

# Metody identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida*. Część III. Systemy automatyczne i testy rzadko wykorzystywane

Sebastian Gnat

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

Implementacja automatycznych systemów identyfikacji drożdży z rodzaju *Candida* do laboratoriów diagnostycznych związana jest z dużą liczbą badań wykonywanych przez daną jednostkę, co oczywiście ma dalsze przełożenie na cenę pojedynczego badania i wykorzystanie urządzeń. Stąd systemy automatyczne znajdują szerokie zastosowanie w laboratoriach wysokoprzepustowych, np. w ośrodkach medycznych III referencji bądź laboratoriach komercyjnych o szerokim profilu działalności. Przychodnie weterynaryjne prowadzące własną pracownię mikrobiologiczną zazwyczaj korzystają z klasycznych metod identyfikacji bądź systemów półautomatycznych opartych o testy biochemiczne do samodzielnej interpretacji wyników. Niemniej jednak zwiększona liczba inwazyjnych zabiegów w weterynarii, nieodłącznie związana z wydłużoną hospitalizacją zwierząt oraz stosowaniem szerokospektralnej antybiotykoterapii, skłania do wniosku, że sięganie po systemy automatyczne identyfikacji grzybów w laboratoriach weterynaryjnych jest tylko kwestią czasu, a ich wdrożenie może odesłać do lamusa techniki klasyczne.

W tym artykule przedstawiony jest przegląd i omówienie systemów automatycznych oraz nowych, szybkich metod diagnostyki grzybów z rodzaju *Candida*. Szczególna uwaga została skupiona na zaletach i ograniczeniach tych systemów oraz możliwościach implementowania do rutynowego stosowania w laboratoriach klinicznych.

## Systemy automatyczne

### System Vitek YBC i system Vitek 2 ID-YST

System Vitek (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA) został pierwotnie opracowany przez McDonnell Douglas jako zautomatyzowany system do wykrywania i szybkiej identyfikacji bakterii bezpośrednio z próbek moczu. System został następnie zmodyfikowany pod kątem identyfikacji grzybów i wprowadzony do laboratorium klinicznego jako AutoMicrobic System (AMS; 1, 2, 3, 4). Składa się z 30-dołkowej jednorazowej plastikowej karty zawierającej 26 konwencjonalnych testów biochemicznych i cztery kontrole ujemne (5–7). System umożliwia identyfikację 27 gatunków drożdży *Candida*, istotnych z medycznego punktu widzenia, w czasie 22–24 godzin (8). Karta biochemiczna drożdży (YBC, Yeast biochemical card) jest jednym z kilku pakietów testowych używanych z systemem Vitek, który składa się z zaprogramowanego komputera, jednostki czytnika połączonej

### Methods of species identification of fungi of the genus *Candida*. Part III. Automated systems and rarely used tests

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

It is imperative that pathogenic agents are identified accurately to the species level. The implementation of automatic systems for the identification of *Candida* yeasts is associated with a large number of tests performed by a given unit, which certainly has a further impact on the price of a single test and the use of devices. Hence, automatic systems are widely used in high-throughput laboratories, e.g. in commercial laboratories with a wide range of activities. Veterinary clinics with their own microbiological unit usually use classical identification methods or semi-automatic systems based on biochemical tests for independent interpretation of the results. Nevertheless, the increased number of invasive procedures, inherent in prolonged hospitalization of animals, and the use of broad-spectrum antibiotic therapy, leads to the conclusion that using automatic fungal identification systems in veterinary laboratories is only a matter of time, and their implementation may leave the classical techniques obsolete. This article provides an overview and discussion of automatic systems as well as new, rapid methods of diagnosing *Candida* fungi. Particular attention has been focused on Vitek YBC, Vitek 2 ID-YST, Abbot Quantum II, and Microbial ID systems.

