može ostaviti kandidemija sa zaostalim meningitisom koji se, prema literaturi, javlja u 35%, pa čak do 70% bolesnika. Meningitis uzrokovan kandidom često ostavlja posljedice u obliku širokog spektra neurorazvojnih poremećaja – od gluhoće, sljepoće pa sve do cerebralne paralize. Studije su pokazale da je *Candida* spp. u neonatalnim jedinicama intenzivnog liječenja na trećem mjestu kao uzrok kasne neonatalne sepsa.^{36,37}

Zbog nespecifičnih simptoma i slabe osjetljivosti mikološke kultivacije brojne se studije bave istraživanjem mogućih graničnih vrijednosti u ovoj populaciji. Teškoće u standardizaciji graničnih vrijednosti vjerojatno uzrokuje i povećana propusnost nezrelih crijeva u ovoj dobnoj skupini koja omogućava izlazak BDG-a iz crijeva i bez invazije uzročnika. Prije nekoliko godina objavljena je retrospektivna studija u kojoj su ispitanici bili novorođenčad sa sumnjom na kandidijazu. BDG je određivan u 18 bolesnika s kandidijazom i u 43 bolesnika bez nje. Rezultati su pokazali da je BDG bio viši u bolesnika s kandidijazom negoli bez nje (364 pg/mL prema 89 pg/mL, $p < 0,001$). Autori su zaključili da je pri graničnoj vrijednosti od 125 pg/mL u novorođenčadi osjetljivost testa 84%-tna, a specifičnost 75%-tna.³⁸ S druge strane, retrospektivna studija objavljena početkom 2018. godine, koja je uključivala 47-ero novorođenčadi prosječne gestacijske dobi 30 tjedana i prosječne rodne mase od 1200 g, dokumentirala je optimalnu graničnu vrijednost od 106 pg/mL (61,5%-tna osjetljivost, 81%-tna specifičnost). Važno je naglasiti da je vrijednost BDG-a u bolesnika s visokom vrijednosti postala niža pri primjeni antifungika.³⁹

BDG u djece

IGI je rastući problem ne samo u djece oboljele od hematoloških bolesti već i u pedijatrijskih bolesnika nakon kirurškog zahvata, transplantacije solidnih organa i ostalih bolesti povezanih s dugotrajnom hospitalizacijom. Ove infekcije i u djece imaju izrazito visoke stope mortaliteta i morbiditeta.⁴⁰ U pedijatrijskim jedinicama intenzivnog liječenja prepoznavanje IGI-ja poseban je izazov i za pedijatre i za mikrobiologe jer specifični patognomonični simptomi ne postoje, a nema ni validiranoga prediktivnog bodovnog kriterija kao kod odraslih (npr., *Candida score*).⁴¹ Ove infekcije zahvaćaju ne samo krvotok nego i mokraćni sustav, peritonealnu šupljinu, pa i središnji živčani su-

stav i ne mogu se uvijek dokazati konvencionalnim dijagnostičkim metodama. Čak oko 50% kandidemija može ostati nedokazano spomenutim metodama.⁴² Granične vrijednosti za interpretaciju vrijednosti BDG-a iz seruma pedijatrijskih bolesnika još nisu standardizirane. Objavljena su brojna istraživanja radi pokušaja standardizacije i određivanja graničnih vrijednosti. Posebno je zanimljiva trogodišnja prospektivna studija u koju su bili uključeni pedijatrijski bolesnici s dokazanom kandidemijom i kontrolna skupina zdrave djece niskog rizika (27 bolesnika prema 100 kontrola). Važno je istaknuti da nije zabilježena statistički značajna razlika između svih kontrolnih dobni skupina ($p = 0,94$) u srednjoj vrijednosti BDG-a: 41,7 pg/mL – nedonoščad, 65,4 pg/mL – od rođenja do 12 mjeseci, 55,9 pg/mL – 1 – 3 godine, 50,8 pg/mL 4 – 6 godina, 50,4 pg/mL 7 – 12 godina, 77,4 pg/mL 13 – 21 godina. Srednja vrijednost BDG-a u bolesnika s kandidemijom bila je znatno povišena u usporedbi s kontrolom: 371,9 pg/mL (R 24,5; 17.189,4) prema 56,5 pg/mL (R 2,0; 1556,0) $p \leq 0,0001$. U ovoj je studiji upotreba granične vrijednosti od 80 pg/mL pokazala osjetljivost od 77%, specifičnost od 67% i NPV od 91,7%. Pri graničnoj vrijednosti od 100 pg/mL specifičnost je narasla na 76%, a NPV na 92,6%. Autori u zaključku ove studije navode da granična vrijednost od 80 do 100 pg/mL ima dovoljan NPV da isključi većinu IGI-ja u pedijatrijskih bolesnika i da je razina u djece niskog rizika slična kao u odraslih.⁴³

