

Ptk 1. Algmaterjali mikroskoopia	3
Ptk 2. Seente isoleerimine bioloogilistest materjalidest	6
Ptk 3. Pärmide samastamine	11
Ptk 4. Seente ravimtundlikkuse määramine	16
Ptk 5. Dermatofüütide samastamine	19
Ptk 6. Hallituseente samastamine	24
Ptk 7. Uuring seente esinemise suhtes - proovide transport, käsitlemine ja tulemuste interpretatsioon	29
Ptk 8. Antikeha ja antigeeni uuringud invasiivsete seeninfektsioonide diagnostikas	39
Lisad 1-12	

Algmaterjali mikroskoopia

Algmaterjali otsene mikroskoopia on üks kiiremaid võimalusi diagnoosi püstitamiseks. Seened on bakteritest oluliselt suuremad, kuid neid leidub organismis palju vähem. Samuti on seeninfektsioon sageli lokaliseerunud kindlasse organisse, mis muudab selle avastamise keerukaks. Kui uuritakse kudet, tuleb proove võtta kahjustunud koe erinevatest piirkondadest. Vedelike (uriin, aspiiraadid, liikvor) uurimisel tuleks alati kasutada materjali kontsentreerimist, et tagada vähestegi seeneosiste jõudmine uuritavasse preparaati. Külv on küll tundlikum meetod võrreldes mikroskoopiaga, kuid teatud juhtudel on viimasel eelised. Rõgas või mädas võib sageli näha juba surnud seene elemente. Ka mikroskoopia positiivseks osutunud küüne preparaadid jäävad kultuuris sageli negatiivseks.

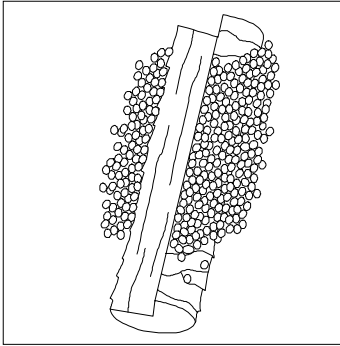
Tabel 1. Seente eristamiseks sobivad värvingud

Meetod	Materjal	Aeg	Leiud	Märkused
Calcofluor, Blankophor + NaOH või KOH	Erinevad materjalid	1-5 min	Seened fluorestseeruvad, proovimaterjal lüüsub.	Vajalik fluorestsents-mikroskoop. Artefaktid võivad helendada (puuvillakiud!). Ei ole võimalik näha hüüfide pigmentatsiooni.
Tušivärving	Liikvor krüptokokoosi kahtluse korral	1-2 min	Pärmiraku kapsel muutub tumedal taustal nähtavaks.	Helendavad lümfotsüüdid võivad anda kapslitaalse halo.
Gram'i värving	Erinevad materjalid	3 min	Seened värvuvad Gram-positiivselt.	<i>Cryptococcus</i> -pärmirakke ümbritsev kapsel ei ole nähtav.
Grocott' hõbetamismeetod	Parafiini sisestatud materjalid	2,5 tundi	Seened värvuvad mustalt rohekal taustal.	Seigseened värvuvad nõrgalt. Aeganõudev.
PAS värving	Parafiini sisestatud materjalid	25-30 min	Seened värvuvad lillakas- punaselt roosal taustal.	PAS-positiivsed artefaktid võivad sarnaneda seentele.
Giemsa värving	Luuüdi	15 min	Võimaldab näha rakusisesid patogeene, nt <i>Histoplasma capsulatum</i>	Seenpatogeenidest ainult liigi <i>H. capsulatum</i> eristamiseks.

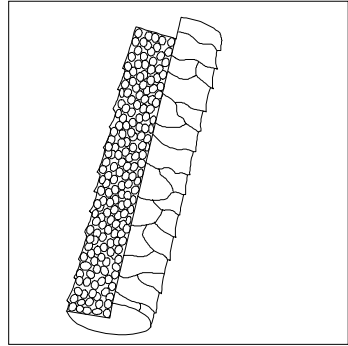
Mükoloogialaborites kasutatakse enamasti vähe värvimismetoodikaid, mistõttu tuleb vajadusel kasutada teiste laborite abi (bakterioloogia, patoloogia, histoloogia). Lisaks erinevatele värvimismeetoditele ja tavapärasele valgusmikroskoopiales tuleks kasutada faasikontrast- ja fluorestsentsmikroskoopiat. Võimalikest värvimismeetoditest annab ülevaate tabel 1.

Enamasti ei ole mikroskoopia põhjal võimalik seent liigi tasemel identifitseerida. Erandiks on *pityriasis versicolor*'i tekitaja *Malassezia furfur* nahakettudes ja *Scopulariopsis brevicaulis* küünete materjalis (eosed iseloomuliku kujuga). Mõnikord on võimalik piiritleda patogeenide kitsam rühm. Kui nähakse pungrakke ja/või pseudomütseeli, on tegu pärmseentega. Kui mikroskoopia leitakse kitsaid, paljude tihedalt paiknevate ristvaheseintega seenehüüfe, siis on need hallitusseened (sealhulgas dermatofüüdid, mis tulevad kõne alla keratiniseerunud kudede puhul). Kui leitakse lai, harvade vaheseintega, 60–90° hargnevaid seenehüüfe, võib tegu olla seigseentega (*Zygomycetes*; *Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*). Dermatofüütidest põhjustatud juuste nakkuse korral on mikroskoopia põhjal samuti võimalik piiritleda patogeenide rühm:

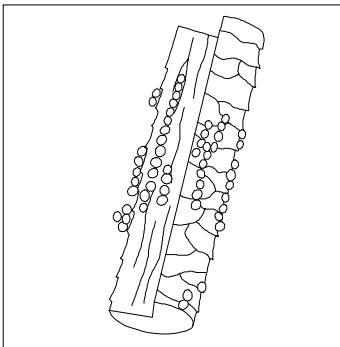
1. Ektothrix – eosed juuksekarva pinnal (joonis 1.). Väikesed eosed (2–3 mm) on liikidel *Microsporum canis* ja *M. audonii*. Suured eosed (5–8 mm) on liikidel *M. gypseum* ja *M. gallinae*. Suured, ahelatena paiknevad eosed on liigil *Trichophyton verrucosum* (5–10 mm).
2. Endothrix – eostemass juuksekarva sees (joonis 2.). Eoste läbimõõt 5–8 mm, juuksekarvad enamasti murdunud või keerdunud. Endothrix'i põhjustavad *T. tonsurans* ja *T. violaceum*.
3. Ekto-endothrix – eosed nii juuksekarva sees kui pealispinnal (joonis 3.). Segatüüpi infektsiooni põhjustavad *T. rubrum* ja *T. mentagrophytes*.
4. Faavus – seenehüüfid ja õhuruumid juuksekarva sees, juuksed ei murdu. Faavust tekitab *T. schoenleinii* (joonis 4.).



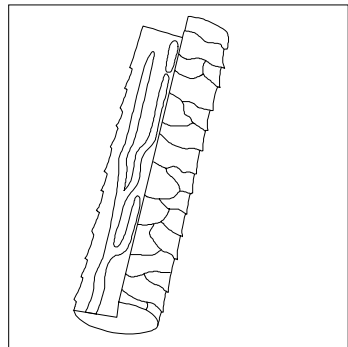
Joonis 1. Ektothrix juustel



Joonis 2. Endothrix juustel



Joonis 3. Endo-ektothrix juustel



Joonis 4. Faavus juustel

Seente isoleerimine bioloogilistest materjalidest

Bioloogilise materjali külvamisel tuleb jälgida, et potentsiaalsele patogeenile tagataks optimaalsed kasvutingimused. Lähem teave patsiendi haiguse (põhihaigus, immunoloogiline staatus, reisid, kontaktid loomadega, varasem antibakteriaalne ja antifungaalne ravi) ja proovimaterjali kohta (materjali liik, kogumisaeg) võimaldab kõige tõenäolisema patogeeni avastamiseks rakendada erimetoodikaid. Erinevate proovimaterjalide säilitamise, transpordi ja käsitlemise eeskirjad on toodud lisades 1–11. Vedelike (uriin, aspiraadid, liikvor) uurimisel tuleks alati kasutada materjali kontsentreerimist tagamaks väheste seeneosiste jõudmist kultuuri. Siiski tuleb arvestada seda, et kontsentreerimine võib põhjustada soovimatute organismide ülekasvu (nt samaaegse bakteriaalse ja seennakkuse korral). Tugev pärmide ülekasv proovimaterjalis pärsib ka hallitusseente kasvu. Koeproovid tuleb tükeldada võimalikult väikeseks, kuid homogeniseerimist ei saa alati soovitada, kuna hallitusseente mütseeli lõhkumine üksikuteks rakkudeks võib seene hävitada (eriti tundlikud on seigseened).

Külviks sobiv sööde valitakse enamasti vastavalt proovimaterjalile ja sellest sagedamini isoleeritavatele patogeenidele, arvestades diagnoosi. Peamiselt kasutatakse universaalsöötmeid, mis tagavad enamikule seenpatogeenidest optimaalse kasvu. Vajadusel, eriti kui kahtlustatakse nn eksootilist mükoosi (krüptokokoos, histoplasmoos) valitakse esmaskülviks spetsiaalsööde (nt *brain heart infusion agar*).

Peamised mükoloogilised universaalsöötmed on Sabouraud' glükoos agar (SGA) ja linnaseagar (MEA, *malt ekstrakt agar*). Mükoloogilisi söötmeid turustavad suured diagnostikakompaniid (Difco, Oxoid) pulbrina. Enamikku mükoloogilisi söötmeid steriliseeritakse autoklaavi režiimil 121 °C 15 minutit.

Allpool on toodud ülevaade enamlevinud mükoloogilistest söötmetest:

1. Sabouraud' glükoos agar (SGA)

SGAd kasutatakse patogeensete seente isoleerimiseks. Dermatofüütide isoleerimiseks kasutatavale söötmele lisatakse tsükloheksimiidi (500 mg 1 liitri kohta) ja klooramfenikooli (50 mg liitri kohta). Tsükloheksimiid inhibeerib

enamiku saprootroofsete seente kasvu. Patogeensetest seentest on tsükloheksimiidile tundlikud mõned perekond *Candida* liigid, perekonnad *Cryptococcus*, *Aspergillus* ja seigseened (*Mucor*, *Rhizomucor* jt).

Valmistuskäik

10 g mükoloogilist peptooni

40 g glükoosi

20 g agarit

1 l destilleeritud vett

Lahusta komponendid 1 liitris destilleeritud vees. Kuumuta keemiseni, kuni pulber on täielikult lahustunud. Söötme pH on 7 (enne autoklaavimist). Autoklaavi 121 °C juures 15 min. Lase jahtuda umbes temperatuurini +50 °C ja lisa antibiootikum. Vala Petri tassidesse, söötmekihi paksus on umbes 4 mm.

Söötme positiivne kvaliteedikontroll

Teostatakse tüvedega *Candida albicans* ATCC 90028 ja/või *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 32994. Testtüvest valmistatakse suspensioon 0,9% NaCl-lahuses läbipaistvusega 0,5 McFarland'i skaala järgi. Testtassile külvatakse 1 ml suspensiooni. Inkubeerimistemperatuur 28–30 °C

Candida albicans ATCC 90028 – 48 h +37 °C, hea kasv, vahase pinnaga valged kolooniad.

Saccharomyces cerevisiae CCUG 32994 – 48 h +37 °C, hea kasv, vahase pinnaga valged kolooniad.

2. 2% või 4% linnaseagar (ingl. *malt extract agar*, MEA)

2% MEAd kasutatakse dermatofüütide (*Epidermophyton*, *Microsporium*, *Trichophyton*), hallituseente (*Aspergillus*, *Penicillium*) ja seigseente (*Zygomycetes*; *Mucor*, *Rhizomycor*, *Rhizopus*) morfoloogia-agarina liikide samastamisel.

4% MEAd kasutatakse SGA alternatiivina patogeensete seente isoleerimiseks.

Valmistuskäik

20 g või 40 g malt ekstrakti

20 g agarit

1 liiter destilleeritud vett

Lahusta komponendid 1 liitris destilleeritud vees. Kuumuta keemiseni, kuni

pulber on täielikult lahustunud. Söötme pH on 7 enne autoklaavimist. Autoklaavi +121 °C juures 15 min. Lase jahtuda umbes temperatuurini +50 °C ja lisa antibiootikum (nt 100 mg klooramfenikooli). Vala Petri tassidesse, söötme kihi paksus on umbes 4 mm.

Söötme positiivne kvaliteedikontroll

Kontroll teostatakse tüvedega *Candida albicans* ATCC 90028 ja/või *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 32994. Testtüvest valmistatakse suspensioon 0,9% NaCl-lahuses läbipaistvusega 0,5 McFarland'i skaala järgi. Testtassile külvatakse 1 ml suspensiooni.

Candida albicans ATCC 90028 – 48 h +37 °C, hea kasv, vahase pinnaga valged kolooniad.

Saccharomyces cerevisiae CCUG 32994 – 48 h +37 °C, hea kasv, vahase pinnaga valged kolooniad.

3. Maisiagar (ingl. *corn meal agar*, CMA)

Maisiagarit kasutatakse pärmide (*Ascomycetes*: *Saccharomyces*; *Candida*; *Basidiomycetes*: *Trichosporon*, *Geotrichum*) morfoloogia-agarina liikide samastamiseks.

Valmistuskäik

17 g maisiagarit

10 ml Tween-80

1 l destilleeritud vett

Lahusta söötme komponendid 1 liitris destilleeritud vees. Kuumuta keemiseni, kuni pulber on täielikult lahustunud. Autoklaavi +121 °C juures 15 min. Lase jahtuda umbes temperatuurini +50 °C ja vala morfoloogiatestiks sobivatesse 50 mm Petri tassidesse.

