

การตรวจวินิจฉัยขั้นต้นโรคติดเชื้อราแบบลุกลามในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง

Early diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patient

บดินทร์ บุตรอินทร์*
Bordin Butr-Indr*

แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Division of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University

* ผู้รับผิดชอบบทความ
* Corresponding author

บทนำ

ผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่ำ ทำให้มีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายจาก แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา ผู้ป่วยในกลุ่มนี้ได้แก่เด็กทารก ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด ผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือด และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี เป็นต้น จากการศึกษาในผู้ป่วยเด็กที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ พบว่ามีความเสี่ยงในการติดเชื้อจุลชีพในระบบทางเดินหายใจสูงในผู้ใหญ่ที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia), ผู้ป่วยเอดส์ (AIDS) และผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะมีโอกาสติดเชื้อในช่วงสองระยะการรักษาร่วมกันด้วย ระยะที่หนึ่งเรียกว่า immediate phase คือช่วงหนึ่งเดือนแรกของการปลูกถ่ายอวัยวะมีโอกาสติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม nosocomial bacterial pneumonia มากที่สุด ระยะที่สองช่วงเดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 6 หลังการปลูกถ่ายอวัยวะจะพบ การติดเชื้อทางเดินหายใจโดยติดเชื้อไวรัส เชื้อ Mycobacteria และเชื้อรา¹

โรคติดเชื้อราแบบลุกลาม (invasive fungal infection) เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต ของผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ² จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการติดเชื้อราในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งในอวัยวะต่างๆ มีโอกาสในการติดเชื้อรา 20-30%, 10-15 % และ 5% ตามลำดับ² ในผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะพบการติดเชื้อราสูงเช่นเดียวกัน โดยในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายตับ, หัวใจ, ไชกระดูก และไต พบการติดเชื้อราแทรกซ้อน 28-42%, 10-35%, 2-30% และ 0-20% ตามลำดับ³ พบว่ามีการตรวจพบการติดเชื้อรา ในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ

เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เชื้อราที่พบเป็นสาเหตุหลักได้แก่ *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* และ *Cryptococcus neoformans*⁴ จากการศึกษาการติดเชื้อราในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะตั้งแต่ปี ค.ศ. 2004-2007 พบว่า มีผู้ป่วยติดเชื้อ *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *C. neoformans* และเชื้อราชนิดอื่นๆ มีความถี่ 59, 24.8, 7 และ 5.8 % ตามลำดับ⁵

Candida spp.

การติดเชื้อ *Candida spp.* ในกระแสเลือดเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยมีอัตราการติดเชื้อสูงเพิ่มขึ้นในสหรัฐอเมริกา และยุโรป⁶ *Candida spp.* เป็นเชื้อประจำถิ่นที่บริเวณผิวหนัง ระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์⁷ การติดเชื้อในกระแสเลือดมักพบในผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) มีการใส่สายสวนทางการแพทย์ และสายน้ำเกลือเป็นระยะเวลานาน^{8,9} ลักษณะของเชื้อ *Candida spp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อทำการเก็บจากสิ่งส่งตรวจ และทดสอบโดยตรงด้วยวิธี KOH preparation จะพบลักษณะ budding yeast cell และ hyphae (รูปที่ 1) วิธีการตรวจนี้ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไปสามารถตรวจพิสูจน์ขั้นต้นได้ จากสถิติที่ผ่านมาพบว่า *Candida albicans* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ก่อโรคมามากที่สุด แต่ในระยะหลังมีรายงานว่า *Candida spp.* สายพันธุ์อื่นๆ ก็มีอัตราการก่อโรคที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน⁴ ในยุโรปตอนใต้พบ *C. parapsilosis* มีอุบัติการณ์เป็นอันดับที่สองรองจาก *C. albicans* และพบ *C. glabrata* ก่อโรคเป็นอันดับที่สองในเยอรมัน อังกฤษ และฝรั่งเศส⁶

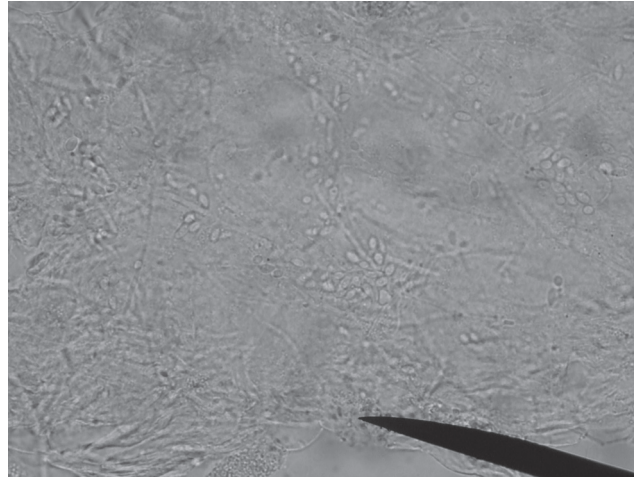


Figure 1. Budding yeast cell and pseudohyphae of *Candida albicans* examined by KOH preparation from oral thrush