**Keywords:** *Candida* fungi, diagnosis, automatic systems, rapid methods, veterinary laboratories.

z inkubatorem, modułu napełniania testów, modułu uszczelniającego i drukarki (7). Ogólnie rzecz biorąc, przy użyciu systemu Vitek z kartą YBC najczęściej izolowane klinicznie gatunki, takie jak *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. glabrata*, zostały zidentyfikowane z bardzo wysokim poziomem ufności sięgającym 86–99,2% (5, 6, 9, 10). Natomiast wskaźniki identyfikacji systemu wahały się od 83 do 98% testowanych próbek (5, 7, 11, 12). Wyniki badań naukowych dla innych niż wskazane powyżej gatunków nie są w pełni jednoznaczne. Chociaż el-Zaatari i wsp. (6) wykazali, że dokładność systemu Vitek dla rzadziej diagnozowanych gatunków *Candida* wynosiła 94,1%, dane z badania przeprowadzonego przez Dooleya i wsp. (10) nie potwierdziły tego stanowiska. Badacze ci podają, że system ten prezentuje niewystarczającą wiarygodność w identyfikacji rzadkich drożdżaków.

Zaletami systemu Vitek z kartą biochemiczną YBC są m.in.: bardzo krótki czas przygotowania próbek, zautomatyzowana inokulacja substratów tą samą

zawiesiną każdego izolatu, eliminacja zmienności testu, możliwość wykonywania 26 testów biochemicznych jednocześnie z tego samego inokulum oraz wspomagana komputerowo identyfikacja (8, 13, 14, 15). Dodatkowo, dla systemu przeznaczone są wykonywane na bieżąco i łatwe do wprowadzenia aktualizacje oprogramowania komputerowego, które odzwierciedlają zmiany w profilach biochemicznych izolatów tych samych gatunków i tym samym zwiększają pulę danych zidentyfikowanych organizmów (12). Wskazywane wady systemu obejmują brak możliwości ręcznego tworzenia kopii zapasowych oraz brak określania progów wiarygodności identyfikacji przy odczycie wyników (8). Ponadto wymienia się jako minusy systemu potrzebę dużej liczby inokulum, ograniczenia tworzenia własnych baz danych, niewielką przestrzeń do przechowywania jednorazowych rurek do wstrzykiwaczy oraz krótki okres trwałości kart YBC, wynoszący zaledwie dwa miesiące w 4°C (12, 16, 17, 18).

System Vitek 2 ID-YST to zautomatyzowany system II generacji oparty na karcie biochemicznej z 64 studzienkami zawierającymi reagenty dla 47 fluorescencyjnych testów (ryc. 1). Analizowane reakcje biochemiczne to 20 testów asymilacji węglowodanów, sześć testów asymilacji kwasów organicznych, osiem studzienek z substratami do wykrywania oksydaz sprzężonych z 4-metyloumbeliferonem, dziewięciu studzienek z substratami dedykowanymi dla wykrywania aryloamidaz oraz czterech innych testów (9). W badaniu przeprowadzonym przez Graf i wsp. (9) za pomocą systemu Vitek 2 ID-YST, z zastosowaniem dodatkowych testów podawanych w instrukcji producenta, zidentyfikowano poprawnie 92,1% izolatów klinicznych, w tym z wiarygodnością sięgającą 100% dla *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. glabrata*, 96,8% dla *C. parapsilosis* i 89,7% dla *C. krusei*. Natomiast bez wykonywania dodatkowych testów wiarygodność spadała do 87,6%. W przeciwieństwie do tego badania Cardenes-Perera i wsp. (19) oraz Massonet i wsp. (20) wskazują, że system Vitek 2 ID-YST jest przydatny głównie do identyfikacji zaledwie dwóch gatunków, tj. *C. glabrata* i *C. dubliniensis*.

Główną zaletą unowocześnionego systemu Vitek 2 jest oparcie karty biochemicznej na bardzo czułych

reakcjach fluorescencyjnych oraz skrócenie czasu analizy do 15 godzin (9, 19, 21, 22, 23). Niestety niektóre dane naukowe jako poważną wadę wskazują, że użycie kultur starszych niż 24-godzinne, prowadzi do uzyskiwania wyników wątpliwych (20).