Positiivne kvaliteedikontroll

Kontroll teostatakse tüvedega *Candida albicans* ATCC 90028 ja/või *Candida tropicalis* ATCC 750. Kontrolltüvesid inkubeeritakse 48 h +25 °C juures.

Candida albicans ATCC 90028 – vahase pinnaga valged või kreemikasvalged kolooniad, esinevad pseudohüüfid ja hüüfid, pungrakud, tipmised klamüdosporiidid.

Candida tropicalis ATCC 750 – vahase pinnaga valged või kreemikad kolooniad, esinevad iseloomuliku kujuga pungrakud, pseudohüüfid ja hüüfid.

4. Czapek dox agar (CzA)

Czapek dox agarit kasutatakse hallituseente (*Aspergillus*, *Penicillium*) morfoloogia-agarina liikide samastamiseks.

Valmistuskäik

45,4 g *Czapek dox* agarit (Oxoid)

1 liiter destilleeritud vett

Lahusta agar destilleeritud vees. Kuumuta keemiseni, kuni pulber on täielikult lahustunud. Autoklaavi +121 °C juures 15 min. Lase jahtuda umbes temperatuurini +50 °C ja lisa antibiootikum (nt 100 mg klooramfenikooli). Vala Petri tassidesse, söötmekihi paksus on umbes 4 mm.

5. Kartuli glükoos agar (ingl. *potato dextrose agar*, PDA)

PDA-d kasutatakse morfoloogia-agarina pärmseente ja hallituseente samastamiseks.

Valmistuskäik

39 g kartuli glükoos agarit (Oxoid)

1 l destilleeritud vett

Lahusta agar 1 liitris destilleeritud vees. Kuumuta, kuni pulber on täielikult lahustunud. Autoklaavi +121 °C juures 15 min. Lase jahtuda umbes temperatuurini +50 °C ja lisa antibiootikum (nt 100 mg klooramfenikooli). Vala Petri tassidesse, söötmekihi paksus on umbes 4 mm.

Positiivne kvaliteedikontroll

Candida albicans ATCC 90028 – iseloomuliku morfoloogiaga pseudohüüfid ja pungrakud.

6. Lämmastikkomponendiga sööde (ingl. *yeast nitrogen base*, YNB)

YNBi kasutatakse pärmide (*Candida*, *Saccharomyces* jt) suhkrute assimilatsioonitesti keskkonnana.

Valmistuskäik

6,7 g *yeast nitrogen base*'i (Difco)

20,0 g agarit

1 l destilleeritud vett

Lahusta söötme komponendid 1 liitris destilleeritud vees. Kuumuta keemiseni, kuni pulber on täielikult lahustunud. Autoklaavi +121 °C juures 15 min. Lase jahtuda umbes temperatuurini +50 °C. Kasutatakse kohe pärmide suhkrute assimilatsioonitestideks.

Positiivne kvaliteedikontroll

Teostatakse assimilatsioonitest *C. albicans* tüvega ATCC 90028, mis peab andma iseloomuliku auksanogrammi: glükoos - positiivne, hea kasv; galaktoos - positiivne, hea kasv; sahharoos - positiivne, hea kasv; maltoos - positiivne, hea kasv; laktoos - negatiivne, kasv puudub; rafinoos - negatiivne, kasv puudub; tsellobioos - negatiivne, kasv puudub; rhamnoos - negatiivne, kasv puudub; trehhaloos - positiivne, hea kasv.

Pärmseeni iseloomustab võime moodustada pungrakke (blastospoore). Erinevalt hallitusseentest, mida samastatakse peamiselt koloonia ja mikroskoopiliste tunnuste alusel, kasutatakse pärmseente samastamiseks valdavalt erinevaid biokeemilisi teste ning vähem morfoloogilisi tunnuseid. Enamik pärmseeni kasvab hästi tavapärasel bakterioloogilistel ja seentele sobivaltel söötmetel (SGA, MEA, v.a *Malassezia*). Pärmseened kasvavad kiiresti, optimaalsetes tingimustes (30–37 °C) ilmuvad kolooniad 1–3 ööpäevaga. Liik *Candida albicans* moodustab 70–80% kliinilisest materjalist isoleeritud pärmseentest. Viimastel aastatel on kõikjal maailmas täheldatud teiste *Candida* perekonna liikide osakaalu suurenemist inimpatogeenidena. Lisaks on kliinilises praktikas tavalisemad perekondade *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Trichosporon* ja *Cryptococcus* esindajad.

Samastamise esmane tingimus on puhaskultuuri olamasolu. Mittesteriilsest materjalist (nt kurgulima, röga, tupe sekreet, roe) tuleb seen isoleerida puhaskultuuri, kasutades antibiootikumilisandiga seentele sobivaid söötmeid.

1. Pärmikolooniate kirjeldamine

Erinevaid pärmseente perekondi iseloomustavad rohkem või vähem erinevad koloonia tunnused. Vähemalt 24 tunni vanuseid kolooniaid vaadeldakse luubi või binokulaarmikroskoobi abil (väikestel suurendustel) ning kirjeldatakse koloonia iseloom (kuiv *versus* limane, vahane), värvus (valge, roosa, must või pruun), kuju (kõrge *versus* lame, sile *versus* ebatasane) ja koloonia servaala (sile *versus* ebatasane).

2. Mikroskoopia

Preparaat valmistatakse 0,9% NaOH või 1-10% KOH lahusesse. Pärmide mikroskopeerimisel kirjeldatakse rakkude kuju (ümarad *versus* piklikud), iseloom (pungrakud, artrokoniidid), samuti polüsahhariidse kapsli esinemine või puudumine. Kapsli vaatlemiseks tuleb teha tušipreparaat (vt lisa 1). Limaste kolooniate ja kapsliga pungrakkude esinemine viitab perekonnale *Cryptococcus*. Mõningatel juhtudel võib kapsel olla väga õhuke ja raskesti

vaadeldav, siis tuleb perekondi eristada biokeemiliste või seroloogiliste testidega.

3. Seerumtest (vt lisa 2.)

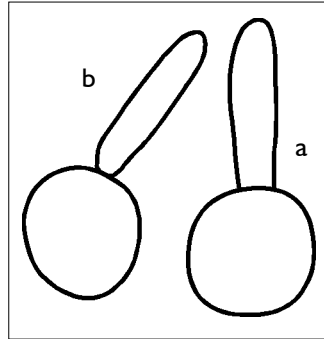
Positiivne seerumtest võimaldab samastada liiki *Candida albicans*. Kui seerumtest on positiivne, siis ei ole edasine testimine vajalik. Tuleb siiski arvestada, et seerumtest on positiivne ka liigil *C. dublinensis*. Liiki *C. dublinensis* on isoleeritud eeskätt AIDS-iga patsientidelt ning vajadusel tuleb liikide lõplikuks samastamiseks kasutada täiendavaid teste (nt temperatuuritest 42 °C juures, *C. dublinensis* ei kasva; ja assimilatsioonitest). Samuti on võimalik, et mõned liigi *C. tropicalis* tüved

annavad seerumtestis positiivse tulemuse, eriti testaja lõppfaasis (2,5–3 tundi). Liigi *C. tropicalis* tüvedel on arenev idumõik emaraku lähedal sissenõrdunud, erinevalt liigist *C. albicans*, mil see on alati laia alusega (vt joonis 5.).

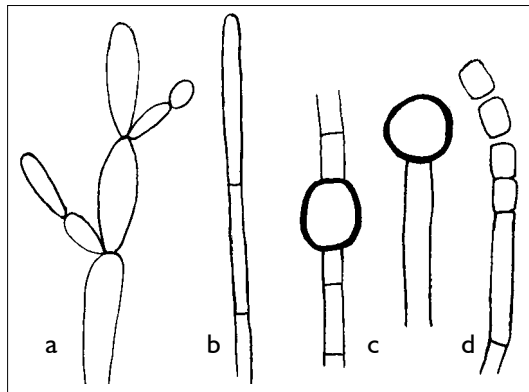
Seerumtestiks kasutatakse hobuse, inimese või vasika vereseerumit. Testtemperatuur on 37 °C ja inkubeerimise kestus 1,5–3 tundi (optimaalne 2 tundi).

4. Morfoloogiatest (vt lisa 3.)

Morfoloogiatestiga selgitatakse pärmseente võimet moodustada erinevat tüüpi struktuure, nagu pseudohüüfid, tõelised hüüfid,



Joonis 5. a. Liigi *Candida albicans* idutoruga (ingl. germ tube) pärmirakk b. Liigi *Candida tropicalis* alusel ahenenud idutoruga pärmirakk



Joonis 6. a. Pseudohüüf b. Hüüf c. Interkalaarsed ja tipmised klamüdosporiid d. Artrokoniidideks lülistunud hüüf

klamüdosporiid, artrokoniidid, mis võimaldab eristada seeneperekondi (vt tabel 2. ja joonis 6.).

Testiks kasutatakse maisiagarit (Tween-80 lisandiga) või kartuli glükoos agarit. Optimaalne inkubeerimistemperatuur on 23–25 °C, kestus 48 tundi. Enamik *Candida* perekonna liike moodustavad maisiagaril pseudomütseeli. Liigile *C. albicans* on tüüpiline klamüdosporiide moodustumine.

Tabel. 2. Mikromorfoloogiliste tunnuste esinemine patogeensete pärmseente perekondades

Organism	Pungrakud	Pseudo-hüüfid	Tõelised hüüfid	Kotteosed (askosporiid)	Artrokoniidid	Muud iseloomulikud tunnused
<i>C. albicans</i>	+	+	+			klamüdosporiid
<i>Candida</i> spp.	+	+/-	+/-			
<i>Saccharomyces</i> spp.	+	+/-	+/-	+		
<i>Hansenula</i> spp.	+	+	+/-	+		«kübara-kujulised» askosporiid
<i>Cryptococcus</i> spp.	+					kapsel
<i>Rhodotorula</i> spp.	+					roosa või punane või kollane pigment
<i>Geotrichum</i> spp.			+		+	
<i>Trichosporon</i> spp.	+	+	+		+	

5. Kott-eoste moodustumise kontroll

Pärmid moodustavad kott-eoseid (askospoore) enamasti juhul, kui toitainete hulk keskkonnas on piiratud. Testiks kasutatakse erinevaid toitainevaesemaid söötmeid, näiteks sobivad MEA ja atsetaatar. Sageli moodustuvad askosporiid ka morfoloogiatestiks kasutataval maisiagaril. Söödet inkubeeritakse toatemperatuuril (23–25 °C) kuni 1 kuu. Testi kontrollitakse kord nädalas fikseerides pärmirakud leegis alusklaasile ja töödeldes neid Ziel-Neelsen karbool fustiinihahusega, milles kott-eosed värvuvad punaseks ja vegetatiivsed rakud roheliseks.

6. Biokeemilised testid

6.1. Fermentatsioonitest

Fermentatsiooni all mõistetakse pärmseente võimet tekitada gaasi (sõltumata keskkonna pH-näitajatest) kasutades elutegevuseks erinevaid suhkruid. Fermentatsioonitestid on aeganõudvad ja neid ei soovitata kliinilises laboris rutiinseks kasutamiseks. Fermentatsioonitesti kasutatakse vajadusel täiendava testina (lisaks suhkrute assimilatsioonitestile ja morfoloogiatestile) pärmseente lõplikuks samastamiseks.

Klassikaliselt kasutatakse testiks Durham'i katseklaase, kus kogunev gaas on hästi nähtav. Teste inkubeeritakse toatemperatuuril (25–30 °C) kuni 10 päeva, tehes vaatlusi iga 2-3 päeva järel. Mõnede liikide fermentatsioon on aeglane, ilmnedes alles 10-päevase perioodi viimastel päevadel. Testsuhkruteks on D-glükoos, D-galaktoos, sahharoos, maltoos, laktoos, trehhaloos ja rafinoos.

6.2. Suhkrute assimilatsioonitest (vt lisa 4.)

Assimilatsiooni all mõistetakse pärmseente võimet kasutada aeroobsetes tingimustes elutegevuseks suhkruid. Liigiti on suhkrute kasutamine erinev. Kasvu testitakse enamasti 16 suhkru olemasolul (D-glükoos, D-galaktoos, sahharoos, maltoos, laktoos, tsellobioos, melibioos, trehhaloos, rafinoos, melesitoos, ksüloos, L-sorboos, erütritool, D-mannitol, D-sorbitool, inositol). Testi inkubeeritakse toatemperatuuril (25–30 °C) ja tulemusi loetakse 48 tunni möödudes. Liikide samastamiseks tuleb kasutada käsiraamatuid, kus on ära toodud erinevatele liikidele iseloomulik suhkrute assimilatsioonimuster (auksanogramm).

6.3. Nitraadi assimilatsioonitest (vt lisa 6)

Nitraadi assimilatsioonitest võimaldab hinnata pärmseente nitraatide kasutamise võimet. Test teostatakse sarnaselt suhkrute assimilatsioonitestile. Testi inkubeeritakse toatemperatuuril (25–30 °C) ja tulemusi loetakse 48 tunni möödudes.