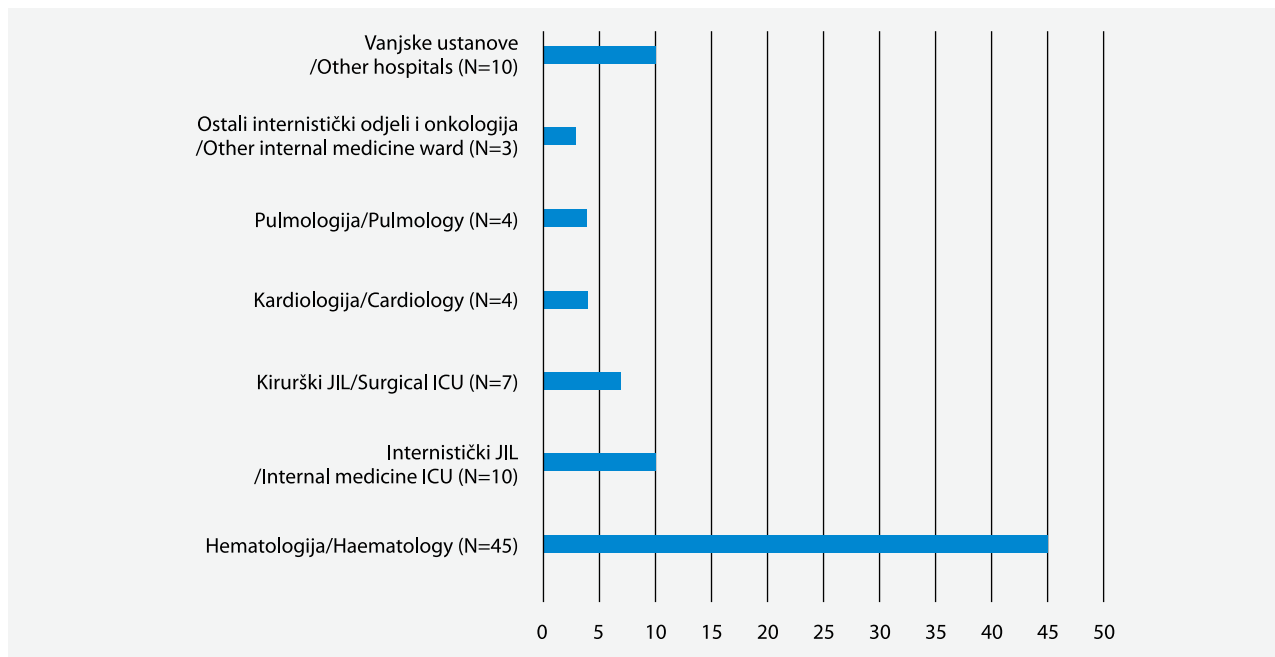
Dosadašnji rezultati određivanja 1,3-β-D-glukana u KBC-u Zagreb

Određivanje BDG-a u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb provodi se od prosinca 2017. godine. U razdoblju od 15. 12. 2017. do 17. 5. 2018. ispitano je 109 uzoraka seruma. Populaciju bolesnika činili su kod 76,1% (83/109) uzoraka bolesnici odrasle dobi, a u 23,9% (26/109) pedijatrijski bolesnici.

Objavljivanje naših rezultata odobrilo je Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb.