จากการสำรวจพบการเกิด disseminated candidiasis สูงถึง 25%⁴ นอกจากนั้นเชื้อ *Candida* spp. ยังเป็นสาเหตุของการเกิด deep cutaneous fungal infection ในผู้ป่วยเด็กที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำสูงถึง 33%¹⁰ และเป็นสาเหตุของ deep-seated infection ในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำถึง 69.4%³

***Aspergillus* spp.**

Aspergillus spp. เป็นราสายที่พบทั่วไปในธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อมในรูปของ conidia ลักษณะก้านชูสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus* spp. ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงใน

รูปที่ 2 ซึ่งการติดเชื้อมักเกิดจากการหายใจเอาสปอร์ในอากาศ ซึ่งมีขนาด 2-4 ไมโครเมตร เข้าไปในปอด ในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำจะไม่สามารถกำจัดสปอร์ได้ เชื้อจึงสามารถเจริญและแบ่งตัวในถุงลม จากนั้นจึงรุกรานเข้าสู่หลอดเลือดแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ เกิดเป็นโรค aspergillosis แบบลุกลาม¹¹ เชื้อ *Aspergillus* spp. ที่พบอุบัติการณ์การก่อโรคมามากที่สุดคือ *A. fumigatus* รองลงมาคือ *A. flavus*, *A. niger* และ *A. terreus* ตามลำดับจากการศึกษาพบว่า *A. fumigatus* เป็นสาเหตุของ invasive aspergillosis ถึง 82% ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก⁴

Aspergillosis เป็นโรคจากเชื้อราที่พบมากที่สุดใ

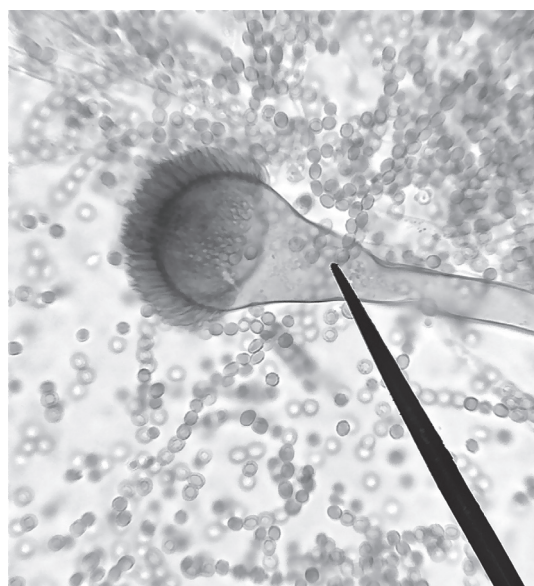


Figure 2 *Aspergillus fumigatus*

ผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือด และผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก^{2,12} นอกจากนี้ยังพบในผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะ โดยมีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายตับที่เป็นโรค aspergillosis แบบลุกลามเพิ่มสูงถึง 100% เนื่องจากผู้ป่วยได้รับยากดระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการปฏิเสธอวัยวะ จึงมีการทำงานของ cell-mediated immunity ต่ำลง ทำให้เพิ่มโอกาสในการติดเชื้อฉวยโอกาสได้มากขึ้น¹³ จากการศึกษาพบว่า *Aspergillus* sp. ยังเป็นสาเหตุของ deep-seated infection ในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำในอัตราถึง 13.9%³ ปัจจุบันพบว่าความถี่ในการเกิดโรค aspergillosis แบบลุกลามเพิ่มขึ้นเนื่องจากการใช้ยา fluconazole สำหรับป้องกันการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายไขกระดูก ยาชนิดนี้ทำให้เกิดการดื้อยา เชื้อจึงสามารถอยู่รอดเกิดการเกาะตัว และขยายพื้นที่การลุกลามมากขึ้น นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่ายีนของเชื้อ *Aspergillus* spp. มีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อใช้ fluconazole และมีผลทำให้ความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้นอีกด้วย⁶

Cryptococcus neoformans

Cryptococcus neoformans เป็นเชื้อที่ก่อโรค cryptococcosis ในคนปกติ และในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ โดยพบการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะประมาณ 3% ของผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำทั้งหมด เชื้อชนิดนี้พบในมูลของนกพิราบ ดังนั้น ผู้ป่วยที่อยู่ใกล้บริเวณที่มีนกพิราบอาศัยอยู่มาก จึงมีความเสี่ยงในการติดเชื้อสูง⁶ cryptococcosis ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในระบบประสาทส่วนกลาง เชื้อนี้เป็นเชื้อหลักที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วย AIDS และผู้ป่วยที่รักษาด้วยยา corticosteroid การติดเชื้อมักเริ่มจากการหายใจเอาเชื้อเข้าไปในปอดเกิด pulmonary cryptococcosis และเชื้อสามารถรุกรานเข้าสู่กระแสเลือดผ่านไปยังระบบประสาท ก่อให้เกิด meningitis และ meningoencephalitis^{7,14} ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายตับมีรายงานว่า *C. neoformans* เป็นเชื้อที่ก่อโรคติดเชื้อราแบบลุกลามอันดับที่สาม การติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลาง และแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย มีโอกาสเกิดขึ้นได้ถึง 52–61% ของผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะทั้งหมด การศึกษาที่ผ่านมายังพบว่า cryptococcosis มีอุบัติการณ์ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ 12 คนในผู้ป่วย 1000 คน ซึ่งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อที่พบได้แก่ pneumonia, meningitis และ disseminated infection โดยมีอัตราการติดเชื้อ 46%, 36% และ 11% ตามลำดับ และมีอัตราการตายจากโรค cryptococcosis ในผู้ป่วยยังสูงถึง 25%¹⁵