6.4. Uurea hüdrolüüsi test (vt lisa 8)

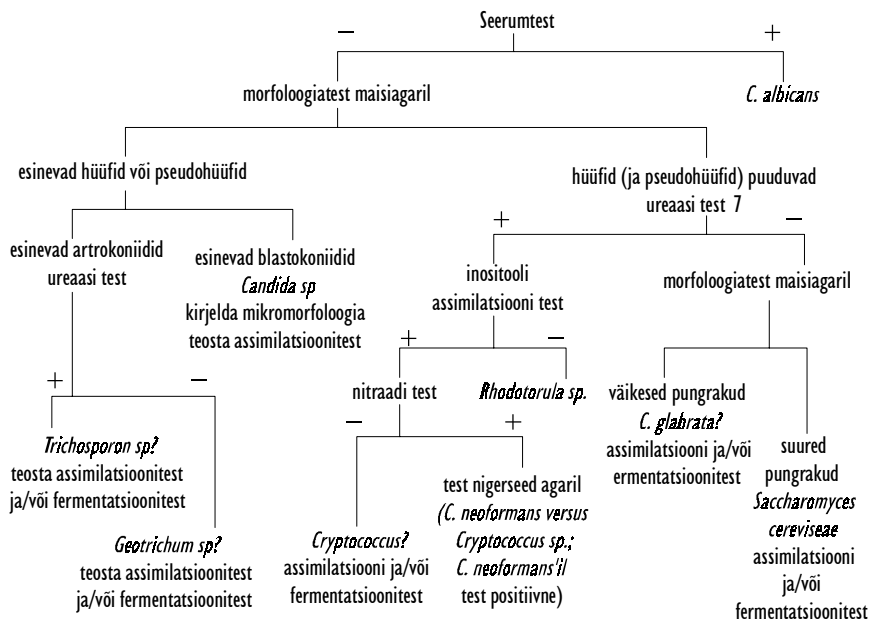
Uurea hüdrolüüsi test võimaldab eristada kandseente hulka kuuluvaid pärme (*Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*) ja mõnda dermatofüüti (*Trichosporon mentagrophytes*), millel on olemas ureaas. Kuna test on valgustundlik, on alati soovitatav lisada positiivne ja negatiivne kontroll. Testi

inkubeeritakse toatemperatuuril 7 ööpäeva.

6.5. Diagnostilised paketid

Igapäevases laboripraktikas on otstarbekas kasutada suurte diagnostikakompaniide toodetud diagnostilisi pakette ning ainult probleemsete tüvede puhul teostada klassikalised fermentatsiooni- ja assimilatsioonitestid või täiendavad lisatestid. Usaldusväärsemad testid pärmide samastamiseks on ID 32 C ja API 20 (Bio Merieux) ja Vitek. Need süsteemid võimaldavad samastada umbes 60 kliinilises praktikas sagedamini esinevat pärmseent (vt lisa 5.). Lihtsam test on ChromagarCandida (Becton-Dickinson), mis võimaldab samastada 4 kõige sagedasemat *Candida* perekonna liiki (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* ja *C. glabrata*; vt lisa 11.). Diagnostiliste pakettide kasutamisel tuleb rangelt järgida tootjapoolset kasutusjuhendit.

Tavalisemate patogeensete pärmseente samastamise skeem



Seente ravim tundlikkuse määramine

Seeninfektsioonide sagenemine, riskirühma kuuluvate patsientide ja ravimresistentsete tüvede kasv aasta-aastalt tingivad vajaduse uurida ravim tundlikkust *in vitro*. Testide tulemusi mõjutavad kõige rohkem valitud testsööde, inokulumi suurus, samuti inkubeerimise kestus ja temperatuur. Seos *in vitro* määratud minimaalse inhibeeriva ravim kontsentratsiooni (MIK) ja ravimi kliinilise efektiivsuse vahel sõltub paljugi konkreetse ravimi farmakokineetikast ja infektsiooni asukohast. Standardiseeritud meetodid on olemas asoolide (flukonasool, itrakonasool, ketokonasool) ja amphoteriis-B ravim tundlikkuse määramiseks nii pärmseentele kui hallitustele. Ravim tundlikkuse määramine on oluline eelkõige resistentsete tüvede leviku hindamiseks ja kohaliku epidemioloogilise olukorra selgitamiseks. Ideaaljuhul määrab klinitsist esmase antifungaalse ravi kohalike epidemioloogiliste andmete põhjal, sest patogeeni isoleerimine ja ravim tundlikkuse määramine nõuab vähemalt 48 tundi.

1. Makro- ja mikrolahendusmeetodid

Makrolahendusmeetod on kehtiv referentsmeetod, mille on välja töötanud Riiklik Kliiniliste Laborite Standardite Komisjon (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) USA-s. Makrolahendusmeetod võimaldab määrata minimaalset inhibeerivat kontsentratsiooni (MIK) nii asoolide kui amphoteriis-B jaoks. Meetodit saab edukalt reprodutseerida erinevates laborites (korrelatsioon 80–99%), kuid kuna see on tehniliselt suhteliselt keerukas ja aeganõudev (48 tundi), siis ei sobi ta igapäevases praktikas kasutamiseks. Makrolahendusmeetodi modifikatsioon on mikrolahendusmeetod, kus test viiakse läbi mikrotiiter-plaatidel. Mõlemal juhul kasutatakse RPMI-1640 vedelsöödet 0.165 M MOPS ja 20g/L glükoosi lisandiga. Inokulumi kontsentratsioon on $0,5-2,5 \times 10^3$ rakku. Testtemperatuur on 35 °C, testi kestus 48 tundi. Detailselt on protseduuri kirjeldatud NCCLSi protokollis M27-A pärmseente ja protokollis M38-P hallitusseente tundlikkuse määramiseks (vt kasutatud kirjandus).

2. Kolorimeetrilised meetodid

Meetod põhineb reagentil *alamar blue*, mis reageerib mikroobide kasvule keskkonnas värvimuutusega (sinisest punaseks). Värvimuutus on kergesti jälgitav ja võimaldab määrata pärmseente MIK. Valmispaketina turustatakse kolorimeetrilisi teste pärmide MIK määramiseks paneelina Sensititre YeastOne (AccuMed International). Paneelil on mikrotiiterplaadi süvendites ravimite lahjenduste seeria, millele on lisatud reagenti *alamar blue*. Meetod korreleerub hästi NCCLS referentsmetoodikaga ja on kiirem (24 tundi).

3. E-test meetod

Meetod põhineb antifungaalse preparaadiga immutatud testribal, millele on märgitud ravimi kontsentratsiooni gradient. Vastavalt inhibeeritud kasvu tsoonile loetakse testribalt MIK. Meetod korreleerub hästi NCCLSi referentsmetoodikaga. E-test on välja töötatud Rootsis (Biodisc).

4. Disk-difusioon meetodid

Disk-difusioonmeetodid ei ole standardiseeritud. Mitmed erinevad diagnostikakompaniid turustavad antifungaalsete preparaatidega immutatud paberdiske (Abtek, MAST) või tablette (Rosco Diagnostica). Kasutatavad söötmed on *yeast nitrogen base* (YNB) ja RPMI-1640, inkubatsiooniaeg 24–48 tundi. Disk-difusioonmeetod on siiski arvestatav meetod resistentsete tüvede kiireks väljaselgitamiseks.

Tabel 3. Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIK, mg/l) tõlgendamine

Antifungaalne preparaat	Tundlik	Tundlik ravimdoosist sõltuvalt	Mõõdukalt tundlik	Resistentne
Amphoteriin-B	< 1			> 2
5 flutsütoosiin	< 4		8–16	> 32
Flukonasool	< 8 ¹	16–32 ²		> 64
Mikonasool	< 8			> 16
Ketokonasool	< 8			> 16
Itrakonasool	< 0,125	0,25–0,5		> 1

¹ ravimdoos 100–200 mg/päevas

² ravimdoos 200–400 mg/päevas

Tuleb arvestada, et nii flukonasooli kui itrakonasooli MIK tundlikkusklasside piirväärtuste andmed pärinevad limaskestade kandidoosiga patsientidelt ja ei pruugi seetõttu olla üheselt üle kantavad invasiivse kandidoosiga patsientidele.

Dermatofüütide samastamine

Dermatofüüte samastatakse koloonia ja mikromorfoloogiliste tunnuste alusel. Sageli ei ole tüve isoleerimine vajalik, iseloomulikud mikrokoopilised tunnused ilmuvad juba esmaskülviks kasutatud söötmel (SGA; MEA) u 7 päeva vanuses kultuuris. Kui esmaskülvi sööde sisaldab tsükloheksimiidi, võib mõnede iseloomulike tunnuste ilmumine olla pärsitud. Selektiivne sööde dermatofüütidele on *dermatophyte test medium*, DTM, millel enamik baktereid ja saprotroofseid hallitusseeni ei kasva. Tüüpilised kolooniatunnused (nt pigment) ilmuvad enamasti kartuli glükoos agaril või maisiagaril (glükoosi lisandiga). Liikide eristamiseks on vajalikud test urea agaril (liikide *Trichophyton rubrum* ja *T. mentagrophytes* eristamiseks), juuste perforatsiooni test, külv riisiteradele (liikide *Microsporum audonii* ja *M. canis* eristamiseks; vt lisad 8-10.).

Liigi määramisel võib abiks olla teave nakkusallikast (teine nakatunu, loom, pinnas), mis piiritleb võimaliku patogeeni kitsama rühma (antropofiil, zoofiil, geofiil), ja kolde asukohast, samuti kahjustuse iseloom ja leid materjali algmikroskoopial (eriti juuste nakkuse puhul – ektothrix'i *versus* endothrix'i tekitavad liigid).

Dermatofüütide esmaskülve inkubeeritakse temperatuuril 28–32 °C kuni 21 päeva. Kaks korda nädalas hinnatakse külve mikrokoopiliselt. Probleemsed tüved isoleeritakse kartuli glükoos agarile või spetsiaalsöötmele.

Mikroskoopia

Dermatofüütide hulka kuuluvad seened perekondadest *Epidermophyton*, *Microsporum* ja *Trichophyton*. Dermatofüütidel esineb puhaskultuuris kaht tüüpi eoseid – mikrokoniiide ja makrokoniiide. Perekondade eristamisel on peamisteks tunnusteks makrokoniiidid, nende kuju ja suurus, samuti kolooniatunnused. Perekonnas *Microsporum* on makrokoniiidid paksuseinalised ja karedapinnalised, perekondade *Trichophyton* ja *Epidermophyton* seentel on makrokoniiidid õhukeseseinalised ja siledapinnalised. Mikrokoniiidid puuduvad perekonna *Epidermophyton* seentel. Mikrokoniiidide kuju on oluline liikide *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* ja *T. terrestre* eristamiseks. Muud liikide eristamisel olulised struktuurid on tipmised klamüdosporid (*M.*

audonii), tipmiselt laienenud hüüfid (*T. shoenleinii*) ja hüüfide peegelduv hargnemine (*T. violaceum*) ning spiraalhüüfid (*T. mentagrophytes*).

Sageli tekib dermatofüütidel massiliselt mikro- ja makrokoniide ning traditsioonilisel viisil on raske saada hästivaadeldavat preparaati. Hea läbipaistvuse saavutamiseks võib kasutada kleeplinti. Väike tükk läbipaistvat jääka kleeplinti surutakse pintsettide abil õrnalt vastu kolooniat. Seejärel tõstetakse kleeplint, mille külge on ühe kihina kleepunud seene eosed, mikroskopeerimislahusesse (Amman'i lahus, 3% KOH, laktofenool-puuvillasinise lahus) ja kaetakse katteklaasiga.

1. *Microsporium canis*

Koloonia

Koloonia (SGA) laiuv, õhuke, villane, hallikas kuni pruunikas-valge, pöördel kollane.

Mikroskoopia

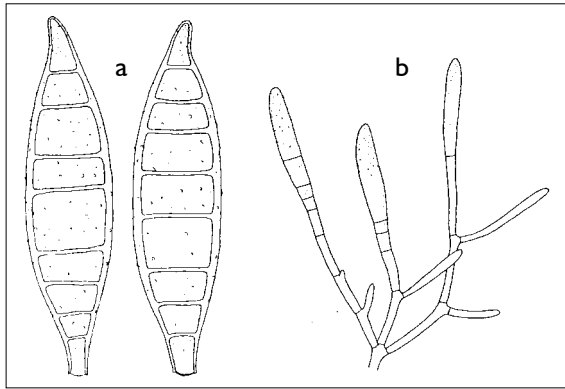
Makrokoniidid paksuseinalised, kändunud tipuga, paljurakulised (6–12), 35–110 x 12–25 µm.

Mikrokoniidid õhukeseseinalised, piklikud või pirnjad (vt joonis 7.).

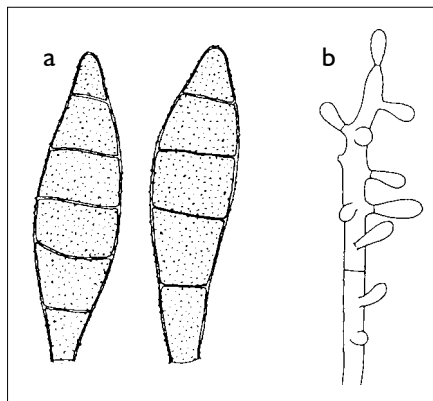
2. *M. gypseum*

Koloonia

Koloonia (SGA) puuderjas, kahvatu kaneelipruun, pöördel kollakaspunane, mõnikord roosaka varjundiga.



Joonis 7. a. Liigi *Microsporium canis* makrokoniidid b. Noored makrokoniidid



Joonis 8. a. Liigi *Microsporium gypseum* makrokoniidid b. Mikrokoniidid

Mikroskoopia

Makrokoniidid paksuseinalised, silindrilised, paljurakulised (3–6), 25–60 x 8,5–15,0 μm . Mikrokoniidid istuvad või varrekesel, õhukeseseinalised, piklikud või pirnjad (vt joonis 8.).

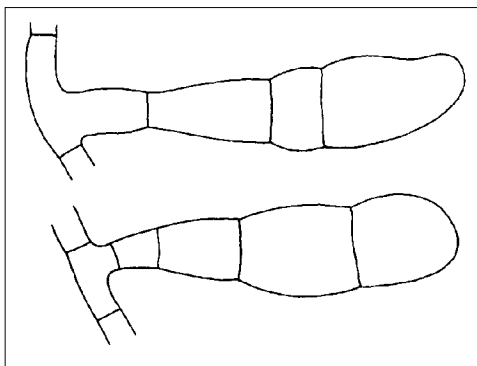
3. *Epidermophyton floccosum*

Koloonia

Koloonia (SGA) sametine, kergelt voldiline, kahvatukollane kuni sinepikollane, pöördel kollakaspruun, keskel tumedam.

