

Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Interní hematologická klinika Lékařské fakulty Masarykovy
univerzity a Fakultní nemocnice Brno

Habilitační práce

Diagnostika a terapie invazivních mykotických infekcí u
hematologických nemocných

MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D.

BRNO 2010

Obsah

1. ÚVOD.....	5
1.1. INVAZIVNÍ MYKOTICKÉ INFEKCE U HEMATOONKOLOGICKÝCH NEMOCNÝCH.....	5
1.2. PŘÍLOHY K ÚVODNÍ KAPITOLE.....	9
1.2.1. Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Křen L., Křikavová L., Mayer J.: Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice Postgraduální medicína, 9, 2007, 3: 240-252.....	10
1.2.2. Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Lochmanová J., Dvořáková M., Mayer J.: Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR - přednosti a úskalí. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 13, 2007, 5: 184-190.....	23
1.2.3. Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Lengerová M., Mayer J.: Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod. Vnitřní lékařství, 53, 2007, 9: 990-999.....	31
1.2.4. Ráčil, Z., Kocmanová, I., Weinbergerová, B., Winterová, J., Bohatá, Š., Mayer, J.: Léčba invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných. Farmakoterapie, 4, 2008, 2: 207-217.....	42
2. VÝZKUM NA POLI DIAGNOSTIKY A TERAPIE INVAZIVNÍCH MYKOTICKÝCH INFEKČÍ NA IHOK LF MU A FN BRNO	54
3. DETEKCE GALAKTOMANNANU V ČASNÉ DIAGNOSTICE INVAZIVNÍ ASPERGILÓZY.....	57
3.1. DETEKCE GALAKTOMANNANU – LITERÁRNÍ DATA	57
3.1.1. Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J.: Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 13, 2007, 5, 176-183.....	59
3.2. DETEKCE GALAKTOMANNANU – VLASTNÍ ZKUŠENOSTI.....	68
3.2.1. Ráčil, Z., Kocmanová, I., Wagnerová, B., Winterová, J., Lengerová, M., Moulis, M., Mayer, J.: Využití detekce galaktomannanu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematoonkologických nemocných. Vnitřní lékařství, 54, 2008, 1: 45- 52.....	69
4. IDENTIFIKACE MOŽNÝCH PŘÍČIN FALEŠNÉ POZITIVITY PLATELIA ASPERGILLUS ELISA TESTU	78
4.1. INTRAVENÓZNÍ PODÁNÍ PENICILINOVÝCH ANTIBIOTIK	78
4.2. APLIKACE ROZTOKU PLASMA-LYTE	79
4.3. PRŮNIK ANTIGENU Z GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU.....	80
4.4. PŘÍLOHY KE KAPITOLE	81
4.4.1. Ráčil, Z., Kocmanova, I., Langerova, M., Wintrova, J., Mayer, J.: Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia Aspergillus test	

	for Galactomannan detection in serum. Journal of Clinical Microbiology, 45, 2007, 9: 3141-3142.....	82
	4.4.2. Ráčil, Z., Kocmanova, I., Weinbergerova, B., Toskova, M., Winterova, J., Lengerova, M., Buresova, L., Timilsina, S. & Mayer, J. Mucositis does not lead to false-positivity of the Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 29, 2010, 7: 851-855	85
5.	1,3-β-D GLUKAN V DIAGNOSTICE INVAZIVNÍ ASPERGILÓZY A JINÝCH INVAZIVNÍCH MYKOTICKÝCH INFEKČÍ HEMATOONKOLOGICKÝCH NEMOCNÝCH.....	91
	5.1. DETEKCE 1,3-β-D GLUKAN – LITERÁRNÍ DATA.....	91
	5.1.1. Kocmanová, I., Ráčil, Z., Koukalová, D., et al.: Laboratorní stanovení 1,3-b-D glukanu a jeho využití v diagnostice invazivních mykóz. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 14, 2008, 3: 88-92.....	94
	5.2. DETEKCE 1,3-β-D GLUKAN – VLASTNÍ ZKUŠENOSTI	100
	5.2.1. Ráčil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I. & Mayer, J. Difficulties in using 1,3-beta-D glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal diseases in patients with hematological malignancies - high frequency of false positive results and their analysis. J Med Microbiol., 59, 2010, 9: 1016-1022.....	102
	5.2.2. Ráčil, Z., Kocmanova, I., Weinbergerova, B., Winterova, J., Lengerova, M., Hrcirova, K., Mayer, J.: Detekce 1,3-β-D glukanu v diagnostice invazivních mykotických infekcí u nemocných s hematologickou malignitou: přínos metody ve skríningu invazivních mykóz a v konfirmaci galaktomanan pozitivních. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 15, 2009, 2: 48-57	110
6.	EPIDEMIOLOGIE, DIAGNOSTIKA A LÉČEBNÉ VÝSLEDKY PŘÍPADŮ INVAZIVNÍCH ASPERGILOVÝCH INFEKČÍ NA INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÉ KLINICE LF MU A FN BRNO	121
	6.1.1. Ráčil, Z., Mayer, J., Kocmanová, I., Wagnerová, B., Winterová, J., Folber, F., Lengerová, M., Moulis, M., Žáčková, D., Šmardová, L., Janíková, A., Navrátil, M., Dvořáková, D., Vorlíček, J.: Invazivní aspergilové infekce u hematoonkologických nemocných: význam jednotlivých diagnostických metod, léčebných postupů a nástin finanční náročnosti léčby. Vnitřní lékařství, 54, 2008, 2: 24-36.....	123
7.	ČASNÁ DIAGNOSTIKA INVAZIVNÍCH ZYGOMYKÓZ.....	136
	7.1. EPIDEMIOLOGIE A MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY – LITERÁRNÍ PŘEHLED	136
	7.2. INVAZIVNÍ ZYGOMYKÓZY NA INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÉ KLINICE LF MU A FN BRNO – MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA	137

	7.2.1. Hrcirova, K., Lengerova, M., Kocmanova, I., Racil, Z., Volfova, P., Palousova, D., Moulis, M., Weinbergerova, B., Winterova, J., Toskova, M., Pospisilova, S. & Mayer, J. Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples Using High Resolution Melt Analysis. J Clin Microbiol., 48, 2010, 9: 3392-3394.....	140
8.	ZÁVĚR.....	144
9.	LITERATURA (KTERÁ NENÍ SOUČÁSTÍ PUBLIKOVANÝCH PRACÍ ZAČLENĚNÝCH DO TEXTU)	145

1. Úvod

1.1. Invazivní mykotické infekce u hematologických nemocných

Infekce obecně jsou vedle rezistentní nádorové choroby druhou nejčastější příčinou smrti u nemocných s hematologickou malignitou ⁽¹⁾. Příčin jejich zvýšené náchylnosti k těmto komplikacím je celá řada ^(2, 3).

Jedny z nejzávažnějších infekcí, se kterými se můžeme u imunokompromitovaných nemocných s hematologickým nádorovým onemocněním setkat, jsou invazivní mykózy. Ve srovnání s bakteriálními infekcemi je jejich výskyt sice jednoznačně méně častý, na druhou stranu jejich incidence dramaticky narůstá a morbidita a mortalita s nimi spojená je výrazně vyšší ^(4, 5).

V posledních několika letech jsme svědky významných změn v epidemiologii, diagnostice a léčbě invazivních mykotických infekcí ⁽⁶⁾.

Epidemiologie

Během posledních 10 let došlo k významnému nárůstu frekvence invazivních mykotických infekcí u hematologických pacientů ⁽⁴⁾. Hlavní příčinou je narůstající počet nemocných, kteří jsou léčeni agresivními protinádorovými léky a/nebo podstupují výrazně imunosuprimující terapeutické postupy (alogenní transplantace krvetvorné tkáně, léčba primárně rezistentních onemocnění, používání monoklonálních protilátek aj.). Incidence invazivních mykotických infekcí pak závisí na typu hematologického onemocnění, intenzitě a typu protinádorové léčby. Pohybuje se od méně než 0,5% u onemocnění jako je chronická lymfatická leukémie, mnohočetný myelom nebo Hodgkinské i non-Hodgkinské lymfomy přes 4% u nemocných s akutní lymfoblastickou leukémií až po incidenci 7% u pacientů s akutní myeloidní leukémií ⁽⁷⁾. Podobně je frekvence invazivních mykotických infekcí u autologních transplantací pod 2% v porovnání s alogenními, kde se pohybuje mezi 15-25% ⁽³⁾.

Nejčastějšími původci jsou stále zástupci rodů *Candida* a *Aspergillus*, nicméně se významně změnil poměr v jejich zastoupení. Zatímco výskyt invazivních kandidóz od konce minulého tisíciletí trvale klesá (především díky masivnímu rozšíření flukonazolové profylaxe), počet infekcí způsobených vláknitými houbami významně narůstá⁽⁸⁻¹⁰⁾. V absolutní většině se jedná o invazivní aspergilózu, která je dnes nejfrekventnější invazivní mykotickou infekcí u vysoce rizikových hematoonkologických nemocných – pacientů s akutní myeloidní leukémií a po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně^(11 2004, 12). Navíc stále nabývají na významu infekce vyvolané dalšími vláknitými houbami, zejména zygomycetami (*Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp.). Jejich výskyt je sice stále raritní, ale během posledních několika let se významně zvýšil^(13, 14).

Podrobnou analýzu epidemiologie a rizikových faktorů předkládá souhrnná práce autora s názvem „Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v diagnostice a epidemiologii“ která je přílohou č.1 této kapitoly.

Stanovení diagnózy invazivních mykotických infekcí

Jednoznačně největším problémem diagnostiky je nedostatečná senzitivita „konvenčních“ diagnostických metod – tzn. korelace klinických a/nebo radiologických příznaků s kulturačním a/nebo histologickým průkazem mykotického patogena v primárně sterilním materiálu (krev, biopsie). Některé klinické příznaky a radiologické nálezy mohou být u nemocných s omezenou možností zánětlivé odpovědi pozdní a nespecifické. Také kulturační vyšetření jsou často negativní nebo pozdně pozitivní a histopatologická diagnóza, která vyžaduje invazivní proceduru k získání vzorku tkáně, je u kritických a pancytopenických pacientů jen velmi obtížně proveditelná⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Všechny zmíněné limitace vedly k prudkému rozvoji tzv. „nekultivačních“ diagnostických metod, které jsou zaměřeny zejména na detekci povrchových antigenů hub nebo fungální DNA. Jednoznačně největších pokroků bylo dosaženo v časně diagnostice invazivní aspergilózy. U invazivní kandidózy jsou nekultivační metody prozatím málo přesvědčivé a u infekcí vyvolaných ostatními houbami stále na úrovni výzkumu. Je však nutno vždy zdůraznit, že konvenční

mikrobiologické a histologické diagnostické přístupy jsou stále základem pro stanovení definitivní diagnózy hlubokých mykotických infekcí a slouží jako konfirmační postupy při posuzování přínosu nových diagnostických postupů⁽¹⁵⁾.

Podrobné informace o možnostech diagnostiky jednotlivých invazivních mykóz jsou podány v přehledné práci autora „Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v diagnostice a epidemiologii“, která je přílohou č.1 této kapitoly.

Nekultivační metody použitelné pro diagnostiku hlubokých mykóz

Jak bylo řečeno výše, limitace konvenčních diagnostických přístupů vedla k významnému rozvoji “nekultivačních” metod. Jejich cílem je zvýšit pravděpodobnost stanovení správné diagnózy u nemocných v riziku nebo s podezřením na infekci. V obou případech je výsledkem zkrácení doby do definitivní diagnózy a časné nasazení cílené tzv. „pre-emptivní“ antimykotické léčby.

Platí, že ideální marker pro nekultivační diagnostiku invazivních mykotických infekcí by měl: a) být schopen zachytit infekci v její časné fázi; b) být spojen s infekcí ne s pouhou kolonizací mikroorganismem; c) být specifický pro patogen, který je detekován; d) neměl by zkříženě reagovat s lidským DNA, respektive DNA jiných mikroorganismů; e) test by měl být technicky jednoduše proveditelný a měl by být standardizován a validován⁽¹⁸⁾.

Nekultivační metody používané pro časnou diagnostiku invazivních mykotických infekcí lze obecně dělit na molekulárně biologické a sérologické (imunologické).

Metody molekulárně biologické využívají možnosti detekovat nukleové kyseliny mykotických patogenů pomocí různých variant polymerázové řetězové reakce (PCR). Mají svůj jednoznačný význam ve zrychlení a zpřesnění identifikace hub a jejich záchytu v biotických materiálech. Ovšem využití je omezené, protože doposud nebyla standardizována optimální metodika, výsledky mezilaboratorního srovnávání jsou nepřesvědčivé. Výsledkem je, že na základě positivity PCR

metod zatím nelze zahájit preemptivní terapii^(15, 19, 20). Jednotlivé aspekty molekulárně biologické diagnostiky invazivní aspergilózy jsou analyzovány v přehledném článku „Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR – přednosti a úskalí“, který je přílohou č.2. Velký důraz je ale také kladen na časnou diagnostiku zygomykóz – a dosud nejvíce nadějným postupem je právě molekulárně biologické vyšetření materiálu získaného bronchoalveolární laváží.

Druhá skupina nekultivačních metod využívá detekci antigenů (nejčastěji antigenů buněčné stěny) hub nebo protilátek proti nim v séru nebo jiných tělesných tekutinách. Tyto metody jsou obecně nazývané metodami sérologickými (imunologickými). V jejich rámci byla testována celá řada přístupů, nicméně většího uplatnění a klinického významu dosáhlo pouze několik z nich: detekce antigenu galaktomannanu pro invazivní aspergilózu, detekce mannanu a protilátek proti němu (antimannanu) v diagnostice invazivní kandidózy a detekce 1,3-β-D glukanu, který je „panfungálním“ antigenem^(6, 18, 21-26).

Podrobné souhrnné informace o jednotlivých sérologických metodách a jejich využitelnosti pro časnou diagnostiku invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných byly publikovány autorem ve formě přehledné práce „Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod“, které je přílohou č.3 této kapitoly.

Léčba invazivních mykotických infekcí

Po mnoho let byl jediným dostupným lékem pro léčbu invazivních mykóz amfotericin B deoxycholát. V posledních 10–20 letech jsme však svědky významných změn i na poli antimykotik – na trh vstoupila nová léková skupina azolových antimykotik - její zástupci flukonazol, následně itraconazol, vorikonazol a relativně recentně posakonazol; amfotericin B byl inkorporován do tří forem lipidových nosičů, s cílem snížit toxicitu původní molekuly; a konečně byla vyvinuta zcela nová léková skupina – echinokandiny, která v současné době čítá již tři zástupce. Řada nových léků má menší toxicitu než původní molekula konvenčního amfotericinu B (C-AMB) a některé z nich

v určitých případech také větší efektivitu ⁽²⁷⁾. Dostupnost nových léčebných možností změnila tradiční antimykotické postupy a alespoň u části invazivních mykóz také zlepšila výsledky léčby a prognózu nemocných.

Jednotlivé skupiny antimykotik včetně jejich farmakokinetiky a standardní postupy v léčbě nejčastějších forem invazivních mykotických infekcí jsou detailně analyzovány v přehledné práci autora s názvem „Léčba invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných“, která je přílohou č. 4 této úvodní části.

1.2. Přílohy k úvodní kapitole

- 1.2.1. Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Křen L., Křikavová L., Mayer J.:
Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny
v epidemiologii a diagnostice Postgraduální medicína, 9, 2007, 3: 240-252**

Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice

¹MUDr. Zdeněk Ráčil, ²Mgr. Iva Kocmanová, ¹MUDr. Barbora Wágnerová,
³MUDr. Leoš Křen, Ph.D., ⁴MUDr. Lucie Křikavová, ¹prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.

¹Masarykova univerzita v Brně, LF MU a FN, Interní hematoonkologická klinika

²Masarykova univerzita v Brně, LF MU a FN, Oddělení klinické mikrobiologie

³Masarykova univerzita v Brně, LF MU a FN, Ústav patologie

⁴Masarykova univerzita v Brně, LF MU a FN, Radiologická klinika

Souhrn

Invazivní mykotické infekce představují závažnou infekční komplikaci imunokompromitovaných nemocných s nádorovým onemocněním. Ve srovnání s bakteriálními infekcemi je jejich výskyt jednoznačně méně častý, na druhou stranu incidence invazivních mykotických infekcí narůstá a morbidita a mortalita s nimi spojená je výrazně vyšší, než je tomu u infekcí bakteriálních. Přestože invazivní mykózy postihují celou skupinu nemocných s nádorovým onemocněním, je jejich výskyt u pacientů se solidními nádory spíše vzácný. Naopak velice časté jsou u nemocných s hematologickými malignitami, a to především je-li součástí léčebného režimu transplantace krevtvořné tkáně.^(1,2)

Předcházející dvě desetiletí přinesly významné změny v epidemiologii invazivních mykóz a během posledních několika málo let pak došlo i ke značným pokrokům v diagnostice a léčbě těchto velmi závažných infekcí.

Klíčová slova

invazivní mykotické infekce • rizikové faktory • klinické příznaky • diagnostika

Původci invazivních mykotických infekcí

Více než devadesát procent invazivních mykotických infekcí u nemocných s nádorovým onemocněním je vyvoláno kmeny *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. Nicméně stále častěji se můžeme setkat i s infekcemi vyvolanými takzvanými vzácnými mykotickými patogeny, jako jsou především mikromycety třídy *Zygomycetes* (*Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp.), *Fusarium* spp., a eventuálně i některé další, vysloveně vzácné houby (*Altemaria* spp., *Scedosporium* spp. aj.).⁽²⁾ Přestože je popsáno přes 100 druhů kandid, více než 95 % všech invazivních infekcí vyvolává pouze 5 z nich: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Kmeny kvasinek jsou

běžnými komenzály povrchu lidského těla (především sliznic trávicího ústrojí). Není proto překvapením, že většina případů invazivní kandidózy u onkologických, a zvláště pak hematoonkologických nemocných je infekcí endogenní (prostup kolonizujících kmenů kvasinek poškozenou sliznicí při mukozitidě do cirkulace). Může však jít i o infekci exogenní, jak je tomu u většiny kvasinkových infekcí centrálních žilních katétrů (přenos především rukama personálu).^(1,2)

Podobně jako u kandid je také dokumentováno kolem 100 aspergilových rodů, ale naprostou většinu invazivních infekcí u lidí vyvolává jen několik z nich: *A. fumigatus*, méně častěji pak *A. flavus*, *A. niger* a *A. terreus*.⁽¹⁾ Aspergilové konidie jsou ubikvitní a vyskytují se ve vzduchu, prachu a tlející půdě. V nemocničním prostředí je pak můžeme nacházet ve vzduchu, sprchách, rezervoárech vody a květináčích. Jejich množství ve vzduchu se výrazně zvyšuje při různých rekonstrukcích a stavebních úpravách v nemocnicích a jejich okolí. Invazivní aspergilóza je

tedy infekcí exogenní, kdy infekci u imunokompromitovaných nemocných vyvolají inhalované konidie.^(1, 2) Také invazivní zygomykóza a fusarióza jsou infekce exogenní. Konidie zygomycet a fusárií jsou opět ubikvitní a vyskytují se v prachu, stojící vodě a tlející vegetaci. K infekci dochází inhalací, ingescí, eventuálně i kontaminací ran. U zygomykóz dominuje přenos inhalační cestou a podobně jako u aspergilových kmenů může dojít k nozokomiálnímu rozšíření zygomycet klimatizací a opět především v období rekonstrukčních prací. U fusariózy je vedle inhalační cesty velmi častou branou vstupu infekce do organismu kontaminace drobných kožních poranění.^(1, 3)

Epidemiologie

Během posledních dvou dekád došlo k významnému nárůstu frekvence výskytu invazivních mykotických infekcí.⁽¹⁾ Příčinou tohoto stavu je neustále narůstající počet závažně imunokompromitovaných nemocných. Od roku 1980 výrazně vzrostl počet pacientů se solidními tumory a hematologickými onemocněními, kteří jsou léčeni agresivní chemoterapií vedoucí k neutropenii, narostlo významně množství transplantací krevetvorné tkáně (především pak alogenních transplantací krevetvorné tkáně), zvýšil se počet transplantací solidních orgánů, více nemocných je léčeno imunosupresivními léky z nejrůznějších indikací a jsou léčeni i nemocní ve vyšších věkových skupinách.⁽¹⁾ Frekvence výskytu invazivních mykotických infekcí je velmi malá u nemocných se solidními tumory a pohybuje se pod 2 %. Riziko vzniku mykotické infekce je zde významně spojeno s intenzitou léčby (s nejvyšší frekvencí invazivních mykóz, která se však pohybuje maximálně kolem 2,5 %, se setkáváme u nádorových one-

mocnění plic, jícnu, žlučníku a ovarií).⁽⁴⁾ Absolutní většinu případů (> 50 %) tvoří invazivní kandidóza, a to i v současnosti, na rozdíl od nemocných léčených pro hematologickou malignitu. Ve více než 2/3 je způsobena kmeny *Candida albicans*. Naopak infekce vyvolané vláknitými houbami jsou u těchto nemocných velmi vzácné.^(4, 5)

Zcela odlišnou situaci nacházíme u pacientů s hematologickou malignitou. Zde se v závislosti na charakteru onemocnění, respektive charakteru a intenzitě protinádorové léčby, pohybuje frekvence invazivních mykotických infekcí od 2 % (např. autologní transplantace krevetvorné tkáně) až po 15–25 % (např. indukční léčba akutní leukémie nebo alogenní transplantace krevetvorné tkáně).⁽⁶⁾

Právě u této skupiny onkologických nemocných došlo k největším změnám ve spektru invazivních mykóz. Od začátku devadesátých let minulého století, kdy se rozšířila masivní profylaxe flukonazolem u hematologických nemocných, trvale klesá incidence invazivních kandidóz.^(4, 7, 8) Tento pokles je však způsoben pouze snížením výskytu kandidémi vyvolaných flukonazol citlivými kmeny kvasinek (především *Candida albicans*). Naopak ve stejné době došlo k významnému procentuálnímu nárůstu infekcí vyvolaných kmeny s vysokou rezistencí na flukonazol (*C. glabrata* a *C. krusei*), které jsou v současné době příčinou více než poloviny invazivních kandidóz.⁽⁶⁾ Rezistence těchto kmenů na flukonazol se však v různých zemích (ale i v různých nemocničních zařízeních) liší a v České republice je přibližně 20–30 % kmenů *Candida glabrata* a 90–95 % kmenů *Candida krusei* na flukonazol rezistentní. Profylaxe flukonazolem a pokles výskytu invazivních kandidových infekcí u hematologických nemocných za posled-

ních 20 let jsou však doprovázeny výrazným nárůstem incidence invazivních mykotických infekcí vyvolaných vláknitými houbami.^(4, 7, 8) Absolutní většinu těchto infekcí představuje invazivní aspergilóza, která je v současné době nejčastější mykózou u nemocných po alogenní transplantaci krevetvorné tkáně.^(9, 10) Incidence infekcí vyvolaných ostatními vláknitými houbami, a to především invazivní zygomykózy (*Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp.) a invazivní fusariózy (*Fusarium* spp.), je sice nízká, ale během posledních několika let zvláště ve velkých transplantčních centrech významně narostla.⁽¹¹⁾ (Tab. 1)

Rizikové faktory

Rizikové faktory invazivní kandidózy

Pacienti s aktivním nádorovým onemocněním patří z důvodů imunodeficientního stavu způsobeného samotnou nádorovou chorobou (neutropenie, poškození integrity sliznic způsobené tímto onemocněním a další) mezi jedince s vysokým rizikem vzniku nozokomiální kandidémie. Celá řada léčebných postupů (kortikoterapie, alemtuzumab, vysokodávkovaný cytosinarabozid, zavedení centrálního žilního katétru) a komplikací spojených s nádorovou chorobou (renální selhání, nutnost chirurgického výkonu, pobyt na JIP) a protinádorovou léčbou (neutropenie, mukozitida, GvHD, nutnost antibiotické léčby, kolonizace kmeny kvasinek na sliznicích) pak toto riziko dále významně zvyšuje. Ve srovnání s onkologickými nemocnými, kteří nemají výše zmíněné přídatné rizikové faktory, pak riziko invazivní kandidózy u nemocných s malignitou každá třída antibiotik zvyšuje 2krát, centrální žilní katétr 7krát, mnohočetná kolonizace kvasinkami 10krát

Tab. 1 – Incidence invazivních mykotických infekcí u jednotlivých skupin onkologických nemocných^(3, 4, 6)

Onkologické onemocnění/léčba	Invazivní mykózy celkem	Aspergilóza	Incidence		Vzácné vláknité houby (zygomykóza, fusarióza a další)
			Kandidóza		
			před zavedením profylaxe azoly	po zavedení profylaxe azoly	
alogenní transplantace krevetvorné tkáně	15–25 %	10–20 %	15–25 %	< 5 %	vzácné
akutní leukémie	10–15 %	10 %	15–20 %	< 5 %	vzácné
autologní transplantace krevetvorné tkáně	2–6 %	< 2 %	10 %	< 5 %	velmi vzácné
ostatní hematologické malignity a solidní tumory	< 5 %	vzácné	10 %	< 2 %	velmi vzácné

Tab. 2 – Rizikové faktory invazivní kandidózy^(1, 6, 20)

neutropenie
mukozitida
centrální žilní katétr
pobyt na JIP
věk > 70
chirurgický zákrok na gastrointestinálním traktu
podávání širokospektrých antibiotik
renální selhání
parenterální výživa
reakce štěpu proti hostiteli (GvHD = Graft versus Host Disease)
kolonizace sliznic kvasinkami
protinádorová léčba
kortikoterapie (>1 mg/kg/den po dobu > 3 týdnů)
nukleotidové analogy
vysokodávkovaný cytosinarabozid
alemtuzumab

Tab. 3 – Rizikové faktory invazivní aspergilózy^(1, 6, 10, 20)

neutropenie – zvláště hluboká (neutrofilů < 0,1x 10 ⁹ /l) a prolongovaná (>10 dnů)
reakce štěpu proti hostiteli (GvHD = Graft versus Host Disease) stupně III–IV
alogenní transplantace krvetvorné tkáně se štěpem od HLA neshodného příbuzeneckého dárce nebo se štěpem od nepříbuzeneckého dárce
věk nad 40 let
reaktivace CMV po transplantaci krvetvorné tkáně
kolonizace dýchacích cest kmeny aspergillů u vysoce rizikových nemocných
protinádorová léčba/nebo léčba GvHD
kortikoterapie (> 1 mg/kg/den po dobu > 3 týdnů)
infiximab
alemtuzumab

a akutní dialýza 18krát. Pobyt na JIP pak významně usnadňuje přenos kmenů kvasinek mezi nemocnými, a je proto důležitým přídatným rizikovým faktorem.⁽¹⁾ Již z těchto rizikových faktorů je dobře viditelné, že preventivní opatření (především redukce používání širokospektrých antibiotik, zlepšení péče o žilní katetry a důsledné dodržování postupů zabráňujících přenosu infekce rukama personálu) mohou z velké části snížit riziko invazivní kandidózy.⁽¹⁾ (Tab. 2)

Rizikové faktory invazivní aspergilózy a infekcí vyvolaných ostatními vzácnými vláknitými houbami

Invazivní aspergilóza postihuje daleko menší spektrum pacientů ve srovnání s invazivní kandidózou. Dvě třetiny nemocných s invazivní aspergilózou tvoří pacienti s hematologickou malignitou (včetně nemocných léčených transplantací krvetvorné tkáně). Největším rizikovým faktorem pro její vznik je tedy hematologická malignita a její léčba.⁽¹⁾ Další faktory zvyšující riziko u této skupiny nemocných ukazuje Tab. 3. Pro invazivní zygomykózu a fusariózu

opět platí, že nejvýznamnějším rizikovým faktorem je hematologická malignita včetně transplantace krvetvorné tkáně. Riziko invazivní zygomykózy pak dále zvyšuje GvHD a její léčba, dlouhodobá kortikoterapie, terapie desferoxaminem, diabetická ketoacidóza, renální selhání a expozice rekonstrukčním pracím v nemocnici. Poslední práce také ukazují na určité zvýšené riziko zygomykózy při dlouhodobém podávání vorikonazolu, širokospektrého antimykotika, které však na zygomykózu není účinné.^(1, 3)

Hlavními rizikovými faktory invazivní fusariózy jsou neutropenie a reakce štěpu proti hostiteli a její léčba, zejména je-li použito vysokých dávek kortikoidů.^(1, 3, 12)

Klinické projevy

Klinické projevy invazivní kandidózy

Invazivní kandidóza probíhá ve většině případů pod obrazem izolované kandidémie. Klinické manifestace kandidémie jsou však velmi nespecifické. Většinou je jediným příznakem přetrvávající horečka, eventuálně septický stav nereagující na podávání širokospektrých antibiotik.⁽¹³⁾

Právě ze znalosti této situace vychází princip empirické antimykotické léčby febrilní neutropenie – horečky u neutropenických nemocných nereagující na 5–7denní podávání širokospektrých antibiotik.