### System Abbott Quantum II

System Quantum II (Abbott Laboratories, Irving, Teksas, USA) składa się z wielopunktowo perforowanego kartridża, fotometru o podwójnej długości fali, który mierzy zmiany kolorymetryczne w poszczególnych komorach kartridża, oraz jednorazowej plastikowej płytki z 20 komorami zawierającymi liofilizowane media biochemiczne (5, 24, 25, 26). System został zaprojektowany do identyfikacji tlenowych pałeczek Gram-ujemnych lub drożdży (1). Identyfikacja drożdży przeprowadzana jest na podstawie odczytów turbidometrycznych lub kolorymetrycznych w komorach płytki z reagentami biochemicznymi po 24 godzinach od inokulacji materiału (5). Kiehn i wsp. (24), korzystając z systemu Abbot Quantum II, zidentyfikowali poprawnie 80,4% izolatów *Candida*, 7,8% z nich zostało zidentyfikowanych błędnie, a 11,8% nie uzyskało wyniku identyfikacji. Większość błędnych identyfikacji spowodowana była fałszywie pozytywnymi reakcjami asymilacyjnymi. Ponadto 25 z 29 niezidentyfikowanych drożdżaków *Candida* było sklasyfikowanych w gatunkach *C. parapsilosis* lub *C. pseudotropicalis*. Dane z badania przeprowadzonego przez Salkina i wsp. (26) wykazały, że system Quantum II umożliwił w 92% wiarygodną identyfikację pospolitych gatunków, np. *C. albicans* i *C. glabrata*, a tylko w 73% w przypadku rzadkich izolatów. Natomiast Pfaller i wsp. (5) określili dokładność systemu na 94% w identyfikacji pospolitych izolatów i 67% w przypadku izolatów rzadkich. W tym ostatnim badaniu izolaty *C. parapsilosis* były identyfikowane błędnie z największą częstotliwością, a w drugiej kolejności *C. tropicalis*. Za błędne wyniki identyfikacji odpowiadało wiele reakcji fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Autorzy zasugerowali, że standaryzacja inokulum za pomocą spektrofotometru lub hemocytometru może poprawić działanie systemu.



Ryc. 1. Moduł z kartami biochemicznymi YST oraz ogólny pogląd urządzenia Vitek 2 (zdjęcia ze strony internetowej producenta)



Ryc. 2. Ogólny pogląd na różne modele systemu identyfikacji MIS (Microbial ID)

### Microbial identification system

System identyfikacji drobnoustrojów (MIS; Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA) jest dobrze znanym, w pełni zautomatyzowanym systemem chromatografii gazowej, który identyfikuje bakterie i grzyby ze źródeł środowiskowych i klinicznych w oparciu o ich unikalne profile kwasów tłuszczowych (27, 28, 29). System ten składa się z jednostki do chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym, automatycznym systemem nakładania próbek, integratorem i komputerem (ryc. 2; 30). MIS może rozróżnić ponad 140 związków, w tym estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME), dimetyloacetyle (DMA), aldehydy (ALDE) i inne związki, które są charakterystyczne dla poszczególnych gatunków (28), podając najbardziej prawdopodobne gatunki wraz z zakresem korelacji profilu izolatu z gatunkami w bazie danych (30).