Mikroskoopia

Makrokoniidid õhukeseseinalised, 2–5-rakulised, 10–40 x 6–12 μm . Mikrokoniidid puuduvad (vt joonis 9.).



Joonis 9. Liigi *Epidermophyton floccosum* makrokoniidid

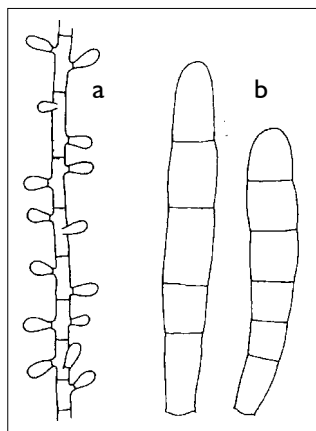
4. *Trichophyton rubrum*

Koloonia

Koloonia (SGA) kohev, valge, mõnikord vananedes roosaka tooniga, pöördel veinipunane kuni oliivjas, harva kollane.

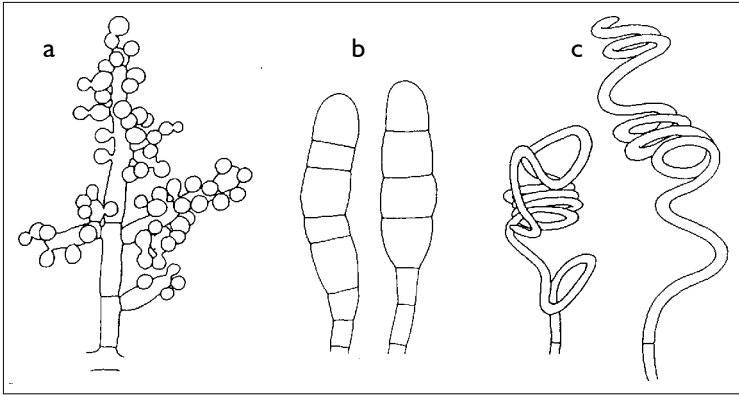
Mikroskoopia

Makrokoniidid enamasti puuduvad, õhukeseseinalised, erineva suurusega, silindrilised või sigarikujulised. Mikrokoniidid kultuuris valdavalt pisara- või tilgakujulised, kitsa alusega, istuvad, 3,0–5,5 x 2,0–3,5 μm (vt joonis 10.).



Joonis 10. a. Liigi *Trichophyton rubrum* mikrokoniidid b. Makrokoniidid

5. *Trichophyton mentagrophytes*



Joonis 11. a. Liigi *Trichophyton mentagrophytes* mikrokoniidid b. Makrokoniidid c. Spiraalhüüfid

Koloonia

Koloonia (SGA) puuderjas või kohev, kreemikas kuni kollakaspruun, pöördel ookerjas kuni punakaspruun, mõnikord tumepruun.

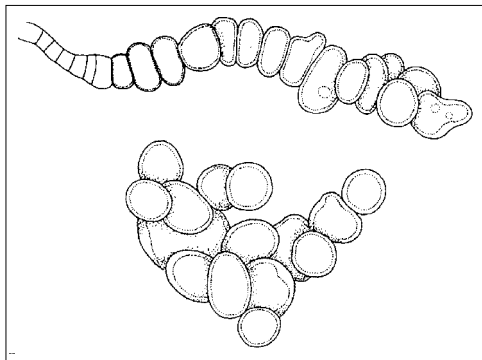
Mikroskoopia

Makrokoniidid 3–8-rakulised, õhukeseseinalised, silindrilised või sigari-kujulised, kultuuris mikrokoniidid valdavalt ümarad, 2 μm diameetriga, paiknevad tihedate kobaratena piki hüüfe. Tihti esineb spiraalhüüfe (vt joonis 11.).

6. *Trichophyton verrucosum*

Koloonia

Koloonia (SGA) kumer, nahkjnas, hiljem kergelt sametine, kreemikas kuni hallikasvalge, pöördel



Joonis 12. Liigi *Trichophyton verrucosum* klamüdosporid

kreemikas või lõheroosa.

Mikroskoopia

Eoseid enamasti ei moodustu, makrokoniidid 4–7-rakulised (tiamiiniga sööde!), sigarikujulised, mikrokoniidid munajad või pirnjad. Värskel isolaadil tavaliselt palju ahelatena paiknevaid klamüdospoore ja laienuvad tipuga hüüfe. Kasv kiirem temperatuuril 37 °C (võrrides 28 °C). Klamüdospoore moodustub arvukalt temperatuuril 37 °C (vt joonis 12.).

7. *Trichophyton violaceum*

Koloonia

Koloonia (SGA) läikiv, nahkjas, kortsulise pinnaga, kollane, aprikoosivärvi või punakaslilla, aeglase kasvuga.

Mikroskoopia

Eoseid enamasti ei moodustu, harva esinevad ovaalsed kuni pirnjad mikrokoniidid. Hüüfid väänduvad, peegelduvalt hargnevad (ingl. *reflexive branching*).

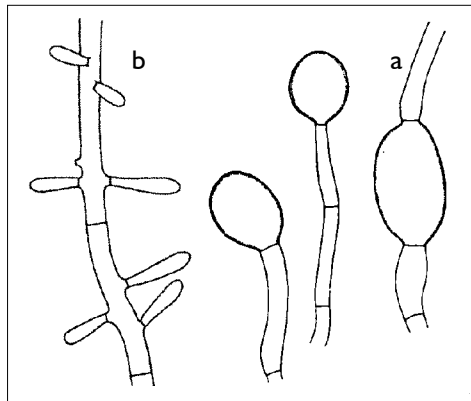
8. *Trichophyton tonsurans*

Koloonia

Koloonia (SGA) varieeruv, enamasti seemisnahka meenutav, voldiline, valkjas kuni hallikas, kollakas kuni roostepruun, pöördel mahagonpunane või pruun või kollane.

Mikroskoopia

Makrokoniidid õhukese-seinalised, 2–6-rakulised, harvaesinevad. Mikrokoniidid noores kultuuris valdavalt piklikud, tõlvjad kuni silindrilised, vanas kultuuris valdavalt ümarad, õhupallikujulised, kitsa alusega (vt joonis 13.).



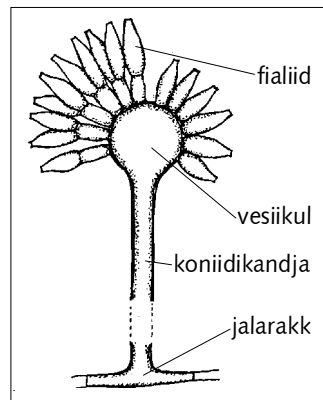
Joonis 13. a. Liigi *Trichophyton tonsurans* klamüdospoorid b. Noored mikrokoniidid

Hallitusseente samastamine

Terminit «hallitusseen» kasutatakse meditsiinilises kirjanduses kõigi seeneniidistikku ehk mütseeli moodustavate seente tähistamiseks. Erinevaid süstemaatilisi klasse (*Zygomycetes* – seigseened, *Ascomycetes* – kottseened, *Basidiomycetes* – kandseened, *Hyphomycetes* – avateisseened) iseloomustavad erinevad mikromorfoloogilised tunnused. Peamiselt samastataksegi hallitusseeni mikromorfoloogiliste ja kultuuritunnuste põhjal.

Valgusmikroskoobi preparaadi valmistamiseks on otstarbekas vaadelda kultuuri esmalt binokulaarmikroskoobis väikesel suurendusel. See võimaldab välja valida parima koha, kust preparaati materjali võtta (viljakehad, koniidikandjad jm). Kui kultuur on vana ja eoseid väga palju, võetakse materjali servaalalt, vajadusel hiljem ka keskkosast. Petri tassi ei avata täiesti, vaid materjali võetakse pooleldi avatud tassist, vältimaks eoste lendumist. Seente valgusmikroskoopiaks võib kasutada 0,9% NaCl lahust, 1-10% KOH lahust või spetsiaalseid mikroskopeerimislahuseid, mille koostised on toodud lisas 10. Seentest, millel on hüdrofoobsed koniidid (nt *Aspergillus*, *Penicillium*) tehakse preparaat piimhappesse või piimhappe-puuvillasises lahusesse ja kuumutatakse preparaati nõrgalt. Seigseentest võib preparaadi teha kraanivette, sest piimhape ja KOH mõjutavad tugevasti nende kuju. Preparaadi võib teha läbipaistvat kleeplinti kasutades nagu kirjeldatud dermatofüütide samastamise peatükis.

Üldse tuntakse u 400 patogeenset seent, hallitusseened on enamasti oportunistlikud patogeenid, nakatades tugeva immuunsupressiooniga patsiente. Oportunistlikke infektsioone põhjustavad sagedamini need vähesed hallitusseeneliigid, mis on võimelised kasvama +37 °C juures ja kõrgemal temperatuuril. Olulisemad patogeenid kuuluvad perekonda *Aspergillus* (*Ascomycetes*), *Fusarium* (*Ascomycetes*), *Scedosporium* (*Hyphomycetes*) ja seigseente (*Zygomycetes*) mõned



Joonis 14. Perekonna *Aspergillus* koniidikandja

perekonnad (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*). Kliinilistel isolaatidel võivad tüüpilised mikromorfoloogilised tunnused olla redutseerunud, mistõttu on tüvesid raske samastada.

Aspergillus

Perekonda *Aspergillus* kuuluvaid liike iseloomustab laienuv tipuga koniidikandja, millele kinnitub 1-2 rida fialiide (vt joonis 14.).

Koniid – mittesugulise paljunemise eos, mis tekib spetsiaalsel koniidikandjal

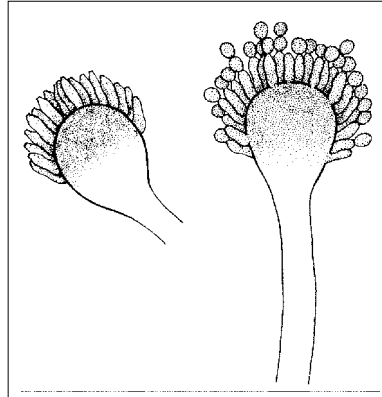
Koniidikandja – lihtne või harunenud seeneniit, mis on spetsialiseerunud koniidide tekkeks

Vesiikul – koniidikandja puhetunud tipuosa

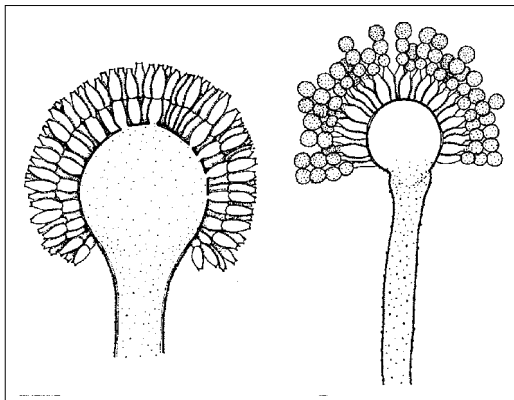
Fialiid – koniide tekitav rakk

Kõige sagedasemaks invasiivseid mükoose tekitavaks hallitusseeneks on *Aspergillus fumigatus* (vt joonis 15.). Tavaliselt saab infektsioon alguse eoste sissehingamisel ülemistest või alumistest hingamisteedest. Perekonna *Aspergillus* liikide samastamiseks kasutatakse puhaskultuuri isoleeritud tüvede mikromorfoloogiliste tunnuste võrdlemist 7 päeva vanuses kultuuris linnaseagaril ja/või *Czapek dox* agaril.

Liigi *A. fumigatus* kolooniad on sinakasrohelist, vanemana suitsuhallid roheka varjundiga (MA, CZ). Vesiikul on lehvikutaoliselt kaetud fialiididega vaid ülemise kolmandiku osas. Iseloomulik on ka fialiidide paiknemine paralleelselt koniidikandja pikiteljega, sageli on osa fialiidne pisut



Joonis 15. Liigi *Aspergillus fumigatus* koniidikandja



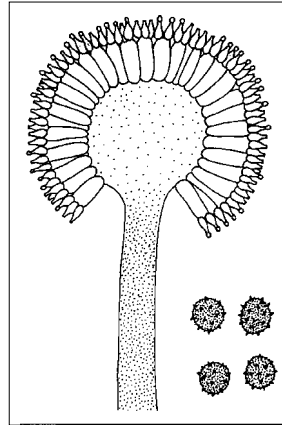
Joonis 16. Liigi *Aspergillus flavus* koniidikandja

käändunud. Eosed on väikesed (2-3 μm). See liik on ühena vähestest hallitusseentest võimeline kasvama väga kõrgel temperatuuril (kuni +52 °C), mistõttu on võimalik samastamiseks kasutada temperatuuritesti +45 °C juures.

Sagedased aspergillooside põhjustajad on ka *A. flavus*, *A. niger* ja *A. terreus*.

Liigi *A. flavus* kolooniad on algul kollakad, hiljem kollakasrohelised. Vesiikul on ümar, kogu pinna ulatuses fialiididega kaetud (vt. joonis 16.). Fialiidid paiknevad 1-2 reana, koniidid on massina rohekad (3,5–4,5 μm). *A. flavus* kasvab hästi temperatuuril + 37 °C.

Liigi *A. niger* kolooniad on noorena kollakad, kuid värvuvad kiiresti mustjaspruuniks. Koniidikandjad moodustavad tiheda mati. Vesiikul on ümar. Fialiidid paiknevad kahe reana ja katavad vesiikult kogu ulatuses (vt joonis 17.). Koniidikandja siledapinnaline. Eosed massina tumepruunid kuni mustad, koniidid ogalised, 3,5–5,0 μm läbimõõdus. *A. niger* kasvab hästi temperatuuril +37 °C.