Přibližně u 15 % onkologických nemocných s neutropenií se v průběhu invazivní kandidózy objeví makronodulární rash. Nejčastěji je lokalizován na končetinách, ale může být i celotělový a často je zaměňován za kožní polékovou alergickou reakci.⁽¹³⁾ Histologické vyšetření těchto morf pak prokáže v hlubších vrstvách dermis přítomnost blastokonidií a pseudohyfy.⁽¹⁴⁾

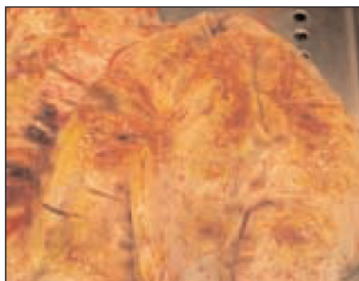
Hematogenní cestou může infekce diseminovat do nejrůznějších tkání a orgánů. Teoreticky může dojít k postižení jakékoliv tkáně, a potom tedy k rozvoji příznaků vyplývajících z postižení těchto orgánů. U neutropenických nemocných, většinou s dlouhodobou hlubokou neutropenií (např. u nemocných léčených pro akutní leukémii), je nejčastější formou této tkáňové diseminace invazivní kandidózy postižení jater, sleziny a v některých případech i ledvin – tzv. hepatosplenická kandidóza.⁽¹³⁾

Klinické projevy invazivní aspergilózy

Vzhledem k inhalační formě infekce začíná invazivní aspergilóza ve většině případů pod obrazem pneumonie, jen přibližně v 5 % případů pak pod obrazem sinusitidy. Infekce může následně opět diseminovat hematogenní cestou do nejrůznějších orgánů (játra, CNS, ledviny). U hematologických nemocných a především pak u pacientů po transplantaci krvetvorné tkáně k této diseminaci dochází ve 30–50 % případů.⁽¹⁵⁾ Obr. 1, 2.

Klinické projevy invazivní zygomykózy a fusariózy

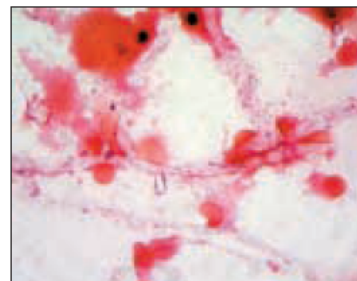
Invazivní zygomykóza typicky postihuje rinocerebrální oblast. U neutropenických nemocných se však nejčastěji setkáme s formou plicní. Méně časté je pak postižení kožní a gastrointestinální. Typickým projevem zygomykózy je vaskulární (především arteriální) invaze a následná trombotizace cév s infarzací a nekrotizací okolních tkání. V okolí postižení se pak vytváří pyogenní reakce. U hematologických nemocných nejčastější, tzv. plicní forma invazivní zygomykózy je navíc doprovázena febrilním stavem a angioin vazou vede k rychlé diseminaci infekce do kontralaterální plice a dalších orgánů. Velmi charakteristickou vlastností této inva-



Obr. 1 – Diseminovaná invazivní aspergilóza – postižení mozku



Obr. 2 – Diseminovaná invazivní aspergilóza – postižení myokardu (šipky ukazují místa postižení)



Obr. 3 – Přímá mikroskopie barvení podle Grama – *Aspergillus* spp. (materiál sputum)

zvířní mykotické infekce je extrémně rychlá progresse většinou s fulminantním koncem.⁽¹⁰⁾ Klinické formy pak ukazuje Tab. 4. Zatímco u imunokompetentních nemocných fusarióza postihuje většinou pouze místo vstupu mikroorganismu (keratitida, onychomykóza, kožní infekce), u 75 % nemocných s hematologickou malignitou infekce z místa vstupu do organismu (kožní léze, dýchací cesty) velice rychle hematogenně diseminuje.⁽¹¹⁾ Při diseminaci infekce může být postižen prakticky jakýkoliv orgán, nicméně nejčastěji se setkáme s postižením kůže (70–90 %), plic a paranazálních sinů (70–80 %).⁽¹²⁾ Onemocnění se pak klinicky manifestuje jako febrilní stav nereagující na antibiotickou léčbu, většinou současně s pneumonií, sinusitidou nebo celulitidou v místě kožní léze, pokud tato byla branou

vstupu infekce. Jak je zmíněno výše, u většiny nemocných dochází při diseminaci charakteristicky k rozvoji mnohčetných bolestivých kožních lézí (drobné ulcerující léze, podkožní noduly, erytém), které mohou vznikat po celém těle, predilekčně však na končetinách.⁽¹²⁾ Klinický průběh onemocnění je opět většinou velice rychlý.

Diagnostika

Historicky byla diagnóza invazivní mykotické infekce limitovaná korelací klinických příznaků s kulturačním nebo histologickým průkazem patogenu ve sterilním klinickém materiálu. Příznaky invazivních mykóz jsou však u imunokompromitovaných nemocných s omezenou možností zánětlivé odpovědi většinou pozdní

a nespecifické. Kulturační vyšetření ze sterilních materiálů je často negativní anebo pozdně pozitivní a histopatologická diagnóza, která vyžaduje invazivní proceduru k získání vzorku tkáně, je u kritických a pancytopenických pacientů jen velmi obtížně proveditelná.^(17, 18) Nárůst invazivních mykotických infekcí a jejich vysoká mortalita však vedly k požadavku časnějšího stanovení diagnózy, a tak i k časnějšímu zahájení antimykotické léčby s cílem zlepšit prognózu nemocných s touto infekcí. Proto došlo v posledním desetiletí k rozvoji sérologických a molekulárně biologických metod (tzv. nekultivačních metod), které tuto diagnostiku umožňují. Jednoznačně největších pokroků bylo v tomto směru dosaženo v časné diagnostice invazivní aspergilózy. U invazivní kandidózy jsou nekultivační metody prozatím méně přesvědčivé a u infekcí vyvolaných ostatními vláknitými houbami stále na úrovni výzkumu. Pořád ale platí, že konvenční mikrobiologické a histologické diagnostické přístupy jsou základním kamenem pro definitivní stanovení diagnózy invazivní mykotické infekce.⁽¹⁷⁾ Úspěšná diagnóza a léčba invazivních mykóz tedy jednoznačně vyžaduje týmový přístup zahrnující spolupráci kliniků, mikrobiologů, molekulárních biologů a patologů.

Metody pro diagnózu invazivních mykotických infekcí

Konvenční mikrobiologické metody

Přímá mikroskopie. Přímá mikroskopie klinických materiálů je základním a nejrychlejším krokem pro diagnostiku invazivních mykóz. Může přinést první předběžnou informaci o přítomnosti kvasinek nebo plísní v klinickém materiálu a v některých případech je možné podle morfologie struktur orientačně určit i pravděpodobného původce infekce. Při přímé mikroskopii je k barvení nátěrů z odebraných biologických vzorků používáno

Tab. 4 – Klinické formy invazivní zygomykózy a jejich projevy⁽¹⁶⁾

rinocerebrální forma	nejčastější klinická forma (typicky postihuje nemocné s diabetickou ketoacidózou)
	příznaky podobné sinusitidě (bolesti obličeje, očí); následně dochází k příznakům z rychlé progresse do struktur obličeje a orbity
	teploty nemusí být vždy přítomny
	častou komplikací je trombóza kavernózních sinů a karotid
plicní forma	nejčastější forma onemocnění u pacientů s hematologickou malignitou
	projevuje se nespecifickými příznaky progredující pneumonie – horečka, kašel, dušnost; po angioinvasi může vzniknout hemoptýza
gastrointestinální forma	typicky postihuje nemocné s těžkou malnutricí
	nejčastěji postihuje žaludek, ileum, colon
	klinický obraz odpovídá příznakům z intraabdominálního abscesu
kožní forma	vzniká v místech drobných poranění, hmyzího vpichu, popálenin
	dochází k rychlé progredující destrukci kůže a k rychlému šíření do podkožních tkání
diseminovaná forma	nejčastěji vzniká hematogenní diseminací plicní formy

Tab. 5 – Charakteristická mikroskopická morfologie nejvýznamnějších mykotických patogenů⁽¹⁷⁾

Mykotický patogen	Charakteristická mikroskopická morfologie
<i>Candida</i> spp.	oválné pučící kvasinky 2–6 µm, možnost přítomnosti pseudohyfů a v některých případech i skutečných septovaných hyfů
<i>Aspergillus</i> spp.	septované dychotomicky se větvcí hyfy uniformní šíře (3–6 µm), v kavitách mohou být viditelné i hlavičky konidií
zygomycózy	široké, tenkostěnné, aseptované nebo velmi řídké septované hyfy šíře 6–25 µm, okraje hyfů jsou nerovnoběžné a větvení je nepravidelné
<i>Fusarium</i> spp.	septované, pravidelně se větvcí hyfy s pravidelným okrajem

Tab. 6 – Příčiny falešné pozitivita a negativita při detekci mannanu a antimannanu⁽¹⁹⁾

Mannan	
Falešná pozitivita	
není popisována	
Falešná negativita	
infekce <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. kefyr</i>	slabší vazba mezi protilátkou v testu s mannanem těchto kmenů (různá exprese epitopů)
nedostatečná frekvence odběrů	rychlá eliminace
vysoký titer protilátek proti mannanu	rychlejší eliminace
Antimannan	
Falešná pozitivita	
kolonizace	imunitní odpověď na antigeny kolonizujících kvasinek
Falešná negativita	
imunosuprese	nedostatečná tvorba protilátek

Tab. 7 – Příčiny falešné pozitivita a negativita při detekci galaktomannanu⁽¹⁸⁾

Galaktomannan	
Falešná pozitivita	
GvHD (reakce štěpu proti hostiteli)	neznámá (pravděpodobně tvorba autoprotilátek)
alogenní transplantace krvevorné tkáně	poškození integrity GIT při mukozitidě a průnik galaktomannanu ze stravy
předčasně narození novorozenci	neznámá (pravděpodobně kolonizace <i>Bifidobacterium</i> spp. a průnik přes nezralou sliznici GIT)
kontaminace vatou	společná glukopyronáza
<i>Bifidobacterium</i> spp. (kolonizace)	molekulární podobnost povrchových antigenů
<i>Penicillium marneffei</i> (infekce nebo kontaminace vzorku)	sdílený galaktomannan
antibiotika (piperacilin/tazobaktam, co-amoxicilin, ampicilin)	příměs galaktomannanu
Falešná negativita	
protilátky proti galaktomannanu	tvorba imunokomplexů a zrychlená eliminace
malá frekvence odběrů	kolísání galaktomannanu během dne a během dnů
profylaxe antimykotiky s účinností na <i>Aspergillus</i> spp.	nižší load mykotického patogenu = nižší množství uvolněného galaktomannanu



Obr. 4 – Kultivace – *Candida albicans*



Obr. 5 – Kultivace – *Aspergillus fumigatus*

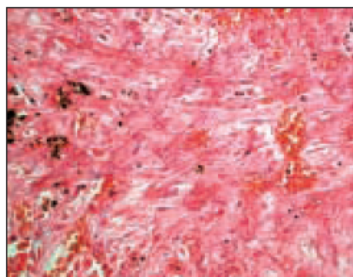
především barvení podle Grama nebo Giemsa a velice užitečné je i barvení za použití fluorescenčních barviv (např. Calcofluor), která se specificky vážou na chitin ve stěnách hub.

Velkou výhodou přímé mikroskopie je rychlost (výsledky mohou být k dispozici již do 1 hodiny od odběru materiálu). Nevýhodou tohoto vyšetření je relativně malá senzitivita, která je nižší než u kultivace, a tedy negativita přímé mikroskopie materiálu nevyklučuje mykotickou infekci.⁽¹⁷⁾ Obr. 3.

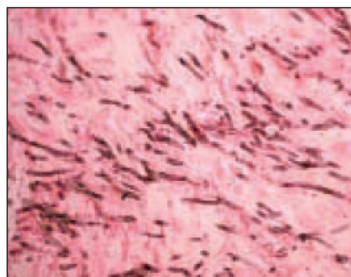
Kultivace. Kultivace kvasinek a plísní z biologických materiálů má pro diagnózu invazivních mykóz zásadní význam. Umožňuje přesnou identifikaci patogenů a následně je navíc možné vyšetření jejich citlivosti k antimykotikům.

Kultivační průkaz mykotických patogenů má však několik limitujících faktorů. Prvním z nich je obecná vlastnost kvasinek a plísní, kterou je obvykle pomalejší růst, než je tomu u většiny bakterií. Rychlost růstu je odlišná u různých hub. Zatímco kvasinky lze kultivačně prokázat již během několika dnů, u vláknitých hub může být výsledek vyšetření k dispozici v intervalu až několika týdnů. Kultivační průkaz mykóz, zvláště pak vláknitých hub, je tedy většinou pozdní a invazivní mykóza je v období kultivačního průkazu většinou již ve velmi pokročilém stavu.⁽¹⁷⁾

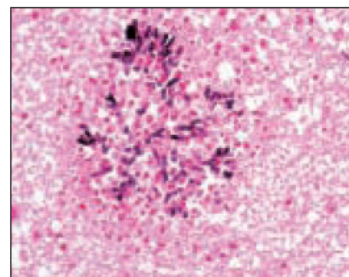
Druhým limitujícím faktorem kultivace je



Obr. 6 – Histologie – barvení hematoxylin-eozinem. Invazivní aspergilóza – postižení plic.



Obr. 7 – Histologie – barvení podle Grocottova. Invazivní aspergilóza – postižení plic – stejný pacient jako na Obr. 6.



Obr. 8 – Histologie – barvení podle Grocottova. Invazivní aspergilóza – postižení CNS – stejný pacient jako na Obr. 1.

prediktivní hodnota průkazu mykotického patogenu v klinickém materiálu. Kultivační průkaz kvasinek nebo plísní v primárně sterilním materiálu (hemokultura, mozkomíšni mok, biopsie tkání) má téměř 100% prediktivní hodnotu a je-li v kontextu s klinickým stavem nemocného, pak je diagnóza invazivní mykózy jistá. Ale i v těchto případech je nutné myslet na možnost kontaminace (houby se běžně nachází v prostředí). Zatímco například průkaz kmenů *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. nebo *Fusarium* spp. z hemokultury je s vysokou pravděpodobností signifikantní, kultivační průkaz kmenů *Aspergillus* spp. (s výjimkou *A. terreus*) nebo *Penicillium* spp. (s výjimkou *P. marneffei*) je s největší pravděpodobností způsoben kontaminací při odběru nebo zpracování vzorku. Zcela odlišná je prediktivní hodnota průkazu mykotických agens z primárně nesterilních materiálů, jako je tekutina získaná bronchoalveolární laváží, sputum, punkáty paranazálních dutin nebo moč. V těchto případech není průkaz mykotických patogenů považován za dostatečně signifikantní, aby byl diagnostickým kritériem pro invazivní mykózu, neboť se může jednat o kolonizaci. Prediktivní hodnota těchto nálezu však významně závisí na typu mykotického agens, na charakteru vyšetřovaného materiálu a na hloubce imunitního deficitu nemocného.⁽¹⁷⁾ Příkladem může být kultivační nález mykotických patogenů z materiálu z dýchacích cest, kde prediktivní hodnota je vyšší u vláknitých hub než u kvasinek a u vláknitých hub je tím vyšší, čím hlubší je imunodeficit nemocného. Obr. 4, 5.

Histologické metody

Histologický průkaz mykotických patogenů v primárně sterilní tkáni představuje jeden ze základních bodů v diagnostice invazivních mykóz. Jejich velkou výhodou je vedle vysoké specifity především rychlost dostupnosti výsledku vyšetření.

K orientační identifikaci jednotlivých mikroorganismů je využívána jejich morfologická odlišnost. Na druhou stranu právě proto, že se jedná pouze o morfologické hodnocení (bez následného kultivačního průkazu), není možná jednoznačná identifikace původce invazivní mykotické infekce, která je nezbytná pro volbu účinného antimykotika.⁽¹⁷⁾ Morfologické charakteristiky nejčastějších původců invazivních mykóz v histologickém vyšetření ukazuje Tab. 5.

Standardní histologické barvení hematoxylin-eozinem dokáže zobrazit nejen mykózu, ale i tkáňovou reakci v jejím okolí. Pro zvýšení pravděpodobnosti záchytu i malého množství mykotických struktur ve tkáni se však používá několik speciálních barvení, jako je metoda stříbření podle Grocott a PAS (periodic acid-Schiff). Bohužel – přestože jsou již popsány imunofluorescenční metody využívající monoklonální nebo polyklonální protilátky zaměřené proti buněčným strukturám jednotlivých hub, které umožňují přesnější identifikaci původce – komerčně zatím dostupné nejsou. Hlavní příčinou je celá řada antigenních podobností mykotických patogenů, což vede často ke zkřížené reakci, a tak k falešně pozitivně těchto metod.⁽¹⁷⁾ Obr. 6, 7, 8.

Nekultivační metody

Hlavním důvodem rozšíření těchto metod je rychlá, senzitivní, specifická a neinvazivní diagnostika invazivních mykóz, která by vedla k časnému zahájení cílené antimykotické léčby.

Metody využívající detekci cytoplazmatických antigenů, antigenů buněčné stěny nebo protilátek proti nim v séru nebo jiných tělesných tekutinách pomocí imunologických nebo biochemických metod se souhrnně označují jako sérologické metody. Pro sérologickou diagnostiku invazivních mykóz byla testována celá řada metod. Nicméně většího uplatnění a klinického významu dosáhlo pouze několik



Obr. 9 – Detekce galaktomannanu ELISA metodikou – výsledek reakce (následně je detekována intenzita žlutého zabarvení)

z nich: detekce antigenu mannanu a protilátek proti němu (antimannanu) v diagnostice invazivní kandidózy, detekce antigenu galaktomannanu pro invazivní aspergilózu a nově pak detekce antigenu 1,3-β-D gluknanu, který umožňuje „pan-fungální“ diagnostiku.

Druhou skupinu nekultivačních metod pak tvoří metody molekulárně biologické, které využívají detekci nukleových kyselin mykotických patogenů pomocí různých variant polymerázové řetězové reakce (PCR).

Mannan a antimannan. Mannan je hlavní glykoprotein buněčné stěny kvasinek, který se uvolňuje do tělesných tekutin, kde pak může být detekován. V cirkulaci velice rychle indukuje tvorbu protilátek (tzv. antimannanů) různých tříd. Vzniklé imunitní komplexy jsou pak z oběhu velice rychle eliminovány. Pro úspěšnou detekci mannanu je tedy nutný frekventní a opakovaný odběr vzorků séra a také uvolnění mannanu z imunokomplexů zahřátím vzorku při jeho zpracování. K mannanemii dochází přibližně u 31–90 % nemocných s kandidémií a procento pozitivit je významně ovlivněno celou řadou faktorů: frekvencí odběrů (nízká frekvence odběrů vede k falešně negativně výsledku), stupněm imunodeficitu nemocného, kmenem kandidy vyvolávajícím invazivní infekci (falešně negativní je reakce u infekcí vyvolaných *C. krusei*, *C.*



Obr. 10 – Předozadní snímek plic – invazivní aspergilóza – postižení plic (klinovité zastínení v pravém laloku na rozhraní středního a horního pole a mnohočetné měkké infiltráty vlevo – nespecifický obraz)



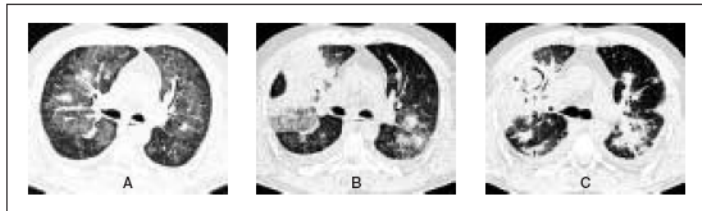
Obr. 11 – HRCT plic – invazivní aspergilóza – postižení plic (v obou lalocích plic mnohočetné denzity místy až splyvající, mající charakter mléčného zakalení?????) (CEHO)



Obr. 12 – CT mozku – invazivní aspergilóza – postižení CNS (stejný pacient jako na obrázku 1 a 8)



Obr. 13 – CT jater – invazivní aspergilóza – postižení jater (mnohočetná ložiska v játrech nativně i postkontrastně hypodenzní; šipky ukazují místa postižení)



Obr. 14 – HRCT plic – invazivní aspergilóza – postižení plic. Vývoj obrazu na HRCT u nemocného s 14denní neutropenií po chemoterapii pro akutní myeloidní leukémii. (A) mnohočetné drobné denzity bilat.; (B) atypická infiltrae l. dx.; (C) kulovité ložisko s air crescent sign a okolním infiltrátem l. dx.)

parapsilosis a *C. kefyr*) a metodou použitou k detekci mannanu.⁽¹⁹⁾ Dříve používaná latexová aglutinace měla velmi nízkou senzitivitu a dnes je již nahrazena sandwichovou ELISA metodou, která je významně citlivější a komerčně dostupná jako Platelia Candida Ag (Bio-Rad). Jako pozitivní je v tomto kitu označován vzorek s hodnotou mannanu větší než 0,5 ng/ml. K diagnostice invazivní kandidózy je využívána také detekce protilátek proti mannanu, již zmíněný tzv. antimannan. V našich podmínkách je nejčastěji používána opět ELISA metoda detekující protilátky proti mannanu všech tříd, komerčně dostupná jako Platelia Ab/Ac/Ak (Bio-Rad). Při použití tohoto testu je pak zjištěná hodnota 5–10 AU/ml označována jako intermediární a hodnota > 10 AU/ml jako pozitivní. Klinické využití detekce protilátek je však značně limitováno. Příčinou je jednak falešná negativita u imunokompromitovaných nemocných, u kterých dochází k produkci často jen minimálního množství protilátek, a jednak falešná pozitivita u pacientů se slizniční kolonizací kvasinkami, kdy dochází k imunitní odpovědi na antigeny těchto kolonizujících kmenů.⁽¹⁹⁾ (Tab. 6)