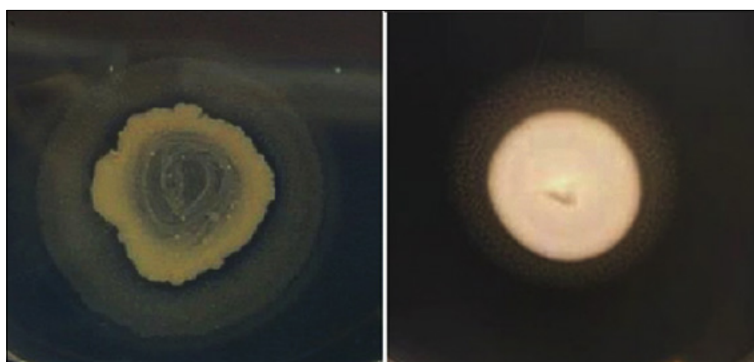
Pierwsze badania naukowe nad wiarygodnością systemu w identyfikacji drożdży nie były obiecujące, bowiem wykazano wówczas, że tylko 68–75% izolatów zostało prawidłowo zidentyfikowanych przez MIS do poziomu gatunku (27, 30). Crist i wsp. (27) wykazała natomiast, że MIS zidentyfikował 100% badanych grzybów z gatunków *C. krusei*, *C. kefyr* i *C. guilliermondii*. Z drugiej strony tylko 79,2% izolatów *C. albicans*, 64,1% *C. glabrata*, 19,0% *C. tropicalis* i 75,7% *C. parapsilosis* zostało prawidłowo zidentyfikowanych za pomocą tego systemu (27). Najczęściej błędnie identyfikowanym drożdżem był gatunek *C. glabrata*, który w MIS identyfikowany był jako *Saccharomyces cerevisiae* (27, 30, 31). Chociaż analiza kwasów tłuszczowych za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej jest z powodzeniem stosowana do identyfikacji prątków i innych trudnych do hodowli mikroorganizmów, obecna baza danych jest uważana za niewystarczającą do rutynowej identyfikacji klinicznie istotnych drożdży z rodzaju *Candida* (27).

### Biotypowanie

#### Test Tween 80

Test Tween 80 został początkowo zastosowany do określania aktywności lipolitycznej bakterii i różnych gatunków grzybów *Chrysosporium* (32). Ze względu na fakt, że wiele patogennych gatunków drożdży *Candida* również wydziela enzymy lipolityczne, takie jak esterazy (33) i fosfolipazy (34), zaproponowano go jako użyteczny test do identyfikacji gatunkowej tych grzybów (35, 36). Hydroliza podłoża zawierającego Tween 80 jest związana z enzymami lipolitycznymi wytwarzanymi tylko przez pewne gatunki grzybów z rodzaju *Candida*. Uwolnione kwasy tłuszczowe poddane lizie przez enzymy grzybicze wiążą się z wapniem obecnym w podłożu i tworzą nierozpuszczalne kompleksy (35). Występowanie efektu halo widocznego w świetle przechodzącym wokół miejsca inokulacji na podłożu Tween 80 wskazuje, że dany izolat drożdży *Candida* wytwarza esterazę (test dodatni; ryc. 3; 35, 37). Slifkin (35) w swoich badaniach określił, że wszystkie szczepy klasyfikowane w gatunkach *C. albicans* i *C. tropicalis* wywoływały

Ryc. 3. Pozytywny wynik testu z Tween 80 uzyskany dla *Candida albicans*





reakcję halo na standardowym podłożu Tween 80, która pojawiała się po 2–3 dniach od posiewu. Natomiast izolaty *C. guilliermondii* i *C. rugosa* dawały efekt halo dopiero po 8–10 dniach, a pozostałe gatunki w obrębie rodzaju *Candida*, w tym *C. dubliniensis* nie dawały wyniku dodatniego w ciągu 10 dni od inokulacji. Dlatego test Tween 80 został uznany za dobrą metodę do różnicowania gatunków *C. albicans* i *C. dubliniensis* (35).

## Nowe narzędzia diagnostyczne

### Test wykrywania (1,3)- $\beta$ -D-glukanu

Uzupełnienie omówionych we wszystkich częściach tego cyklu artykułów technik diagnostycznych stanowią inne testy komercyjne, które zostały ocenione pod kątem ich skuteczności w diagnostyce inwazyjnej kandydozy. Te metody umożliwiają, bez hodowli grzyba, wykrywanie DNA drożdży *Candida* i antygenów grzybowych w surowicy. Jedną z obiecujących technik jest test wykrywający (1,3)- $\beta$ -D-glukan (38, 39, 40). Wykazał on zarówno czułość, jak i swoistość na poziomie 77% (41). W badaniu przeprowadzonym przez Held i wsp. (42) zaobserwowano, że test wykrywający (1,3)- $\beta$ -D-glukan był zdecydowanie bardziej wiarygodny w diagnostyce kandydemii w porównaniu z innymi ocenianymi testami, m.in. opartymi na hodowli i analizach biochemicznych.