Joonis 17. Liigi *Aspergillus niger* koniidikandja ja koniidid

Seigseened (Zygomycetes)

Kirjeldatakse seigseentest põhjustatud kopsu, naha ja rinotserebraalseid infektsioone. Seigseentest põhjustatud infektsioone iseloomustab kiire progresseerumine. Seigseened on väga kiire kasvuga, koloonia läbimõõt kasvab ööpäevaga mitu sentimeetrit. Enamik seigseente inimpatogeenidena kirjeldatud liikidest on väliskeskkonnas laialt levinud ja tavalised labori kontaminandid, mistõttu võib olla probleemiks kontaminatsiooni eristamine patogeenist. Mõned patogeensed liigid on võimelised kasvama kõrgel temperatuuril (kuni 45 °C; *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera*).

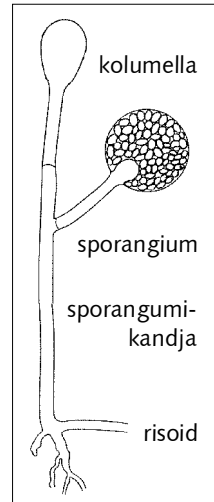
Seigseentele on iseloomulik sporangiumite esinemine, mõned liigid kinnituvad risoidide abil. Perekondade ja liikide eristamisel on oluliseks tunnuseks kolumella esinemine/puudumine ja selle kuju (vt joonis 18.). Mikroskoopiliselt iseloomustab seigseeni ilma vaheseinteta paljutuumaline mütseel. Hüüfid on võrreldes kottseentega (nt *Aspergillus*) palju laiemad ja hargnevad peaaegu täisnurkselt. Kolooniad on algul enamasti valged ja kohevad, hiljem pruunikad või hallikad täites Petri tassi mõne päevaga.

Sporangium – mittesugulise paljunemise struktuur, milles tekivad endogeenselt sporangiospoorid

Sporangiospoorid – sporangiumis tekkivad eosed

Kolumella – sporangiumikandja pikendus sporangiumi sees

Risoid – seeneniit, mis on spetsialiseerunud substraadile kinnitumiseks



Joonis 18. Seigseene (*Zygomycetes*) sporangiumikandja

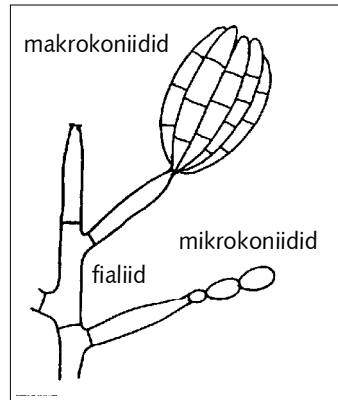
Scedosporium

Liiki *Scedosporium apiospermium* on kirjeldatud kopsuinfektsioonide, aju abstsesside ja keratiidi põhjustajana. *Scedosporium*-infektsioonid alluvad raskesti ravile, seen on amphoteriitsiin-B resistentne. Kolooniad on algul hiirhallid, hiljem tumedamad, pöördel samuti tumehallid kuni mustad. *S. apiospermium* kasvab hästi temperatuuril +37 °C.

Ovaalsed, sirge alusega, pruunid koniidid arenevad lihtsatel või harunenud kandjatel, 3,5–7 x 5–12 µm (vt joonis 19.).

Fusarium

Perekonna *Fusarium* seened on tavalised mullasaprotoofid, kuid neid on kirjeldatud ka keratiidi ja hematogeenselt dissemineerunud süsteemsete infektsioonide põhjustajatena. Kolooniad on enamasti eredavärvilised, valkjaskollastes, roosakates, lillakates toonides, kohevad või kergelt vahased. Koniidikandjad on lihtsad või harunenud, esinevad nii üherakulised mikrokonidid kui mitmerakulised makrokonidid. Makrokonidid on enamasti kõverdunud. Mikro- ja makrokonidid võivad paikneda ahelatena või moodustada kogumikke (vt joonis 20.).



Joonis 20. Perekonna *Fusarium* koniidikandja

Uuring seente esinemise suhtes - proovide transport, käsitlemine ja tulemuste interpretatsioon

Biopsiad

1.Proov

Steriilsetes tingimustes kogutud biopsiamaterjal transporditakse võimalikult kiiresti laborisse keeratava korgiga steriilses katsutis 0,9% NaCl-lahuses.

2.Proovi säilitamine

Proov ei tohi kuivada! Kui proovile ei ole lisatud füsioloogilist lahust, siis tuleb lisada proovi laborisse saabumisel 1-2 ml steriilset 0,9% NaCl-lahust, olenevalt proovimaterjali hulgast. Vajadusel säilitatakse proovi külmikus temperatuuril +4 °C kuni 8 tundi. Proov säilitatakse ka pärast külvamist kuni ööpäev +4 °C külmikus, edasi –20 °C juures.

3.Külv

Koetükki võib bakteriaalse kontaminatsiooni vältimiseks eelnevalt töödelda antibiootikumilahusega, milleks sobib nt gentamütsiin. Koetükk asetatakse steriilsesse Petri tassi, lõigatakse skalpelli ja pintsettide abil võimalikult peeneks (koetükkide läbimõõt 0,5–1 mm). Kui proovitükk on kõhrkoest, homogeniseeritakse see steriilses uhmris vähese füsioloogilise lahusega. Külvatakse steriilse Pasteur'i pipetiga tilkadena (8–12 tilka söötmeplaadile). Soovitav on söötmeplaadi tagaküljele märkida materjali asukohad – see hõlbustab hiljem võimaliku kontaminatsiooni eristamist patogeenist. Sööde: antibiootikumiga SGA. Suuremad koetükid surutakse skalpelli abil osaliselt söötmesse. Inkubeeritakse vähemalt 14 päeva, soovitatavalt 21 päeva, temperatuuril +28–30 °C.

4.Preparaat

Kõigist biopsiamaterjalidest tehakse preparaat Gram'i, Giemsa ja/või *Calcoflour white*'i menetluse järgi. Igast koetükist tehakse kaks preparaati

surudes koetükke korduvalt vastu mikroskoobi alusklaasi või kahe alusklaasi vahel.

5.Samastamine

Kõik biopsiamaterjalidest isoleeritud seened samastatakse liigi tasemel.

6.Ravimtundlikkuse määramine

Kõigil biopsiamaterjalidest isoleeritud pärmseentel määratakse ravimtundlikkus minimaalse inhibeerivat kontsentratsiooni võimaldava meetodiga kokkuleppel analüüsi tellijaga.

7.Interpretatsioon

Kõik biopsiamaterjalist isoleeritud pärmseened loetakse haigustekitajateks. Hallitussente isoleerimisel tuleb arvestada materjali kontaminatsiooni võimalusega ja hinnata konkreetse hallitussene võimet tekitada oportunistlikke infektsioone.

Haavamäda, eritised

1.Proov

Eritisi ja mäda kogutakse süstlaga aspireerides steriilsesse katsutisse.

2.Proovi säilitamine

Proovi säilitatakse +4 °C juures kuni 24 tundi.

3.Külv

Viskoossele mädale lisatakse võrdses koguses füsioloogilist lahust, segatakse ja tsentrifuugitakse režiimil 1500 x g 10 minutit. Abstsessivedelikke tsentrifuugitakse samuti. Külvatakse tilkadena otse süstlast, tsentrifuugitud materjali korral külviaasaga. Sööde: antibiootikumiga SGA. Külve inkubeeritakse temperatuuril +28–30 °C vähemalt 7 päeva, soovitavalt kuni 21 päeva. Külve hinnatakse iga päev.

4.Preparaat

Materjalist valmistatakse preparaat *Calcofluor white*'i keskkonnas või Gram'i värvinguga.

5.Samastamine ja interpretatsioon

Kõik materjaliltgast kasvanud organismid loetakse patogeenseteks ja

samastatakse liigi tasemel.

6. Ravim tundlikkuse määramine

Kõigi haavamädast ja eritistest isoleeritud pärmseente ravim tundlikkus määratakse kokkuleppel tellijaga ravimi minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni meetodil.

Juukseid, küünesid, nahk

1. Proov ja proovi säilitamine

Proovimaterjal kogutakse nahalt nüri skalpelliga kaapeid tehes. Küüntest võetakse proovimaterjal skalpelli, küreti või küünepuuriga. Juukseid kogutakse pintsettidega kitkudes, proovis peab olema juureosa. Proov kogutakse spetsiaalsesse prooviümbrikusse või puhtasse, kuiva klaas- või plastkonteinerisse. Proovi säilitatakse toatemperatuuril. Tuleb vältida proovi niiskumist säilitamise käigus.

2. Külvi

Vajadusel lõigatakse proovimaterjal skalpelliga väiksemaks, sobivad 1–2-mm läbimõõduga tükid. Materjal raputatakse söötmele, surudes suuremad tükid osaliselt söötmesse. Tehakse kaks külvi – antibiootikumilisandiga MEA ning tsükloheksimiidi ja antibiootikumiga SGA. Külvamisel tuleb jälgida, et materjali jätkuks ka preparaadiks. Kui materjali on vähe, tuleb eelistada preparaati. Tasse inkubeeritakse kuni 21 päeva temperatuuril +28–30 °C. Kui kahtlustatakse liigist *Trichophyton verrucosum* põhjustatud infektsiooni, inkubeeritakse üht külvi temperatuuril + 37 °C. Külve hinnatakse kaks korda nädalas. Vajadusel dermatofüüdid isoleeritakse (kontamineerunud esmaskülvi, pärsitud kasv tsükloheksimiidiga agaril vm).

3. Preparaat

Mikroskoobi alusklaasile pannakse tilk mikroskopeerimislahust (10% KOH, 5% KOH+ glütserooli segu, *Calcofluor white*) ja lisatakse proovimaterjal.

4. Samastamine

Kõik dermatofüüdid ja infektsiooni põhjustavad hallitusseened samastatakse liigi tasemel.

5. Interpretatsioon

Kõik isoleeritud dermatofüüdid loetakse haigustekitajateks. Hallitusseente isoleerimise korral tuleb arvestada materjali kontaminatsiooni võimalusega ja hinnata konkreetse hallitusseene võimet tekitada oportunistlikke infektsioone, samuti mikroskoopilist leidu. Hallitusseene infektsiooni diagnoosimiseks on vajalik korduv isoleerimine, v.a *Scopulariopsis brevicaulis*.

Liikvor ja lumbaalpunktaat

1.Proov

Proov võetakse steriilsesse keeratava korgiga katsutisse mahus 3–5 ml, lastel vähem.

2.Proovi transport ja säilitamine

Proovi transporditakse ja säilitatakse temperatuuril +37 °C mitte kauem kui 24 tundi.

3.Külv

Proov tsentrifuugitakse režiimil 1500 x g 10 minutit. Enamik supernatanti eemaldatakse (säilitatakse *Cryptococcus*-antigeeni uuringuteks), sade lahustatakse väikeses koguses supernatandis ning külvatakse steriilse Pasteur'i pipetiga tilkadena kahele söötmeplaadile: üks SGA ja üks PDA plaat. Üht söötmeplaati inkubeeritakse temperatuuril +28–30 °C, teist +37 °C vähemalt 7 päeva, soovitatavalt 21 päeva.

4.Preparaat

Sademest tehakse preparaat Gram'i värvinguga. Kui preparaadis leidub pärmirakke, tehakse täiendav tušipreparaat *Cryptococcus*-rakkude uuringuks.

5.Samastamine

Kõik liikvorist või lumbaalpunktaadist isoleeritud seened samastatakse liigi tasemel.

6.Ravimtundlikkuse määramine

Kõigil liikvorist või lumbaalpunktaadist isoleeritud pärmseentel määratakse ravimtundlikkus minimaalse inhibeerivat kontsentratsiooni võimaldava meetodiga kokkuleppel analüüsi tellijaga.

7. Interpretatsioon

Kõik liikvorist või lumbaalpunktaadist isoleeritud seened loetakse haigustekitajateks.

Limaskestad (suu, nina, tupp) ja emakakael, ureetra, väliskõrv - tampooniga võetud proovid

1. Proovid

Proov võetakse füsioloogilises lahuses niisutatud tampooniga transportsöötmega varustatud katsutisse. Pärast proovivõttu peab tampoon olema söötmesse surutud, et vältida proovi kuivamist. Proovi säilitatakse +4 °C juures kuni 24 h.

2. Külv

Sööde: antibiootikumiga SGA. Tampooni rullitakse söötmeplaadi pinnal või külvatatakse poolkvantitatiivse külvi põhimõttel. Tasse inkubeeritakse temperatuuril +37 °C 7 päeva. Tasse hinnatakse iga päev, enamasti ilmuvad pärmide kolooniad 48 tunni jooksul. Hallitusseened, eriti kõrvast ja haavamaterjalidest, võivad kasvama hakata alles 4-5 päeva möödudes.

3. Preparaat

Limaskestadelt, emakakaelalt, ureetrast võetud materjal värvitakse Gram'i järgi. Väliskõrvast tampooniga võetud materjalist preparaate ei tehta, kuna materjali hulk on väga erinev (enamasti väga vähene), mikroskoopiaks sobib eelistatult spaatliga kogutud materjal.

4. Samastamine

Kõik limaskestadelt, ureetrast või väliskõrvast isoleeritud pärmseened ja võimalikud oportunistlikke infektsioone põhjustavad hallitusseened samastatakse liigi tasemel.