Galaktomannan. Galaktomannan je polysacharid buněčné stěny hub specifický pro kmeny aspergillů, který je uvolňován do séra a tělesných tekutin. K jeho detekci v séru (ale i v jiných tělesných tekuti-

nách) se opět dříve používala metoda latexové aglutinace, která však byla nahrazena jednoznačně citlivější sandwichovou ELISA metodou (Platelia Aspergillus EIA, Bio-Rad). Tento test využívá vazby monoklonální protilátky na galaktofuranové epitopy molekuly galaktomannanu. Množství těchto epitopů může kolísat mezi jednotlivými aspergilovými kmeny a v různých fázích infekce. Předpokládá se, že pro uvolnění galaktomannanu z hyf do cirkulace je nezbytná angioinvasze infekce. Stupeň angioinvasze pak kolísá v závislosti na imunitním deficitu nemocného a stupni poškození tkání cytotatiky nebo radioterapií. Nutnost angioinvasze je také vysvětlením, proč u některých typů aspergilových infekcí, jako např. aspergilomu, kde hyfy rostou v preformované dutině bez invaze do tkáně, je test negativní. Po průniku do cirkulace může být galaktomannan vázán specifickými protilátkami a vytvářet imunitní komplexy, a tak vést k falešné negativitě testu. Nicméně u imunokompromitovaných nemocných, u kterých je imunitní odpověď potlačena, se tento mechanismus uplatňuje pravděpodobně jen minimálně.^(17, 18) Test je semikvantitativní, výsledek je udáván ve formě indexu pozitivity – podílu optické denzity testovaného vzorku a optické denzity kontrolního vzorku, obsahujícího přibližně 1 ng galaktomannanu/ml. Hodnota indexu pozitivity, od kterého je

Tab. 8 – Příčiny falešné pozitivity a negativity při detekci 1,3-β-D glukanu⁽¹⁷⁾

1,3 β-D glukán	
Falešná pozitivita	
hemodialýza s celulóзовou kapslí (ne polymethylmetakrylátové)	obsahuje (1,3)-β-D-glukan
gáza	obsahuje (1,3)-β-D-glukan
intravenózní imunoglobuliny	obsahuje (1,3)-β-D-glukan z celulóзовých membrán při zpracovávání krevních derivátů
Falešná negativita	
není popisována	

Tab. 9 – Zobrazovací metody a jejich použití pro diagnostiku invazivních mykotických infekcí

Metoda	Infekce, u které lze využít	Nález	Nevýhody a limitace metody
rtg plic	invazivní aspergilóza, fusarióza, zygomycóza	infiltráty v plicním parenchymu	změny nespecifické a velmi pozdní
rtg paranazálních dutin	invazivní aspergilóza, fusarióza	zastínění dutin	změny nespecifické
UZV parenchymatálních orgánů	hepatosplenická kandidóza, diseminace invazivních infekcí vyvolaných vláknitými houbami	hypoechogenní ložiska	změny nespecifické
CT mozku	diseminace invazivních infekcí vyvolaných vláknitými houbami	hypodenzní ložiska	změny nespecifické
CT paranazálních dutin	invazivní aspergilóza, fusarióza	hyperplastické slizniční lemy, event. vyplnění celých dutin; častá destrukce skeletu	
HRCT plic	invazivní infekce vyvolaná vláknitými houbami	charakteristické změny; u neutropenických nemocných také s charakteristickým vývojem (blíže viz text)	nelze od sebe odlišit jednotlivé infekce vyvolané vláknitými houbami

Tab. 10 – Diagnostika invazivní kandidózy – využití jednotlivých metod

	Senzitivita	Specifita	PPV	NPV	Komentář
Konvenční mikrobiologické metody (kultivace a mikroskopie)					
hemokultura	cca 50 %	téměř 100 %			Nejvýznamnější materiál pro diagnostiku invazivní kandidózy. Specifita výrazně klesá, jde-li o hemokulturu odebranou z žilního katétru (možná kolonizace zevního konce katétru).
ostatní sterilní materiály (mozkomíšni mok, biopsie tkání a punktáty abscesů)	relativně vysoká	téměř 100 %			klinicky méně využitelné – biopsie tkání není často možné provést u kritických nemocných
sputum, tracheální aspirát, tekutina získaná BAL	pozitivní kultivace není kritériem pro diagnózu invazivní kandidózy – možná kolonizace				
moč	pozitivní kultivace není většinou kritériem pro diagnózu invazivní kandidózy – známka kolonizace/kontaminace, zvláště u nemocných s močovým katétre				
Histologie – primárně sterilní materiály					
biopsie tkání a punktáty abscesů	relativně vysoká	téměř 100 %			klinicky méně využitelné – biopsie tkání není často možné provést u kritických nemocných
Sérologické metody					
mannan ^(21, 22)	30–40 %	98 %	85 %	84 %	
antimannan ^(21, 22)	53–67 %	94 %	72 %	87 %	častá falešná pozitivita při kolonizaci nemocného kvasinkami
kombinovaná detekce mannanu a antimannanu ⁽²²⁾	80 %	92–93 %	78 %	93 %	předchází o 6–7 dní před pozitivní HBK
1,3 β-D glukán ⁽²³⁾	81,30 %	87,1 % ^A	83,8 % ^A	75,1 % ^A	předchází 10 dní klinickou diagnózu ⁽²⁴⁾ ^A – pro celou skupinu IFI
Zobrazovací metody					
CT, UZV parenchymatálních orgánů zejména jater a sleziny	nutné provedení u všech nemocných s kandidémií pro vyloučení orgánové diseminace infekce – zvláště při přetrvávající kandidémií (????) a kandidémií(????), která není katéetrového původu				
echokardiografie	nutné provedení u všech nemocných s kandidémií při přetrvávající kandidémií (???), zvláště je-li spojena s hemodynamickou nestabilitou, novým poslechovým nálezem na chlopních, a u nemocných s předchozím onemocněním chlopní				
oční pozadí	vhodné provedení u všech nemocných s kandidémií pro vyloučení orgánové diseminace infekce – v současné době však pozitivní nález spíše výjimečný				

Tab. 11 – Diagnostika invazivní aspergilózy – využití jednotlivých metod

	Senzitivita	Specificita	PPV	NPV	Komentář
Konvenční mikrobiologické metody – kultivace					
materiál z dýchacích cest (sputum, tracheální aspirát, tekutina získaná z BAL) ^(25, 26)	40 % ⁽²⁵⁾	90 % ⁽²⁵⁾	závisí na rizikovosti nemocného ⁽²⁶⁾ 1. alogenní HSCT, hematologická malignita, neutropenie – 72 % 2. autologní HSCT, kortikoterapie, solidní tumory – 58 % 3. ostatní – 14 %	95 % ⁽²⁵⁾	
ostatní sterilní materiály (mozkomíšni mok, biopsie tkání a punktáty abscesů)	relativně vysoká – např. CT vedená tenkojehlová biopsie plic – 71 % ⁽²⁷⁾	téměř 100 %	téměř 100 %		klinicky méně využitelné – biopsii tkání není často možné provést u kritických nemocných
Konvenční mikrobiologické metody – cytologie					
materiál z dýchacích cest (sputum, tracheální aspirát, tekutina získaná z BAL) ⁽²⁵⁾	64 %	99 %	závisí na rizikovosti nemocného – vysoké riziko – hematologická malignita, alogenní HSCT – 84 %	97 %	
ostatní sterilní materiály (mozkomíšni mok, biopsie tkání a punktáty abscesů)	relativně vysoká – např. CT vedená tenkojehlová biopsie plic – 71 % ⁽²⁷⁾	téměř 100 %	téměř 100 %		klinicky méně využitelné – biopsii tkání není často možné provést u kritických nemocných
Histologie – primárně sterilní materiály					
biopsie tkání a punktáty abscesů	relativně vysoká – např. CT vedená tenkojehlová biopsie plic – 71 % ⁽²⁷⁾	téměř 100 %	téměř 100 %		klinicky méně využitelné – biopsii tkání není často možné provést u kritických nemocných
Sérologické metody					
galaktomannan – sérum ⁽²⁸⁾	97 %	99 %	99 %	98 %	pozitivita = 2 a vícekrát IP >/= 0,5, specificita stoupá s rizikovostí nemocného, pozitivita předchází až o 10 dnů klinickou diagnózu ⁽²⁹⁾ vývoj hodnoty IP při léčbě koreluje s léčebnou odpovědí ⁽³⁰⁾
galaktomannan – tekutina získaná BAL	85 %	100 %	100 %	88 %	pozitivita v tekutině získané BAL často předchází i o několik dní pozitivitu v séru
1,3- β-D glukán ⁽²³⁾	80,0 %	87,1 % ^A	83,8 % ^A	75,1 % ^A	předchází 10 dní klinickou diagnózu ^{(24)A} – pro celou skupinu IFI
Zobrazovací metody					
rtg plic	známky nespecifické a pozdní				
HRCT plic	Výhody: pozitivní u 40–50 % neutropenických nemocných s normálním rtg plic, pravidelně prováděné HRCT plic zkrátí dobu do stanovení dg. o 5–7 dní, charakteristický vývoj změn na HRCT (hallo, atypická infiltrace, air crescent) u neutropenických nemocných			Nevýhody: změny na HRCT nejsou jednoznačně typické pro mykotické infekce, nelze odlišit typ mykotické infekce s angioinvasí	
CT paranazálních dutin	indikováno při známkách postižení PND – infiltrace často s invazí do skeletu				
CT (UZV) parenchymatозních orgánů zejména jater a sleziny, event. mozku	nutné u nemocných s klinickými známkami přetrvávající infekce či orgánového postižení pro vyloučení hematogenní diseminace infekce				
HSCT ????, PND ????, IFI ????, PPV ???, NPV ????					

Tab. 12 – Diagnostika invazivní fusariózy a zygomykózy – využití jednotlivých metod

Invazivní fusarióza					
Konvenční mikrobiologické metody – kultivace a cytologie					
hemokultura	pozitivní u 40–60 % pacientů ⁽¹²⁾ , zásadní význam pro stanovení diagnózy a odlišení od ostatních vláknitých hub				
ostatní materiály (kůže, punktát z paranazálních dutin, materiál z dýchacích cest, bioptické materiály)	zásadní význam pro stanovení diagnózy a odlišení od ostatních vláknitých hub, při pozitivním nálezu a přítomném klinickém korelátu u imunosuprimovaných nemocných je vzhledem k závažnosti nález ve většině případů interpretován jako klinicky významný				
Histologie					
biopsie tkání zejména kožních lézí	často první provedené vyšetření, pro definitivní odlišení nutná kultivace				
Sérologické metody					
1,3-β-D glukán ⁽²³⁾	senzitivita	specifická	PPV	NPV	předchází 10 dní klinickou diagnózu ⁽²⁴⁾
	100,0 %	87,1 % ^A	83,8 % ^A	75,1 % ^A	^A – pro celou skupinu IFI
Zobrazovací metody – podle místa postižení					
rtg plic	známky nespecifické a pozdní				
HRCT plic	změny neodlišitelné od invazivní aspergilózy, respektive infekce vyvolané jinou vláknitou houbou				
CT paranazálních dutin	indikováno při známkách postižení PND – infiltrace často s invazí do skeletu				
CT (UZV) parenchymatózních orgánů, zejména jater a sleziny, event. mozku	nutné u nemocných s klinickými známkami přetrvávající infekce či orgánového postižení pro vyloučení hematogenní diseminace infekce				
Invazivní zygomykóza					
Konvenční mikrobiologické metody – kultivace a cytologie					
aspirát z paranazálních dutin, materiál z dýchacích cest, eventuálně další bioptické materiály (kůže, biopsie střevní, punktáty parenchymatózních orgánů)	zásadní význam pro stanovení diagnózy a odlišení od ostatních vláknitých hub, při pozitivním nálezu a přítomném klinickém korelátu u imunosuprimovaných nemocných je vzhledem k závažnosti nález ve většině případů interpretován jako klinicky významný				
Histologie					
biopsie tkání	často jediné vyšetření s pozitivním výsledkem, pro definitivní odlišení nutná kultivace				
Sérologické metody					
nelze použít					
Zobrazovací metody – dle místa postižení					
rtg plic	známky nespecifické a pozdní				
HRCT plic	změny neodlišitelné od invazivní aspergilózy, respektive infekce vyvolané jinou vláknitou houbou				
CT paranazálních dutin	indikováno při známkách postižení PND – infiltrace často s invazí do skeletu				
CT (UZV) parenchymatózních orgánů, zejména jater a sleziny, eventuálně mozku	nutné u nemocných s klinickými známkami přetrvávající infekce či orgánového postižení pro vyloučení hematogenní diseminace infekce				
PPV ????, NPV ???, IFI ????					

vzorek označován jako pozitivní, má pak velký význam pro senzitivitu i specifitu testu. V současné době je jako pozitivní označován vzorek s hodnotou indexu pozitivity > 0,5.

Podobně jako u ostatních nekultivačních metod se i přes nesporný význam detekce galaktomananu pro diagnostiku invazivní aspergilózy můžeme setkat s falešnou pozitivitou a negativitou testu. Jejich příčiny ukazuje Tab. 7.

Galaktomannan lze s výhodou detekovat i v jiných materiálech, než je sérum. Nejčastěji je využívána detekce galaktomananu v tekutině získané bronchoalveolární laváží pro diagnostiku plicní formy in-

vasivní aspergilózy a mozkomíšním moku pro posouzení postižení CNS touto infekcí. Obr. 9.

1,3-β-D glukán. 1,3-β-D glukán je hlavním polysacharidem buněčné stěny celé řady hub. Na rozdíl od galaktomananu je integrální součástí skeletu buněčné stěny a do okolí je uvolňován pouze při růstu buňky. Pro jeho detekci v séru je tedy vedle angioinvasivní nutná i viabilita mykotického patogenu. 1,3-β-D glukán je sice přítomen v buněčné stěně všech patogenních hub, ale jeho množství, a tedy i tendence k uvolňování do okolí je u jednotlivých patogenů odlišná. Může být tedy označen jako tzv. panfungální marker,

neboť je detekovatelný kromě u nemocných s invazivní aspergilózou a kandidózou také u nemocných s infekcemi vyvolanými vzácnými houbami, jako jsou *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces* spp., *Acremonium* spp. aj. Na druhou stranu nelze tento test použít k detekci kryptokokové infekce a k diagnostice invazivní zygomykózy. Příčinou je právě výše zmíněné malé množství 1,3-β-D glukánu v jejich buněčné stěně.⁽¹⁷⁾

Pro detekci 1,3-β-D glukánu se používá takzvaný G-test. Tento test využívá schopnosti glukánu aktivovat koagulační cestu v lyzátu amébocytů z kraba *Ostreprea*

amerického. Aktivované koagulační enzymy pak odštěpují chromogenní substrát a je vyhodnocována změna zabarvení v čase. Komerčně dostupný G-test se jmenuje Fungitel (Cape Code), kde jako pozitivní je označován vzorek s hodnotou > 80 pg/ml.

Hlavní výhodou tohoto testu je jeho „panfungality“, nevýhodou je jak velká citlivost (měřeny jsou pikogramové hodnoty polysacharidu), a tak i laboratorní a finanční náročnost. I u tohoto testu jsou popisovány falešné pozitivitu (Tab. 8).⁽¹⁷⁾

Molekulárně biologické metody. Molekulární biologie představuje velice nadějný přístup pro diagnostiku invazivních mykóz. Podobně jako u bakterií se zdá, že nejslibnějším přístupem je kombinace širokospektré PCR („panfungální PCR“), kdy je amplifikován produkt společný téměř pro všechny patogenní houby (např. 18S rRNA) s následnou specifikací amplifikovaného produktu pomocí restrikční endonukleázové analýzy, sekvenace nebo hybridizace.⁽¹⁷⁾

V současné době však molekulárně biologické metody stále nepatří mezi rutinní postupy při diagnostice invazivních mykóz. Hlavní příčinou je neexistence mezilaboratorní standardizace.⁽¹⁷⁾

Zobrazovací metody

Zobrazovací metody umožňují detekovat orgánové postižení invazivní mykózou. Protože hlavní formou invazivní kandidózy je v současné době izolovaná kandidémie, není překvapením, že hlavní uplatnění nachází zobrazovací metody při posuzování orgánového postižení invazivní infekcí vyvolanou vláknitými houbami. Jejich hlavní nevýhodou je, že nepřinášejí žádnou informaci o původci, který postižení orgánů vyvolal, a je tedy nutno je vždy kombinovat s biopsií a následným histologickým a mikrobiologickým vyšetřením, které pak diagnózu invazivní mykotické infekce teprve stanoví. Bohužel, vzhledem k trombocytopenii a často i kritickému stavu hematoonkologických nemocných s invazivní mykotickou infekcí, biopsie většinou není možná. Velkým přínosem pak v tomto případě mohou být výše zmíněné nekultivační diagnostické metody. Dostupné zobrazovací metody, jejich využití, nejčastější nálezy a limitace těchto metod ukazuje Tab. 9.

Jednoznačně největší přínos ze zobrazovacích metod přináší HRCT plic, a to při diagnostice invazivních mykotických infekcí vyvolaných vláknitými houbami, především invazivní aspergilózy. HRCT je pozitivní u 40–50 % nemocných s invazivní aspergilózou a normálním nálezem

na rentgenovém snímku plic. U neutropenických nemocných mají změny na HRCT plic i typický vývoj. V časně fázi infekce se setkáváme s takzvanými „halo“ příznaky (pozitivní u 68 % nemocných v 3. den infekce). V pozdní fázi infekce pak nacházíme tzv. „air crescent“ příznak (pozitivní u 63 % nemocných v 14. den infekce). Nevýhodou HRCT je však fakt, že nás dokáže informovat pouze o přítomnosti infekce plic vyvolané vláknitou houbou s angioinvasí, nepřináší však informaci o etiologii této infekce. Nejčastěji jde sice o invazivní aspergilózu, ale stejný obraz můžeme nacházet i u invazivní zygomykózy, eventuálně i fusariózy.⁽²⁾ Obr. 10–14.

Diagnostika jednotlivých invazivních mykóz

Využití jednotlivých diagnostických metod u nejvýznamnějších invazivních mykotických infekcí ukazují Tab. 10–12.

Závěr

Posledních 10–15 let představuje velmi významné období v oblasti invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných.

Zvýšení počtu imunosuprimovaných nemocných, změny v protinádorové léčbě, ale i profylaktické používání antimykotik vedly k nárůstu incidence invazivních mykóz způsobených vláknitými houbami, zejména pak invazivních aspergilóz. Stále častěji se však setkáváme i s infekcemi, které způsobují vzácné, dříve zcela raritní vláknité houby, jako jsou invazivní zygomykóza a fusarióza.

Na druhou stranu právě diagnostika invazivní aspergilózy, a to diagnostika nekultivační, zaznamenala v posledních letech zcela zásadní pokroky a umožňuje časnější zahájení cílené antimykotické léčby, tak důležité pro prognózu nemocných s touto infekcí. Nutno však podotknout, že nekultivační diagnostika ostatních invazivních mykóz, a to včetně invazivní kandidózy, je stále spíše ve fázi výzkumu, zcela jistě ne rutinního používání. Ale i zde lze v několika následujících letech (především po větších zkušenostech s detekcí 1,3 β-D glukanu a standardizací PCR metod) očekávat podobné pozitivní změny ve časně diagnostice, a tak i v léčbě těchto závažných infekcí.

Literatura

1. PFALLER, MA. *Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends.* Clin Infect Dis, 2006, 43 Suppl. 1, p. S3–14.

2. RUHNKE, M., MASCHMEYER, G. *Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer – review of the literature.* Eur J Med Res, 2002, 7, p. 227–235.
3. NUCCI, M., MARR, KA. *Emerging fungal diseases.* Clin Infect Dis, 2005, 41, p. 521–526.
4. YAMAZAKI, T., KUME, H., MURASE, S., et al. *Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan.* J Clin Microbiol, 1999, 37, p. 1732–1738.
5. HANNA, H., KONTOYIANNIS, D., BUDDINENI, J., et al. *The changing epidemiology of candidemia in hematologic malignancy: Candida glabrata and Candida krusei are the leading cause of fungemia.* Program and abstracts of the 45th ICAAC, December 16–19, 2005, Washington, D. C., USA, p. Abstract M-989.
6. O'BRIEN, SN., BLIJLEVENS, NMA., MAHFOUZ, TH., et al. *Infections in Patients with Hematological Cancer: Recent Developments.* Hematology, 2003, 2003, p. 438–472.
7. VAN BURIK, JH., LEISENRING, W., MYERSON, D., et al. *The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients.* Medicine (Baltimore), 1998, 77, p. 246–254.
8. GROLL, AH., SHAH, PM., MENTZEL, C., et al. *Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital.* J Infect, 1996, 33, p. 23–32.
9. MORGAN, J., ALEXANDER, B., WANNEMUEHLER, K. *Quantification of Risk for Invasive Fungal Infections (IFI) among Transplant (TX) Recipients Reporting to TRANSNET.* Program and abstracts of the 45th ICAAC, October 30–November 2, 2004, Washington, D.C., USA, p. Abstract M-1058.
10. MARR, KA., CARTER, RA., BOECKH, M., et al. *Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors.* Blood, 2002, 100, p. 4358–4366.
11. MARR, KA., CARTER, RA., CRIPPA, F., et al. *Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients.* Clin Infect Dis, 2002, 34, p. 909–917.
12. DIGNANI, MC., ANAÏSSIE, E. *Human fusariosis.* Clin Microbiol Infect, 2004, 10 Suppl 1, p. 67–75.
13. REX, JH., WALSH, TJ., ANAÏSSIE, EJ. *Fungal infections in immunocompromised hosts.* Adv Intern Med, 1998, 43, p. 321–371.
14. BODEY, GP., LUNA, M. *Skin lesions associated with disseminated candidiasis.* JAMA, 1974, 229, p. 1466–1468.
15. LIN, SJ., SCHRANZ, J., TEUTSCH, SM. *Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature.* Clin Infect Dis, 2001, 32, p. 358–366.
16. SPELLBERG, B., EDWARDS, J., JR., IBRAHIM, A. *Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management.* Clin. Microbiol. Rev., 2005, 18, p. 556–569.
17. ALEXANDER, BD., PFALLER, MA. *Contemporary Tools for Diagnosis and Management of Invasive Mycoses.* Clin Infect Dis, 2006, 43 Suppl. 1, p. S15–27.
18. SHAO, PL., HUANG, LM., HSUEH, PR. *Invasive fungal infection – laboratory diagnosis and antifungal treatment.* J Microbiol Immunol Infect, 2006, 39, p. 178–188.
19. ELLEPOLA, AN., MORRISON, CJ. *Laboratory diagnosis of invasive candidiasis.* J Microbiol, 2005, 43 Spec No, p. 65–84.
20. MASCHMEYER, G. *The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats.* Int J Antimicrob Agents, 2006, 27 Suppl. 1, p. 3–6.
21. SENDID, B., TABOURET, M., POIROT, JL., et al. *New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating Candida albicans mannan and anti-mannan antibodies: useful combined test for dia-*

- gnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol*, 1999, 37, p. 1510–1517.
22. CHEN, Y., SUN, H., WANG, J., et al. *Usefulness of Combined Detection of Mannanemia and Antimannan Antibodies for the Diagnosis of Invasive Candidiasis*. Program and abstracts of the 44th ICAAC, October 30–November 2, 2004, Washington, D. C., USA, p. Abstract M-264.
23. OSTROSKY-ZEICHNER, L., ALEXANDER, BD., KETT, DH., et al. *Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans*. *Clin Infect Dis*, 2005, 41, p. 654–659.
24. ODABASI, Z., MATTIUZZI, G., ESTEY, E., et al. *Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome*. *Clin Infect Dis*, 2004, 39, p. 199–205.
25. LEVY, H., HORAK, DA., TEGTMEIER, BR., et al. *The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis*. *Respir Med*, 1992, 86, p. 243–248.
26. HORVATH, JA., DUMMER, S. *The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis*. *Am J Med*, 1996, 100, p. 171–178.
27. NOSARI, A., ANGHILIERI, M., CARRAFIELLO, G., et al. *Utility of percutaneous lung biopsy for diagnosing filamentous fungal infections in hematologic malignancies*. *Haematologica*, 2003, 88, p. 1405–1409.
28. MAERTENS, J., THEUNISSEN, K., VERBEKEN, E., et al. *Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and hematological stem cell transplant recipients*. *Br J Haematol*, 2004, 126, p. 852–860.
29. MARR, KA., BALAJEE, SA., MCLAUGHLIN, L., et al. *Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance*. *J Infect Dis*, 2004, 190, p. 641–649.
30. BOUTBOUL, F., ALBERTI, C., LEBLANC, T., et al. *Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease*. *Clin Infect Dis*, 2002, 34, p. 939–943.

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR8452-3/2005.

e-mail: zracil@fnbrno.cz

- 1.2.2. Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Lochmanová J., Dvořáková M., Mayer J.: Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR - přednosti a úskalí. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 13, 2007, 5: 184-190**

Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR – přednosti a úskalí

M. LENGEROVÁ¹, Z. RÁČIL², K. HRNČÍŘOVÁ¹, J. LOCHMANOVÁ¹, D. DVOŘÁKOVÁ¹, J. MAYER^{1,2}

¹Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN Brno

²Interní hematologická klinika, FN Brno

SOUHRN

Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Lochmanová J., Dvořáková D., Mayer J.: **Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR – přednosti a úskalí**

Přestože PCR detekce mykotických patogenů v klinických vzorcích se na stránkách odborných časopisů objevuje již více než dvacet let, je použití této metody pro rutinní diagnostiku invazivní aspergilózy stále diskutabilní. A to i přesto, že metody molekulární biologie již našly své stálé místo v mnoha odvětvích moderní mikrobiologie. Genotypizace bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika, molekulární epidemiologie, ale i rutinní detekce, např. virových infekcí z nejrůznějších klinických materiálů je v dnešní době zcela běžnou praxí. Ve všech těchto oblastech znamenalo zavedení metody PCR diagnostiky zrychlení, zpřesnění a zjednodušení celého procesu. Tento přehledový článek má za cíl ukázat, v čem je detekce původců mykotických infekcí jiná a proč se ji dosud nepodařilo zavést do rutinní praxe.