Odrasli bolesnici

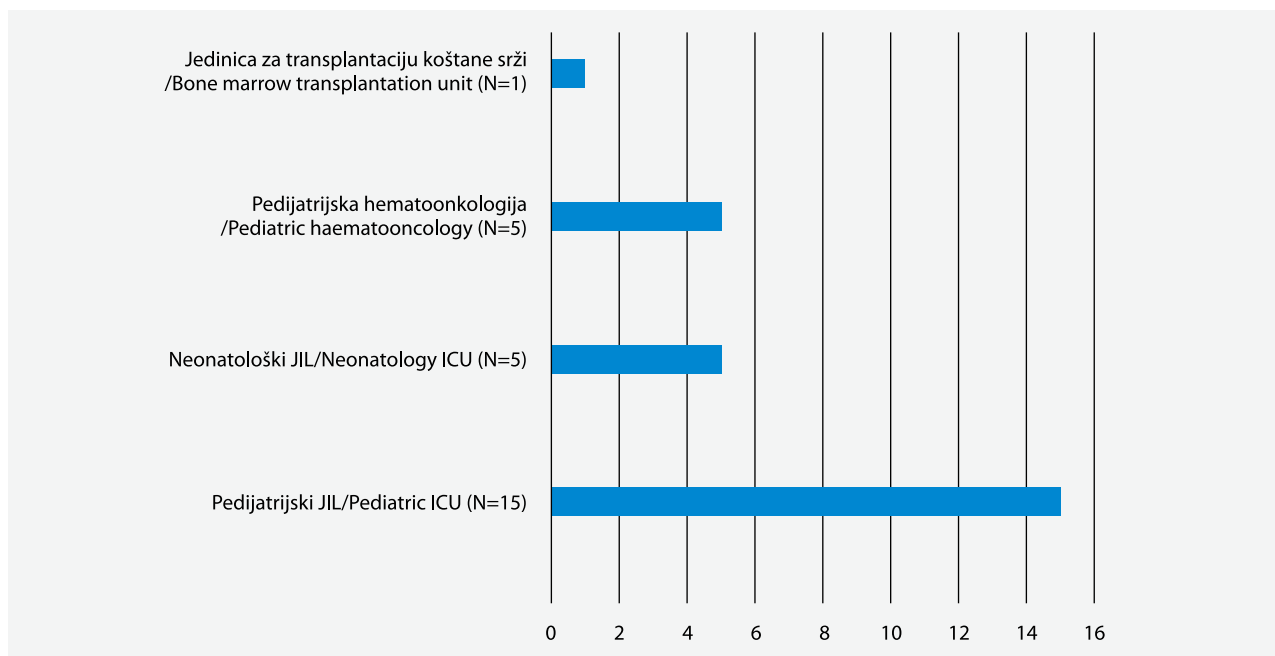
Odrasli bolesnici kod kojih je određivan BDG bili su pretežno muškog spola (57/83, 68,7%), a test je bio pozitivan kod njih 32,5% (27/83). Vrijednosti pozitivnih rezultata odraslih bolesnika kretale su se u rasponu od 84,85 do 15.677 pg/mL. Specijalnosti odjela na kojima su uzeti uzorci odraslih bolesnika prikazane su na **grafikonu 1**. Distribucija pozitivnih rezultata prema specijalnostima odjela odgovarala je prikazanoj distribuciji primljenih uzoraka. Pozitivan rezultat BDG-a otkriven je kod 14 hematoloških bolesnika, četiri bolesnika u internističkoj jedinici intenzivnog liječenja, četiri bolesnika u kirurškoj jedinici intenzivnog liječe-



JIL – jedinica intenzivnog liječenja/ICU – intensive care unit

GRAFIKON 1. SPECIJALNOSTI ODJELA NA KOJIMA SU UZETI UZORCI ODRASLIH BOLESNIKA (N = 83)

GRAPH 1. THE SPECIALTY OF THE DEPARTMENTS FROM WHICH ADULT PATIENTS' SAMPLES WERE OBTAINED (N = 83)



JIL – jedinica intenzivnog liječenja/ICU – intensive care unit

GRAFIKON 2. SPECIJALNOSTI ODJELA NA KOJIMA SU UZETI UZORCI PEDIJATRIJSKIH BOLESNIKA (N = 26)

GRAPH 2. THE SPECIALTY OF THE DEPARTMENTS FROM WHICH PEDIATRIC PATIENTS' SAMPLES WERE OBTAINED (N = 26)

nja, jednog bolesnika u kardiološkoj jedinici intenzivnog liječenja te u četiri bolesnika čiji su uzorci upućeni iz drugih zdravstvenih ustanova.