5. Ravim tundlikkuse määramine

Kõigi limaskestadelt, ureetrast või väliskõrvast isoleeritud pärmseentel määratakse ravim tundlikkus disk-difusioon meetodiga või minimaalse inhibeerivat kontsentratsiooni võimaldava meetodiga kokkuleppel tellijaga.

6. Interpretatsioon

Candida- perekonda kuuluvad pärmseened kuuluvad suu ja tupe limaskesta

normaalse mikrofloora koosseisu. Positiivne mikroskoopiline leid, positiivne külv ja kliiniliste sümptomite olemasolu toetavad kandidoosi diagnoosi. Väikese hulga isoleeritud pärmseene ($< 10^3$ *Candida* rakku/ml), mikroskoopilise leiu puudumise ja ebaselge kliiniku korral on näidustatud kordusanalüüs. On patsiente, kellel 10^3 - 10^6 *Candida* rakku/ml esinemine vaginaalsekreedis ei tekita kliinilisi sümptomeid. Hallitusseened ei kuulu inimese normaalsesse mikrofloorasse. Hallitusseente isoleerimisel tuleb arvestada materjali kontaminatsiooni võimalusega ja hinnata konkreetse hallitusseene võimet tekitada oportunistlikke infektsioone, samuti mikroskoopilist leidu.

Roe

1.Proov

Proov kogutakse puhtasse keeratava korgiga plastkonteinerisse. Proovi säilitatakse temperatuuril $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuni 12 tundi.

2.Külv

Vedelas faasis poovimaterjal ei vaja töötlemist. Tahkest proovist võetakse väike tükk (ca 0,3g), mis suspendeeritakse 3 ml 0,9% NaCl-lahuses (segatakse Vortex-segajal). Sööde: antibiootikumiga SGA. Külvatakse poolkvantitatiivse külvi põhimõttel külviaasaga või tilkadena kogu söötmeplaadile. Vajadusel teostatakse kvantitatiivne külv, tehes materjali suspensioonist kümnekordsed lahjendused ja külvates kindla koguse (0,1–0,5 ml). Külvi inkubeeritakse temperatuuril $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuni 7 päeva. Külve hinnatakse iga päev.

3.Preparaat

Preparaate roojast ei tehta.

4.Samastamine

Kõik roojast isoleeritud pärmseened samastatakse liigi tasemel. Kõik isoleeritud hallitusseened loetakse kontaminantideks.

5.Ravimtundlikkuse määramine

Roojast isoleeritud perekond *Candida*-pärmseente ravimtundlikkus määratakse disk-difusioonmeetodil kokkuleppel analüüsi tellijaga.

6. Interpretatsioon

Rooja uuring seentele on näidustatud immuunosupressiooniga patsientidel pärmseente kolonisatsiooni selgitamiseks või pikaajalisest antibakteriaalsest ravist tekkinud probleemide tõttu. Umbes 40% tervest elanikkonnast ja 75% imuunsupresseeritud patsientidest on normaalselt koloniseeritud *Candida*-perekonna pärmseentega. Sama pärmseene liigi korduv isoleerimine ja domineerimine võib viidata ravi vajavale probleemile.

Röga ja bronhiloputusmaterjali

1. Proov

5–10 ml materjali kogutakse steriilsesse keeratava korgiga katsutisse.

2. Proovi säilitamine

Proovi säilitatakse temperatuuril +4 °C kuni 12 tundi. Rohkem kui 12 tundi tagasi võetud materjal uuringuks ei sobi!

3. Külv

Rögaproovi hinnatakse mikroskoopiliselt väikese suurendusega enne külvi tegemist, selleks et vältida väheinformatiivseid külve süljest: kui vaateväljas on vähem kui 10 lameepiteelirakku ja rohkem kui 25 polümorfonukleaarset leukotsüüti või on näha alveolaarseid makrofaage, on tegemist alumistest hingamisteedest pärineva röga. Proovile lisatakse võrdses koguses destilleeritud vett, segatakse Vortex-segajal 1–2 minutit. Seejärel tsentrifuugitakse proov režiimil 2000 x g 15 minutit. Supernatant eemaldatakse ja sade külvatakse poolkvantitatiivselt või kvantitatiivselt (100 või 500 ml). Sööde: antibiootikumiga SGA. Söötmeplaati inkubeeritakse temperatuuril +28–30 °C vähemalt 7 päeva, soovitatavlt kuni 21 päeva. Kui kahtlustatakse aspergilloosi, on soovitatav külvata lisaks teine söötmeplaat, mida inkubeeritakse temperatuuril +45 °C. Külve hinnatakse iga päev.

4. Preparaat

Tsentrifuugitud proovi sademest tehakse preparaat optilise markeri (*Calcofluor white* vm) keskkonnas ja/või Gram'i värvinguga. Vajadusel võib sadet mikroskopeerida ka 10% KOH-lahuses.

5.Samastamine

Kõik rögest või bronhiloputusmaterjalist isoleeritud pärmseened ja potentsiaalselt oportunistlikke infektsioone põhjustavad hallitusseened samastatakse liigi tasemel.

6.Ravimtundlikkuse määramine

Kõigil rögest isoleeritud pärmseentel määratakse ravimtundlikkus kokkuleppel tellijaga disk-difusioon meetodil või kasutades mõnda ravimi minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni meetodit.

7.Interpretatsioon

Candida-infektsiooni diagnoosimisel omab diagnostilist väärtust kvantitatiivne külv. 10^4 - 10^5 pärmirakku/ml viitab võimalikule infektsioonile, vajalik on korduv analüüs ja seroloogilised testid, enam kui 10^6 pärmirakku/ml on märgiks infektsiooni olemasolust. *Candida* võib rögas esineda kontaminandina neelust või suust. Ainult positiivne rögaproov ei ole piisav aspergilloosi diagnoosimiseks, vajalikud on korduvad positiivsed külvid ja/või histoloogiline leid või positiivne antigeeni või antikeha test.

Uriin

1.Proov

Proov kogutakse steriilsesse keeratava korgiga katsutisse.

2.Proovi säilitamine

Proovi säilitatakse +4 °C juures kuni 12 tundi. Rohkem kui 12 tundi tagasi võetud materjal uuringuks ei sobi!

3.Külv

Proov tsentrifuugitakse režiimil 1500 x g 10 minutit. Väikseid koguseid (vähem kui 0,5 ml) ei tsentrifuugita. Supernatant eemaldatakse, sade lahustatakse väheses supernatandis, steriilse Pasteur'i pipetiga külvatakse 1–4 tilka materjali. Sööde: antibiootikumiga SGA. Vajadusel teostatakse kvantitatiivne külv, külvates 100 või 500 ml sadet. Külvi inkubeeritakse temperatuuril +28–30 °C vähemalt 7 päeva, soovitatavalt 21 päeva. Külve hinnatakse iga päev.

4.Preparaat

Proovi tsentrifuugimisel tekkinud sademest valmistatakse preparaat Gram'i

värvinguga.

5.Samastamine

Kõik uriinist vähemalt $>10^2$ pärmirakku/ml isoleeritud pärmid samastatakse liigi tasemel.

6.Ravim tundlikkuse määramine

Kõigi uriinist vähemalt $>10^2$ pärmirakku/ml isoleeritud pärmseentel määratakse ravim tundlikkus kokkuleppel tellijaga disk-difusioon meetodil või kasutades mõnda ravimi minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni meetodit.

7.Interpretatsioon

Keskjoa uriinis loetakse $>10^4$ *Candida* rakku/ml märgiks võimalikust infektsioonist. Põiepunktsioonil kogutud uriinis loetakse oluliseks 10^2 - 10^3 *Candida* rakku/ml. Püskateetri uriini analüüs ei ole näidustatud. Kateeteruriinis võib esineda kuni 10^8 *Candida* rakku/ml ilma patsiendi kliiniliste sümptomiteta. Ka põie- või neerukivide esinemine võib tingida *Candida* rakkude arvukuse ajutise tõusu uriinis, sellistel patsientidel on näidustatud kordusanalüüs.

Veri

1.Proov

Steriilsetes tingimustes veeni punkteerides kogutakse 10 ml verd (lastel 5 ml), mis süstitakse verekülvi pudelisse. Kasutatavast verekultuuri süsteemist (Bactec, Septi-Check, Signal) sõltuvalt tuleb järgida tootjapoolseid instruktsioone. Vere säilitamine ja transport toimub temperatuuril $+37$ °C.

2.Külv

Kasvu ilmnmisel esmases verekultuuris tehakse materjali väljakülv. Sööde: antibiootikumiga SGA. Inkubeeritakse $+28$ - 30 °C vähemalt 7 päeva, soovitatavalt kuni 14 päeva.

3.Preparaat

Kasvu ilmnmisel esmases verekultuuris tehakse materjalist preparaat Gram'i värvinguga.

4.Samastamine ja interpretatsioon

Kõik verest isoleeritud seened loetakse haigustekitajateks ja samastatakse liigi

tasemel. Hallituseente isoleerimine süsteemse seeninfektsiooni korral on üliharv!

5.Ravimtundlikkuse määramine

Kõigil verest isoleeritud pärmseentel määratakse ravimtundlikkus kokkuleppel tellijaga ravimi minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni meetodil.

Antikeha ja antigeeni uuringud invasiivsete seeninfektsioonide diagnostikas

Peamised antigeensed markerid asuvad seente rakuseinas (mannan, galaktomannan, β -1,3-D-glükaan, kitiin). On ka mitmeid võimalusi seene ainevahetuse metaboliitide (enolaas, D-arabinitool) ja seentevastaste antikehade määramiseks. Immunoloogiliste meetodite eeliseks on kiirus — test kestab 2—4 tundi, korduvaks positiivseks testiks, mis annab aluse diagnoosi püstituseks, kulub ideaaljuhul ööpäev. Infektsiooni ägeda kulu korral tuleb arvestada, et antikehade teke võtab aega, samuti ei pruugi immuunosupressiooniga patsientidel määrataval tasemel antikehi tekkida.

***Candida* - antigeenid**

Candida - mannaani määramiseks on olemas nii ELISA kui lateks aglutinatsioonitestid (BIO-RAD Pasteur). ELISA formaadis testid on väga tundlikud - tundlikkus 0,1 ng/ml.

***Candida* - antikehad**

Candida mannaani vastaste antikehade määramiseks on olemas ELISA test (BIO-RAD Pasteur). Tootja soovib *Candida* mannaani ja mannaani vastaseid antikehi määrata kombineeritult. Antikeha ei pruugi olla määratav antigeeni kõrge kontsentratsiooni tõttu. Juhul, kui antigeeni kontsentratsioon vereseerumis jääb allapoole testi tundlikkuspiiri, võib antikehi leiduda määratavas hulgas.

***Aspergillus* - galaktomannan**

Aspergillus-galaktomannani määramiseks on olemas nii lateks aglutinatsiooni kui ELISA testid vereseerumist (BIO-RAD Pasteur). Galaktomannan ilmub määrataval tasemel verre juba enne muude aspergilloosile viitavate sümptomite ilmnemist. ELISA testi tundlikkus on erinevates uuringutes 57-100%, spetsiifilisus 66-100%.

***Cryptococcus* - antigeen**

Cryptococcus - glükuroonoksümannani (kapsli polüsahhariid) määramiseks on

olemas lateks aglutinatsioonitestid (Pastorex, BIO-RAD Pasteur; Calas Crypto LA, Meridian Diagnostics) ja ELISA test (Premier, Meridian Diagnostics). Latekstestide tundlikkus on 92% ja spetsiifilisus 100%. ELISA testi tundlikkus on 100%, spetsiifilisus 98%.

Proovivõtt

Seroloogilisteks testideks võetakse 5—10 ml verd steriilsesse kindalt suletavasse katsutisse, anticoagulante ei ole soovitatav lisada. Analüüsitakse vereseerumit (minimaalselt 1 ml). Vereseerumi transport toimub temperatuuril +4 °C.

Lisa 1. Tušipreparaadi (ingl. *india ink*) valmistamine

Tušipreparaat valmistatakse juhul, kui liikvori mikroskoopial (Gram'i värving, *Calcofluor white* vm) on leitud pärmirakke. Tušipreparaat võimaldab näha krüptokokoosi tekitaja *Cryptococcus neoformans* iseloomulikke polüsahhariidset kapslit.

1. Liikvor tseentrifuugitakse 1500 x g 10 minutit (3000 pööret/minutis). Supernatant eemaldatakse ja säilitatakse *Cryptococcus*-antigeeni uuringuks.
2. 1-2 tilka sadet tilgutatakse mikroskoobi alusklaasile.
3. Lisatakse võrdses koguses (1-2 tilka) musta tušši ja segatakse.
4. Preparaat kaetakse kattedklaasiga ja vaadatakse 20- või 40-kordse objektiiviga valgusmikroskoobi heleväljas nõrga valgustugevusega. *Cryptococcus*-infektsiooni korral on preparaadis tumedal taustal näha suured, 5–20 μm läbimõõduga pärmirakud, mida ümbritseb iseloomulik heledam limakapsel.

Lisa 2. Seerumtest (ingl. *germ tube test*) liigi *Candida albicans* samastamiseks

Seerumtest teostatakse liigi *Candida albicans* samastamiseks. Testiks kasutatakse hobuse, inimese või vasika vereseerumit. Liigil *Candida albicans* areneb keskmiselt 2,5 tunni jooksul iseloomulik laia alusega idumõik (idutoru, ingl. *germ tube*), mis on hästi jälgitav tavalises valgusmikroskoobis 20–40-kordse objektiivi kasutamisel.