Klíčová slova: PCR, real-time PCR, *Aspergillus* sp., invazivní aspergilóza

SUMMARY

Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Lochmanová J., Dvořáková D., Mayer J.: **Detection of invasive aspergillosis by PCR and real-time PCR – benefits and drawbacks**

PCR detection of fungal pathogens in clinical samples has been discussed in journals for more than two decades. However, its use for diagnosing invasive aspergillosis is still controversial, despite the fact that molecular methods are routinely used in various fields of modern microbiology. These are e. g. genotyping of bacterial strains resistant to antibiotics, molecular epidemiology or routine detection of viral infections in clinical material. PCR methods have made the diagnostic applications faster, simpler and more accurate. This review deals with issues related to molecular methods for diagnosing invasive fungal infections and the main factors limiting their use in everyday clinical practice.

Keywords: PCR, real-time PCR, *Aspergillus* sp., invasive aspergillosis

Klin mikrobiol inf lék 2007;13(5):184–190

Adresa: Mgr. Martina Lengerová, PhD., Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno, e-mail: mlengerova@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 23. 8. 2007

Přijato k tisku: 2. 10. 2007

Úvod

Aspergillus sp. je saprofytická plíseň, která má v životním prostředí důležitou roli v metabolismu uhlíku a dusíku. Její přirozenou nikou je půda, kde roste se podílí na rozkladu organického substrátu. V rámci svého reprodukčního cyklu produkuje každý organismus tisíce konidií, které se uvolňují do prostředí. Konidie řady druhů, včetně patogenních pro člověka, jsou velmi malé (2–3 μm), takže se mohou při vdechnutí dostat až do plicních alveolů. Inhalace konidií imunokompetentními jedinci nevede obvykle k žádnému klinickému projevu, k jejich eradikaci z dýchacích cest stačí běžné tkáňové obranné mechanismy a mechanismy vrozené buněčné imunity. Ještě v nedávné době byl rod *Aspergillus* považován za poměrně slabého patogena způsobujícího převážně alergické projevy u osob dlouhodobě vystavených prostředí s velkým výskytem plísní (např. pracující v zemědělství). Spolu s tím, jak se imunosupresivní léčba stává agresivnější a imunokompromitovaných pacientů přibývá,

se však situace dramaticky změnila [1,2,3].

U těchto pacientů *Aspergillus* sp. způsobuje především infekce dolních a významně méně častěji horních dýchacích cest (neinvazivní – aspergilom, invazivní – pneumonie, sinusitida). Přibližně u 20 % nemocných pak dochází k diseminaci procesu z plic hematogenní cestou s následným postižením především centrální nervové soustavy a parenchymatózních orgánů (játra, slezina). Postižen může být ale teoreticky jakýkoliv orgán.

Za více než 90 % aspergilových infekcí je zodpovědný druh *A. fumigatus*. K tomuto prvenství přispívá několik faktorů – zejména malé spory tohoto druhu, rychlý růst mycelia při teplotě 37 °C a skromné nutriční požadavky [4]. Infekce u lidí mohou způsobovat také další druhy – *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* a *A. nidulans*.

Pro prognózu nemocných má zásadní význam časné zahájení antimykotické léčby, a tedy i časné stanovení diagnózy. Vzhledem k tomu, že konvenční diagnostické metody

(kultivace, cytologie, zobrazovací metody) často ve své senzitivitě a časnosti selhávají, došlo v posledních letech k rozvoji nekultivačních diagnostických metod. Mezi tyto, vedle metod imunologických (detekující antigeny mykotických patogenů), patří právě i PCR (z angl. polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) diagnostika. Úspěšná detekce mykotických patogenů pomocí PCR má několik základních kamenů – výběr vhodného klinického materiálu pro testování, izolaci DNA, výběr vhodné PCR metody a v neposlední řadě správná interpretace výsledků. Bohužel každý jednotlivý z nich skrývá mnohá úskalí.

Výběr vhodného klinického materiálu pro detekci

Mikroskopická detekce fungálních hyf a pozitivní kultivace jinak sterilní tkáně jsou samozřejmě nejpřesnější diagnostické metody, bohužel u většiny pacientů je toto možné až při velkém a nevratném poškození vnitřních orgánů popř. post mortem. Získání materiálu (nejčastěji plicního parenchymu) navíc vyžaduje biopsii, která je jen velmi obtížně proveditelná u kritických nemocných s trombocytopenií a koagulopatií.

V případě plicního postižení je u imunokompromitovaných pacientů často prováděna bronchoalveolární laváž (BAL) za účelem získání materiálu z dolních cest dýchacích.

Senzitivita a negativní prediktivní hodnota PCR detekce *Aspergillus* sp. v BAL dosahuje 90–100 %, ale pozitivní prediktivní hodnota jen 32–52 % – falešně pozitivní výsledky jsou tedy poměrně časté. Detekce *Aspergillus* sp. v tomto materiálu totiž může odrážet nejen infekci, ale i kolonizaci, popř. kontaminaci. Jestliže předpokládáme, že množství patogena je při kolonizaci nižší než při aktivní infekci mohlo by pokrok v tomto směru znamenat zavedení kvantitativní PCR [6]. Nastavení vhodné hranice positivity, např. na základě počtu kopií v 1 ml BAL, by potom umožnilo rozdělit pacienty do skupin s větším či menším rizikem rozvoje invazivní mykotické infekce (IFI, z angl. invasive fungal infections).

BAL je však také invazivní procedura a její provedení může být u části nemocných spojeno s komplikacemi (krváčení, zhoršení ventilačních parametrů). Navíc je laváž prováděna až na základě abnormality na zobrazovacích metodách, tedy při již většinou plně rozvinuté plicní patologii.

Bioptované tkáně ani tekutina z BAL tedy nejsou vždy optimálním materiálem pro screening nemocných s rizikem invazivní aspergilózy.

V klinické praxi je vzorkem, který lze získat relativně snadno a opakovaně, periferní krev. Detekce fungální DNA v periferní krvi je nejčastější screeningovou metodou používanou u pacientů s rizikem rozvoje IFI.

Co vlastně v krvi detekujeme?

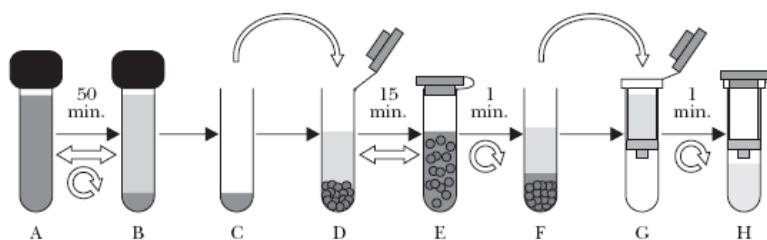
Základní otázkou, kterou je potřeba zodpovědět, je, jakou část nebo formu plísňové buňky obsahující DNA v krvi vlastně detekujeme. Jde o uvolněné konidie, neviabilní fragmenty plísňových hyf, fagocytované části nebo volnou DNA? Přítomnost konidií je velmi nepravděpodobná, protože pro jejich tvorbu nemají plísně v krevním řečišti vhodné prostředí (není přítomno rozhraní se vzduchem). Přítomnost volné DNA, jako možného cíle izolace, nelze vyloučit, protože bylo publikováno několik prací detekujících DNA v plazmě [7] a séru [8]. Mennink-Kersten a kol. [9] publikovali, že fungální DNA je do krve uvolňována pouze po narušení hyf např. v důsledku obranných mechanismů hostitele nebo autolýzy při nedostatku živin. Problémy s detekcí fungální DNA v krvi však naznačují, že volná DNA patrně nebude dominantní složkou.

Použití různých technik izolace DNA z různých krevních frakcí přináší často velmi rozporuplné výsledky. Costa a kol. [10] publikovali, že množství DNA získané po izolaci ze séra, plazmy a leukocytů je srovnatelné. Loeffler a kol. [11] uvádějí, že pro detekci *Aspergillus* sp. je vhodnější provádět izolaci z plné krve než z plazmy. White a kol. [12] zjistili, že po inokulaci DNA izolované ze známého množství *A. fumigatus* a následné izolaci pomocí přístroje pro automatickou izolaci nebyl ani jeden ze vzorků pozitivní (v diskuzi uvádějí, že zvolená metoda nebyla pravděpodobně vhodná pro izolaci volné DNA nebo došlo k degradaci DNA působením DNáz).

Je tedy velmi pravděpodobné, že DNA je v krvi přítomna v různých formách, např. podle stadia infekce nebo zaháje-

Obrázek 1

Schéma izolace DNA pomocí rozbíjecích skleněných kuliček a kolonky. Východím materiálem je zpravidla 5 ml periferní krve (A). V prvním kroku dochází k lýzi erytrocytů pomocí hypotonického roztoku (B). Tento krok je nutný k odstranění krevního barviva hemoglobinu, který je známým inhibitorem PCR. Zbytek buněk je poté sedimentován centrifugací (C) a peletka přenesena do zkumavky s lyzačním roztokem a skleněnými rozbíjecími kuličkami (D). Poté je zkumavka intenzivně třepána na vortexu, asi 5–15 minut (E). Zbytky buněčného debrisu spolu s kuličkami jsou opět sedimentovány centrifugací (F) a supernatant nanesen na kolonku (G). Na té je selektivně zachycena uvolněná DNA, promyta od zbytků proteinů a poté pomocí roztoku se specifickým pH odmyta do sběrné zkumavky (H).



Obrázek 2

Schéma uspořádání podjednotek rDNA a ITS oblastí v genomu *A. fumigatus*



Obrazek 3

Srovnání sekvencí oblasti 18S rDNA mezi A. fumigatus (GenBank accession number AF548062) a některými air-borne fungi – Acremonium alternatum (AY083232), Cladosporium cladosporioides (AF548070), Fusarium culmorum (AF548073), Penicillium verruculosum (AF510496). Černé bloky vyznačují úseky sekvence homologické mezi všemi druhy.

Acremonium alternatu	-----atctcaggtatcgtttatttgata-----gtaccctactac-----tggatcaggtggtaattctagagctaaacatgctcaaaaccccaacttcggaagggatgtattttagatgaa	116
Aspergillus fumigatu	-----tcgggtgaaactgcgaatggctcattcaataggtatcgtttatttgata-----gtaccctactac-----tggatcaggtggtaattctagagctaaacatgctcaaaaccccaacttcggaagggatgtattttagatgaa	139
Cladosporium cladosp	-----tcgggtgaaactgcgaatggctcattcaataggtatcgtttatttgata-----gtaccctactac-----tggatcaggtggtaattctagagctaaacatgctcaaaaccccaacttcggaagggatgtattttagatgaa	139
Fusarium culmorum AF	-----tcgggtgaaactgcgaatggctcattcaataggtatcgtttatttgata-----gtaccctactac-----tggatcaggtggtaattctagagctaaacatgctcaaaaccccaacttcggaagggatgtattttagatgaa	139
Penicillium verrucul	ctagtgataagcactctttctcgtgaaactgcgaatggctcattcaataggtatcgtttatttgata-----gtaccctactac-----tggatcaggtggtaattctagagctaaacatgctcaaaaccccaacttcggaagggatgtattttagatgaa	158
Acremonium alternatu	aaacccatgcccctcgggg-----gctccatgggtgaaacataataacttaacgaatgcgatggccttgcgcggggagtggttcaatccaattctgacctatacaacttt-----cgatggcaggatcaggcccaacaagggaacgggtaacggggaa	267
Aspergillus fumigatu	aaacccatgcccctcgggg-----gctccatgggtgaaacataataacttaacgaatgcgatggccttgcgcggggagtggttcaatccaattctgacctatacaacttt-----cgatggcaggatcaggcccaacaagggaacgggtaacggggaa	290
Cladosporium cladosp	aaacccatgcccctcgggg-----gctccatgggtgaaacataataacttaacgaatgcgatggccttgcgcggggagtggttcaatccaattctgacctatacaacttt-----cgatggcaggatcaggcccaacaagggaacgggtaacggggaa	290
Fusarium culmorum AF	aaacccatgcccctcgggg-----gctccatgggtgaaacataataacttaacgaatgcgatggccttgcgcggggagtggttcaatccaattctgacctatacaacttt-----cgatggcaggatcaggcccaacaagggaacgggtaacggggaa	290
Penicillium verrucul	aaacccatgcccctcgggg-----gctccatgggtgaaacataataacttaacgaatgcgatggccttgcgcggggagtggttcaatccaattctgacctatacaacttt-----cgatggcaggatcaggcccaacaagggaacgggtaacggggaa	309
Acremonium alternatu	tgggctcgcctccggggaaggagcctgagaacaggctacacatccaagggaaggcagcggggcgaatatacccaatccggcaacggggaggtagtgacaataaactactgatacagggtctctttgggtctgtaattgggaatggaacaataataat	427
Aspergillus fumigatu	tgggctcgcctccggggaaggagcctgagaacaggctacacatccaagggaaggcagcggggcgaatatacccaatccggcaacggggaggtagtgacaataaactactgatacagggtctctttgggtctgtaattgggaatggaacaataataat	450
Cladosporium cladosp	tgggctcgcctccggggaaggagcctgagaacaggctacacatccaagggaaggcagcggggcgaatatacccaatccggcaacggggaggtagtgacaataaactactgatacagggtctctttgggtctgtaattgggaatggaacaataataat	450
Fusarium culmorum AF	tgggctcgcctccggggaaggagcctgagaacaggctacacatccaagggaaggcagcggggcgaatatacccaatccggcaacggggaggtagtgacaataaactactgatacagggtctctttgggtctgtaattgggaatggaacaataataat	450
Penicillium verrucul	tgggctcgcctccggggaaggagcctgagaacaggctacacatccaagggaaggcagcggggcgaatatacccaatccggcaacggggaggtagtgacaataaactactgatacagggtctctttgggtctgtaattgggaatggaacaataataat	469
Acremonium alternatu	cccttaacgaggacaactggagggaagctggtgcccagcagcggcgttaattccagctccaaatagcgtatattaagttgttgggttaaaaagctcgttagtgaaaccttgggctcagctggccggtccgcctcaccgctgacactgggtccgcaagg	587
Aspergillus fumigatu	cccttaacgaggacaactggagggaagctggtgcccagcagcggcgttaattccagctccaaatagcgtatattaagttgttgggttaaaaagctcgttagtgaaaccttgggctcagctggccggtccgcctcaccgctgacactgggtccgcaagg	610
Cladosporium cladosp	cccttaacgaggacaactggagggaagctggtgcccagcagcggcgttaattccagctccaaatagcgtatattaagttgttgggttaaaaagctcgttagtgaaaccttgggctcagctggccggtccgcctcaccgctgacactgggtccgcaagg	610
Fusarium culmorum AF	cccttaacgaggacaactggagggaagctggtgcccagcagcggcgttaattccagctccaaatagcgtatattaagttgttgggttaaaaagctcgttagtgaaaccttgggctcagctggccggtccgcctcaccgctgacactgggtccgcaagg	610
Penicillium verrucul	cccttaacgaggacaactggagggaagctggtgcccagcagcggcgttaattccagctccaaatagcgtatattaagttgttgggttaaaaagctcgttagtgaaaccttgggctcagctggccggtccgcctcaccgctgacactgggtccgcaagg	629
Acremonium alternatu	cttttctctctgaggaaactatgacct-----ct-actggctatggc-----agggaaacaggacttttactt-----tgaaaaaattagagttgct-aggcaggcctt-actcgaatacatttagcatggaaataaaaataggacgtgaggtctattttt	735
Aspergillus fumigatu	cttttctctctgaggaaactatgacct-----ct-actggctatggc-----agggaaacaggacttttactt-----tgaaaaaattagagttgct-aggcaggcctt-actcgaatacatttagcatggaaataaaaataggacgtgaggtctattttt	757
Cladosporium cladosp	cttttctctctgaggaaactatgacct-----ct-actggctatggc-----agggaaacaggacttttactt-----tgaaaaaattagagttgct-aggcaggcctt-actcgaatacatttagcatggaaataaaaataggacgtgaggtctattttt	758
Fusarium culmorum AF	cttttctctctgaggaaactatgacct-----ct-actggctatggc-----agggaaacaggacttttactt-----tgaaaaaattagagttgct-aggcaggcctt-actcgaatacatttagcatggaaataaaaataggacgtgaggtctattttt	758
Penicillium verrucul	cttttctctctgaggaaactatgacct-----ct-actggctatggc-----agggaaacaggacttttactt-----tgaaaaaattagagttgct-aggcaggcctt-actcgaatacatttagcatggaaataaaaataggacgtgaggtctattttt	777
Acremonium alternatu	tggtttctcaggaccggctaatgatttaatagggaatgctgggggcatcagttatcaatgctcagaggtgaatattctggatttgaagaactaactactgcgaaagcatttgcacaggatgttttcaatatacaggaccgaagttaggggatcga	892
Aspergillus fumigatu	tggtttctcaggaccggctaatgatttaatagggaatgctgggggcatcagttatcaatgctcagaggtgaatattctggatttgaagaactaactactgcgaaagcatttgcacaggatgttttcaatatacaggaccgaagttaggggatcga	915
Cladosporium cladosp	tggtttctcaggaccggctaatgatttaatagggaatgctgggggcatcagttatcaatgctcagaggtgaatattctggatttgaagaactaactactgcgaaagcatttgcacaggatgttttcaatatacaggaccgaagttaggggatcga	916
Fusarium culmorum AF	tggtttctcaggaccggctaatgatttaatagggaatgctgggggcatcagttatcaatgctcagaggtgaatattctggatttgaagaactaactactgcgaaagcatttgcacaggatgttttcaatatacaggaccgaagttaggggatcga	915
Penicillium verrucul	tggtttctcaggaccggctaatgatttaatagggaatgctgggggcatcagttatcaatgctcagaggtgaatattctggatttgaagaactaactactgcgaaagcatttgcacaggatgttttcaatatacaggaccgaagttaggggatcga	935
Acremonium alternatu	agcagctcagataccgtctgtcttaaccataaacatgcccagctagggaatgggagcgttcaat-ctgagccctgcccagcctaccgaaatacaaggctctgggctcaggggggatgagctcgcaaggctgaaccttaagaaattgacggg	1050
Aspergillus fumigatu	agcagctcagataccgtctgtcttaaccataaacatgcccagctagggaatgggagcgttcaat-ctgagccctgcccagcctaccgaaatacaaggctctgggctcaggggggatgagctcgcaaggctgaaccttaagaaattgacggg	1074
Cladosporium cladosp	agcagctcagataccgtctgtcttaaccataaacatgcccagctagggaatgggagcgttcaat-ctgagccctgcccagcctaccgaaatacaaggctctgggctcaggggggatgagctcgcaaggctgaaccttaagaaattgacggg	1075
Fusarium culmorum AF	agcagctcagataccgtctgtcttaaccataaacatgcccagctagggaatgggagcgttcaat-ctgagccctgcccagcctaccgaaatacaaggctctgggctcaggggggatgagctcgcaaggctgaaccttaagaaattgacggg	1073
Penicillium verrucul	agcagctcagataccgtctgtcttaaccataaacatgcccagctagggaatgggagcgttcaat-ctgagccctgcccagcctaccgaaatacaaggctctgggctcaggggggatgagctcgcaaggctgaaccttaagaaattgacggg	1094
Acremonium alternatu	agggcaccacaggggtggagcctcggcttaatttgactcaaacacgggaaactcaccaggctccagacacaataggatgacagattgagagctcttctctgattttgggtgggtggatgcatggcgttcttagtttgggtggatgcatgcatgatt	1210
Aspergillus fumigatu	agggcaccacaggggtggagcctcggcttaatttgactcaaacacgggaaactcaccaggctccagacacaataggatgacagattgagagctcttctctgattttgggtgggtggatgcatgcatgatttgggtgggtggatgcatgcatgatt	1234
Cladosporium cladosp	agggcaccacaggggtggagcctcggcttaatttgactcaaacacgggaaactcaccaggctccagacacaataggatgacagattgagagctcttctctgattttgggtgggtggatgcatgcatgatttgggtgggtggatgcatgcatgatt	1235
Fusarium culmorum AF	agggcaccacaggggtggagcctcggcttaatttgactcaaacacgggaaactcaccaggctccagacacaataggatgacagattgagagctcttctctgattttgggtgggtggatgcatgcatgatttgggtgggtggatgcatgcatgatt	1233
Penicillium verrucul	agggcaccacaggggtggagcctcggcttaatttgactcaaacacgggaaactcaccaggctccagacacaataggatgacagattgagagctcttctctgattttgggtgggtggatgcatgcatgatttgggtgggtggatgcatgcatgatt	1254
Acremonium alternatu	aattcagataacgaaacagaccttaaccttaactatgccccttatctttgacaaataggcttcttagagggactctgggtg-aaagccgaggaagtltggagcaataacagctctgtgagcccttagatgcttggggccagcagcctca	1369
Aspergillus fumigatu	aattcagataacgaaacagaccttaaccttaactatgccccttatctttgacaaataggcttcttagagggactctgggtg-aaagccgaggaagtltggagcaataacagctctgtgagcccttagatgcttggggccagcagcctca	1392
Cladosporium cladosp	aattcagataacgaaacagaccttaaccttaactatgccccttatctttgacaaataggcttcttagagggactctgggtg-aaagccgaggaagtltggagcaataacagctctgtgagcccttagatgcttggggccagcagcctca	1394
Fusarium culmorum AF	aattcagataacgaaacagaccttaaccttaactatgccccttatctttgacaaataggcttcttagagggactctgggtg-aaagccgaggaagtltggagcaataacagctctgtgagcccttagatgcttggggccagcagcctca	1392
Penicillium verrucul	aattcagataacgaaacagaccttaaccttaactatgccccttatctttgacaaataggcttcttagagggactctgggtg-aaagccgaggaagtltggagcaataacagctctgtgagcccttagatgcttggggccagcagcctca	1412
Acremonium alternatu	ctgacgggcccagcaggttcaacttgcagaaaggttgggttaacttgttaaacctctcgtgctggggatagagcatttgcattattgctcttcaacaggaaat-cttagtaagcgaagctatcagcttgaattgatttaagctccctgccctttg	1527
Aspergillus fumigatu	ctgacgggcccagcaggttcaacttgcagaaaggttgggttaacttgttaaacctctcgtgctggggatagagcatttgcattattgctcttcaacaggaaat-cttagtaagcgaagctatcagcttgaattgatttaagctccctgccctttg	1552
Cladosporium cladosp	ctgacgggcccagcaggttcaacttgcagaaaggttgggttaacttgttaaacctctcgtgctggggatagagcatttgcattattgctcttcaacaggaaat-cttagtaagcgaagctatcagcttgaattgatttaagctccctgccctttg	1554
Fusarium culmorum AF	ctgacgggcccagcaggttcaacttgcagaaaggttgggttaacttgttaaacctctcgtgctggggatagagcatttgcattattgctcttcaacaggaaat-cttagtaagcgaagctatcagcttgaattgatttaagctccctgccctttg	1550
Penicillium verrucul	ctgacgggcccagcaggttcaacttgcagaaaggttgggttaacttgttaaacctctcgtgctggggatagagcatttgcattattgctcttcaacaggaaat-cttagtaagcgaagctatcagcttgaattgatttaagctccctgccctttg	1572
Acremonium alternatu	tacacaccccccctgctactaccgattgaatggctcagtaggggcttggagctgggctggaggggtgggcaacttaccct-aaagcccggaactcttcaaacctdggctcattaga-----	1644
Aspergillus fumigatu	tacacaccccccctgctactaccgattgaatggctcagtaggggcttggagctgggctggaggggtgggcaacttaccct-aaagcccggaactcttcaaacctdggctcattaga-----	1692
Cladosporium cladosp	tacacaccccccctgctactaccgattgaatggctcagtaggggcttggagctgggctggaggggtgggcaacttaccct-aaagcccggaactcttcaaacctdggctcattaga-----	1694
Fusarium culmorum AF	tacacaccccccctgctactaccgattgaatggctcagtaggggcttggagctgggctggaggggtgggcaacttaccct-aaagcccggaactcttcaaacctdggctcattaga-----	1690
Penicillium verrucul	tacacaccccccctgctactaccgattgaatggctcagtaggggcttggagctgggctggaggggtgggcaacttaccct-aaagcccggaactcttcaaacctdggctcattaga-----	1731

Obrázek 4
Srovnání sekvencí oblasti 18S rDNA mezi *A. fumigatus* (AF548062) a človkem (U13369). Černé bloky vyznačují úseky sekvence homologické mezi všemi druhy