### Test wykrywania galaktomannanu

Galaktomannan jest polisacharydowym składnikiem ściany komórkowej grzybów, który można wykryć we krwi podczas inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Wykrywanie tego związku można również stosować w analizach związanych z prognozowaniem i monitorowaniem odpowiedzi na terapię. Ponadto, aby zoptymalizować wiarygodność wyników, oznaczenia wykonuje się zwykle dwa razy w tygodniu w przedziale największego ryzyka (43, 44). Jednym z ograniczeń metody, wskazywanych w literaturze, są wyniki fałszywie dodatnie (45). Niektórzy z producentów rozwiązali ten problem w oferowanych przez siebie testach (46).

Test wykrywania (1,3)- $\beta$ -D-glukanu w połączeniu z testem na obecność galaktomannanu może być bardzo interesujący dla zaawansowanych laboratoriów diagnostycznych, zwłaszcza szpitalnych, ponieważ testy te mogą być stosowane do wykluczenia lub potwierdzenia podejrzenia inwazyjnych infekcji grzybiczych (47). Fontana i wsp. (47) przetestowali wskazaną kombinację testów na surowicach 46 pacjentów hematologicznych i zaobserwowali, że czułość i swoistość wyniosły odpowiednio 95,83% i 54,54%, a dodatnie i ujemne wartości predykcyjne: 69,7% i 92,3%.

## Podsumowanie

Automatyczne systemy identyfikacji grzybów z rodzaju *Candida* niosą wiele zalet, wśród których

niewątpliwym postępowaniem w porównaniu z metodami klasycznymi jest wyeliminowanie błędów odczytu wyniku, jaki zawsze może się przydarzyć diagnoście laboratoryjnemu. Interpretacja komputerowa polega na stosowaniu identycznego standardu dla wszystkich próbek. Ponadto bazy danych tworzone przez producentów tych systemów mogą być na bieżąco aktualizowane poprzez wprowadzanie nowo oznaczonych profili. W chwili obecnej ceny tych urządzeń są wysokie i nie pozwalają na szeroką implementację, niemniej jednak rozwój diagnostyki mikrobiologicznej wraz z jej coraz większą centralizacją, związaną z możliwościami szybkiego transportu próbek poprzez sieć internetową, mogą nasuwać przypuszczenie, że zapotrzebowanie na tego typu systemy w najbliższych latach będzie wyższe.

## Piśmiennictwo

1. St Germain G., Beauchesne D.: Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 2296–2299.
2. Melhem M., Bertolotti A., Lucca H., Silva R., Meneghin F., Szeszs M.: Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Brazilian J. Microbiol.* 2013, 44, 1257–1266.
3. Idelevich E.A., Grunewald C.M., Wüllenweber J., Becker K.: Rapid Identification and Susceptibility Testing of *Candida* spp. from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2. *Coste AT, ed. PLoS One.* 2014, 9, e114834.
4. Ambaraghassi G., Dufresne P.J., Dufresne S.F., Vallières É., Muñoz J.F., Cuomo C.A., Berkow E.L., Lockhart S.R., Luong M.-L.: Identification of *Candida auris* by Use of the Updated Vitek 2 Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study. *Land GA, ed. J. Clin. Microbiol.* 2019, 57.
5. Pfaller M.A., Preston T., Bale M., Koontz F.P., Body B.A.: Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident, and AutoMicrobic systems for identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26, 2054–2058.
6. el-Zaatari M., Pasarell L., McGinnis M.R., Buckner J., Land G.A., Salikin I.F.: Evaluation of the updated Vitek yeast identification data base. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 1938–1941.
7. Fenn J.P., Segal H., Barland B., Denton D., Whisenant J., Chun H., Christofferson K., Hamilton L., Carroll K.: Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1184–1187.
8. Neppelenbroek K., Seo R., Urban V., Silva S., Dovigo L., Jorge J., Campanha N.: Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* 2014, 20, 329–344.
9. Graf B., Adam T., Zill E., Göbel U.B.: Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1782–1785.
10. Dooley D.P., Beckius M.L., Jeffrey B.S.: Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 2889–2892.
11. Qadri S.M.H., Flournoy D.J., Qadri S.G.M., Ramirez E.G.: Rapid identification of yeasts by semi-automated and conventional methods. *Med. Microbiol. Immunol.* 1986, 175, 307–316.
12. Oblack D.L., Rhodes J.C., Martin W.J.: Clinical evaluation of the AutoMicrobic system Yeast Biochemical Card for rapid identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 1981, 13, 351–355.
13. Kaur R., Dhakad M., Goyal R., Haque A., Mukhopadhyay G.: Identification and Antifungal susceptibility testing of *Candida* species: A Comparison of Vitek-2 system with conventional and molecular methods. *J. Glob. Infect. Dis.* 2016, 8, 139.
14. Cejudo M.T.G., Gallego A.G., Lacasa E.C., Aller A.I., Romero A., García J.P., Andrés G.Q., Martín-Mazuelos E.: Evaluation of the VITEK 2 system to test the susceptibility of *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, flucytosine, flucanazole and voriconazole: a comparison with the M27-A3 reference method. *Med. Mycol.* 2010, 48, 710–719.
15. Ochiuzzi M.E., Cataldi S., Guelfand L., Maldonado I., Arechavala A.: Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Rev. Argent. Microbiol.* 2014, 46, 107–110.