การตรวจวินิจฉัยก่อนผู้ป่วยเกิดพยาธิสภาพ

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลามในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำนั้นมียาจำกัดหลายประการ เช่น ในการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อรา ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลาราว 2–3 สัปดาห์เนื่องจากเชื้อเจริญช้า การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการมีขั้นตอนเริ่มจากการรับส่งตรวจ ทำ direct examination โดยการย้อมหาตัวเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงทำได้หลายวิธี เช่น KOH preparation, wright's staining, calcofluor white stain และ gram's stain เป็นต้น วิธีดังกล่าวเป็น การตรวจหาเชื้อเบื้องต้นจากสิ่งส่งตรวจ หลังจากนั้นจึงนำสิ่งส่งตรวจลงอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพาะเลี้ยง เมื่อมีเชื้อขึ้นจากสิ่งส่งตรวจจึงทำการตรวจพิสูจน์เชื้อ ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยทั้งหมดนี้ต้องใช้ความชำนาญในการตรวจพิสูจน์ ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน ทำให้ผู้ป่วยกลุ่มภูมิคุ้มกันต่ำมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ²⁸ หากตรวจทาง serological detection โดยการตรวจหาแอนติบอดีก็ไม่สามารถทำได้เนื่องจากผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำไม่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ หรือมีการสร้างในปริมาณที่น้อยมาก มีปริมาณต่ำกว่าช่วงค่าของการตรวจหา ส่วนการตรวจทางพยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ (histopathology) โดยการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) ไม่สามารถทำได้เช่นกันหากผู้ป่วยมีอาการหนัก ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสเพิ่มการติดเชื้อแทรกซ้อนขึ้นมามาก¹⁶⁻¹⁷ ดังนั้นการใช้วิธีตรวจที่รวดเร็ว ไม่กระทบต่อสภาพของผู้ป่วย จึงมีความจำเป็น เพื่อมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย ปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคใหม่ที่เป็นทางเลือก ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลาม สามารถตรวจได้ในระยะแรกของการติดเชื้อ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยทางรังสีวิทยา การตรวจหาแอนติเจน (fungal cell wall marker) และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อรา (fungal DNA)¹⁷

การตรวจวินิจฉัยทางรังสีวิทยา

การตรวจวินิจฉัยทางรังสีวิทยาเป็นการตรวจด้วยภาพถ่าย เป็นวิธีสำคัญที่มีบทบาท ในการตรวจหาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อราในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ในปัจจุบันวิธีที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายคือวิธี computerized tomography (CT)¹⁸ การตรวจอวัยวะต่างๆ ด้วย CT scan ประกอบไปด้วย segmental consolidation, patchy infiltrates และ nodules ซึ่งช่วยในการตรวจหาโรคได้รวดเร็วขึ้น โดยใช้สำหรับการแพร่กระจายของโรคระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ การทำ CT scan บริเวณทรวงอกสามารถตรวจหาโรคติดเชื้อราแบบลุกลามในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อซึ่งจะช่วยให้การให้ยาเพื่อรักษาด้วยยาต้านเชื้อราเร็วขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการ

รอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า CT scan สามารถใช้เป็นวิธีในการตรวจวินิจฉัย และสามารถตรวจพบรอยโรคในระยะแรก โดยลดเวลาในการตรวจพบโรค aspergillosis แบบลุกลามบริเวณปอดก่อนเกิดพยาธิสภาพจาก 7 วัน เหลือเพียง 2 วัน วิธีนี้ยังใช้เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นก่อนทำการตรวจด้วยการส่องกล้องผ่านหลอดลม และการตรวจวิเคราะห์ชิ้นเนื้อปอด (lung biopsy) อีกด้วย⁴ นอกจากนี้วิธีนี้ยังใช้ตรวจวินิจฉัย *Cryptococcal pneumonia* ที่มีลักษณะรอยโรคแบบ reticular หรือ reticulonodular interstitial pattern และ candidiasis เช่น pulmonary candidiasis ซึ่งจะพบลักษณะ patchy consolidation, focal cavitation และ nodules เป็นต้น¹⁸ การทำ CT scan ยังมีความสำคัญในการตรวจติดตามการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อที่รักษาด้วยยาต้านเชื้อรา และใช้ในการตรวจติดตามผู้ป่วย hepatosplenic fungal infection อีกด้วย¹⁵ อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยด้วย CT scan ในผู้ป่วยเด็กที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำควรคำนึงถึงความเสี่ยงในการได้รับรังสี การติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมระหว่างนำส่งผู้ป่วย และการสัมผัสผู้ป่วย¹⁷ นอกจากนี้สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกประการคือ การตรวจดูลักษณะรอยโรคจากภาพถ่ายในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำเป็นการวินิจฉัยที่ยังไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อก่อโรคได้ เช่น การตรวจดูภาพถ่ายบริเวณทรวงอกซึ่งมีความถูกต้องต่ำ แต่หากวินิจฉัยร่วมกับอาการของผู้ป่วยที่จำเพาะต่อการติดเชื้อ การทำ CT scan สามารถเพิ่ม