A. FUMIGATUS	5	ATTTAA	100	ATTTAA	200	ATTTAA	300	ATTTAA	400	ATTTAA	500	ATTTAA	600	ATTTAA	700	ATTTAA	800	ATTTAA	900	ATTTAA	1000	ATTTAA	1100	ATTTAA	1200	ATTTAA	1300	ATTTAA	1400	ATTTAA	1500	ATTTAA	1600	ATTTAA	1700	ATTTAA	1800	ATTTAA	1900	ATTTAA	2000	ATTTAA	2100	ATTTAA	2200	ATTTAA	2300	ATTTAA	2400	ATTTAA	2500	ATTTAA	2600	ATTTAA	2700	ATTTAA	2800	ATTTAA	2900	ATTTAA	3000	ATTTAA	3100	ATTTAA	3200	ATTTAA	3300	ATTTAA	3400	ATTTAA	3500	ATTTAA	3600	ATTTAA	3700	ATTTAA	3800	ATTTAA	3900	ATTTAA	4000	ATTTAA	4100	ATTTAA	4200	ATTTAA	4300	ATTTAA	4400	ATTTAA	4500	ATTTAA	4600	ATTTAA	4700	ATTTAA	4800	ATTTAA	4900	ATTTAA	5000	ATTTAA	5100	ATTTAA	5200	ATTTAA	5300	ATTTAA	5400	ATTTAA	5500	ATTTAA	5600	ATTTAA	5700	ATTTAA	5800	ATTTAA	5900	ATTTAA	6000	ATTTAA	6100	ATTTAA	6200	ATTTAA	6300	ATTTAA	6400	ATTTAA	6500	ATTTAA	6600	ATTTAA	6700	ATTTAA	6800	ATTTAA	6900	ATTTAA	7000	ATTTAA	7100	ATTTAA	7200	ATTTAA	7300	ATTTAA	7400	ATTTAA	7500	ATTTAA	7600	ATTTAA	7700	ATTTAA	7800	ATTTAA	7900	ATTTAA	8000	ATTTAA	8100	ATTTAA	8200	ATTTAA	8300	ATTTAA	8400	ATTTAA	8500	ATTTAA	8600	ATTTAA	8700	ATTTAA	8800	ATTTAA	8900	ATTTAA	9000	ATTTAA	9100	ATTTAA	9200	ATTTAA	9300	ATTTAA	9400	ATTTAA	9500	ATTTAA	9600	ATTTAA	9700	ATTTAA	9800	ATTTAA	9900	ATTTAA	10000	ATTTAA
H. SAPIENS	5	ATTTAA	100	ATTTAA	200	ATTTAA	300	ATTTAA	400	ATTTAA	500	ATTTAA	600	ATTTAA	700	ATTTAA	800	ATTTAA	900	ATTTAA	1000	ATTTAA	1100	ATTTAA	1200	ATTTAA	1300	ATTTAA	1400	ATTTAA	1500	ATTTAA	1600	ATTTAA	1700	ATTTAA	1800	ATTTAA	1900	ATTTAA	2000	ATTTAA	2100	ATTTAA	2200	ATTTAA	2300	ATTTAA	2400	ATTTAA	2500	ATTTAA	2600	ATTTAA	2700	ATTTAA	2800	ATTTAA	2900	ATTTAA	3000	ATTTAA	3100	ATTTAA	3200	ATTTAA	3300	ATTTAA	3400	ATTTAA	3500	ATTTAA	3600	ATTTAA	3700	ATTTAA	3800	ATTTAA	3900	ATTTAA	4000	ATTTAA	4100	ATTTAA	4200	ATTTAA	4300	ATTTAA	4400	ATTTAA	4500	ATTTAA	4600	ATTTAA	4700	ATTTAA	4800	ATTTAA	4900	ATTTAA	5000	ATTTAA	5100	ATTTAA	5200	ATTTAA	5300	ATTTAA	5400	ATTTAA	5500	ATTTAA	5600	ATTTAA	5700	ATTTAA	5800	ATTTAA	5900	ATTTAA	6000	ATTTAA	6100	ATTTAA	6200	ATTTAA	6300	ATTTAA	6400	ATTTAA	6500	ATTTAA	6600	ATTTAA	6700	ATTTAA	6800	ATTTAA	6900	ATTTAA	7000	ATTTAA	7100	ATTTAA	7200	ATTTAA	7300	ATTTAA	7400	ATTTAA	7500	ATTTAA	7600	ATTTAA	7700	ATTTAA	7800	ATTTAA	7900	ATTTAA	8000	ATTTAA	8100	ATTTAA	8200	ATTTAA	8300	ATTTAA	8400	ATTTAA	8500	ATTTAA	8600	ATTTAA	8700	ATTTAA	8800	ATTTAA	8900	ATTTAA	9000	ATTTAA	9100	ATTTAA	9200	ATTTAA	9300	ATTTAA	9400	ATTTAA	9500	ATTTAA	9600	ATTTAA	9700	ATTTAA	9800	ATTTAA	9900	ATTTAA	10000	ATTTAA
A. FUMIGATUS	10001	ATTTAA	10100	ATTTAA	10200	ATTTAA	10300	ATTTAA	10400	ATTTAA	10500	ATTTAA	10600	ATTTAA	10700	ATTTAA	10800	ATTTAA	10900	ATTTAA	11000	ATTTAA	11100	ATTTAA	11200	ATTTAA	11300	ATTTAA	11400	ATTTAA	11500	ATTTAA	11600	ATTTAA	11700	ATTTAA	11800	ATTTAA	11900	ATTTAA	12000	ATTTAA	12100	ATTTAA	12200	ATTTAA	12300	ATTTAA	12400	ATTTAA	12500	ATTTAA	12600	ATTTAA	12700	ATTTAA	12800	ATTTAA	12900	ATTTAA	13000	ATTTAA	13100	ATTTAA	13200	ATTTAA	13300	ATTTAA	13400	ATTTAA	13500	ATTTAA	13600	ATTTAA	13700	ATTTAA	13800	ATTTAA	13900	ATTTAA	14000	ATTTAA	14100	ATTTAA	14200	ATTTAA	14300	ATTTAA	14400	ATTTAA	14500	ATTTAA	14600	ATTTAA	14700	ATTTAA	14800	ATTTAA	14900	ATTTAA	15000	ATTTAA	15100	ATTTAA	15200	ATTTAA	15300	ATTTAA	15400	ATTTAA	15500	ATTTAA	15600	ATTTAA	15700	ATTTAA	15800	ATTTAA	15900	ATTTAA	16000	ATTTAA	16100	ATTTAA	16200	ATTTAA	16300	ATTTAA	16400	ATTTAA	16500	ATTTAA	16600	ATTTAA	16700	ATTTAA	16800	ATTTAA	16900	ATTTAA	17000	ATTTAA	17100	ATTTAA	17200	ATTTAA	17300	ATTTAA	17400	ATTTAA	17500	ATTTAA	17600	ATTTAA	17700	ATTTAA	17800	ATTTAA	17900	ATTTAA	18000	ATTTAA	18100	ATTTAA	18200	ATTTAA	18300	ATTTAA	18400	ATTTAA	18500	ATTTAA	18600	ATTTAA	18700	ATTTAA	18800	ATTTAA	18900	ATTTAA	19000	ATTTAA	19100	ATTTAA	19200	ATTTAA	19300	ATTTAA	19400	ATTTAA	19500	ATTTAA	19600	ATTTAA	19700	ATTTAA	19800	ATTTAA	19900	ATTTAA	20000	ATTTAA
H. SAPIENS	10001	ATTTAA	10100	ATTTAA	10200	ATTTAA	10300	ATTTAA	10400	ATTTAA	10500	ATTTAA	10600	ATTTAA	10700	ATTTAA	10800	ATTTAA	10900	ATTTAA	11000	ATTTAA	11100	ATTTAA	11200	ATTTAA	11300	ATTTAA	11400	ATTTAA	11500	ATTTAA	11600	ATTTAA	11700	ATTTAA	11800	ATTTAA	11900	ATTTAA	12000	ATTTAA	12100	ATTTAA	12200	ATTTAA	12300	ATTTAA	12400	ATTTAA	12500	ATTTAA	12600	ATTTAA	12700	ATTTAA	12800	ATTTAA	12900	ATTTAA	13000	ATTTAA	13100	ATTTAA	13200	ATTTAA	13300	ATTTAA	13400	ATTTAA	13500	ATTTAA	13600	ATTTAA	13700	ATTTAA	13800	ATTTAA	13900	ATTTAA	14000	ATTTAA	14100	ATTTAA	14200	ATTTAA	14300	ATTTAA	14400	ATTTAA	14500	ATTTAA	14600	ATTTAA	14700	ATTTAA	14800	ATTTAA	14900	ATTTAA	15000	ATTTAA	15100	ATTTAA	15200	ATTTAA	15300	ATTTAA	15400	ATTTAA	15500	ATTTAA	15600	ATTTAA	15700	ATTTAA	15800	ATTTAA	15900	ATTTAA	16000	ATTTAA	16100	ATTTAA	16200	ATTTAA	16300	ATTTAA	16400	ATTTAA	16500	ATTTAA	16600	ATTTAA	16700	ATTTAA	16800	ATTTAA	16900	ATTTAA	17000	ATTTAA	17100	ATTTAA	17200	ATTTAA	17300	ATTTAA	17400	ATTTAA	17500	ATTTAA	17600	ATTTAA	17700	ATTTAA	17800	ATTTAA	17900	ATTTAA	18000	ATTTAA	18100	ATTTAA	18200	ATTTAA	18300	ATTTAA	18400	ATTTAA	18500	ATTTAA	18600	ATTTAA	18700	ATTTAA	18800	ATTTAA	18900	ATTTAA	19000	ATTTAA	19100	ATTTAA	19200	ATTTAA	19300	ATTTAA	19400	ATTTAA	19500	ATTTAA	19600	ATTTAA	19700	ATTTAA	19800	ATTTAA	19900	ATTTAA	20000	ATTTAA

ní/nezahájení antimykotické terapie. Obecně lze říci, že při správně zvolené izolační metodě je dobrým výchozím materiálem plná periferní krev, která obsahuje jak volnou DNA tak krevní buňky s fagocytovanými částicemi.

Stanovení a srovnání citlivosti izolačních a detekčních metod

Provést absolutní stanovení citlivosti používaných izolačních a detekčních metod je téměř nemožné. Běžně se tato stanovení provádějí inokulací krve od negativního pacienta buď izolovanou DNA, definovaným počtem konidií nebo vláken plísňové kultury. Ani jedna z těchto metod však není schopná plně simulovat situaci v klinickém vzorku. Izolovaná DNA nemůže poskytnout informaci o situaci, kdy je DNA uzavřena v odolné buněčné stěně plísni, konidie se v krvi nevyskytují a přesně natitrovat hyfy také není možné. Proto musíme mít na paměti, že srovnání citlivosti mezi jednotlivými pracemi a uváděné absolutní hodnoty jsou jen velmi orientační.

Výběr metody izolace DNA

Zcela zásadním krokem pro úspěšnou detekci funkčních patogenů je izolace DNA. Velmi účinná metoda izolace DNA je potřebná zejména z důvodu malé koncentrace cirkulující fungální DNA. V literatuře se uvádí, že v krvi cirkuluje při mykotické infekci množství DNA odpovídající 1 CFU v 1 ml krve. Při běžném odběru cca 5 ml krve máme tedy k dispozici cca < 5 CFU na vzorek. Tyto musíme nejprve odizolovat a pak ještě detekovat pomocí PCR. Pokud po izolaci DNA extrahujeme do výsledného objemu 50 µl – pak je jedna CFU přítomna v každých cca 10 µl. Použijeme-li toto množství do PCR dostáváme se velmi blízko k detekčním limitům této metody. Může se stát, že vzniká tzv. sampling efekt, tedy jedna z paralel PCR může být negativní a jiná pozitivní. Ke správné interpretaci takových výsledků potom pomůže opakovaný odběr vzorků.

Na rozdíl od buněčných stěn bakteriálních buněk a obalů virů, které lze rozrušit pomocí detergentů přítomných v lyzačních roztocích většiny komerčně dodávaných izolačních kitů, je složení buněčné stěny hub podobné spíše buňkám rostlinným než živočišným (přítomnost složitých polysacharidů, jako je glukán, galaktomannan, chitin a další). Při izolaci fungální DNA je proto nutné její narušení me-

chanicky, chemicky nebo enzymaticky. Srovnáním účinnosti izolace fungální DNA pomocí různých komerčních kitů [13] a in-house metod [14,15,16] se v poslední době zabývalo několik prací. Pro mechanické rozbití se jako neúčinnější ukázalo rozdrčení mycelií v tekutém dusíku za použití třecí misky a tloučku. Tento postup lze však s úspěchem použít jen pro izolaci DNA z kultur, kdy se DNA následně používá např. pro genotypizaci plísni. Její použití v rutinní diagnostické praxi není možné vzhledem tomu, že se nejedná o jednorázový materiál a hrozila by cross-kontaminace vzorků. Další metodou mechanického rozrušení buněčných stěn je použití inertních skleněných kuliček a vortexu. Tento postup byl použit jednak v několika in-house metodách izolace a je také základem izolace v několika komerčních kitech. Další způsoby, jako např. sonikace, byly používány méně často. Chemická metoda rozložení houbových stěn spočívá v inkubaci vzorku s různými chemickými činidly – kyselými (různé koncentrovaná HCl) nebo zásaditými (5M NaOH), a je opět víceméně na úrovni experimentu.

Nejčastěji používané je enzymatické působení, které spočívá v inkubaci vzorku s roztokem proteolytických a celulozických enzymů (nejčastěji se jedná o proteázu nebo proteinázu K a roztok zymolyázy nebo lytikázy). Hlavní nevýhodou tohoto postupu je poměrně dlouhá doba inku-

bace vzorku s enzymy (1h – přes noc). Celková doba izolace DNA z plné krve pak trvá nejméně 6 hodin. Tím se snižuje možnost použití této metody pro rutinní screeningová vyšetření.

Zdá se, že nevhodnější metodou je kombinace více různých pretreatmentů (ošetření vzorku mechanicky, chemicky nebo enzymaticky) a následně izolace DNA na kolonce pomocí komerčního kitu. Např. použití skleněných kuliček a vortexu zajistí rozbití odolných buněčných stěn, následná aplikace proteinázy K zlyžuje nadbytečné lidské buňky a fungální DNA pak izolujeme na kolonce. Na *obrázku 1* je znázorněno schéma izolace DNA z plné krve s využitím skleněných kuliček a kolonek s přibližnou dobou trvání jednotlivých kroků.

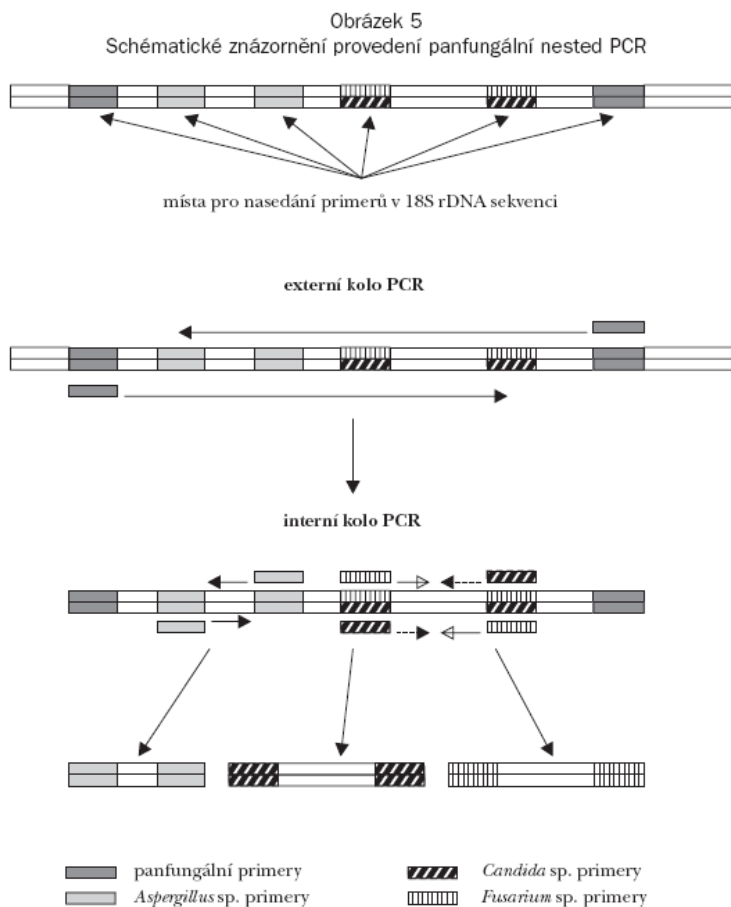
Po izolaci je velmi vhodné změřit koncentraci získané DNA, protože v případě izolace z plné krve je fungální DNA získána spolu s velkým nadbytkem lidské DNA. Je nutné mít stále na paměti, že zejména při detekci rDNA genů existuje značná homologie mezi sekvencemi lidské a fungální rDNA. V přítomnosti velkého nadbytku lidské DNA v PCR reakci primery mohou nespecificky nasedat na lidskou DNA a tímto je inhibována specifická amplifikace.

Další možností jak izolovat fungální DNA je použití automatického izolátoru (s nebo bez pretreatmentu vzorku) a příslušného kitu. Hlavními nevýhodami použití je vysoká pořizovací cena přístrojů, vysoké náklady na jednotlivou analýzu (několik tis. Kč), omezené množství zpracovaného vzorku a omezené spektrum detekovaných mykotických patogenů.

Výběr cílové sekvence pro PCR

Množství fungální DNA přítomné v krvi je na samé hranici citlivosti PCR metod. Proto jsou jako cílové sekvence pro amplifikaci metodou PCR nejčastěji používány tzv. multikopiové geny (jsou v genomu přítomny v desítkách až stovkách kopií). Nejčastějšími cílovými geny pro PCR detekci jsou geny pro jadernou ribozomální DNA (rDNA) a mitochondriální DNA

V genomu *A. fumigatus* je přítomno asi 120 kopií rDNA genů a skládají se ze tří podjednotek: 18S rRNA, 5,8S rRNA a 28S rRNA. Mezi jednotlivými podjednotkami se pak nachází oblasti ITS1 (internal transcribed spacer 1) a ITS2 (internal transcribed spacer 2) – schéma viz *obrázek 2*. Kromě toho, že jsou přítomny ve více kopiích jsou geny pro rDNA mezidruhově hodně konzervované. Proto jsou často používány k navržení primerů pro tzv. panfungální PCR (bude vysvětleno níže). Použití konzervovaných úseků genomu může být velkou výhodou, ale může také značně zkomplikovat situaci. Oblasti totiž nejsou



konzervované jen mezi jednotlivými druhy rodu *Aspergillus*, ale často také s ostatními plísněmi, např. takovými, které často nazýváme „air-borne fungi“, tj. plísněmi běžně přítomnými v prostředí (obr. 3). Např. homologie oblastí ITS1-5,8S-ITS2 (které patří mezi nejvíce variabilní části genu pro rDNA) mezi *A. fumigatus* a *Penicillium* sp. dosahuje téměř 90 % [17]. To vše je nutné mít na paměti při navrhování primerů. Porovnání sekvencí zvolených primerů oproti databázi sekvencí je naprostou nutností. Naše zkušenosti však ukazují, že ani toto není zárukou 100% specifickosti PCR reakce. Proto je nutné, zejména při zavádění nové metody, ověřit specifickost vznikajících PCR produktů sekvencí. Suboptimální podmínky při PCR reakci mohou umožnit amplifikaci sekvencí třeba i s několika bázovou neshodou (mismatch) proti cílové sekvenci.

Dalším úskalím zvolených primerů může být homologie zvolené sekvence s lidskou rDNA (obr. 4). Přestože se jedná o fylogeneticky velmi vzdálené druhy existuje jistý stupeň homologie. Po podrobnější analýze jsme zjistili, některé dosud publikované primery už z principu nemohou specificky detekovat fungální DNA (např. primery N5 a N6 v práci Gutzmer a kol. [18]). Takové primery byly např. publikovány ve studiích, které byly často prováděny na laboratorních kulturách, kde nebyla lidská DNA přítomna. Pro detekci fungální DNA přímo v klinických vzorcích jsou ale nepoužitelné.

PCR a real-time PCR

V podstatě lze používané metody rozdělit na dvě základní skupiny – metody panfungální a metody specifické.

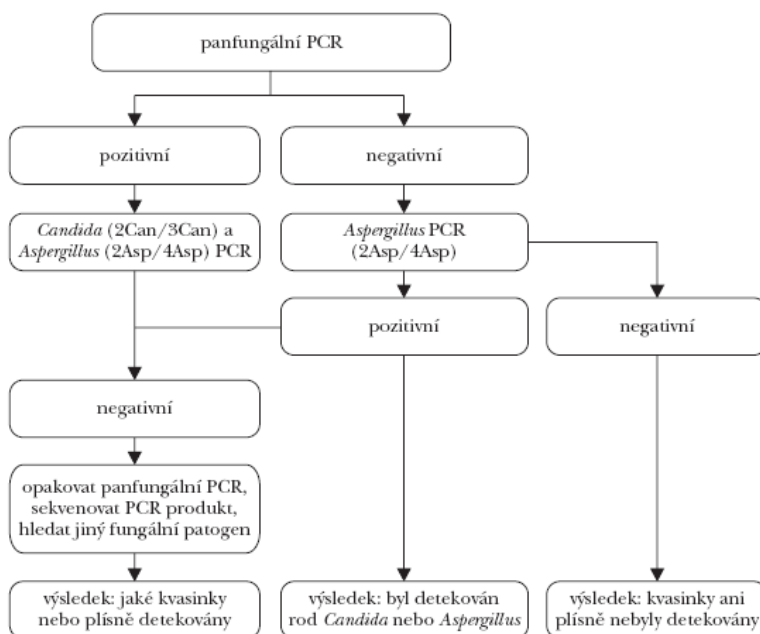
Panfungální mají za úkol amplifikovat DNA z homologních oblastí genu několika druhů buď v rámci jednoho rodu [19] nebo i několika rodů současně [20,21]. Jedná se většinou o metody kvalitativní (tzn. výsledek je pouze pozitivní/negativní) – často nested („uhnížděné“) PCR ke zvýšení citlivosti. Příklad použití nested panfungální PCR je uveden v obrázku 6. V prvním (externím) kole jsou do reakce použity primery, které nasedají na úsek DNA homologní pro všechny detekované druhy. V druhém (interním) kole jsou potom v jedné nebo více nezávislých reakcích použity primery specifické např. pro jednotlivé rody nebo druhy. Primery dokážou na cílovou sekvenci nasednout i přes jedno- nebo dvoubázové neshody v párování (neměly by být přítomny v posledních třech bázích na 3' – konci primeru). Použití nested PCR je obecně spojováno s vyšším rizikem kontaminace v důsledku větší manipulace s PCR produkty z externího kola. Naopak velkou výhodou je zvýšená citlivost reakce, která je cca 10x citlivější než real-time PCR.

Jistým mezikrokem mezi kvalitativ-

ní a kvantitativní panfungální PCR je použití real-time PCR s fluorescenčním barvivem SYBR Green. V této reakci vznikají PCR produkty jako při kvalitativní PCR, ale při reakci jsou ještě do vznikající dvouřetězcové DNA nespécificky inkorporovány molekuly SYBR Green. Specifické produkty lze od nespécifických po PCR reakci odlišit provedením tzv. analýzy tání PCR produktů (melting analysis). Spočívá v postupném zahřívání reakční směsi v rozmezí teplot 50–99 °C. Při vzrůstající teplotě dochází k denaturaci dvouřetězcové DNA, uvolnění molekul SYBR Green a tím vymizení fluorescence. Specifické a nespécifické produkty budou v důsledku různé délky (ale i obsahu GC párů atd.) denarovat při různé teplotě, a tím je lze odlišit. Použití SYBR Green real-time PCR je tedy možné a bylo popsáno [22], ale jeho optimalizace je složitá. Navíc k jednoznačnému určení druhu mykotického patogena je často nutné vyšetření doplnit o další kroky, např. o sekvenční analýzu.

Nejrychlejší a nespécifitější metodou detekce je použití real-time PCR se specifickými sondami. Do současné doby bylo publikováno několik desítek prací, které k detekci fungálních infekcí používají real-time PCR. Nejčastěji se jedná o reakce specifické pro jeden rod či druh. V podstatě jsou použity všechny 3 základní přístupy, které můžeme u real-time PCR nalézt – hybridizační sondy [10,23,24,25,26], hydrolyzační sondy [8,27,28] i molecular beacons [29]. Lewis White a kol. [30] publikovali (mezi)národní multicentrickou studii srovnání PCR metod pro detekci *Aspergillus* sp. a *Candida* sp. Zatímco metody pro detekci *Candida* sp. byly mezilaboratorně dobře srovnatelné a dosahovaly dosta-

Obrázek 6
Schéma vyšetřování klinických vzorků na přítomnost mykotických patogenů jak bylo navrženo v práci Lewis-White a kol. [30]



čující citlivosti (10 CFU), testované metody pro detekci *Aspergillus* sp. byly mnohem variabilnější. Po podrobných analýzách bylo doporučeno schéma testování klinických vzorků, které je prezentováno na obrázku 6.

Prvním krokem je testování pomocí panfungální PCR publikované Loefflerem a kol. [26]. Na tuto navazuje použití dvou specifických metod pro detekci *Candida* sp. a dvou metod pro detekci *Aspergillus* sp. Pro detekci rodu *Aspergillus* sp. byly vybrány dvě real-time metody využívající hydrolyzační sondy, které vznikly kombinací dříve publikovaných metod [7,12]. Bohužel u obou metod jsou v článku zmíněny problémy se specifitou – dochází k amplifikaci lidské DNA při použití přístrojů Rotorgene 3000 (Corbet Research) a 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems). Reakce tedy zřejmě nejsou dostatečně robustní na to, aby mohly být používány rutinně jako screeningová metoda.

Závěr

Závěrem je možno říci, že PCR a real-time PCR mají své místo vedle ostatních moderních metod pro diagnostiku invazivní aspergilózy. Technické zvládnutí metod izolace se již nyní stává snadnějším díky vývoji nových komerčních kitů. V současné době je také již k dispozici první komerční kit pro detekci *Aspergillus* sp. – *Aspergillus* Tracer (Affigene, Francie). Klíčovým problémem zůstává objasnění biologických procesů při invazivní mykotické infekci, reakci imunitního systému a odpovědi na antimykotickou léčbu. Ve světle těchto poznatků pak bude možné pochopit a správně interpretovat výsledky molekulárně-biologické detekce mykotických patogenů v klinických vzorcích.

Tato práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NR8452-3/2005.