16. Hata DJ., Hall L., Fothergill A.W., Larone D.H., Wengenack N.L.: Multicenter Evaluation of the New VITEK 2 Advanced Colorimetric Yeast Identification Card. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**, 1087–1092.
17. Karabicak N., Uludag Altun H., Karatuna O., Hazirolan G., Aksu N., Adiloglu A., Akyar I.: Evaluation of Common Commercial Systems for the Identification of Yeast Isolates in Microbiology Laboratories: A Multicenter Study. *Mikrobiyol. Bul.* 2015, **49**, 210–220.
18. Bikandi J., Millán R.S., Moragues M.D., Cebas G., Clarke M., Coleman D.C., Sullivan D.J., Quindós G., Pontón J.: Rapid Identification of *Candida dubliniensis* by Indirect Immunofluorescence Based on Differential Localization of Antigens on *C. dubliniensis* Blastospores and *Candida albicans* Germ Tubes. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2428–2433.
19. Cárdenes-Perera C.-D., Torres-Lana Á., Alonso-Vargas R., Moragues-Tosantas M.-D., Pontón-San Emeterio J., Quindós-Andrés G., Arévalo-Morales M.-P.: Evaluation of API ID 32C® and VITEK-2® to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, **50**, 219–221.
20. Massonet C., Van Eldere J., Vaneechoutte M., De Baere T., Verhaegen J., Lagrou K.: Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Yeast Species. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 2209–2211.
21. Vijgen S., Nys S., Naesens R., Magerman K., Boel A., Cartuyvels R.: Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre YeastOne antifungal testing. *Med. Mycol.* 2011, **49**, 107–110.
22. Meurman O., Koskensalo A., Rantakokko-Jalava K.: Evaluation of Vitek 2 for identification of yeasts in the clinical laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, **12**, 591–593.
23. Posteraro B., Efreimov L., Leoncini E., Amore R., Posteraro P., Ricciardi W., Sanguinetti M.: Are the Conventional Commercial Yeast Identification Methods Still Helpful in the Era of New Clinical Microbiology Diagnostics? A Meta-Analysis of Their Accuracy. Warnock DW, ed. *J. Clin. Microbiol.* 2015, **53**, 2439–2450.
24. Kiehn T.E., Edwards F.E., Tom D., Lieberman G., Bernard E.M., Armstrong D.: Evaluation of the Quantum II yeast identification system. *J. Clin. Microbiol.* 1985, **22**, 216–219.
25. Pincus D.H., Orenga S., Chatellier S.: Yeast identification – past, present, and future methods. *Med. Mycol.* 2007, **45**, 97–121.
26. Salkin I.F., Schadow K.H., Bankaitis L.A., McGinnis M.R., Kemna M.E.: Evaluation of Abbott Quantum II yeast identification system. *J. Clin. Microbiol.* 1985, **22**, 442–444.
27. Crist A.E., Johnson L.M., Burke P.J.: Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 2408–2410.
28. Teng L.-J., Hsueh P.-R., Liaw S.-J., Ho S.-W., Tsai J.-C.: Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2004, **37**, 327–334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599464>
29. Müller K., Schmid E.N., Kroppenstedt R.M.: Improved identification of mycobacteria by using the microbial identification system in combination with additional trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2477–2480.
30. Kellogg J.A., Bankert D.A., Chaturvedi V.: Limitations of the Current Microbial Identification System for Identification of Clinical Yeast Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 1197–1200.