Töö käik:

1. Katsutisse pipeteeritakse 500 ml vereseerumit. Vereseerumit võib säilitada temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Vähemalt 24 tunni vanusest pärmikultuurist võetakse 1–3 pärmikolooniat ja suspendeeritakse seerumis. Rakkude kontsentratsioon suspensioonis peab olema vahemikus 10^4 – 10^5 /ml.
3. Suspensiooni segatakse hoolikalt Vortex-segajal.
4. Suspensioon asetatakse 1,5–3 (keskmiselt 2,5) tunniks termostaati temperatuuriga $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mitte hoida üle 3 tunni!
5. Pärast inkubeerimist kantakse 1-2 tilka suspensiooni mikroskoobi alusklaasile, kaetakse kattedklaasiga ja vaadatakse valgusmikroskoobis väikesel suurendusel.
6. Samastamine: kui seerumi mikroskoopial on enamikul vaateväljas olevatel rakkudel näha laia alusega idumõik, siis on tegemist liigiga *C. albicans*.

Võimalikud vead

1. Seerumi inkubeerimisel temperatuuril $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ üle kolme tunni võib idumõik areneda ka mõnedel teistel *Candida*-liikidel.
 2. 3-tunnise inkubeerimisaja juures võib idumõik areneda ka *Candida tropicalis* tüvedel, oluline on vaadata idumõigu kuju. *Candida albicans* tüvedel on idumõik alati laia alusega. *C. tropicalis* tüvedel on see alati alusel ahenenud ja sisse nõõrdunud, meenutades pungrakku (vt joonis 5).
- Seerumi kvaliteedikontroll: *Candida albicans* tüvega ATCC 90028 – positiivne, areneb iseloomuliku kujuga idumõik.
Candida glabrata tüvega ATCC 90030 – negatiivne, idumõiku ei teki.

Lisa 3. Pärmseente morfoloogiatest

Morfoloogiatest teostatakse pärmseente lõplikuks samastamiseks koos suhkruete assimilatsioonitestiga või vajadusel täiendava testina. Test võimaldab kirjeldada iseloomulikke morfoloogiaelemente (hüüfid, pseudohüüfid, klamüdosporid, artrokoniidid).

Töö käik

1. Testiks kasutatakse 5 cm diameetriga Petri tasse, millesse on eelnevalt valatud õhukese kihina (ca 2 mm) maisiagar (Tween-80 lisandiga) või kartuli glükoos agar.
2. Tardunud agarile külvatakse mõne triibuna testitav, vähemalt 24 h vanune pärmikultuur ja kaetakse see leegis steriliseeritud mikroskoobi katteklaasiga.
3. Testtasse inkubeeritakse temperatuuril 25 °C 48 tundi. Tekkinud mikroaerofiilsetes tingimustes areneb pärmseenele iseloomulik pseudomütseel või mütseel.
4. Petri tassis olevat pärmikultuuri vaadeldakse väikestel suurendustel valgusmikroskoobi heleväljas.

Positiivne kontroll

Candida albicans ATCC 90028 – iseloomulik morfoloogia, pseudohüüfide tipus arenevad paksukestalisel klamüdosporid.

Lisa 4. Pärmseente samastamine suhkrute assimilatsioonitestiga

Suhkrute assimilatsioonitesti (kombinatsioonis morfoloogiatestiga) kasutatakse kõigi kliinilisest materjalist isoleeritud pärmseente samastamiseks, mida ei ole võimalik samastada seerumtestiga ega selektiivsel söötmel *ChromMagar Candida*. Samuti kõigi normaalselt steriilsetest materjalidest (veri, liikvor, koetükid jms.) isoleeritud pärmseente samastamiseks.

1. Valmista testitavast pärmseene tüvest 0,5 ml suspensiooni 0,9% NaCl-lahuses tihedusega, mis vastab Mc'Farlandi skaalal väärtusele 2,0.
2. Sulata 10 ml lämmastikkomponendiga söödet (*Nitrogen yeast base*). Jahuta sööde temperatuurini +45 °C. Lisa jahutatud söötmele 0,5 ml suspensiooni, sega hoolikalt ning vala steriilsesse 9 mm Petri tassi. Lase söötmel tarduda.
3. Valmista ette testitavate suhkrutega impregneeritud paberzettad. Testiks valitakse 6–16 suhkrut. Põhiritta kuuluvad glükoos, maltoos, sahharoos, laktoos, trehhaloos, tsellobioos ja rafinoos. Aseta 5 mm paberzettad alusele ning pipeteeri kettale 1-2 tilka küllastatud testsuhkru lahust. Kuivata paberzettad termostaadis temperatuuril +37 °C.
4. Aseta söötmeplaadile küllastatud suhkrulahuses immutatud 5 mm paberzettad, nii et kasvu ketta ümber saaks selgelt eristada.
5. Inkubeeri söötmeplaate temperatuuril +27–30 °C vähemalt 48 tundi.
6. Kasv testsuhkruga paberketta ümber on märgiks selle suhkru assimilatsioonist. Kui testitav pärmitüvi ei ole võimeline testsuhkrut kasutama, kasvu ei ilmne.
7. Erinevate suhkrute assimilatsiooni hindamisel saadakse auksanogramm, mida võrreldakse liigiomase auksanogrammiga käsiraamatutes:
Barnett & Payne Yarrow 1990. *Yeasts; Characteristics and identification*. Cambridge University Press.
Kreger-van Rij NJW 1984. *The Yeasts: A taxonomic study*. 3rd edition, Elsevier, Amsterdam.

Lisa 5. Pärmseente samastamine API ID32C (BioMerieux) testiga

Pakett API ID 32C on pärmseente samastamiseks mõeldud väikesemõduline assimilatsioonitest, mida saab kasutada koos spetsiaalselt kohandatud andmebaasiga. Testpaneelil on 32 süvendit, mis sisaldavad kuivatatud suhkruid. Testitavast tüvest spetsiaalses kasvulahuses (C-sööde) valmistatud suspensiooniga inokuleeritud paneeli inkubeeritakse 24–48 tundi. Paneel võimaldab 60 pärmseene liigi samastamist.

Pakett API ID 32C (BioMerieux) sisaldab:

- testpaneeli ID 32 C
- kaant testpaneelile
- katsutit C söötmega (*C medium*)
- tabeleid tulemuste hindamiseks

Töö käik

1. 24–48 h vanusest identifitseeritava pärmseene puhaskultuurist tehakse suspensioon steriilses vees tihedusega, mis vastab McFarlandi skaalal väärtusele 2,0, kasutades võrdluseks standardit.
2. Avatakse paketti kuuluv C-söötmega ampull, murdes ära ampulli korgiosa. 250 ml suspensiooni pipeteeritakse C-söötmega katsutisse ja segatakse hoolikalt.
3. Avatakse testpaneeli pakend ja markeeritakse testpaneel (analüüsi number, kuupäev). Igasse testpaneeli süvendisse pipeteeritakse 135 ml pärmisuspensiooni C-söötmes.
4. Testpaneel kaetakse kaanega ja inkubeeritakse nn niiske kambri tingimustes temperatuuril +28–30 °C 24–48 tundi.
5. Pärast 24 h ja 48 h inkubeerimist hinnatakse testpaneelil pärimtüve kasvu erinevate suhkrute olemasolul testpaneeli süvendites, asetades testpaneeli tumedale taustale, mis hõlbustab hindamist. Kui süvendis on näha kasv, st süvendi sisaldis ei ole enam läbipaistev, loetakse test positiivseks. Kui süvendis kasv puudub, st süvendi sisu on jäänud selgeks, loetakse test negatiivseks. Tulemused kantakse paketti kuuluvale tulemuste hindamise lehele vastavalt

testitud suhkrute järjekorrale.

6. Kui testpaneel on hinnatud, arvutatakse liigiomane numbriline kood, mis on vajalik pärmseene liigi määramiseks kasutades arvutiprogrammi API (BioMerieux). Suhkrud on tulemuste hindamise lehel rühmitatud kolme kaupa, kolmiku esimeses positsioonis olev positiivne test annab 1, teises positsioonis olev positiivne test 2 ja kolmandas positsioonis olev positiivne test 4 punkti. Liites kokku kõigi kolme positsiooni punktid saadakse numbriline kood. Liigiomane numbriline kood sisestatakse arvutiprogrammi API ja hinnatakse kriitiliselt arvuti pakutud tulemust (sobivus morfoloogiatestiga!).

Lisa 6. Pärmseente nitraadi assimilatsioonitest

Nitraadi assimilatsioonitesti kasutatakse täiendava testina (lisaks suhkrute assimilatsioonitestile ja morfoloogiatestile) kliinilisest materjalist isoleeritud pärmseente samastamiseks. Test teostatakse sarnaselt suhkrute assimilatsioonitestile, kuid söötmena kasutatakse *yeast carbon base*'i, mis ei sisalda lämmastikkomponente. Testis kasutatakse kaht 5 mm läbimõõduga paberketast, millest üks on impregneeritud KNO_3 ja teine peptoniga (positiivne kontroll). Kasv paberketta ümber näitab nitraadi kasutamist ja test loetakse positiivseks.

Lisa 7. Urea hüdrolüüsi test

Mõnedel seeneliikidel (*Trichophyton mentagrophytes*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon sp.*) esineb ureat lagundav ensüüm ureaas. Ureaasi olemasolu kontrollitakse urea-agaril ja testi kasutatakse nende seeneliikide samastamiseks. Urea-agarile lisatud fenoolpunane muutub kollasest punaseks keskkonna aluseliseks muutumisel, kui ureaasi toimel urea laguneb ja eraldub ammoniaak: $\text{NH}_2\text{CONH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3 + 2\text{NH}_3$
Punase värvi ilmumine näitab ureaalset aktiivsust!

1 liitri söötme jaoks:

1,0 g mükoloogilist peptooni
5,0 g NaCl
1,8 g KH_2PO_4
5,0 g glükoosi
20 g agarit
1000 ml destilleeritud vett
6 ml fenoolpunase lahust
100 ml urea lahust

Fenoolpunase lahuse valmistamine:

0,2 g fenoolpunast
50 ml 99% etanooli
50 ml destilleeritud vett
Sega ained hoolikalt, lahuse pH=6,5

Urea lahuse valmistamine:

20 g ureat (40%)
100 ml destilleeritud vett

Lahusta urea hoolikalt destilleeritud vees.

Urea lahus ja fenoolpunase lahus lisatakse söötmele pärast autoklaavimist!

Lahusta teised söötme komponendid 1 l destilleeritud vees. Lahuse pH = 6,2–6,5 (temperatuuril +25 °C). Autoklaavi söödett 15 minutit temperatuuril +121 °C. Kui sööde on jahtunud umbes temperatuurini +50 °C, lisa urea ja fenoolpunase lahused. Vala sööde kaldasendis katseklaasisse, 3 ml igasse

katseklaasi. Sööde peab olema ühtlase tumekollase värvusega. Valmis söötmega katseklaase peab säilitama pimedas. Valguse toimet uurea laguneb ja sööde muutub 7–14 päevaga kõlbmatuks.

Söötmed inokuleeritakse testitava seenega ja inkubeeritakse pimedas temperatuuril +26 °C 7 päeva. Testi hinnatakse 7. päeval, kollase värvi muutumine punaseks näitab ureaasi olemasolu.

Negatiivne kontroll: *Trichophyton rubrum*

Positiivne kontroll: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton interdigitale*

Lisa 8. Juuste perforatsioonitest

Testi kasutatakse liigi *Trichophyton rubrum* eristamiseks liikidest *T. interdigitale* ja *T. mentagrophytes*.

Umbes 1 cm pikkusteks tükkideks lõigatud inimese juuksed steriliseeritakse. Steriliseeritud juuksed asetatakse Petri tassi või katsutisse destilleeritud vette, millele on lisatud 1-2 tilka 10% pärmiekstrakti. Juustele külvatakse testitav seenetüvi ja inkubeeritakse toatemperatuuril kuni 4 nädalat. Külvi hinnatakse iga nädal mikroskoopiliselt. Test on positiivne, kui seen perforaab juukseid, st risti läbi juuksekarva tekib koonusekujuline süvend.

Trichophyton rubrum – ei perforaeri juukseid

T. mentagrophytes – perforaerib juukseid

T. interdigitale – perforaerib juukseid

Lisa 9. Kasvukiiruse test riisiteradel liikide *M. canis* ja *M. audonii* eristamiseks

Valmistuskäik:

poleeritud riisiterad – 8 g

destileeritud vesi – 25 ml

Riis ja vesi pannakse Erlenmayer'i kolbi või keeduklaasi ning autoklaavitakse 15 min +121 °C juures. Riis inokuleeritakse samastatava seeneliigi väikeste mütseelifragmentidega. Kasvu (koloonia läbimõõtu) hinnatakse 7 päeva möödudes; *M. canis* kasvab poleeritud riisil kiiresti, *M. audonii* väga aeglaselt.

Lisa 10. Mikroskopeerimislahused

10.1. Laktofenool - puuvillasinine

Koostis:

85% piimhape (ingl. *lactic acid*) – 20 ml

konsentreeritud fenool – 20 ml

glütserool – 40 ml

destilleeritud vesi – 20 ml

puuvillasinine (ingl. *cotton blue* ehk *anilin blue*) – 0,05 mg

Fenool lahustatakse piimhappes, lisatakse glütserool ja vesi. Lõpuks lisada mõned kristallid puuvillasinist.

10.2. Amman'i lahus

Koostis:

piimhape (ingl. *lactic acid*) – 10 ml

glütserool (85 %) – 20 ml

destilleeritud vesi – 10 ml

10.3. KOH + glütserool lahus

Koostis:

kristalliline KOH – 5,0 g

glütserool (85%) – 25,0 g

destilleeritud vesi – 20,0 g

KOH lahustatakse vees, seejärel lisatakse glütserool.

10.4. Optilise markeri *Calcofluor white*'i kasutamine proovimaterjali uuringul seente esinemise suhtes

Tootja (Becton Dickinson - Difco, USA) turustab reagenti *Calcofluor white* 0,5 ml ampullidena, mis sisaldavad 0,05% reagenti lahust.