Literatura:

- Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002;100(13):4358–4366.
- Jordanides NE, Allan EK, McLintock LA, et al. A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(4):389–395.
- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgrad Med*. 2007;9(3):240–252.
- Latge JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*. 2001;9(8):382–389.
- Raad I, Hanna H, Huaranga A, et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis using polymerase chain reaction-based detection of *Aspergillus* in BAL. *Chest*. 2002;121(4):1171–1176.
- Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J, et al. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4304–4311.
- Kami M, Fukui T, Ogawa S, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1504–1512.
- Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):844–846.
- Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJG, Verweij PE. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-(beta)-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1711–1718.
- Costa C, Costa JM, Desterke C, et al. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2224–2227.
- Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(10):3830–3833.
- White PL, Linton CJ, Ferry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis*. 2006;42(4):479–486.
- Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5122–5128.
- Griffiths LJ, Anym M, Doffman SR, et al. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 9):1187–1191.
- Karakousis A, Tan L, Ellis D, Alexiou H, Wormald PJ. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microbiol Methods*. 2006;65(1):38–48.
- Lugert R, Schettler C, Gross U. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro. *Mycoses*. 2006;49(4):298–304.
- Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1510–1515.
- Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 12):1207–1214.
- Skladny H, Buchheidt D, Baust C, et al. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):3865–3871.
- Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):2902–2908.
- Gaudio PA, Gopinathan U, Sangwan V, Hughes TE. Polymerase chain reaction based detection of fungi in infected corneas. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(7):755–760.
- Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, et al. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 3):243–248.
- Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47(3):487–496.
- Spiess B, Buchheidt D, Baust C, et al. Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):1811–1818.
- Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(8):745–753.
- Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):586–590.
- Costa C, Vidaud D, Olivi M, et al. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J Microbiol Methods*. 2001;44(3):263–269.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3922–3925.
- Musher B, Fredricks D, Leisenring W, et al. *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5517–5522.
- White PL, Barton R, Guiver M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: A United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn*. 2006;8(3):376–384.

1.2.3. Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Lengerová M., Mayer J.: Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných pomocí sérologických metod. Vnitřní lékařství, 53, 2007, 9: 990-999

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod

Z. Ráčil¹, I. Kocmanová², B. Wagnerová¹, M. Lengerová¹, J. Mayer¹

¹ Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

² Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prim. MUDr. Alena Ševčíková

Souhrn: Invazivní mykotické infekce se během posledních dvou dekad staly jedním z důležitých faktorů ovlivňujících morbiditu a mortalitu nemocných s hematologickou malignitou. Přestože se v posledních několika letech setkáváme s nárůstem incidence invazivních mykóz způsobených vzácně se vyskytujícími houbami, absolutní většina oportunních mykotických infekcí je způsobena kmeny kandid a především pak kmeny aspergilů. Časná diagnóza a zahájení účinné antimykotické léčby má zásadní vliv na prognózu nemocných. V poslední době došlo k výraznému pokroku právě na poli časně diagnostiky invazivních mykóz – vedle nových zobrazovacích metod je to především rozvoj nových sérologických metod. V následující souhrnné práci přinášíme základní informace o nejdůležitějších z nich a zejména o jejich využití v rutinní klinické praxi.

Klíčová slova: hematologické malignity – invazivní mykotické infekce – sérologické metody – galaktomannan – mannan – anti-mannan – 1,3-β-D-glukan

Early diagnosis of invasive fungal infections in hematooncological patients by serological methods

Summary: Invasive fungal infections have become one of the major causes of morbidity and mortality in hematooncological patients over the past 2 decades. Even there is an increasing incidence of invasive fungal infections caused by rare filamentous fungi, the majority of infections are caused by *Candida* sp. and especially *Aspergillus* sp. Early diagnosis and prompt initiation of anti-fungal treatment are leading factors influencing prognosis of patients with invasive fungal infection. Important advances in the field of early diagnosis of invasive fungal infections have been realized over the last years. Beside of new radiological methods the major progress has been done in serological methods. In this paper we review the most important of these serological methods and their position in routine clinical practice.

Key words: hematological malignancies – invasive fungal infections – serological methods – galactomannan – mannan – anti-mannan – 1,3-β-D-glucan

Důvody pro vývoj a používání sérologických metod v diagnostice invazivních mykotických infekcí

Invazivní mykotické infekce představují závažnou infekční komplikaci imunokompromitovaných nemocných s nádorovým onemocněním. Ve srovnání s bakteriálními infekcemi je jejich výskyt jednoznačně méně častý, na druhou stranu incidence invazivních mykotických infekcí narůstá a morbidita a mortalita s nimi spojená je výrazně vyšší, než je tomu u infekcí bakteriálních. Přestože invazivní mykózy

postihují celou skupinu nemocných s nádorovým onemocněním, je jejich výskyt u pacientů se solidními nádory spíše vzácný. Naopak velice časté jsou u nemocných s hematologickými malignitami, a to především, je-li součástí léčebného režimu transplantace krvetvorné tkáně [1,2].

Během posledních dvou dekad došlo k signifikantnímu nárůstu frekvence výskytu těchto infekcí u hematoonkologických nemocných [1]. U této skupiny pacientů se v závislosti na charakteru onemocnění, respektive charakteru a intenzitě protinádorové

léčby, pohybuje incidence invazivních mykóz od 2 % (např. autologní transplantace krvetvorné tkáně) až po 15 až 25 % (např. indukční léčba akutní leukemie nebo alogenní transplantace krvetvorné tkáně) [3]. Vedle zvýšení incidence invazivních mykotických infekcí však dochází i ke změně ve spektru vyvolávajících patogenů. Od začátku 90. let minulého století, kdy se u hematoonkologických nemocných rozšířila masivní profylaxe flukonazolem, trvale klesá incidence invazivních kandidóz, zejména vyvolaných na flukonazol citlivými kmeny kvasinek [4–6]. Naopak

Tab. 1. Nejvýznamnější studie sledující význam detekce GM pro diagnostiku invazivní aspergilózy (IA) u hematoonkologických nemocných.

Práce	celkový počet pacientů/ počet pacientů s IA	GM cut-off index	senzitivita (%)	specifická (%)	PPV (%)	NPV (%)
Maertens (1999) [20]	243/33	1,0	92,6	95,4	93	95
Maertens (2001) [21]	362/95	1,0	89,7	98,1	87,5	98,4
Maertens (2002) [22]	100/27	1,0	97,4	98,8	94,4	98,8
Sulahians (2001) [23]	797/53	1,5	90,5	94	52	98,7
Herbrecht (2002) [24]	797/153	1,5	29,4	94,8	57,7	84,9
Rovira (2004) [26]	74/8	1,5	75	100	100	97
Pinel (2003) [25]	807/48	1,0	50	99,6	85	96,8

GM – galaktomannan, IA – invazivní aspergilóza, PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

ve stejném období dochází k výraznému nárůstu incidence invazivních infekcí vyvolaných vláknitými houbami [4–6]. Absolutní většinu představuje invazivní aspergilóza, která je v současné době nejčastější mykózou u nemocných po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně [7,8]. Incidence infekcí vyvolaných ostatními vláknitými houbami, a to především invazivní zygomykóza a invazivní fusarióza, je naštěstí sice stále nízká, ale i tato během posledních několika let zvláště ve velkých transplantčních centrech významně narostla [9].

Vysoká mortalita na tato onemocnění, anebo naopak úspěch léčby jsou ovlivňovány celou řadou faktorů. Nicméně klíčový vliv na zlepšení přežití pacientů s invazivní mykotickou infekcí má časné zahájení účinné antimykotické léčby ještě v době, kdy je nálož mykotického patogenu malá a poškození tkáně omezené [10,11]. Bohužel časné zahájení léčby, které vyžaduje včasnou a co možná nejpřesnější diagnózu, zůstává největší překážkou a nejednou se stává, že je definitivní diagnóza stanovena až ante mortem. Klinické symptomy těchto infekcí jsou totiž velmi variabilní a nespecifické a často se rozvíjejí až velmi pozdě. Konvenční mikrobiologické metody (mikroskopie, kultivace) jsou většinou v časných stádiích nevytěžné. Histologický průkaz infekce (přestože stále zůstává základním kamenem pro definitivní potvrzení diagnózy), vyžaduje

invazivní výkon, který je často u trombocytopenických pacientů neproveditelný. Konvenční radiologické metody jsou málo senzitivní. Výjimku představuje pouze vysoce rozlišovacího CT (HR CT) v časně diagnostice plicních forem invazivních mykóz způsobených vláknitými houbami, nicméně RTG náleznám ani v tomto případě nedokáže přinést informaci o původu, eventuálně změnách v plicním parenchymu [12,13].

Z výše uvedeného vyplývá potřeba nových přístupů k časné diagnostice invazivních mykotických infekcí, zvláště pak v souvislosti se skupinou nejvíce ohrožených nemocných pacientů s hematologickou malignitou. Období mezi vznikem infekce a rozvojem klinických příznaků představuje terapeutické okno – pokud je ovšem v tomto období infekce pravidelným screeningem detekována, může být časně zahájena agresivní antimykotická léčba s následným zlepšením prognózy nemocných.

Tento takzvaný preemptivní přístup vyžaduje rychlé, neinvazivní, senzitivní a specifické diagnostické metody.

Tyto požadavky splňují v posledních letech se rozvíjející nekultivační diagnostické metody, které obecně dělíme na molekulárně biologické a sérologické.

Metody **molekulárně biologické** využívají detekce nukleových kyselin mykotických patogenů pomocí různých variant polymerázové řetězové reakce (PCR). Bohužel přestože se zdá PCR detekce invazivních mykóz velmi perspektivní, doposud nebyla nalezena

standardní a optimální metodika, která by byla všeobecněji rozšířena, a tak do dnešního dne nelze výsledky mezilaboratorně srovnávat. PCR metody tedy zatím není možno využít jako diagnostické kritérium pro invazivní mykotické infekce [14,15].

Druhá skupina nekultivačních metod využívá **imunologických nebo biochemických postupů** k detekci cytoplazmatických antigenů, antigenů buněčné stěny nebo protilátek proti nim v séru nebo jiných tělesných tekutinách. Tyto metody se souhrnně označují jako **sérologické**. V rámci sérologické diagnostiky invazivních mykóz byla zkoušena celá řada postupů. Nicméně většího uplatnění a klinického významu dosáhlo pouze několik z nich: detekce antigenu galaktomannanu pro invazivní aspergilózu, obdobně detekce mannanu a protilátek proti němu (antimannanu) v diagnostice invazivní kandidózy a nově pak detekce antigenu 1,3-β-D-glukanu, který umožňuje „panfungální“ diagnostiku.

V této souhrnné práci bychom chtěli informovat o možnostech laboratorní diagnostiky pomocí sérologických metodik a o klinickém využití takto získaných výsledků v časně diagnostice invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických pacientů.

Galaktomannan – marker invazivní aspergilózy (IA)

Galaktomannan (GM) je polysacharid buněčné stěny aspergilu a některých

dalších hub, který se uvolňuje do tělesných tekutin při růstu a invazi aspergilových hyf do tkání [16,17]. Pro detekci tohoto antigenu v séru a ostatních tělesných tekutinách se využívá krysích monoklonálních protilátek EB-A2, které jsou vysoce specifické pro β -1,5-galaktofuranozylové konce aspergilového galaktomannanu. První komerční kit pro detekci GM byl postaven na principu latexové aglutinace a uveden na trh v roce 1990 (Pastorex Aspergillus). Vzhledem k relativně vysokému detekčnímu limitu (15–20 ng/ml) je však jeho používání spojeno s nízkou senzitivitou. V roce 1995 byl proto na trh uveden nový produkt firmy BioRad, který využívá ELISA metodiku (Platelia Aspergillus). Jeho detekční limit je výrazně nižší (0,5–1 ng/ml), což odpovídá výrazně vyšší senzitivě [18,19]. Reakce je semikvantitativní – výsledek je udáván jako index pozitivity (IP) – poměr mezi naměřenou optickou densitou a optickou densitou kontrolního séra obsahujícího přibližně 1 ng GM/ml.

Prospektivní studie sledující detekci galaktomannanu jako markeru invazivní aspergilózy u nemocných s vysokým rizikem vzniku této infekce ukázaly, že Platelia Aspergillus test má vysokou specifitu pohybující se v rozmezí 81 %–100 %. Extrémně vysoká je také negativní prediktivní hodnota testu, která je v absolutní většině studií nad 95 %. Negativní výsledek testu tedy s velmi vysokou pravděpodobností vylučuje invazivní aspergilózu a falešné negativity jsou vzácné [12,19–26]. Na druhou stranu senzitivita a pozitivní prediktivní hodnota jsou bohužel do určité míry slabými místy tohoto testu.

Senzitivita testu v různých pracích totiž značně kolísá, a to v rozmezí 30 % až 100 % [12,19–26]. Příčin kolísající senzitivity, a tedy faktorů, které senzitivitu testu ovlivňují, je několik. Prvním bodem je hodnota tzv. cut-off indexu pozitivity (cut-off IP), tedy hodnoty indexu pozitivity, od které je vzorek označen jako pozitivní. Maertens et

al, ale i další autoři prokázali, že snížení cut-off z hodnoty IP = 1,5 na hodnotu IP = 0,5 vede k výraznému zvýšení senzitivity testu při současném jen mírném zhoršení jeho specifity (82,7 % vs 96,5 %) [27]. Toto snížení cut-off indexu pozitivity je důležité především u nemocných, kteří dostávají profylakticky antimykotika s efektem na vláknité houby a u nemocných po transplantaci krve tvorné tkáně s reakcí štěpu proti hostiteli (GvHD). U obou těchto skupin pacientů je mykotická nálož nízká a proto při užití vyšších hodnot cut-off IP by tyto nemocní byli falešně označeni za negativní a naopak při cut-off IP = 0,5 je test dokáže správně označit za pozitivní [28,29]. Druhým faktorem ovlivňujícím senzitivitu je frekvence a pravidelnost vyšetřování. Maximální senzitivita je u vysoce rizikových nemocných (pacienti s akutní leukémií podstupující indukční nebo reindukční léčbu, nemocní podstupující alogenní transplantaci krve tvorné tkáně, zvláště pak při rozvoji reakce štěpu proti hostiteli) dosaženo, jestliže jsou odběry krve pro detekci GM prováděny pravidelně a to 2–3krát týdně a potom minimálně 1krát týdně po propuštění z hospitalizace, jestliže riziko invazivní aspergilózy trvá (např. při přítomnosti chronické reakce štěpu proti hostiteli) [19,30].

Druhým slabým místem je pozitivní prediktivní hodnota (PPV) testu (čili pozitivní výsledek správně označí nemocného s invazivní aspergilózou). PPV kolísá v různých pracích v rozmezí 50 %–100 % [12,19–26]. Opět se setkáváme s celou řadou faktorů, které PPV testu ovlivňují. Prvním z těchto faktorů je incidence IA ve vyšetřované skupině pacientů. Pravděpodobnost, že pozitivní výsledek testu označí skutečně nemocného pacienta, je nejvyšší ve skupinách nemocných s nejvyšší incidencí invazivní aspergilózy a těmi jsou především nemocní s akutní leukémií a pacienti po alogenní transplantaci krve tvorné tkáně (incidence IA je zde 10 % resp. 20 %). U ostatních skupin

pacientů, kde je incidence IA nízká (nemocní s lymfomy, mnohočetným myelomem, chronickými leukémiemi a nebo po autologní transplantaci krve tvorné tkáně), je významně nižší i PPV testu [18]. Druhým faktorem ovlivňujícím PPV a specifitu Platelia Aspergillus testu, je kritérium, které označí pacienta jako pozitivního (jednorázová vs opakovaná/konsekutivní pozitivita vzorku). Maertens et al využil test k prospektivnímu sledování nemocných s vysokým rizikem invazivní aspergilózy a prokázal, že jak při použití cut-off indexu pozitivity 1,0, tak 0,5 specifita testu významně narůstá, pokud je nemocný označen za skutečně pozitivního až při pozitivitě 2 vzorků jdoucích za sebou (85,4 % vs 98,8 % a 98,6 % vs 85,1 %) [22,27]. Konečně nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím PPV testu je přítomnost falešných pozitivit. I přes používání konsekutivní pozitivity, je až 20 % pozitivních výsledků falešně pozitivních [18]. Příčin falešných pozitivit Platelia Aspergillus testu je celá řada a mohou být rozděleny do 3 skupin:

- kontaminace vzorku při odběru nebo zpracování,
- průnik antigenu (pravého nebo zkříženě reagujícího) přes poškozenou nebo nezralou sliznici zařizovacího traktu,
- reakce s antigenem (pravým nebo zkříženě reagujícím) v cirkulaci [18,31,32].

Nejvýznamnější příčiny falešné pozitivity ukazuje tab. 2. Odlišení falešné pozitivity od pozitivní skutečné je často nesnadné. Kontaminaci vzorku nám pomůže identifikovat jednak retest pozitivního vzorku a jednak již výše zmíněný požadavek na nutnost minimálně 2 pozitivních vzorků pro označení nemocného jako skutečně pozitivního. V ostatních případech je nutná jednak znalost možných příčin falešné pozitivity lékařem, který provádí interpretaci výsledků, ale především přítomnost jiných známek invazivní aspergilózy (klinický stav, zobrazovací

Tab. 2 Příčiny falešné positivity Platelia Aspergillus testu.

Falešná pozitivita	Mechanismus	Poznámky	Reference
1. Kontaminace vzorku při odběru nebo zpracování vzorku			
<ul style="list-style-type: none"> kontaminace vzdušnými sporami <i>Aspergillus sp.</i> a <i>Penicillium sp.</i> kontaminace vatou (např. při desinfekci místa odběru) 	detekce GM z kontaminujících vláken aspergilů a penicilií zkřížená reakce s glukopyranozovými zbytky	sporadické positivity; k odlišení slouží retest vzorku v laboratoři a vyšetření opakovaného odběru	[57] [58]
2. Průnik antigenu z GIT při postižení nebo nezralosti GIT			
<ul style="list-style-type: none"> předčasně narozené děti, novorozenci mukozitida, střevní GvHD 	průnik antigenů z <i>Bifidobacterium sp.</i> přes nezralou mukózu a zkřížená reaktivita polysacharidů buněčné stěny bifidobakterií s EB-A2 průnik GM ze stravy přes poškozenou mukózu	GM obsažen v celé řadě potravin (těstoviny, rýže, kyselé zelí a další); většinou současně s postižením GIT nutný alespoň částečně zachovaný perorální příjem stravy	[59] [60,61]
3. Reakce s antigeny v cirkulaci			
<ul style="list-style-type: none"> infekce <i>Penicillium sp.</i> penicilinová ATB (piperacilin/tazobactam, ampicilin, co-amoxicillin od některých výrobců) 	zkřížená reakce s polysacharidem penicilií reakce s GM kontaminujícím semisyntetická penicilinová ATB	klinicky nejčastější a nejvýznamnější příčina falešných pozitivit	[32] [18,62,63]
4. Ostatní - zmiňované, ale neověřené příčiny			
<ul style="list-style-type: none"> cyklofosamid bakteriemie paraproteinemie transfúzní přípravky a krevní deriváty 			[32] [32] [64] [65]

GM – galaktomannan, GIT – gastrointestinální trakt, ATB – antibiotika

metody) a nebo alespoň přítomnost rizika pro její vznik (např. nemocný po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně). Klinicky nejvýznamnější příčiny možných falešných pozitivit testu jsou pozitivita při podávání penicilinových antibiotik (piperacilin/tazobactam, ampicilin, některé co-amoxiciliny) a pozitivita při postižení zažívacího traktu [18].

Detekce GM pomocí testu Platelia Aspergillus přináší několik klinicky velmi důležitých výhod.

GM může být při pravidelně prováděném monitoringu zachycen v séru nemocných s invazivní aspergilózou ve velmi časném stádiu infekce, často před rozvojem symptomů nebo podezřelých radiologických abnormalit. V práci Maertense et al předcházela pozitivita GM v séru u 55 % nemocných rozvoj febrilií, a to s mediánem

3,5 dne, u 80 % pacientů abnormalitu na RTG a nebo CT plic s mediánem 8 resp. 6 dnů. Pravděpodobně nejdůležitějším faktem však zůstává, že pozitivita GM předcházela u téměř 90 % pacientů s mediánem 6 dnů zahájení účinné antimykotické léčby. Pravidelně prováděné vyšetřování GM u nemocných s vysokým rizikem IA tedy umožní o řadu dní zkrátit interval do stanovení diagnózy a do zahájení podávání účinného antimykotika a tak výrazně zlepšit prognózu těchto pacientů [11,12].

Další velkou výhodou GM je možnost diferenciální diagnostiky abnormalit na HR CT plic. Obraz invazivní aspergilózy na HR CT, přestože jsou popisované některé charakteristické známky (halo sign, air crescent sign), může být velmi variabilní a při negativě konvenčních mikrobiologických

metod (kultivace, mikroskopie ze sputa nebo tekutiny z bronchoalveolární laváže) je zjištění mykotické etiologie procesu velmi obtížné, ne-li nemožné [33]. Je-li však abnormalita na HR CT doplněna současnou pozitivitou GM ze séra, pak jsou již splněna kritéria pravděpodobné invazivní aspergilózy dle EORTC/MSG (European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group), a mohou tak být ihned podána antimykotika s účinkem na kmeny aspergilů [30,34]. Konečně, na rozdíl od HR CT, může GM detekovaný v séru (resp. vývoj indexu positivity) sloužit jako marker léčebné odpovědi a nebo naopak selhávání zvolené antimykotické léčby [30]. Při efektivní antimykotické léčbě hodnota IP v průběhu léčby klesá, a naopak při jejím selhávání hodnota IP intenzivně narůstá, a dojde-li k více

než dvojnásobnému nárůstu IP po 1 týdnu antimykotické léčby, je s více než 90% jistotou zvolený léčebný postup neúčinný [35].

Přestože je Platelia Aspergillus test určen primárně k vyšetřování séra, lze pomocí něj detekovat GM i v jiných tělesných tekutinách, eventuálně v tkáních [36]. Protože invazivní aspergilóza je ve většině případů inhalační infekcí a primárně jsou postiženy plíce, není překvapením, že nejčastěji vyšetřovaným materiálem jiným než sérum je tekutina získaná bronchoalveolární laváží (BAL). Detekce GM z tekutiny získané BAL je spojena se senzitivitou pohybující se od 60–100 %. Senzitivita je opět vyšší, jestliže je použit jako cut-off dnes doporučovaný IP = 0,5, přičemž specifita testu zůstává stále vysoká (94 %) [37]. Výhodou detekce GM z tekutiny získané BAL je především významně vyšší senzitivita a časnější pozitivita ve srovnání s konvenčními mikrobiologickými metodami používanými k detekci IA z materiálu získaného BAL (kultivace, mikroskopie). Jsou popsány případy, kdy pozitivita GM z tekutiny získané BAL předcházela pozitivitu GM v séru. Tyto nálezy odpovídají patogenezi plicní formy invazivní aspergilózy. V běžné klinické praxi, kdy většinou provádíme BAL v případě nálezu plicních infiltrátů na zobrazovacích metodách, je časový rozdíl mezi pozitivním záchytem GM z krve a z BAL většinou minimální.

Dalším materiálem, ve kterém je často GM detekován, je mozkomíšní mok. Postižení centrálního nervového systému je většinou součástí diseminace plicní formy IA, spíše výjimečně jde o izolované postižení. Detekce GM z mozkomíšního moku u nemocných s postižením CNS je spojena, na rozdíl od velmi často negativní kultivace, s velmi vysokou senzitivitou pohybující se mezi 80–100 % [38,39]. Pozitivita GM z mozkomíšního moku (samotná nebo spolu s pozitivitou GM v séru) je tak vedle klinického a případně i radiologického nálezu jediný mikrobiologický marker, který může vést k dia-

Tab. 3. Detekce galaktomannanu – Platelia Aspergillus – souhrn.

Indikace

- pravidelný monitoring minimálně 2–3krát za týden indikován u pacientů s nejvyšším rizikem IA (alogenní HSCT, GvHD, neutropenie při léčbě AML)
- u ostatních hematologických nemocných indikován odběr při febriliích nereagujících na antibiotika nebo rozvoji plicních infiltrátů

Interpretace

- jako pozitivní je se označuje vzorek s IP > 0,5
- jako pozitivní se označuje nemocný s minimálně s dvěma vzorky s IP > 0,5
- každý první vzorek s IP > 0,5 by měl být v laboratoři netestován pro odlišení laboratorní kontaminace
- každá první pozitivita by měla být ověřena odběrem dalšího vzorku v co nejkratším časovém intervalu

Využití

- časná detekce invazivní aspergilózy
- diferenciální diagnostika plicních infiltrátů
- monitorace léčebné odpovědi na antimykotika
- rizikové body:
 - a) možnost falešných pozitivit
 - b) falešné negativity jsou spíše vzácné
 - c) nízké (hraniční) hodnoty výsledků lze očekávat u nemocných s profylaxí antimykotiky s účinkem na vláknité houby

Další materiály vhodné k testování

- tekutina získaná z BAL – diferenciální diagnostika plicních infiltrátů, možnost časnější pozitivita ve srovnání s detekcí GM v séru
- mozkomíšní mok – diagnostika postižení CNS invazivní aspergilózou

IA – invazivní aspergilóza, HSCT – transplantace krvetvorné tkáně, GvHD – reakce šlepu proti hostiteli, AML – akutní myeloidní leukemie, IP – index positivity, BAL – bronchoalveolární laváž, CNS – centrální nervový systém

gnóze postižení CNS invazivní aspergilózou [38]. Je však nutné si uvědomit, že i při plicní formě IA (bez postižení CNS) může část sérového GM pronikat přes hematoencefalickou bariéru stejně tak jako může dojít k „kontaminaci“ mozkomíšního moku GM z krve při hemoragickém odběru vzorku likvoru. IP pozitivita GM v mozkomíšním moku však v těchto případech bývají výrazně nižší [30,38].

Detekce GM z jiných tělesných tekutin eventuálně z tkání byla sice testována, nicméně interpretace výsledků není v současné době jednotná (30).