Kod hematoloških bolesnika pozitivni rezultati utvrđeni su i u onih na profilaksi posakonazolom, što go-

voru u prilog prije spomenutoj hipotezi da ovaj test, za razliku od određivanja galaktomanana, ima dijagnostičku vrijednost i kod ove skupine hematoloških bolesnika. Već je navedeno da dva uzastopna pozitivna uzorka seruma potvrđuju veću vjerojatnost da se radi

o IGI-ju.¹⁰ Prema nekim istraživanjima kod hematoloških bolesnika, povišenje granične vrijednosti s 80 na 158 pg/mL povećava specifičnost testa, a osjetljivost ostaje ista.²⁶ Od 14 hematoloških bolesnika s pozitivnim rezultatima BDG-testa rezultat je u najmanje dva uzastopna uzorka seruma bio pozitivan kod njih 13, dok su pozitivne vrijednosti BDG-a bile više od 158 pg/mL kod svih pozitivnih bolesnika barem u jednom uzorku seruma. Prema našim rezultatima, povišenje granične vrijednosti ne bi utjecalo na broj pozitivnih bolesnika.

Pedijatrijski bolesnici

Specijalnosti odjela na kojima su uzeti uzorci pedijatrijskih bolesnika prikazane su na grafikonu 2.

Pedijatrijski bolesnici u neonatalnoj jedinici intenzivnog liječenja

U neonatalnoj jedinici intenzivnog liječenja KBC-a Zagreb napravljen je test BDG-a iz 15 uzoraka od pet bolesnika. Trinaest seruma pokazalo je izrazito niske vrijednosti BDG-a, čak niže od opisanih u literaturi za ovu dobnu skupinu. Jedan serum tek rođenoga septičnog djeteta pokazivao je izrazito visoku vrijednost od 254,9 pg/mL i dijete je reagiralo na primjenu antifungika. Serum drugog bolesnika pokazivao je blago povišene vrijednosti od 86,95 pg/mL. Radilo se o djetetu u kojeg se upravo razvijao nekrotizirajući enterokolitis zbog čega je sluznica crijeva zasigurno propusnija nego inače, ali postoji i rizik od razvoja IGI-ja.

Pedijatrijski bolesnici u pedijatrijskoj jedinici intenzivnog liječenja i drugim zavodima Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb

U navedenoj skupini bolesnika na BDG testirano je 105 seruma od 23 bolesnika. Od toga je devetero djece imalo visoke vrijednosti BDG-a, u većini slučajeva više od 100 pg/mL, koje bi se, prema kriterijima za odrasle, interpretirale kao pozitivne. Važno je istaknuti da je jedno dijete na ekstrakorporalnoj membranskoj oksigenaciji imalo izrazito visoke vrijednosti BDG-a, no bez gljivnog izolata čak i u nadzornim kulturama. Nakon primjene antifungika došlo je do poboljšanja znakova infekcije. Moguće je da je ovaj test detektirao IGI i prije pojave kliničkih simptoma. Naši rezultati bolesnika s niskim vrijednostima BDG-a u skladu su s objavljenim studijama i govore u prilog tomu da testiranje BDG-a može pomoći pri isključivanju sumnje na IGI (tablica 1.).

Zaključak

Tijekom posljednjih desetljeća intenzivno se istražuje primjena BDG-a, kao i ostalih biomarkera u dijagnostici IGI-ja. Takav je interes posljedica visokih stopa morbideta i mortaliteta izazvanih IGI-jem u ri-

Tablica 1. Srednje vrijednosti BDG-a u 14 pedijatrijskih bolesnika s niskim vrijednostima

Table 1. Mean BDG values in 14 pediatric patients with low values

| Dob/Age | Vrijednost BDG-a (pg/mL) /BDG pg/mL values |
|---|--|
| Od rođenja do 12 mj. /From birth to 12 months | 27,12 |
| 1 – 3 godine/years | 27,21 |
| 4 – 6 godina/years | 35,955 |
| 7 – 12 godina/years | 29,39 |
| 13 – 18 godina/years | 28,1 |

zičnih skupina. Velik napredak u intenzivnom liječenju pridonio je duljem preživljenju bolesnika, što, između ostaloga, rezultira povišenom stopom incidencije oportunističkih infekcija uzrokovanih gljivama, i u odraslih i u djece. O faktorima rizika od IGI-ja puno se zna, ali se i dalje istražuju jer se neprestano javljaju nove skupine bolesnika s rizikom od razvoja ovih infekcija. Zbog manjkavosti konvencionalnih dijagnostičkih metoda karakteriziranih niskom osjetljivošću i dugotrajnošću, ali koje su zasad još zlatni standard, testiranje BDG-a bilo radi dijagnostike bilo radi probira visokorizičnih bolesnika omogućilo je dijagnostiku IGI-ja čak i prije pojave kliničkih simptoma. Pravodobno uvođenje antifungalne terapije iznimno je bitno i već je više od desetljeća poznato da svaki sat njezina odgađanja donosi povišenje stope mortaliteta od 1,6%. Ova rana dijagnostika u sklopu ostalih kliničkih parametara omogućuje ranu primjenu antifungalnih lijekova i bitno poboljšava ishod liječenja bolesnika.⁴⁴