ความถูกต้องก็จะเป็นหนึ่งในวิธีที่มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจดูลักษณะของโรคปอดในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ โดยใช้ลักษณะทางภาพถ่ายทางรังสีของโรคติดเชื้อราในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำช่วยประกอบให้การวินิจฉัยแยกโรคให้แคบลงได้¹⁸

การตรวจหาสารบ่งชี้จากผนังเซลล์เชื้อรา

การศึกษาโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตของผนังเซลล์เชื้อราเพื่อใช้เป็นสารบ่งชี้สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลามพบว่าน้ำตาล glucan เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อราเกือบทุกชนิด น้ำตาล mannan จะพบในยีสต์และน้ำตาล galactomannan พบในเชื้อราและมีความจำเพาะต่อ *Aspergillus* spp.¹⁷ รูปองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราดังแสดงในรูปที่ 3 จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนางานวิจัยในการตรวจหาคาร์โบไฮเดรตของผนังเซลล์เชื้อราเพื่อใช้เป็นตัวกำหนดการเกิดโรคเชื้อราแบบลุกลาม โดยมีองค์กรวิจัยหลักสององค์กรที่ทำการศึกษอย่างต่อเนื่องประกอบด้วย European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) และ National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses study Group (MSG)¹⁸ จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจและชุดตรวจ สารบ่งชี้บนผนังเซลล์ของเชื้อราโดยตรวจน้ำตาล 3 ชนิดประกอบด้วย

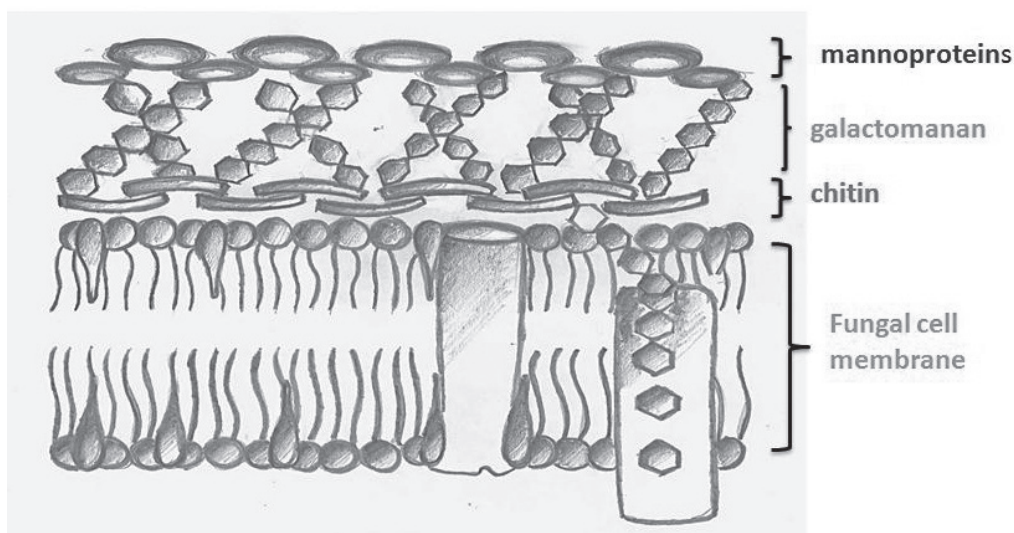


Figure 3. Fungal cell wall structure

1. การตรวจหา galactomannan

Galactomannan เป็น heteropolysaccharides ที่พบในผนังเซลล์ของ *Aspergillus* spp. เชื้อจะสร้างในระหว่างการเจริญและในขณะที่เชื้อสร้างผนังเซลล์ โดยจะถูกปล่อยออกภายนอกเซลล์ สามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือดและชิ้นเนื้อส่งตรวจ¹⁷ ปัจจุบันมีการสร้างชุดตรวจสำหรับตรวจหา galactomannan โดยอาศัยเทคนิค sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (PlateliaAspergillus®; Bio-Rad) ซึ่งได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาใช้สำหรับการตรวจในผู้ป่วยที่คาดว่าจะเป็โรค aspergillosis วิธีนี้ใช้เทคนิค sandwich-ELISA ในการตรวจหาแอนติเจนในซีรัมโดยมีค่า cut-off ที่ > 0.5 ในกรณีที่ได้ผลบวก การตรวจ galactomannan antigen ELISA ในการตรวจวินิจฉัย *Aspergillus* spp. ในซีรัมพบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจหาโรค aspergillosis แบบลูกกลมในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้ออวัยวะ^{7,16} การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความไว (sensitivity) ของวิธีนี้มีช่วงระหว่าง 30%-100% และความจำเพาะ (specificity) อยู่ในช่วง 38%-98%^{7,16} มีการใช้ชุดตรวจ PlateliaAspergillus® ในการตรวจเฝ้าติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคเลือดจำนวน 54 รายซึ่งมีพยาธิสภาพของเม็ดเลือดขาวต่ำมาเป็นระยะเวลานาน ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้มีโอกาสติดเชื้อราชนิดลูกกลมได้สูงในการใช้ชุดตรวจติดตาม เฝ้าระวังการเกิดโรค พบผู้ป่วยติดเชื้อราชนิดลูกกลม 4 ราย และ 17 รายมีโอกาสที่จะป่วยในการศึกษานี้ช่วยลดอัตราการเสียชีวิต ช่วยติดตามการรักษาและทราบถึงการตอบสนองของเชื้อต่อยาได้เป็นอย่างดี^{29,30}