Mannan a antimannan – diagnostika invazivní kandidózy (IC)

Sérologická diagnostika invazivní kandidózy (IC) je na rozdíl od invazivní as-

pergilózy (IA) mnohem složitější. Přestože různé metodiky pro sérologickou diagnostiku IC byly testovány již od 80. let minulého století, jsou publikované zkušenosti mnohem sparské, než je tomu u invazivní aspergilózy (IA). Hlavním problémem je složitá interpretace výsledků, která souvisí s patofyziologií IC, která je dynamickým procesem. U hematologických nemocných představuje vznik invazivní kandidózy kontinuum od kolonizace nemocného přes postupný průnik kvasinek různým stupněm poškozenou mukózou až k jednoznačné infekci krevního řečiště a tkání [40]. V průběhu vývoje byla testována řada markerů využitelných pro časnou diagnostiku IC (enoláza, heat shock proteiny, arabinitol a další), nicméně širšího klinického využití dosáhly jen dva testy (komerčně dostupné) – detekce

Tab. 4. Nejvýznamnější studie sledující význam detekce mannanu, antimannanu a jejich kombinace pro diagnostiku invazivní kandidózy.

Práce	senzitivita (%)	specifická (%)	PPV (%)	NPV (%)
Mannan				
Sendid et al. (1999) [42]	40	98	85	84
Eloy et al. (2002) [66]	43	100		
Rimek et al. (2004) [67]	67	49		
Rimek et al. (2004) [68]	73			
Chen et al. (2004) [69]	30			
White et al. (2005) [70]	75	97		
Antimannan				
Sendid et al. (1999) [42]	53	94	72	87
Persat et al. (2002) [45]	95	52		
Mannan + antimannan				
Sendid et al. (1999) [42]	80	93	78	93
Chen et al. (2004) [69]	80	92-100		
Prela et al. (2005) [71]	89	84	86	88

PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

mannanu a protilátek proti němu, tzv. antimannanu.

Polysacharid mannan je spolu s glukany hlavní komponentou buněčné stěny kvasinek. Na rozdíl od glukánů je však vázán kovalentními vazbami na proteiny buněčné stěny a je vysoce imunogenní [40]. V průběhu invazivní kvasinkové infekce dochází k uvolňování mannanu do tělesných tekutin, kde pak může být detekován. Jeho biologický poločas v krvi je však velmi krátký (pohybuje se v hodinách) a pokud tedy má být zachycen, je nutný frekventní odběr vzorků krve (41). Pro detekci mannanu je využívána monoklonální protilátka EB-CA1, rozpoznávající α -oligomanosové zbytky. Iničiálně (podobně jako u galaktomannanu) byla tato protilátka použita v latexové aglutinaci (Pastorex Candida). Ovšem detekční limit této soupravy je opět relativně nízký (1,5 ng/ml) a senzitivita testu tak nedostatečná. V současné době se mannan detekuje pomocí senzitivnější ELISA metodiky (Platelia Candida Ag) s limitem 0,1–0,5 ng/ml a za pozitivní je považován vzorek s koncentrací mannanu větší než 0,5 ng/ml. Izolovaná detekce tohoto antigenu pro diagnostiku invazivní kandidózy je

však i přes použití ELISA metodiky limitována nízkou senzitivitou, která se pohybuje v rozmezí 30 %–70 % (tab. 4).

Existují dvě hlavní příčiny.

Především je to tranzientnost a rychlá eliminace mannanu z cirkulace a tak nejsou-li odběry prováděny dostatečně často, nemusí být mannan vůbec zachycen. Příkladem může být práce Sendida et al, kde byl mannan ve skupině nemocných s IC, u kterých bylo k dispozici několik odběrů, zachycen ve 40 % případů. Ale pokud byl od pacientů k dispozici pouze jeden vzorek krve, byla senzitivita testu pouze 11 % [42].

Druhým faktorem, ovlivňujícím senzitivitu, je rozdílná schopnost testu rozpoznávat různé druhy kvasinek. Monoklonální protilátka EB-CA1 se váže α -oligomanosové zbytky složené z více jak 4 manóz. Tyto jsou prezentovány ve velkém počtu na povrchu *Candida albicans*, *Candida glabrata* a *Candida tropicalis*, ale v daleko menším množství na povrchu *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a *Candida kefyr*. Z těchto důvodů je senzitivita testu pro detekci IC způsobené posledními třemi jmenovanými druhy velmi malá a pohybuje se pouze kolem 30 % [40]. Specifická testu pro

detekci mannanu kolísá, ale ve většině prací se pohybuje nad 90 %. Přestože falešná pozitivita nebývá častá, může existovat u neutropenických nemocných s mukozitidou v důsledku průniku antigenů kolonizujících kvasinek přes poškozenou bariéru zažívacího traktu [43].

Podobně jako galaktomannan lze i mannan detekovat pomocí Platelia Candida Ag testu také v jiných tělesných tekutinách než v séru. Dosavadní zkušenosti jsou však jen omezené. Nejvíce je využívána detekce z mozkomíšního moku pro diagnostiku kandidové meningitidy, kdy je test pozitivní až ve 100 % případů [44].

Mannan je vysoce imunogenní molekulou a v organizmu vede k rychlé tvorbě protilátek všech tříd – tzv. antimannanů. Antimannan pak opět může být využit v diagnostice invazivní kandidózy. K detekci antimannanu slouží nejčastěji ELISA metodika. Přestože jsou komerčně dostupné testy pro stanovení protilátek jednotlivých tříd (IgG, IgA, IgM), větší senzitivitu přináší a tak i rozšířenější je test detekující celkové protilátky proti mannanu (Platelia Candida Ab) [45]. Výsledek je označován za pozitivní, jestliže koncentrace protilátek přesáhne 10 AU/ml (Arbitrary Units). Senzitivita i specifická samostatně použitého Platelia Candida Ab pro diagnostiku invazivní kandidózy však v různých pracích značně kolísá (od 50 do 90 %) [42]. Nízká senzitivita testu je dána především omezenou schopností tvorby protilátek u imunokompromitovaných hematologických nemocných [40]. Druhým faktorem snižujícím senzitivitu je opět (podobně jako u detekce mannanu) omezená schopnost detekovat infekci vyvolanou kmeny *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a *Candida kefyr* (test používá jako antigen mannan z kmenů *Candida albicans*, který má jen omezenou reaktivitu s protilátkami vznikajícím při infekci těmito kmeny kvasinek) [40]. Hlavním problémem je však nízká specifická testu. Velká část nemocných i přes svou imunosupresi

Tab. 5. Nejvýznamnější studie sledující význam detekce 1,3-β-D-glukanu (Fungitell) pro diagnostiku invazivních mykotických infekcí.

Práce	cut-off (pg/ml)	senzitivita (%)	specifická (%)	PPV (%)	NPV (%)
Koo et al. (2006) [53]	> 60–80	73	88		
Koo et al. (2006) [53]	> 80–100	68	91		
Pazos et al. (2005) [52]	> 120	88	89	70	96
Pickering et al. (2005) [54]	> 80	93	77	52	97
Ostrosky-Zeichner et al. (2005) [51]	> 60	70	87	84	75
Ostrosky-Zeichner et al. (2005) [51]	> 80	64	92	89	78
Odabasi et al. (2004) [50]	> 60	100	90	43	100

PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

reaguje na zvýšenou kolonizaci kvasinami (především v oblasti GIT) právě tvorbou antimannanu, a to i ve vysokém titru, a to bez klinických známek invazivní kandidózy. Jednoznačné označení těchto výsledků za striktně falešně pozitivní je však spornou otázkou. Vznik invazivní kandidózy je, jak výše zmíněno, dynamický proces a kolonizace nemocného kvasinkami je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik infekce. Je tedy spíše otázkou, zda od metody očekáváme časnou a nebo jistou diagnózu invazivní kvasinkové infekce a dle toho to bude cut-off hodnoty výsledku testu, které bude dělit čarou mezi dobrou senzitivitou nebo dobrou specifitou testu [40].

S cílem zvýšit senzitivitu obou testů publikovali v roce 1999 Sendid et al práci, ve které vycházejí z biologického výskytu mannanu a antimannanu v krvi během infekce a pro časnou diagnostiku použili současnou kombinovanou detekci těchto markerů [42]. Zatímco senzitivita při detekci izolovaného mannanu nebo antimannanu byla velmi nízká (40 % resp. 53 %), pokud byl pacient monitorován současně oběma testy a za pozitivního byl označen nemocný s pozitivitou buď mannanu, nebo antimannanu, případně obou, pak senzitivita narostla až na 80 % při stále uspokojivé specifitě (94 %) [42]. Podobných výsledků pak později dosáhli i další autoři (tab. 4). I přes nesporné výhody tohoto přístupu se zde stále setkáváme s již zmiňovanými slabými místy obou testů:

- falešnou negativitou mannanu i antimannanu při infekci vyvolané některými nonalbicans kmeny kvasinek,
- falešnou pozitivitou antimannanu u kolonizovaných nemocných.

Je tedy zřejmé, že jednoznačné postavení (byť kombinované) detekce mannanu a antimannanu v diagnostice invazivní kandidózy není možné v dnešní době bez dalších rozsáhlejších prací pevně stanovit.

Detekce 1,3-β-D-glukanu – „panfungální“ diagnostika

1,3-β-D-glukan (BG) je jedním z hlavních polysacharidů, který obsahuje buněčná stěna prakticky všech mykotických patogenů. Je specifickým antigenem hub a nevyskytuje se v buňkách bakterií, virů ani buňkách lidských. Jako integrální součást skeletu buněčné stěny hub je zde daleko pevněji vázán, než např. galaktomannan nebo mannan a do tělesných tekutin se proto uvolňuje jen ve fázi růstu mykotického agens, a to navíc ve velmi malém množství [46]. BG může být detekován v tělesných tekutinách při invazivní infekci způsobené jak kmeny kandid a aspergilů, tak také při infekci způsobené vzácnými patogeny, jako je *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.*, *Trichosporon sp.*, *Sacharomyces sp.*, ale také například *Pneumocystis jiroveci*. Bohužel vzhledem k malému množství BG v stěně a především k minimálnímu uvolňování z ní není BG v tělesných tekutinách detekovatelný při infekci vyvolané kryptokoky a zygomycetami (*Mucor sp.*, *Rhi-*

zopus sp., *Rhizomucor sp.*) [47–49]. K záchytu antigenu v tělesných tekutinách se používá kolorimetrického testu založeného na vlastnosti BG aktivovat tzv. faktor G, který je součástí amébocytů získaných z klepítkačů ostrorepa amerického (*Limulus polyphemus*) nebo ostrorepa východoasijského (*Tachypleus tridentatus*). Faktor G se v přítomnosti BG aktivuje a krátká kaskádová reakce je vizualizovaná pomocí chromogenního substrátu. Následně je měřena změna optické denzity v čase (kinetická reakce) a nebo koncová optická denzita (endpoint reakce) [19]. Existuje několik komerčně dostupných testů k detekci BG, které se mírně technicky liší, nicméně v Evropě a USA je nejrozšířenější Fungitell™ (Cape Code). Vzhledem ke své „panfungalitě“ se Fungitell™ test jeví jako velice zajímavý pro časnou diagnostiku invazivních mykóz. Na druhou stranu nejsou zatím zkušenosti s testem takové, aby mohl být jednoznačným kritériem pro stanovení diagnózy invazivní mykotické infekce v běžné klinické praxi.

Senzitivita Fungitell™ testu kolísá od 64 % do 100 % [50–53], a to zejména v závislosti na hodnotě cut-off, od které je vzorek označen jako pozitivní (tab. 5). V současné době se doporučuje jako pozitivní označit vzorek s naměřenou hodnotou vyšší než 80 pg/ml a naopak za negativní vzorek s hodnotou pod 60 pg/ml. Přestože detailní kinetika BG při invazivní mykóze není známa, jsou popsány případy, kdy k významnému nárůstu

BG došlo během 5 dnů. Z těchto důvodů je pro časný záchyt invazivní mykotické infekce doporučován odběr krve minimálně 2krát týdně [19]. Pravidelný monitoring vysoce rizikových nemocných ve výše zmíněném intervalu může významně zkrátit dobu do stanovení diagnózy. V práci Pazose et al pozitivita BG předcházela rozvoj febrilií s mediánem 5 dnů, první klinické příznaky mykózy s mediánem 11 dnů, nález na HR CT s mediánem 9 dnů a zahájení antimykotické léčby dokonce s mediánem 14 dnů [52].

Uspokojivá je specifická a především NPV testu, které se pohybují kolem 90 % resp. 95 % (50–53). Při negativním výsledku tedy můžeme s velkou pravděpodobností invazivní mykózu (s výjimkou zygomykózy a kryptokokové infekce) vyloučit.

Podobně jako u detekce GM i v tomto testu se setkáváme s velmi kolísavou PPV (od 40 % do 90 %) a opět je hlavní příčinou možnost falešných pozitivit [50–53]. Jako možné příčiny falešné positivity byly popsány: hemodialýza s celulóзовou kapslí [19], Gram-pozitivní bakteriemie [54], transfuzní přípravky a krevní deriváty (především intravenózní globuliny, albumin, koagulační faktory a přípravky s použitím filtrace při výrobě) [54], kontaminace gázou [54] a podávání některých antibiotik (amoxicilin/klavulénát, ev. imipenem, gentamicin) [53,55]. Nutno však připomenout, že jen v některých z výše uvedených případů byla jednoznačně prokázána přítomnost kontaminujícího glukanu. Naopak nelze (vzhledem k panfungalitě a vysokému detekčnímu limitu testu) s jistotou vyloučit, že mohlo jít v řadě případů o pacienty se subklinickou invazivní mykotickou infekcí. Test je obecně velmi náchylný na kvalitu laboratorního zpracování. Vyšetření se provádí z minimálního množství séra (přibližně 5 ěl) a doporučuje se používat speciální odběrové sety a laboratorní materiál neobsahující glukán. Pickering et al také popsal postupně narůstající pozitivitu vzorku způsobenou

pouze opakovaným přenášením vzorku séra do transportních zkumavek [54]. Všechny zmíněné faktory pak mohou relativně snadno ovlivnit výsledek testu a vyšetření je tedy vhodné provádět v laboratoři se zkušenostmi s touto metodikou.

BG v diagnostice invazivních mykotických infekcí přináší několik významných výhod. Podobně jako u galaktomannanu i zde lze pomocí vývoje hodnot BG sledovat léčebnou odpověď na podání antimykotika. Navíc však tato korelace byla vedle invazivní aspergilózy popsána i u invazivní kandidózy [54–56]. Dále je nespornou výhodou testu jeho panfungalita. Teoreticky by nám jediný test dokázal zachytit jak invazivní aspergilózu, kandidózu a fuzariózu, tak i některé další vzácné invazivní mykotické infekce včetně pneumocystové pneumonie [19]. Na druhou stranu je nutno opět připomenout, že test nezachytí nemocné s invazivní zygomykózou a kryptokokovou infekcí. Při pozitivitě je navíc nutné provést další laboratorní (kultivace, mikroskopie, vyšetření galaktomannanu, mannanu, ev. PCR), RTG a klinické vyšetření s cílem maximálně zpřesnit etiologii infekce a tak maximálně zacílit antimykotickou léčbu. Pozitivita by tedy měla být signálem k zahájení cíleného pátrání po invazivní mykóze. Naopak negativita testu nám s vysokou pravděpodobností (s výjimkou výše zmíněných případů) systémovou mykotickou infekci vyloučí [19]. Konečně se zdá být velice zajímavé použít detekce BG ke konfirmaci pozitivního výsledku Platelia Aspergillus (tzn. galaktomannanu) a tak vyloučit nebo naopak potvrdit falešnou pozitivitu galaktomannanu. V práci Pazose et al měli pacienti s invazivní aspergilózou pozitivitu v obou testech. Naopak pozitivita pouze BG nebo pouze GM svědčila pro falešnou pozitivitu jednoho z testů [52].

Závěr

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických

nemocných pomocí sérologických metod zaznamenala v posledních letech velký pokrok. Sérologickými metodami jsme schopni detekovat nejen invazivní kandidózu a aspergilózu, ale i celou řadu dalších vzácných invazivních mykóz. Bohužel stále není k dispozici sérologická metoda, která by umožňovala diagnostiku systémových zygomykóz – infekcí, jejichž incidence v posledních letech zvláště pak na hematologických pracovištích postupně narůstá.

Zcela jednoznačné místo v časně diagnostice invazivní aspergilózy si vybudovala detekce galaktomannanu pomocí Platelia Aspergillus testu. Umožňuje zkrácení doby do stanovení diagnózy, diferenciální diagnostiku plicních infiltrátů a především časně zahájení účinné antimykotické léčby, jejíž efekt napomáhá monitorovat. Hlavním problémem však zůstává relativně velký počet falešných pozitivit. Kombinace s 1,3- β -D-glukanem nebo s PCR však tyto falešné positivity pravděpodobně dokáže odlišit.

Detekce mannanu a antimannanu v diagnostice invazivní kandidózy má bohužel celou řadu limitů a podobně jako „panfungální“ diagnostika pomocí 1,3- β -D-glukanu bude pro určení jednoznačného místa v klinické praxi vyžadovat většího počtu velkých prospektivních studií.

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR8452-3/2005.

Literatura

1. Pfaller MA. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. Clin Infect Dis 2006; 43(Suppl 1): S3–S14.
2. Ruhnke M, Maschmeyer G. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer – review of the literature. Eur J Med Res 2002; 7: 227–235.
3. O'Brien SN, Blijlevens NMA, Mahfouz TH et al. Infections in Patients with Hematological Cancer: Recent Developments. Hematology 2003; 2003: 438–472.
4. van Burik JH, Leisenring W, Myerson D et al. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal

- diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine (Baltimore)* 1998; 77: 246-254.
5. Groll AH, Shah PM, Mentzel C et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 1996; 33: 23-32.
 6. Yamazaki T, Kume H, Murase S et al. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1732-1738.
 7. Morgan J, Alexander B, Wannemuehler K. Quantification of Risk for Invasive Fungal Infection (IFI) among Transplant (TX) Recipients Reporting to TRANSNET. Program and abstracts of the 45th ICAAC October 30-November 2, 2004; Washington, D.C., USA: Abstract M-1058.
 8. Marr KA, Carter RA, Boeckh M et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002; 100: 4358-4366.
 9. Marr KA, Carter RA, Crippa F et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 909-917.
 10. Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, Leon-Gil C et al. Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study Group of Fungal Infection in the ICU. *Intensive Care Med* 1997; 23: 23-30.
 11. von Eiff M, Roos N, Schulten R et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995; 62: 341-347.
 12. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haematology patients. *Br J Haematol* 2004; 126: 289-297.
 13. Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Invasive fungal infection - laboratory diagnosis and antifungal treatment. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39: 178-188.
 14. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary Tools for Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clin Infect Dis* 2006; 43(Suppl 1): S15-S27.
 15. Maertens J, Deeren D, Dierickx D et al. Preemptive antifungal therapy: still a way to go. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 551-556.
 16. Lehmann PF, Reiss E. Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits. *Infect Immun* 1978; 20: 570-572.
 17. Reiss E, Lehmann PF. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1979; 25: 357-365.
 18. Wheat LJ. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, part I. *Clin Microbiol News* 2005; 27: 51-57.
 19. Quindos G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(Suppl 7): 40-52.
 20. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223-3228.
 21. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K et al. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001; 97: 1604-1610.
 22. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002; 186: 1297-1306.
 23. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P et al. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 2001; 91: 311-318.
 24. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1898-1906.
 25. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2184-2186.
 26. Rovira M, Jimenez M, De La Bellacasa JP et al. Detection of Aspergillus galactomannan by enzyme immunoabsorbent assay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. *Transplantation* 2004; 77: 1260-1264.
 27. Maertens J, Theunissen K, Verbeke E et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004; 126: 852-860.
 28. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190: 641-649.
 29. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A et al. Antifungal therapy decreases sensitivity of the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1762-1769.
 30. Wheat L. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, Part II. *Clin Microbiol News* 2005; 27: 59-63.
 31. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 349-357.
 32. Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transpl Infect Dis* 2003; 5: 158-166.
 33. Lee YR, Choi YW, Lee KJ et al. CT halo sign: the spectrum of pulmonary diseases. *Br J Radiol* 2005; 78: 862-865.
 34. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B 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: 7-14.
 35. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 939-943.
 36. Klontz RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1467-1474.
 37. Musher B, Fredricks D, Leisenring W et al. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5517-5522.
 38. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P et al. Aspergillus galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1496-1499.
 39. Kami M, Ogawa S, Kanda Y et al. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain

- reaction, latex agglutination test, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol* 1999; 106: 536–537.
40. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M et al. Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol* 2002; 51: 433–442.
41. Kappe R, Muller J. Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1665–1669.
42. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL et al. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1510–1517.
43. Greenfield RA, Trout DL, Rickard RC et al. Comparison of antibody, antigen, and metabolite assays in rat models of systemic and gastrointestinal candidiasis. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 409–417.
44. Verduyn Lunel FM, Voss A, Kuijper EJ et al. Detection of the *Candida* antigen mannan in cerebrospinal fluid specimens from patients suspected of having *Candida meningitis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 867–870.
45. Persat F, Topenot R, Piens MA et al. Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidosis. *Mycoses* 2002; 45: 455–460.
46. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310–350.
47. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K et al. (1→3)-beta-D-glucan in culture fluid of fungi activates factor G, a limulus coagulation factor. *J Clin Lab Anal* 1995; 9: 334–339.
48. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K et al. Plasma (1→3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3115–3118.
49. Yoshida M, Obayashi T, Iwama A et al. Detection of plasma (1 → 3)-beta-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 371–374.
50. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199–205.
51. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH et al. Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 654–659.
52. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1→3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 299–305.
53. Koo S, Bryar J, Page JH et al. Clinical utility of the (1-3)-β-D-Glucan Assay. Program and abstracts of the 45th ICAAC September 27–30, 2006; San Francisco, California, USA: Abstract M-1600.
54. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA et al. Evaluation of a (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5957–5962.
55. Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE. 1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* 2006; 354: 2834–2835.
56. Sims CR, Mohr J, Paetznick V. Correlation of Clinical Outcome with β-glucan (BG) Levels in Pts With Invasive Candidiasis. Program and abstracts of the 45th ICAAC September 27–30, 2006; San Francisco, California, USA: Abstract M-1599.
57. Kappe R, Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2489–2490.
58. Dalle F, Lopez J, Caillot D et al. False-positive results caused by cotton swabs in commercial *Aspergillus* antigen latex agglutination test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 130–132.
59. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3925–3931.
60. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 1997; 40: 353–357.
61. Blijlevens NM, Donnelly JP, Meis JF et al. *Aspergillus* galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl Infect Dis* 2002; 4: 64–65.
62. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P et al. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 913–916.
63. Adam O, Auperin A, Wilquin F et al. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 917–920.
64. Knight F, Mackenzie DW. *Aspergillus* antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 1992; 339: 188.
65. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ et al. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 257–260.
66. Eloy O, Tabella C, Harzic M et al. Detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful for diagnosis of deep seated candidiasis. *Ann Biol Clin (Paris)* 2002; 60: 711–714.
67. Rimek D, Redetzke K, Steiner B et al. Experience with the Platelia *Candida* ELISA for the diagnostics of invasive candidosis in neutropenic patients. *Mycoses* 2004; 47: Suppl 1: 27–31.
68. Rimek D, Redetzke K, Singh J et al. Performance of the *Candida* mannan antigen detection in patients with fungemia. *Mycoses* 2004; 47(Suppl 1): 23–26.
69. Chen Y, Sun H, Wang J et al. Usefulness of Combined Detection of Mannanemia and Antimannan Antibodies for the Diagnosis of Invasive Candidiasis. Program and abstracts of the 44th ICAAC October 30–November 2, 2004; Washington, D.C., USA: Abstract M-264.
70. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2181–2187.
71. Prella M, Bille J, Pugnale M et al. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 95–101.

MUDr. Zdeněk Ráčil
www.fnbno.cz
e-mail: zracil@fnbno.cz

Doručeno do redakce: 26. 2. 2006
Přijato po recenzi: 28. 3. 2007

- 1.2.4. Ráčil, Z., Kocmanová, I., Weinbergerová, B., Winterová, J., Bohatá, Š., Mayer, J.: Léčba invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných. Farmakoterapie, 4, 2008, 2: 207-217**

Léčba invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných

MUDr. Zdeněk Ráčil*, Mgr. Iva Kocmanová**;
 MUDr. Barbora Weinbergerová*; MUDr. Jana Winterová*;
 MUDr. Šárka Bohatá***; Prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.* | *Interní hematologická klinika FN
 a LF MU, Brno; **Oddělení klinické mikrobiologie FN, Brno; ***Radiologická klinika FN a LF MU, Brno

Úvod

Během posledních dvou desetiletí celosvětově výrazně narůstá incidence invazivních mykotických infekcí (IFI).¹ K příčinám tohoto jevu patří kromě zlepšení diagnostických postupů především pokroky v lékařské péči, které umožňují přežívání nemocných se závažnými a život ohrožujícími chorobami. Agresivní terapeutické přístupy k nejrůznějším základním onemocněním vedou ke zvýšení počtu imunosuprimovaných jedinců v populaci. Invazivními mykózami jsou nejvíce ohroženi pacienti s nádorovými chorobami, dále také nemocní na jednotkách intenzivní péče a po transplantaci solidních orgánů. Zatímco u nemocných se solidními nádory je výskyt hlubokých mykóz poměrně nízký (incidence se pohybuje do 2 %) a většinou jde o invazivní kandidózu, zcela odlišnou situaci nacházíme u pacientů s hematologickou malignitou.² Zde se v závislosti na charakteru onemocnění, respektive charakteru a intenzitě protinádorové léčby, pohybuje frekvence IFI od 2 % až po 15–25 %.³ Nejvíce jsou ohroženi pacienti po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně a s akutní leukemií.