Calcofluor white'i keskkonnas võib uurida erinevat proovimaterjali seene esinemise suhtes, nagu naha- ja küünte materjal, juuksed, abstsessimaterjal, veri, bronhiloputusvedelik, biopsiamaterjalid, liikvor. Samuti proove, mis sisaldavad väga vähe materjali – näiteks silma sarvkestalt võetud proovid.

UV-valguses lainepikkuse vahemikus 300–400 nm *Calcofluor white*'i keskkonnas olev seenematerjal fluorestseerub intensiivselt kollakasroheliselt.

See on seotud *Calcofluor white*'i reagensis sisalduvate optiliste markeritega, mis seonduvad mittespetsiifiliselt seene rakuseinas leiduvate polüsahhariididega (kitiin, tselluloos, b-glükaan).

Calcofluor white'i ampulle võib säilitada toatemperatuuril pimedas kuni 1 aasta, kuid juba avatud ampulle hoitakse külmikus temperatuuril +4 °C. Tootja soovib avatud ampulli kasutada sama päeva jooksul! Ampulli avamiseks tuleb pintsettide vahel katki suruda plastikust tuubis sisalduv klaasampull.

Reagendi kvaliteedikontrol

teostatakse *Candida albicans* tüvega ATCC 140053 –positiivne või *E. coli* tüvega ATCC 25922 – negatiivne.

Preparaadi valmistamine

1. Uuritav materjal kantakse alusklaasile.
2. Uuritavale materjalile lisatakse 1-2 tilka 10% KOH-d. Biopsiamaterjale hoitakse KOH-lahuses vähemalt 5 min (kui materjal on läbipaistmatu, siis kauem – kuni 20 minutit) ja lisatakse 1-2 tilka *Calcoufluor white*'i lahust.
3. Preparaat kaetakse kattedklaasiga ja varjatakse valguse eest. Enne vaatamist lastakse seista u 15 minutit. Preparaati võib säilitatakse järgmise päevani külmikus niiskele filterpaberile asetatult temperatuuril +4 °C.
4. *C. alcoufluor white*'i keskkonnas preparaati vaadatakse 40-kordse objektiiviga fluorestsentsmikroskoobis.

Võimalikud vead ja probleemid

1. Puuvillakiud võivad preparaadis anda seenehüüfidele sarnase tugevusega fluorestsentsi, kuid neil puudub hüüfidele iseloomulik morfoloogia (näiteks vaheseinad).
2. Liikvori *Cryptococcus neoformans versus Candida* infektsiooni kahtluse korral tuleb teha tušipreparaat – liigile *Cryptococcus neoformans* iseloomulik limakapsel ei ole *Calcofluor white*'i keskkonnas nähtav!
3. Bakterid võivad fluorestseeruda, kuid alati vähem kui seened.
4. Võimaliku segava taustfluorestsentsi ilmnemisel võib preparaadile lisada mõne tilga 10% KOH-d ja lasta sellel enne preparaadi vaatamist kuni 5 min mõjuda.

Lisa 11. Pärmseente samastamine selektiivsel söötmel CHROMagar *Candida*

CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson, USA) võimaldab iseloomuliku värvi abil *Candida* perekonda kuuluvate pärmseente *C. albicans*, *C. tropicalis* ja *C. glabrata*, *C. krusei* esmast samastamist. Selektiivne sööde CHROMagar *Candida* ei sobi liikide lõplikuks samastamiseks, sest rida teisi liike võivad anda sarnaseid värvusreaktsioone. Liigi lõplikuks samastamiseks teostatakse assimilatsioonitest ja/või morfoloogiatest. CHROMagar *Candida* hõlbustab segaflora puhul liikide isoleerimist puhaskultuuri.

Töö käik

1. Vähemalt 24 h vanusest pärmikultuurist (SGA) tehakse külv CHROMagar *Candida* agarile. Kui kolooniate morfoloogia on erinev, tuleb kindlasti isoleerida kõik erinevat tüüpi kolooniad.
2. CHROMagar *Candida* plaati inkubeeritakse temperatuuril +37 °C 24 tundi. Kui pärmikolooniate värv ei ole selgelt väljendunud, inkubeeritakse söötmeplaati jätkuvalt 48 tunnini.
3. Liigi esmane samastamine: *Candida albicans* – ererohelised kõrged kolooniad; *C. tropicalis* – tumedad lillakassinised kuni sinakashallid madalad kolooniad, koloonia servaalalt hajub värv söötmesse; *C. krusei* – valkjad kuni kahvaturoosad, mõnikord eredama roosa, ebatasase servaga kolooniad, 48 tunni möödudes värv süveneb, koloonia pind ebatasane, ebemeline; *C. glabrata* – violetsed kuni purpurpunased kolooniad, konkreetse servaga, 48 tunni möödudes värv ei muutu, koloonia pind sile, läikiv.
4. Kõik normaalsed sterilistest materjalidest (veri, punktaadid jms) pärinevad pärmseened ja potentsiaalsed süvainfektsioonide tekitajad samastatakse lõplikult assimilatsioonitesti ja morfoloogiatestiga. Muudel juhtudel võib pärmseene lõplikult samastada kasutades söödet CHROMagar *Candida*.

Võimalikud vead:

1. CHROMagar *Candida* ei võimalda liiki 100% kindlusega samastada. Rida teisi *Candida* liike (*C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*) võivad anda *C. glabrata* ja *C. krusei* tüvedele sarnase värvusreaktsiooni.

2. Kui identifitseerimise aluseks ei ole puhaskultuur, võib bakteriaalne kontaminatsioon või mitme *Candida* liigi koosinemine takistada iseloomuliku värvi ilmumist!

Positiivne kvaliteedikontroll :

Kontrolltüvi

Candida albicans ATCC 90028

Candida tropicalis ATCC 750

Candida krusei ATCC 6258

Candida glabrata ATCC 90030

Iseloomulik värv

Ereroheline

tumelilla, iseloomuliku ebaselge piirdega

roosa, ebatasase pinna ja servaalaga

purpurpunane kuni lilla, «terava servaga»

Lisa 12. Sagedasemad inimpatogeensed seened ja nende poolt põhjustatud infektsioonid

SÜSTEEMAATILINE RÜHM (PEREKOND, KLASS)	PATOGEENSED LIIGID	ASEND SÜSTEEMIS/ERISTAMISTUNNUSED	INFEKTSIOONID
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> jt.	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluvad hallitusseened; iseloomulikud kultuuritunnused (koniidikandjad, kleistoteetsiumid).	Invasiivsed pulmonaarsed infektsioonid, bronhopulmonaarne allergia, otomükoos, keratinomükoos, dissemineerunud aspergilloos.
<i>Blastomyces</i>	<i>B. dermatitidis</i>	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluvad hallitusseened; dimorfised, infekteerunud kudedes moodustuvad pungarakud (37 °C), kultuuris mütsel (24 °C) ja pungarakud (37 °C); iseloomulikud kultuuritunnused.	Primaarne pulmonaarne infektsioon, dissemineerunud infektsiooni korral võivad tekkida kolded nahal.
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitanae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluvad pärmseened; koosiselt pungarakud ja pseudohüüfid, kultuuris mõnedel liikidel ka hüüfid ja klamüdosporiid. Liikide eristamine toimub füsioloogiliste/biokeemiliste tunnuste alusel.	Limaskestade ja naha kandidoos, immuunpuudulikkusega patsientidel dissemineerunud või süvakandidoos.
<i>Coccidioides</i>	<i>C. immitis</i>	Avateiseente (Hyphomycetes) klassi kuuluvad hallitusseened; kudedes moodustuvad endosporiid, väliskekkonnas ja kultuuris (24 °C) kasvavad artrokonide moodustavate hallitustena.	Koktsidiomükoos — primaarne pulmonaarne infektsioon, dissemineerunud haigusvormi korral naha, luude ja kesknärvisüsteemi infektsioonid.
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. neoformans</i>	Kandseente (Basidiomycetes) klassi kuuluvad pärmseen; iseloomulikkus tunnuseks on pärmirakku ümbritsev limakapsel, mis on nähtav algmaterjalis; hüüfid ja pseudohüüfid puuduvad.	Krüptokokkoos — primaarne pulmonaarne infektsioon, dissemineerunud haigusvorm väljendub enamasti meningiidi ja/või naha infektsioonina.

<i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluv hallitusseen (dermatofüüt); iseloomulikud kultuuritunnused (makro- ja mikrooniidid).	Naha seenhaigused – <i>tinea corporis</i> , <i>tinea cruris</i> , <i>tinea pedis</i> , <i>tinea manuum</i> .
<i>Histoplasma</i>	<i>H. capsulatum</i>	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluv hallitusseen; dimorfne, infitseerunud kudedes moodustuvad pungarakud (37 °C), väliskeskkonnas ja kultuuris (24 °C) hüüfid; iseloomulikud kultuuritunnused.	Histoplasmoos – primaarne pulmonaarne infektsioon, dissimineerunud haigusvorm võib areneda süvamükooosiks.
<i>Malassezia</i> (= <i>Pityrosporum</i>)	<i>M. furfur</i>	Kandseente (Basidiomycetes) klassi kuuluv pärmsseen; dimorfne, infektsiooni iseloomustavad ümarad pärmirakud ja lühikesed harunenud hüüfid, kultuuris pungarakud.	Epidermaalsed nahainfektsioonid.
<i>Microsporum</i>	<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>M. equinum</i> , <i>M. ferrugineum</i> , <i>M. audonii</i>	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluvad hallitusseened (dermatofüüdid); liikide eristamine toimub iseloomulike kultuuritunnuste (makro- ja mikrooniidid) alusel.	Naha seenhaigused – <i>tinea capitis</i> , <i>tinea corporis</i> , <i>tinea manuum</i> .
<i>Pneumocystis</i>	<i>P. carinii</i>	DNA analüüsi põhjal (rRNA, mitokondriaalne DNA) kuulub kottseente (Ascomycetes) klassi; kultuuri isoleerimine pole õnnestunud.	Pneumoonia, peamiselt immuunpuudulikkusega patsientidel.
<i>Scedosporium</i> (= <i>Pseudallescheria</i>)	<i>S. apiospermum</i>	Avateiseente (Hyphomycetes) klassi kuuluv hallitusseen; iseloomulikud kultuuritunnused.	Pärsnaha infektsioonid, posttraumaatilised infektsioonid.
<i>Scopulariopsis</i>	<i>S. brevicaulis</i>	Avateiseente (Hyphomycetes) klassi kuuluv hallitusseen; iseloomulikud kultuuritunnused.	Naha ja küüntele primaarsed ja sekundaarsed infektsioonid.
<i>Scytalidium</i>	<i>S. hyalinum</i> , <i>S. dimidiatum</i>	Avateiseente (Hyphomycetes) klassi kuuluvad hallitusseened; iseloomulikud kultuuritunnused.	Naha ja küüntele infektsioonid.

Lisa 12. Sagedasemad inimpatogeensed seened ja nende poolt põhjustatud infektsioonid (järg)

SÜSTEEMAATILINE RÜHM (PEREKOND, KLASS)	PATOGEENSES LIIGID	ASEND SÜSTEEMIS/ERISTAMISTUNNUSED	INFEKTSIOONID
<i>Sporothrix</i>	<i>S. schenckii</i>	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluv hallitusseen; dimorfne, koesiselt ja kultuuris (37 °C) moodustuvad pungarakud; kultuuris (25 °C) areneb mütseel ja koniidikandjad; eristamine iseloomulike kultuuritunnuste alusel.	Sporotrihoos — lümfokuitaanne infektsioon, posttraumaatilised infektsioonid, pulmonaarne infektsioon.
<i>Trichophyton</i>	<i>T. rubrum</i> , <i>T. violaceum</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. schoenleinii</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. soudanense</i> , <i>T. verrucosum</i>	Kottseente (Ascomycetes) klassi kuuluvad hallitusseened (dermatofüüdid); liikide eristamine iseloomulike kultuuritunnuste (makro- ja mikrooniidid) alusel.	Naha ja küünte seenhaigused — <i>tinea capitis</i> , <i>tinea corporis</i> , <i>tinea cruris</i> , <i>tinea pedis</i> , <i>tinea manuum</i> , <i>tinea unguium</i> .
<i>Trichosporon</i>	<i>T. beigellii</i>	Kandseente (Basidiomycetes) klassi kuuluvad pärmseened; iseloomulikud kultuuritunnused (pungarakud ja artrokoniiidid).	Juuste, küünte ja naha infektsioonid, immuunosupressiooniga patsientidel dissemineerunud infektsioonid.
<i>Zygomycetes</i>	<i>Mucor ssp.</i> , <i>Rhizopus ssp.</i> , <i>Absidia ssp.</i>	Seigseente (Zygomycetes) klassi kuuluvad hallitusseened; iseloomulikud kultuuritunnused.	Invasiivsed pulmonaarsed või siinuste infektsioonid, immuunpuudulikkuse foonil dissemineerunud süvamükooosid.

Edebo, H. et al. 1998. Referentsmetodik för laboratoriediagnostik vid klinisk mikrobiologiska laboratorier.I. Infektionsdiagnostik. I 10. Svampinfektioner. Smittskyddsinstitutet, SMI-tryck nr. 121-1998.

Evans, E.G.V. & Richardson, M.D. 1989. Medical mycology - a practical approach. IRL Press at Oxford University Press. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 1997. NCCLS M27-A, Vol. 17 No. 9.

Hoog, G.S. et al. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands/Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

Odds, F. Bernaerts, R. 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. JCM Vol. 32 (8): 1923-1929.

Wegmann, T. 1987. Medical mycology - a practical guide. Editiones Roche, Basel, Switzerland.

Wimmer, M.L. et al. 1995. Evaluation of CHROMagar *Candida* in a private clinical microbiology laboratory using commercially prepared plates. Poster No. 1676 presented at the 7th European Congress of Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, March 26th-30th, 1995.