จากผลการศึกษาพบว่ามียาหลายปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะของ galactomannan antigen ELISA เช่นพบการเกิดผลบวกปลอมได้บ่อย เมื่อตรวจในผู้ป่วยที่มีการใช้ยาในกลุ่ม β -lactam antibiotics โดยเฉพาะ piperacillin-tazobactam และการรับประทานอาหารที่มี galactomannan เป็นส่วนประกอบ¹⁷ ก่อนหน้านี้มีการใช้ glucuronoxylomanan เป็นสารบ่งชี้การติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* โดยใช้หลักการตรวจ latex agglutination และ ELISA ซึ่งผู้ป่วย cryptococcosis มีการตรวจพบ capsule antigen ได้ทั้งในกระแสเลือด และในน้ำไขสันหลัง เป็นการตรวจพิสูจน์การติดเชื้อ และติดตามการรักษา มีรายงานว่าพบการเกิดผลบวกปลอมในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวกับผู้ป่วย aspergillosis ด้วย³⁰ เห็นได้ว่าเทคนิคนี้ยังไม่สามารถใช้วินิจฉัยผู้ป่วยได้ทุกกลุ่มและการเลือกใช้ในการตรวจมีข้อจำกัดอยู่พอสมควร นอกจากนี้การศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยเด็กพบว่าค่าที่ได้มีความไว 89% และความจำเพาะ 85% ซึ่งมีค่าที่สูง¹⁶

แต่กลับพบว่ามียาหลายกรณีศึกษาเช่นกันที่ผลการทดสอบในผู้ป่วยเด็กโดยการตรวจหา galactomannan ยังให้ผลไม่แน่นอน โดยพบว่าเทคนิคนี้มีผลบวกปลอมในตัวอย่างที่เป็นซีรัม จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า วิธีนี้มีความสามารถใช้ในการตรวจหา galactomannan ใน bronchoalveolar lavage (BAL) ให้ความแม่นยำน่าเชื่อถือ และใช้ในการตรวจตัวอย่าง BAL ในผู้ป่วยเด็กที่เป็น pulmonary aspergillosis ได้ดีกว่าในตัวอย่างซีรัม¹⁹ จึงสรุปได้ว่าในกรณีของผู้ป่วยเด็กจำเป็นต้องเลือกส่งตรวจให้เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัย

2. การตรวจหา (1,3)- β -D-glucan (BDG)

(1,3)- β -D-glucan (BDG) พบในผนังเซลล์ของเชื้อราแทบทุกชนิด การตรวจหา β -D-glucan ไม่จำเพาะกับ genus หรือ species ของเชื้อราแต่มีความไวต่อการตรวจหาเชื้อราก่อโรคได้หลายชนิดทั้ง *Aspergillus* spp. และ *Candida* spp. อย่างไรก็ตามเชื้อก่อโรคบางชนิดเช่น *C. neoformans* และ *Blastomyces dermatitidis* มีปริมาณ β -D-glucan น้อยในผนังเซลล์ทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยในตัวอย่างส่งตรวจได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อทั้งสองชนิดข้างต้น¹⁷ ปัจจุบันมีการผลิตชุดตรวจโดยอาศัยเทคนิค colorimetric assay จากซีรัม ชุดตรวจที่ใช้กันอย่างมากในปัจจุบันคือ Fungitell® (Cape Cod, Inc.)¹⁶ หลักการของเทคนิคนี้ใช้การตรวจ β -D-glucan ในตัวอย่างโดย β -D-glucan จะเป็นตัวกระตุ้น coagulation cascade ผ่านการกระตุ้น factor G จากนั้น factor G กระตุ้น proclotting enzyme ให้เปลี่ยนเป็น clotting enzyme ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ substrate และเกิดสีได้ ในการศึกษาพบว่าการวินิจฉัย β -D-glucan assays ในผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อมีค่าความไวและความจำเพาะ 55-100% และ 71-93% ตามลำดับ โดยค่า cut-off ของวิธีนี้มีค่ากำหนดไว้เท่ากับ 60-120 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร¹⁷ วิธีนี้สามารถตรวจพบ β -D-glucan ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยได้ก่อนผู้ป่วยแสดงอาการของโรคติดเชื้อราแบบลูกกลมถึง 7 วัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Cuenca-Estrella และคณะ พบว่าการตรวจหา β -D-glucan ให้ผลบวกปลอมสูงเมื่อวินิจฉัยในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดร่วมด้วย (coinfection) โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ¹⁶