Neosporiva je vrijednost BDG-testa i u isključivanju IK, no ne treba zaboraviti koje uzročnike gljivnih infekcija ovaj test ne detektira. Zasad nema graničnih vrijednosti za interpretaciju vrijednosti u pedijatrijskih bolesnika. Poučeni iskustvom galaktomanana kod kojeg su te vrijednosti naknadno utvrđene, kao i brojem studija koje se bave pedijatrijskim bolesnicima i BDG-om, s vremenom će sigurno biti utvrđene i granične vrijednosti za ovu populaciju bolesnika. Prema našem iskustvu, čak i bez definiranih graničnih vrijednosti, određivanje vrijednosti BDG-a za rizične pedijatrijske bolesnike može uvelike pomoći.

U KBC-u Zagreb liječe se iznimno teški bolesnici iz cijele Hrvatske među kojima mnogobrojni imaju visok rizik od razvoja IGI-ja. Uvođenje ovog testa, koji Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb kao Centar izvrsnosti Europske konfederacije za laboratorijsku mikologiju trenutačno provodi jedini u Hrvatskoj, bitno je pridonijelo boljem i racionalnijem liječenju IGI-ja kod naših bolesnika. Vrijednost testa prepoznali su i stručnjaci koji se bave

bolesnicima s rizikom od IGI-ja u drugim bolnicama u Hrvatskoj pa je i njima, uz pravilnu interpretaciju, ovaj test pomoć u dijagnostici i liječenju bolesnika.

Uvođenje testa BDG-a te njegova pravilna primjena i interpretacija znatan su napredak u dijagnostici IGI-ja. Cilj našeg Centra izvrsnosti jest daljnji razvoj dijagnostičkih metoda i multidisciplinarnog pristupa koji bi nam omogućio da ostanemo među vodećim svjetskim centrima izvrsnosti, a sve radi poboljšanja ishoda liječenja naših bolesnika s IGI-jem.

LITERATURA

- Schelenz S, Barnes RA, Barton RC i sur. British Society for Medical Mycology. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. *Lancet Infect Dis* 2015;15(4):461–74.
- Tran T, Beal SG. Application of the 1,3-β-D-glucan (Fungitell) Assay in the diagnosis of invasive fungal infections. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(2):181–5.
- Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi (Basel)* 2017;3(4).
- Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis* 2012;54(12):1739–46.
- Theel ES, Doern CD. B-D-glucan testing is important for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2013;51(11):3478–83.
- Warris A, Lehrnbecher T. Progress in the diagnosis of invasive fungal disease in children. *Curr Fungal Infect Rep* 2017;11(2):35–44.
- Wright WF, Overman SB, Ribes JA. (1-3)-β-D-glucan assay: a review of its laboratory and clinical application. *Lab Med* 2011;42(11):679–85.
- Latgé JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 2007;66(2):279–90.
- Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucan. *Cell Microbiol* 2005;7(4):471–9.
- Marty FM, Koo S. Role of (1-3)-beta-D glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2009;47(Suppl 1):233–40.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005;5(10):609–22.
- Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E i sur. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004;39(2):199–205.
- Kato A, Takita T, Furuhashi M i sur. Elevation of blood (1-3)-β-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* 2001;89(1):15–9.
- Prattes J, Schilcher G, Krause R. Reliability of serum 1,3-beta-D-glucan assay in patients undergoing renal replacement therapy: a review of the literature. *Mycoses* 2015;58(1):4–9.
- Ishizuka Y, Tsukada H, Gejyo F. Interference of (1-3)-beta-D-glucan administration in the measurement of plasma (1-3)-beta-D-glucan. *Intern Med* 2004;43(2):97–101.
- Egger M, Prüller F, Raggam R i sur. False positive serum levels of (1-3)-β-D-glucan after infusion of intravenous immunoglobulins and time to normalisation. *J Infect* 2018;76(2):206–10.
- Kanamori H, Kanemitsu K, Miyasaka T i sur. Measurement of (1-3)-beta-D-glucan derived from different gauze types. *Tohoku J Exp Med* 2009;217(2):117–21.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP i sur. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813–21.
- Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M i sur.; European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(6):846–54.
- Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C i sur. β-glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis* 2012;54(5):633–43.
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S i sur. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(Suppl 1):1–38.
- Vena A, Bouza E, Álvarez-Uría A i sur. The misleading effect of serum galactomannan testing in high-risk haematology patients receiving prophylaxis with micafungin. *Clin Microbiol Infect* 2017;23(12):1000.e1–4.
- Giacobbe DR, Del Bono V, Viscoli C, Mikulska M. Use of 1,3-β-D-glucan in invasive fungal disease in hematology patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15(12):1101–12.
- Picardi M, Della Pepa R, Giordano C i sur. (1-3)-β-D-glucan serum increase and small-airway-invasive radiological findings as early signs of pulmonary aspergillosis in high-risk hematologic patients in the posaconazole era: preliminary observations. *Ann Hematol* 2019;98(2):527–31.
- Angebault C, Lanternier F, Dalle F i sur. Prospective evaluation of serum β-glucan testing in patients with probable or proven fungal diseases. *Open Forum Infect Dis* 2016;3(3):ofw128.
- Zhao L, Tang JY, Wang Y i sur. Value of plasma β-Glucan in early diagnosis of invasive fungal infection in children. *Chin J Contemp Pediatr* 2009;11(11):905–8.
- Badiee P, Alborzi A, Karimi M i sur. Diagnostic potential of nested PCR, galactomannan EIA, and beta-D-glucan for invasive aspergillosis in pediatric patients. *J Infect Dev Ctries* 2012;6(4):352–7.
- Koltze A, Rath P, Schöning S i sur. Beta-D-glucan screening for the detection of invasive fungal disease in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2015;53(8):2605–10.
- Groll AH, Castagnola E, Cesaro S, Dalle JH i sur. Forth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *Lancet Oncol* 2014;15(8):e327–40.