31. Peltroche-Llacsahuanga H., Schmidt S., Lütticken R., Haase G.: Discriminative power of fatty acid methyl ester (FAME) analysis using the Microbial Identification System (MIS) for *Candida (Torulopsis) glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, **38**, 213–221.
32. Calvo R.M., Calvo M.A., Larrondo M.: Enzyme activities in *Chryso-sporium* strains. *Mycopathologia.* 1991, **116**, 177–179.
33. Wills E.D.: Lipases. In: 1965:197–240.
34. Ghannoum M.A.: Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, **13**, 122–143.
35. Slifkin M.: Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 4626–4628.
36. Dostál J., Hamal P., Pavlíčková L., Souček M., Ruml T., Pichová I., Hrušková-Heidingsfeldová O.: Simple Method for Screening *Candida* Species Isolates for the Presence of Secreted Proteinases: a Tool for the Prediction of Successful Inhibitory Treatment. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 712–716.
37. Sierra G.: A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1957, **23**, 15–22.
38. Albert O., Toubas D., Strady C., Cousson J., Delmas C., Vernet V., Villena I.: Reactivity of (1 → 3)-β-d-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, **30**, 1453–1460.
39. Posteraro B., De Pascale G., Tumbarello M., Torelli R., Pennisi M., Bello G., Maviglia R., Fadda G., Sanguinetti M., Antonelli M.: Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. *Crit. Care.* 2011, **15**, R249.
40. Kanamori H., Kanemitsu K., Miyasaka T., Ameku K., Endo S., Aoyagi T., Inden K., Hatta M., Yamamoto N., Kunishima H., Yano H., Kaku K., Hirakata Y., Kaku M.: Measurement of (1-3)-BETA-D-Glucan Derived from Different Gauze Types. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009, **217**, 117–121.
41. Ahmad S., Khan Z.: Invasive candidiasis: A review of nonculture-based laboratory diagnostic methods. *Indian J. Med. Microbiol.* 2012, **30**, 264–269.
42. Held J., Kohlberger I., Rappold E., Busse Grawitz A., Häcker G.: Comparison of (1→3)-β-d-Glucan, Mannan/Anti-Mannan Antibodies, and Cand-Tec *Candida* Antigen as Serum Biomarkers for Candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 2013, **51**, 1158–1164.
43. Wingard J.R.: Have novel serum markers supplanted tissue diagnosis for invasive fungal infections in acute leukemia and transplantation? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2012, **25**, 487–491.
44. Schuetz A.N.: Invasive Fungal Infections. *Clin. Lab. Med.* 2013, **33**, 505–525.
45. Hoenigl M., Prattes J., Spiess B., Wagner J., Pruellner F., Raggam R.B., Posch V., Duettmann W., Hoenigl K., Wölfler A., Koidl C., Buzina W., Reinwald M., Thornton C.R., Krause R., Buchheidt D.: Performance of galactomannan, beta-d-glucan, *Aspergillus* lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2014, **52**, 2039–2045.
46. Mikulska M., Furfaro E., Del Bono V., Raiola A.M., Ratto S., Bacigalupo A., Viscoli C.: Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012, **67**, 1746–1748.
47. Fontana C., Gaziano R., Favaro M., Casalinuovo I., Pistoia E., Di Francesco P.: (1-3)-β-D-Glucan vs Galactomannan Antigen in Diagnosing Invasive Fungal Infections (IFIs). *Open Microbiol. J.* 2012, **6**, 70–73.

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