3. การตรวจหา Mannan

Mannan เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งสามารถตรวจพบในกระแสเลือดได้ ผู้ป่วยโรคติดเชื้อราแบบลูกกลมมักถูกใช้เป็น marker ในการตรวจวินิจฉัยโรค candidiasis แบบลูกกลมหรือ candidemia ในผู้ป่วยที่มีสภาวะ

เม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) และผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก¹⁷ ปัจจุบันมีชุดตรวจ mannan ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการคือ Platelia Candida® (Bio-Rad) โดยใช้เทคนิค ELISA ที่รวมการตรวจหา mannan antigen และ anti-mannan antibodies จากซีรัมไว้ด้วยกัน เทคนิคนี้มีค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 80% และ 93% ตามลำดับ¹⁷ วิธีนี้สามารถตรวจพบ mannan ได้ก่อนผู้ป่วยแสดงอาการของโรค 5 วัน¹⁶ จากการศึกษาที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันพบว่าในการตรวจหาโรค invasive candidiasis ที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans*, *C. glabrata* และ *C. tropicalis* ค่าความไวของ Platelia Candida® จะสูงถึง 80–100% แต่ในการตรวจการติดเชื้อที่เกิดจาก *C. krusei* และ *C. parapsilosis* ค่าความไวของการทดสอบนี้จะลดลงอยู่ในช่วง 40-50% เท่านั้น²⁰ การศึกษาของ Mikulska และคณะในการตรวจหา mannan antigen โดยใช้ Platelia Candida® เพื่อวินิจฉัยโรค invasive candidiasis ในผู้ป่วยโรคมะเร็งพบว่า ค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจหา mannan antigen เท่ากับ 58% และ 93% ตามลำดับ ค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจหา anti-mannan antibody เท่ากับ 59% และ 83% ตามลำดับ และในการตรวจหาทั้ง mannan antigen และ anti-mannan antibody รวมกันพบค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 83% และ 86% ตามลำดับและพบว่าค่าความไวของชุดตรวจนี้มีค่าความหลากหลายขึ้นอยู่กับเชื้อ *Candida* spp. ที่เป็นสาเหตุ โดยการตรวจหา *C. albicans* จะให้ค่าความไวที่สูงที่สุด รองลงมาคือ *C. glabrata* และ *C. tropicalis* นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถตรวจพบ mannan antigen และ anti-mannan ในผู้ป่วย candidemia ก่อนจะพบการเจริญของเชื้อ ด้วยการเพาะเลี้ยง 6 และ 7 วันตามลำดับ ในผู้ป่วยโรค hepatosplenic candidiasis แบบลุกลามพบว่า สามารถตรวจพบ mannan antigen และ anti-mannan antibody ได้ก่อนการตรวจพบรอยโรคด้วยภาพถ่ายทางรังสีวิทยาถึง 16 วัน²¹ นอกจากนี้ ในปัจจุบันมีชุดตรวจชนิดใหม่ที่ใช้ในการวินิจฉัยโรค candidiasis แบบลุกลาม โดยการตรวจหา mannan antigen ซึ่งอาศัยหลักการ enzyme immunoassay (down-flow immunoassay) มีชื่อว่า Unimedi Candida monotest (Unitika) เทคนิคนี้มีค่าความไว และความจำเพาะเท่ากับ 82% และ 96% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าชุดตรวจนี้มีค่าความไวสูงกว่า Platelia Candida® อย่างมีนัยสำคัญในการตรวจวินิจฉัย candidemia ที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. parapsilosis*⁹

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อรา

การตรวจทางอณูชีววิทยาอาจเป็นเทคนิคที่มี

ประสิทธิภาพในการตรวจโรคติดเชื้อราแบบลุกลามพบตั้งแต่ระยะแรก เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ให้ผลการวินิจฉัยที่ดี มีความไว และความจำเพาะสูง แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อรานั้นแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากการสกัดแยก DNA ของเชื้อราในสิ่งส่งตรวจทำได้ยาก และมีความซับซ้อนมากกว่า ในการสกัดจึงต้องการวิธีพิเศษ โดยต้องคำนึงถึงการปนเปื้อนของเชื้อจากอากาศ และน้ำเป็นอย่างมาก ทำให้การแปลผลบวกจริงทำได้ยาก¹⁷ ปัจจุบันการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อรายังไม่มีการนำไปใช้ในโรงพยาบาล และยังไม่ได้รับการรับรองจาก European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) และ National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (MSG) เนื่องจากยังขาดวิธีมาตรฐานในการทดสอบเพราะในแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการทำ PCR ที่มีความแตกต่างกัน เช่น การสกัด DNA การใช้ probes และ primers มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม มีการศึกษามากมายเกิดขึ้นเพื่อนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาไปใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลามในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ^{2,16}

การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำน้ำล้างปอด (bronchoalveolar lavage, BAL) จากผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำ 67 รายที่มีความเสี่ยงต่อโรค aspergillosis แบบลุกลาม และเลือดจากผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำ 907 ตัวอย่าง มาตรวจวินิจฉัยโดยใช้ 2-step PCR พบว่า เทคนิคนี้สามารถตรวจหา Aspergillus DNA ได้เมื่อมี DNA ≤ 10 fg และพบว่าในการตรวจวินิจฉัยในเลือดมีค่าความไว และความจำเพาะเท่ากับ 91.7% และ 81.3% ตามลำดับ สิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำล้างปอดให้ค่าความไว และความจำเพาะ 100% และ 93% ตามลำดับ²³ การตรวจหา Aspergillus DNA ในตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยเด็กที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ เพื่อวินิจฉัยโรค aspergillosis แบบลุกลามโดยวิธี nested PCR ในผู้ป่วย 71 คน พบว่าวิธีนี้ให้ผลความไวและความจำเพาะเท่ากับ 80% และ 81% ตามลำดับ²⁴

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลาม มีการพัฒนา และนำเทคนิค PCR-ELISA มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อรา ซึ่งหลักการของเทคนิคนี้คือการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ จากนั้นตรวจหา PCR product ที่ได้โดยการทำ hybridization กับ probes จำเพาะซึ่งติดฉลากด้วย digoxigenin และเติมแอนติบอดีต่อ digoxigenin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เติมน substrate เพื่อดูสีที่เกิดขึ้น ในการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคนี้ไปใช้

ในการตรวจหา *Aspergillus* spp. จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดพบว่าวิธีนี้ให้ความไวและความจำเพาะเท่ากับ 75% และ 96% ตามลำดับ²⁵ นอกจากนี้ได้มีการนำ PCR-ELISA มาใช้ในการตรวจติดตามการติดเชื้อราจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำได้ผลความไวและความจำเพาะเท่ากับ 84.6% และ 92.7% ตามลำดับ พบว่า วิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อก่อนผู้ป่วยแสดงอาการของโรคได้ถึง 17 วัน²⁶ ปัจจุบันได้มีความพยายามคิดค้นชุดตรวจทางอณูชีววิทยา เช่น SeptiFast® (Roche Diagnostics) ที่ประกอบด้วย primers หลายชนิดที่จำเพาะต่อกับทั้งเชื้อรา และแบคทีเรียสำหรับทำ multiplex real-time PCR ที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อราจากตัวอย่างเลือดโดยตรงพบว่ามีผลความไวและความจำเพาะเท่ากับ 78% และ 99% ตามลำดับ²⁷

สรุป

ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบบลุกลามในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำมีการนำเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมาใช้ เช่น การตรวจทางรังสีวิทยา การตรวจหาสารบ่งชี้จากผนังเซลล์เชื้อรา และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อรา เพื่อสามารถวินิจฉัยได้ในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ เพิ่มความรวดเร็วในการรักษา ลดการใช้ยาต้านเชื้อราที่ไม่จำเป็นทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่าย และที่สำคัญเพื่อลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย ที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ เกณฑ์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยถ้าหากผลการทดสอบให้ผลบวกต่อการตรวจมากกว่าหรือเท่ากับ 2 วิธี การตรวจ ที่มีหลักการของการตรวจที่แตกต่างกัน หรือผู้ป่วยมีอาการ และพบลักษณะรอยโรคจากการตรวจทางรังสีวิทยา ผู้ป่วยจะได้รับยาต้านเชื้อราเพื่อรักษาทันที² ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลาม มีการใช้อย่างแพร่หลายในต่างประเทศ โดยใช้การตรวจด้วยภาพถ่ายและการตรวจหาตัวบ่งชี้จากผนังเซลล์เชื้อราซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจาก European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) และ National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (MSG) วิธีการตรวจสามารถช่วยในการวินิจฉัยก่อนที่ผู้ป่วยแสดง และเป็นวิธีที่ไม่มีผลกระทบต่อผู้ป่วยมาก หลักการตรวจทางอณูชีววิทยาจะมีบทบาทมากมายในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อต่าง ๆ แต่ในการตรวจวินิจฉัยโรคจากเชื้อรานั้นยังคงขาดมาตรฐานที่ชัดเจน และยังอยู่ในขั้นตอนของการศึกษา ดังนั้นควรมีการศึกษา และพัฒนานิ่ว PCR และเทคโนโลยีใหม่ ๆ สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลาม เพื่อความรู้ที่เพิ่มขึ้น และค้นพบวิธีที่มีความเป็นมาตรฐานที่เชื่อถือได้ต่อไปในอนาคต

ในขณะนี้ผู้เขียน และคณะวิจัย ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจทางอณูชีววิทยา โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราในกระแสเลือด วิธีดังกล่าวสามารถแยกชนิดของเชื้อ *Candida* spp. ออกจากกันได้ โดยการให้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อรา โดยยื่นเป้าหมายคือบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเป็นบริเวณ finger print ของเชื้อรา การตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ MspI แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษา และวิจัยเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยในกลุ่ม systemic mycosis และผู้ป่วย septicemia เพื่อแยกจากผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด เพื่อเพิ่มความถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย อีกทั้งยังลดอัตราการการใช้ยาผิดประเภท เพื่อมุ่งหวังให้มีอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยสูงขึ้น และลดอัตราการนอนรักษาตัวในโรงพยาบาลลง

ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในแต่ละโรงพยาบาลในประเทศไทย ควรมีการพิจารณา เลือกวิธีการตรวจที่เหมาะสม ในด้านความไว และความจำเพาะต่อการติดเชื้อของโรคติดเชื้อราแบบลุกลามในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำ เนื่องจากการทดสอบแต่ละประเภทมีข้อดี และข้อเสีย ที่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม โรคติดเชื้อราที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ มีความรุนแรง และความรวดเร็วในการแพร่กระจายของโรค อาจจะใช้ระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์ โดยวิธีมาตรฐาน (culture method) ยังคงทำได้ แต่ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ และผู้ป่วยระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยพยาธิสภาพของผู้ป่วยมีความรุนแรงของโรคสูง และมีโอกาสติดเชื้อฉวยโอกาสมาก ซึ่งจำนวนมากในประเทศไทย จำเป็นที่ต้องใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยที่ รวดเร็ว แม่นยำ และมีราคาที่เหมาะสม นำมาใช้ประกอบในการช่วยตรวจวินิจฉัย เพื่อมุ่งหวังในการลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ ผศ.ดร.ขจรศักดิ์ ตระกูลพิ้ว แห่งจุฬารัตนวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ให้คำแนะนำชี้แนะตลอดการเขียน

เอกสารอ้างอิง

1. Silva RF. Chapter 8: Fungal infections in immunocompromised patients. *J Bras Pneumol* 2010; 36(1): 142-7.
2. Barnes RA. Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemo* 2008; 61(1) :13-6.
3. BassiriJahromi S, Khaksar AA. Deep-seated fungal infections in immunocompromised patients in Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2005; 41: 27-32.
4. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55(7): 809-18.
5. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang CH, Olyaei A, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2010; 12(3): 220-9.
6. Caston-Osorio JJ, Rivero A, Torre-Cisneros J. Epidemiology of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(2): 103-9.
7. Musial CE, Cockerill FR, 3rd, Roberts GD. Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1(4): 349-64.
8. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34(1): 7-14.
9. Wanke B, LazeraMdos S, Nucci M. Fungal infections in the immunocompromised host. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(1): 153-8.
10. Marcoux D, Jafarian F, Joncas V, Buteau C, Kokta V, Moghrabi A. Deep cutaneous fungal infections in immunocompromised children. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61(5): 857-64.
11. Tang CM, Cohen J. Diagnosing fungal infections in immunocompromised hosts. *J Clin Pathol* 1992; 45(1): 1-5.
12. Camps IR. Risk factors for invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(2): 119-23.
13. Liu X, Ling Z, Li L, Ruan B. Invasive fungal infections in liver transplantation *Int J Infect Dis* 2011; 15(5): 298-304.
14. Corti M, Palmero D, Eiguchi K. Respiratory infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Pulm Med* 2009; 15(3): 209-17.
15. Metser U, Haider MA, Dill-Macky M, Atri M, Lockwood G, Minden M. Fungal liver infection in immunocompromised patients: depiction with multiphasic contrast-enhanced helical CT. *Radiology* 2005; 235(1): 97-105.
16. Cuenca-Estrella M, Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, et al. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(2): 143-7.
17. Dornbusch HJ, Groll A, Walsh TJ. Diagnosis of invasive fungal infections in immunocompromised children. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(9): 1328-34.

18. Franquet T, Gimenez A, Hidalgo A. Imaging of opportunistic fungal infections in immunocompromised patient *Eur J Radiol* 2004; 51(2): 130-8.
19. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5517-22.
20. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(12): 864-70.
21. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia *Crit Care* 2010; 14(6): 222.
22. Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, Kedzierska J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-3)- β -D-glucan antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(11): 755-66.
23. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Ritter J, Suedhoff T, Baldus M, et al. Detection of Aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clin Infect Dis* 2001; 33(4): 428-35.
24. Hummel M, Spiess B, Roder J, von Komorowski G, Durken M, Kentouche K, et al. Detection of Aspergillus DNA by a nested PCR assay is able to improve the diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients *J Med Microbiol* 2009; 58(10): 1291-7.
25. Lass-Flörl C, Aigner J, Gunsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, et al. Screening for Aspergillus spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* 2001; 113(1): 180-4.
26. Badiie P, Kordbacheh P, Alborzi A, Malekhoseini S, Ramzi M, Mirhendi H, et al. Study on invasive fungal infections in immunocompromised patients to present a suitable early diagnostic procedure. *Int J Infect Dis* 2009; 13(1): 97-102.
27. Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(6): 774-9.
28. Agarwal S, Manchada V, Verma N, Bhalla P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. *Indian J Med Microb* 2011; 29(2): 172-7.
29. Moragues MD, Amutio E, Garcia-Ruiz JC, Ponton J. Usefulness of galactomannan detection in the diagnosis and follow-up of hematological patients with invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20(3): 103-10.
30. Jarque I, Andreu R, Salavert M, et al. Value of Aspergillus galactomannan antigen detection in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis in hematological patients. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20(3): 116-8.