30. *Lehrnbecher T, Hassler A, Groll AH, Bochennek K.* Diagnostic approaches for invasive aspergillosis – specific considerations in the pediatric population. *Front Microbiol* 2018;9:518.
31. *Bassetti M, Righi E, Ansaldi F i sur.* A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med* 2014;40(6):839–45.
32. *Prattes J, Hoenigl M, Rabensteiner J i sur.* Serum 1,3- β -D-glucan for antifungal treatment stratification at the intensive care unit and the influence of surgery. *Mycoses* 2014;57(11):679–86.
33. *Bassetti M, Garnacho-Montero J, Calandra T i sur.* Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2017;43(9):1225–38.
34. *Posteraro B, Tumbarella M, De Pascale G i sur.* (1,3- β -D-glucan)-based antifungal treatment in critically ill adults at high risk of candidaemia: an observational study. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(8):2262–9.
35. *Nucci M, Nouér SA, Esteves P i sur.* Discontinuation of empirical antifungal therapy in ICU patients using 1,3- β -D-glucan. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(9):2628–33.
36. *Kaufman D, Fairchild KD.* Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(3):638–80.
37. *Benjamin DK, Poole C, Steinbach WJ, Rowen JL, Walsh TJ.* Neonatal candidemia and end-organ damage: a critical appraisal of the literature using meta-analytic techniques. *Pediatrics* 2003;112(1):634–40.
38. *Goudjil S, Kongolo G, Dusol L i sur.* (1-3)- β -D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26(1):44–8.
39. *Cornu M, Goudjil S, Kongolo G i sur.* Evaluation of the (1,3)- β -D-glucan assay for the diagnosis of neonatal invasive yeast infections. *Med Mycol* 2018;56(1):78–87.
40. *Brissaud O, Guichoux J, Harambat J, Tandonnet O, Zaoutis T.* Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care* 2012;2(1):6.
41. *Jordan I, Balaguer M, López-Castilla JD i sur.* Per-species risk factors and predictors of invasive *Candida* infections in patients admitted to pediatric intensive care units: development of ERICAP scoring systems. *Pediatr Infect Dis J* 2014;33(8):e187–93.
42. *Novak M, Pleško S i sur.* Epidemiology and fungal infection risk factors in patients hospitalized in neonatal and paediatric intensive care units – a multicentre pilot study. *Signa Vitae* 2016;11(Suppl 2):51–6.
43. *Salvatore CM, Petraitiene R, Sitaras L i sur.* Prospective Study and Analytical Performance of Serum (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in Pediatric Patients. *Open Forum Infect Dis* 2016;3(Suppl 1):1570.
44. *Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH.* Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(9):3640–5.