Právě u této skupiny onkologických nemocných došlo k největším změnám ve spektru původců invazivních mykóz. Od začátku devadesátých let minulého století, kdy se na hematologických pracovištích rozšířila masivní profylaxe fluconazolem, trvale klesá incidence invazivních kandidóz.^{4,5,6} Tento pokles je dán především snížením výskytu kandidemií vyvolaných kvasinkami citlivými na fluconazol (především *Candida albicans*). Zároveň se v uvedeném období naopak zvýšil výskyt infekcí vyvolaných kmeny s vysokou rezistencí na fluconazol (*C. glabrata* a *C. krusei*), které jsou v současné době považovány za etiologické agens více než poloviny invazivních kandidóz na těchto odděleních. Rezistence na fluconazol se ovšem v různých zemích (ale i v různých nemocničních zařízeních) liší; v České republice

je na fluconazol rezistentních přibližně 20–30 % kmenů *Candida glabrata* a 90–95 % kmenů *Candida krusei*.

Pokles výskytu kandidových infekcí u hematologických nemocných za posledních 20 let je však doprovázen výrazným nárůstem invazivních infekcí vyvolaných vláknitými houbami.^{4–6} V naprosté většině případů se jedná o invazivní aspergilózu, která je v současné době nejčastější mykózou u nemocných po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně.⁷ Incidence infekcí vyvolaných ostatními vláknitými houbami, a to především invazivní zygomycózy (*Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp.) a invazivní fusariózy (*Fusarium* spp.) je sice nízká, ale během posledních několika let zvláště ve velkých transplantačních centrech významně vzrostla.⁸

Po mnoho let byl jediným dostupným přípravkem pro léčbu těchto infekcí amphotericin-B deoxycholát. Na počátku 90. let 20. století však vývoj na tomto poli značně pokročil. Na trh vstoupila nová léková skupina azolových antimykotik – fluconazol a následně itraconazol a amphotericin-B byl zakorporován do tří forem lipidových nosičů s cílem snížit toxicitu původní molekuly. Vývoj nových léků se pak ještě více zrychlil po roce 2000, kdy byly pro použití schváleny dva azoly nové generace a zcela nová léková skupina, echinokandiny, která v současné době čítá již tři zástupce. Řada nových léků má menší toxicitu než původní molekula konvenčního amphotericinu-B (C-AMB) a některé z nich jsou v určitých případech také účinnější.⁹

Antimykotika

Většina antimykotik určených pro léčbu invazivních mykóz interferuje se syntézou nebo integritou ergosterolu v buněčné membráně mykotických patogenů nebo zasahuje do tvorby jejich buněčné stěny. Podle mechanismu působení dělíme tedy antimykotika do několika lékových

tabulka 1 Klinicky významná a používaná antimykotika v léčbě invazivních mykotických infekcí – dělení a mechanismus účinku

Léková skupina	Zástupci	Místo působení	Mechanismus působení
Polyeny	Amphotericin-B deoxycholát	Buněčná membrána	Vazba na ergosterol v buněčné membráně s následným poškozením její integrity. Zvýšení permeability buněčné stěny vede k lýze buňky.
	<i>Amphotericiny na lipidovém nosiči:</i>		
	Amphotericin-B lipidový komplex (ABLC)		
	Amphotericin-B koloidní disperze (ABCD) Lipidový amphotericin-B (L-AMB)		
Azoly	Fluconazol	Buněčná membrána	Interakce s enzymy syntetizujícími ergosterol, který je součástí buněčné stěny. Výsledkem je poškození stability membrány s následnou lýzou buňky.
	Itraconazol		
	Voriconazol		
	Posaconazol		
Echinokandiny	Caspofungin	Buněčná stěna	Inhibice enzymu produkujícího 1,3-β-D-glukan, který je jednou z hlavních součástí buněčné stěny. Následně dochází ke snížení kvality buněčné stěny a ztrátě její ochranné funkce pro buňku.
	Anidulafungin		
	Micafungin		
Ostatní	Flucytosin	Mykotická RNA	Flucytosin se po vstupu do buňky metabolizuje na 5-fluorouracil a je následně inkorporován do mykotické RNA. Výsledkem je porucha tvorby RNA/DNA a zánik buňky.

skupin: na polyeny, azoly, echinokandiny a ostatní (do poslední skupiny patří prakticky pouze flucytosin, dnes používaný již výjimečně v kombinované léčbě kryptokokové infekce s C-AMB) (tabulka 1).

Polyeny

Amphotericin-B a jeho lipidové formy mají široké spektrum působení. Mechanismus jejich účinku spočívá ve vazbě na ergosterol (sterol podobný cholesterolu) buněčné membrány mykotické buňky s následným poškozením její integrity. Výsledkem je pak únik intracelulárního obsahu a lýza buňky.

Amphotericin-B deoxycholát

Amphotericin-B deoxycholát (tzv. konvenční amphotericin-B, C-AMB) byl donedávna díky svému širokospektrému a fungicidnímu účinku zlatým standardem v léčbě infekcí způsobených kandidami, kryptokoky a vláknitými houbami.⁹ Jeho použití je limitováno nutností intravenózního podání, a především jeho toxicitou – nefrotoxicitou, toxicitou spojenou s infuzí, a porušením rovnováhy iontů.

Reakce spojené s infuzí C-AMB (zimnice, třesavka, horečka, bronchospasmus a hypotenze) vznikají až u 50–60 % léčených nemocných a lze je velmi významně omezit aplikací léku v dostatečně dlouhé (minimálně 4–6 hodin) nebo 24hodinové infuzi, a především pak premedikací, která předchází vlastní podání C-AMB (antipyretikum, event. v kombinaci s hydrocortisonem a antihistaminikem).¹⁰

Nejzávažnějšími nežádoucími účinky C-AMB jsou však nefrotoxicita a ztráta iontů (především draslíku a hořčíku), jež mohou vznikat až v 80 % případů.¹⁰ I tyto nežádoucí účinky lze výrazně omezit – C-AMB by neměl být podáván nemocným s preexistujícím poškozením renálních funkcí ani současně s dalšími léky s renální toxicitou; nutné je udržení dostatečné diurézy (až 4 l za den), což si většinou vyžadá kanylaci centrální žíly s monitorováním centrálního žil-

ního tlaku při intenzivní intravenózní hydrataci. Nezbytné je intenzivně substituovat ztrátu iontů, především kalia, a to opět většinou ve formě kontinuální infuze koncentrovaného přípravku kalia, popř. i magnezia, cestou centrální žíly. Určité snížení nefrotoxicity přináší i podávání C-AMB v kontinuální 24hodinové infuzi. Neměla by také být překročena kumulativní dávka C-AMB 4 g (poškození ledvin při překročení této dávky je většinou ireverzibilní).^{9,11–13}

Amphotericiny-B na tukovém nosiči

Lipidové přípravky amphotericinu-B – liposomální amphotericin-B (L-AMB, Ambisome – v ČR není registrován), amphotericin-B lipidový komplex (ABLC, Abelcet) a amphotericin-B koloidní disperze (ABCD, Amphocil) – dosud neprokázaly v léčbě IFI přednosti oproti C-AMB.⁹ Tyto přípravky mají několik nesporných výhod. Hlavní z nich je významné snížení nefrotoxicity. I přes omezení rizika poškození ledvinných funkcí však není renální toxicita při jejich podávání nulová a pohybuje se (v závislosti na definici nefrotoxicity) od 10 do 30 % (tabulka 2). Nežádoucí účinky spojené s infuzí (horečka, zimnice, třesavka a další) jsou méně časté u L-AMB a ABLC, ale naopak vyšší u ABCD. S výjimkou L-AMB se proto i u lipidových přípravků amphotericinu-B doporučuje podání premedikace.¹⁰ Další předností je lepší průnik do některých tkání. Prakticky všechny dosahují ve srovnání s C-AMB vyšších koncentrací v játrech a slezině, L-AMB pak navíc také v mozkové tkáni a ABLC v plicích. Určitou nevýhodou amphotericinu na lipidových nosičích je především jejich mnohonásobně vyšší cena ve srovnání s C-AMB.

Azoly

Tato antimykotika patří mezi nejrozšířenější přípravky používané v léčbě mykóz. Mechanismus jejich působení spočívá v inhibici na cytochromu P-450 závislé syntézy ergosterolu, který je nezbytnou součástí buněčné stěny hub.

tabulka 2 Farmakokinetické vlastnosti polyenů

	C-AMB	L-AMB	ABLC	ABCD
Dávka (mg/kg/den)	0,5–1,5 mg/kg/den	3–5 mg/kg/den	5 mg/kg/den	3–6 mg/kg/den
Farmakokinetika ve srovnání s C-AMB				
Maximální koncentrace v séru	2,9 µg/ml	Výrazně vyšší (83 µg/ml)	Nižší (1,7 µg/ml)	Stejná (3,1 µg/ml)
Distribuční objem	1,1 l/kg	Výrazně nižší (0,1 l/kg)	Výrazně vyšší (131 l/kg)	Stejný (4,3 l/kg)
Průnik do tkání ve srovnání s C-AMB				
Játra		2x	2x	0,5–1x
Slezina		0,4x	5x	3x
Plic		NA	2x	0,2x
Ledviny		0,1x	0,2x	0,2x
Mozek		0,1x	0,2x	1,2x
Toxicita				
Nefrotoxicita	Vysoká (až 80 %)	Nízká (10–20 %)	Nízká až střední (15–25 %)	Nízká až střední (15–25 %)
Toxicita spojená s infuzí	Vysoká (50–60 %)	Nízká (10–20 %)	Střední (20–40 %)	Velmi vysoká (70–80 %)

Zatímco první skupina azolů – imidazoly (ketoconazol, clotrimazol, miconazol) se obvykle používá pro léčbu povrchových mykotických infekcí, druhá skupina azolů – triazolů (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) je určena pro terapii jak povrchových, tak systémových fungálních onemocnění. Tabulka 3 pak ukazuje základní vlastnosti jednotlivých triazolů.

První generace triazolů (fluconazol, itraconazol)

Fluconazol (Diflucan, Mycomax) účinkuje na kmeny kandid a kryptokoků, nemá však žádný účinek na vláknité houby. Jde o triazol s vynikající absorpcí a na rozdíl od ostatních léků z této skupiny se vylučuje především ledvinami. Jeho hlavní výhodou je především vysoká bezpečnost a minimální riziko interakcí. Je dostupný jak v perorální, tak v intravenózní formě. Masivní rozšíření tohoto léku však

vedlo k nárůstu počtu izolátů primárně (*C. krusei*) nebo druhotně rezistentních (*C. glabrata*) v populaci.¹⁴

Itraconazol (Sporanox) je rovněž dostupný jak pro perorální, tak pro intravenózní podání. Intravenózní forma obsahuje vehikulum SBECD (sulfo-butyl-ether-cyclodextrin), které zvyšuje rozpustnost léku ve vodě. Perorální forma je k dispozici v podobě kapslí a roztoku, v obou případech je však hlavním problémem velmi omezená absorpční schopnost. Kapsle mají nižší biologickou dostupnost, navíc významně ovlivněnou příjmem potravy. O něco lepší farmakokinetický profil má výše zmíněný perorální roztok. Nedostatečná absorpce perorálního itraconazolu spolu s rizikem četných lékových interakcí je pak příčinou výrazné intra- a interindividuální variability plazmatických koncentrací léku. Aby bylo zajištěno dosažení účinných koncentrací v séru, a naopak aby se vyloučilo nebezpečí vysokých koncentrací,

tabulka 3 Farmakokinetika a základní vlastnosti triazolů

	Vazba na plazmatické bílkoviny	Absorpce po p. o. podání	Průnik do tkání/mozkomíšního moku	Dávkování	Nutnost redukce dávky u renálního poškození	Nutnost redukce dávky u jaterního poškození
Fluconazol	11 %	> 90 %	+++ / +++	400–800 (1 200) mg/den p.o./i. v.	Ano	Ne
Itraconazol	95 %	Variabilní a o 30 % vyšší u soluče (maximálně však cca 55 %)	+++ / + až –	200 mg 2x denně p.o.; 200 mg 2x denně i. v. den 1 a 2 pak 200 mg 1x denně i. v. další dny	p.o. forma ne i. v. forma je kontraindikována	Nejsou údaje
Voriconazol	58 %	90 %	+++ / +++	Nasycovací dávka (den 1): 400 mg 2x denně p.o.; 6 mg/kg 2x denně i. v. Udržovací dávka (ostatní dny): 200 mg 2x denně p.o.; 3 mg/kg 2x denně	p.o. forma ne i. v. forma je kontraindikována	Ano u středně těžkého a těžkého
Posaconazol	> 98 %	8–47 %	+++ / + až – (ale koncentrace v CNS dobré)	400 mg 2x denně p.o. s jídlem nebo 200 mg 4x denně p.o. při omezené možnosti jídla	Ne	Nejsou údaje

tabulka 4 Farmakokinetika a základní vlastnosti echinokandinů

	Vazba na plazmatické bílkoviny	Průnik do mozkomíšního moku	Dávkování	Nutnost redukce dávky u renálního poškození	Nutnost redukce dávky u jaterního poškození	Interakce při současném podávání ciclosporinu
Caspofungin	96,5 %	Ne	Nasycovací dávka (den 1): 75 mg i. v. 1x denně Udržovací dávka (ostatní dny): 50 mg i. v. 1x denně	Ne	Ano	Ano
Anidulafungin	84 %	Ne	Nasycovací dávka (den 1): 200 mg i. v. 1x denně Udržovací dávka (ostatní dny): 100 mg i. v. 1x denně	Ne	Ne	Ne
Micafungin	99 %	Ne	100–150 mg i. v. 1x denně	Ne	Ne	Ne

kteří mohou být spojeny s nežádoucími účinky, je všeobecně doporučováno měření plazmatických koncentrací léku s ohledem na cílové koncentrace 500–2 000 ng/ml.¹⁵

Druhá generace triazolů

Voriconazol (Vfend) a posaconazol (Noxafil) představují druhou generaci triazolů se širokým spektrem účinku na kandidy, *Cryptococcus neoformans* a vláknité houby, včetně *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp. a *Fusarium* spp.

Voriconazol je účinný i na kandidy rezistentní na fluconazol, i když lze již také pozorovat kmeny se zkříženou rezistencí.¹⁶ Je dostupný jak ve formě perorálních tablet a roztoku s velmi dobrou biologickou dostupností, tak ve formě intravenózní infuze (opět za použití nosiče SBEDD). Voriconazol se velmi dobře vstřebává, přesto může být při různých abnormalitách gastrointestinálního traktu jeho absorpce zhoršená. Navíc podobně jako u itraconazolu dochází při různých lékových interakcích k ovlivnění intenzity metabolismu antimykotika indukci cytochromu P-450. Také u voriconazolu se tedy můžeme setkat s poměrně značnou intra- a interindividuální variabilitou plazmatických koncentrací léku. Stále více je proto doporučováno monitorování těchto koncentrací, zvláště při léčbě život ohrožujících infekcí. Cílové koncentrace jsou pak doporučovány v rozmezí od 1,0–2,0 do 4,0 µg/ml.¹⁷

Nejširší spektrum z azolových antimykotik má v současné době posaconazol. Zkřížené rezistence s fluconazolem u kvasinek jsou málo časté, a navíc jde o jediný azol s klinickým účinkem na zygomycety.¹⁸ Posaconazol je zatím dostupný pouze ve formě perorálního roztoku. Jeho absorpce je mnohem proměnlivější, než je tomu u voriconazolu, a významně se zlepšuje při současném požití jídla. Není-li podání dostatečného množství stravy možné, pak je doporučováno rozdělení denní dávky na více částí. Lékové interakce prostřednictvím cytochromu P-450 jsou sice u posaconazolu minimální, avšak právě nejistota v dostatečné absorpci léku na jedné straně a vztah mezi účinkem léčby invazivní aspergilózy a dosaženou plazmatickou koncentrací na straně druhé je důvodem, proč řada autorů doporučuje také měření plazmatických koncentrací tohoto triazolu.¹⁹

Nežádoucí účinky triazolů

Všeobecně představují azoly bezpečnou skupinu antimykotik, a to i při dlouhodobém užívání (tabulka 3). Všechny

triazoly mohou způsobit hepatotoxicitu, která většinou probíhá pod obrazem různě intenzivní elevace transamináz a jen výjimečně vyžaduje ukončení podávání léku. Intravenózní forma itraconazolu a voriconazolu je pak vzhledem k riziku kumulace vehikula SBEDD kontraindikována při poškození renálních funkcí.²⁰ Jednou z nejvýznamnějších nevýhod triazolů je to, že jsou metabolizovány prostřednictvím systému jaterních cytochromů P-450 (CYP) – především CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A4. Geneticky daná aktivita těchto enzymatických systémů, stejně jako vliv jiných léků, které jsou induktory CYP, nebo naopak jeho substráty, může vést k ovlivnění plazmatických koncentrací, a tím k omezení účinnosti, nebo naopak ke zvýšené toxicitě triazolových antimykotik. Naopak triazoly jsou inhibitory CYP, a vedou proto ke zvyšování koncentrací léků metabolizovaných tímto systémem. Bohužel jednou z nejvýznamnějších lékových skupin používaných u pacientů ohrožených IFI jsou imunosupresiva (ale i celá řada dalších léků, jako carbamazepin, barbituráty, rifampicin a další). Podávání některých triazolů současně s určitými imunosupresivy je často kontraindikováno (např. sirolimus při podávání voriconazolu), nebo přinejmenším musí být spojeno s měřením plazmatických koncentrací těchto léků. Nejvyšší riziko „obousměrné“ lékové interakce nacházíme z triazolů u itraconazolu a voriconazolu, významně menší je pak u posaconazolu a fluconazolu.^{21,22}

Echinokandiny

Místem působení echinokandinů je na rozdíl od azolů a polyenů buněčná stěna. Inhibicí enzymu 1,3-β-D syntetázy blokují tvorbu 1,3-β-D glukanu, jednoho ze základních kamenů buněčné stěny. Pod vlivem echinokandinů dochází k významnému narušení tvořící se buněčné stěny hub a následné osmotické lýze mykotické buňky.²³ Skutečnost, že cílové místo působení echinokandinů není přítomno v buňce savců, je vysvětlením pro minimální toxicitu této lékové skupiny.

V současné době jsou k dispozici tři echinokandiny: caspofungin (Cancidas), anidulafungin (Ecalta) a micafungin (Mycamine). Všechny se vyznačují účinností na kmeny kandid a aspergilů, a naopak jsou neúčinné při infekcích vyvolaných *Cryptococcus neoformans* a jinými vláknitými houbami než *Aspergillus* spp.

Echinokandiny jsou dostupné pouze v intravenózní podobě. Do tkání pronikají velmi dobře, s výjimkou mozko-

míšního moku, kde je vzhledem k vysoké vazbě na plazmatické bílkoviny průnik malý. Jejich podávání je spojeno s minimální toxicitou, a vzhledem k tomu, že nejsou metabolizovány cestou cytochromu P-450, mají také jen velmi málo lékových interakcí. Výjimkou je ciclosporin – při současném podávání caspofunginu a micafunginu může docházet k elevaci jaterních enzymů. Při renálním selhávání není nutné snížení dávky echinokandinů, při těžším poškození jaterních funkcí je pak nižší dávkování doporučováno jen u caspofunginu (tabulka 4).

Ostatní léky

Použití ostatních léků v terapii IFI u onkologických nemocných je omezeno prakticky pouze na flucytosin, který je součástí kombinované léčby kryptokokové meningitidy.

Flucytosin patří mezi antimetabolity. Po vstupu do buňky se metabolizuje na 5-fluorouracil a je následně včleněn do mykotické RNA. Výsledkem je porucha syntézy RNA/DNA a její zánik. Flucytosin je k dispozici v perorální i intravenózní podobě. Má velmi dobrou farmakokinetiku, včetně vynikajícího průniku do mozkomíšního moku. Jeho hlavním omezením je úzké spektrum účinku (pouze kvasinky a kryptokoky), a především velmi rychlý rozvoj získané rezistence. Proto se používá pouze v kombinované antimykotické léčbě. Dnes je prakticky jedinou jeho indikací použití v kombinaci s C-AMB v léčbě kryptokokové meningitidy.¹⁰

Léčba invazivní kandidózy

Pro úspěšnou léčbu invazivní kandidózy (IC) má zásadní význam, aby léčba byla zahájena pokud možno co nej-

dříve od okamžiku pozitivního výsledku kulturačního vyšetření na *Candida* spp. z primárně sterilního místa.

Volba antimykotik při léčbě IC je proces skládající se většinou ze dvou kroků. V prvním okamžiku je kliník informován o přítomnosti kvasinky v hemokultuře nebo primárně sterilním materiálu. Teprve s odstupem několika dnů přichází informace o přesné identifikaci, eventuálně citlivosti na antimykotika.

Z dostupných antimykotik prokázaly účinnost v léčbě IC v dobře uspořádané randomizované studii fluconazol, amphotericin-B deoxycholát (a jeho lipidové formy), voriconazol a všechny tři echinokandiny (tabulka 5). Dosud chybí relevantní údaje o použití itraconazolu a posaconazolu v léčbě IC.

Tato zjištění však platí pro běžné pacienty bez neutropenie. Zpráva o účinnosti jednotlivých léčiv u nemocných s neutropenií je výrazně méně. Ve výše zmíněných velkých studiích byli tyto nemocní většinou vyloučeni, nebo tvořili jen velmi malou část kohorty. Z těchto důvodů je velmi obtížné rozhodnout, zda stejná doporučení lze aplikovat i na pacienty s neutropenií.²⁴

Iniciální léčba invazivní kandidózy (do výsledku identifikace kmene)

Pacienti bez neutropenie

Lékem volby pro tuto iniciální léčbu u nemocných bez neutropenie je fluconazol v dávce 400–800 mg/den nebo echinokandiny (caspofungin 70 mg/den 1. den a následně 50 mg/den; anidulafungin 200 mg/den 1. den a následně

tabulka 5 Souhrn randomizovaných studií sledujících účinnost jednotlivých antimykotik v primární léčbě invazivní kandidózy

	Indikace	Srovnávané léky	Počet nemocných	Léčebný úspěch (%)	Definice úspěšné léčby
Rex a spol. 1994 ⁵⁸	Kandidemie	FLU	103	72 (70 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď
		C-AMB	103	81 (79 %)	
Anaissie a spol. ⁵⁹	Invazivní kandidóza	FLU	75	48 (64 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď na konci léčby
		C-AMB	67	44 (66 %)	
Phillips a spol. 1997 ⁶⁰	Kandidemie	FLU	50	25 (50 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď
		C-AMB	53	31 (58 %)	
Mora-Duarte a spol. ²⁵	Kandidemie	KASPO	109	80 (73 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď na konci i. v. léčby
		C-AMB	115	71 (62 %)	
Kullberg a spol. 2005 ⁶¹	Kandidemie	VORI	248	101 (41 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď ve 12. týdnu
		C-AMB následovaný FLU	122	50 (41 %)	
Reboli a spol. 2007 ²⁷	Invazivní kandidóza	ANIDULA	127	96 (76 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď na konci i. v. léčby
		FLU	118	71 (60 %)	
Kuse a spol. 2007 ²⁶	Invazivní kandidóza	MICA	202	181 (90 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď na konci léčby
		L-AMB	190	170 (90 %)	
Pappas a spol. 2007 ⁵⁷	Invazivní kandidóza	MICA 150	191	146 (76 %)	Klinická a mikrobiologická odpověď na konci i. v. léčby
		MICA 100	199	142 (71 %)	
		KASPO	188	134 (72 %)	

Vysvětlivky

C-AMB – konvenční amphotericin-B (amphotericin-B deoxycholát), L-AMB – liposomální amphotericin-B, FLU – fluconazol, VORI – voriconazol, KASPO – caspofungin, MICA – micafungin, ANIDULA – anidulafungin

tabulka 6 Doporučení pro léčbu invazivní kandidózy

Pacient	Iniciální léčba	Následná léčba	Délka léčby	CŽK		
Non-neutropenický pacient Hemodynamicky stabilní	Fluconazol (400–800 mg/den) Caspofungin (70→50 mg/den) Micafungin(100 mg/den)	Následně možná úprava medikace dle výsledku kulturačního vyšetření určení citlivosti na antimykotika <i>in vitro</i>	Délka léčby je 14 dní od poslední pozitivní kultivace a vymizení klinických příznaků infekce	Vytažení centrálního žilního katetru indikováno vždy		
Kriticky nemocný	Anidulafungin (200→100 mg/den) Amphotericin-B deoxycholát 0,6 mg/kg/den (event. amphotericin-B na lipidovém nosiči)					
Neutropenický pacient	Caspofungin (70→50 mg/den) Micafungin(100 mg/den) Anidulafungin (200→100 mg/den) Amphotericin-B deoxycholát 0,6 mg/kg/den (event. amphotericin-B na lipidovém nosiči)				Délka léčby je 14 dní od poslední pozitivní kultivace a vymizení klinických příznaků infekce a současně vymizení neutropenie	Vytažení centrálního žilního katetru vhodné

100 mg/den; micafungin 100 mg/den) nebo amphotericin-B deoxycholát v množství 0,6 mg/kg/den.

Fluconazolu se dává přednost u nemocných, kteří nejsou v kritickém stavu a nedostávají profylaxi azoly, echinokandinům naopak u pacientů, kteří jsou v kritickém stavu (především s multiorgánovým selháváním) nebo u nichž byla použita před rozvojem infekce profylaxe azoly. Pokud tito nemocní nemají poškozené renální funkce, lze u nich zvolit také amphotericin-B deoxycholát nebo jeho lipidové formy.

Pacienti s neutropenií

U těchto nemocných, zvláště byla-li použita profylaxe azoly (která je zde velmi rozšířená) nebo jsou-li kolonizováni kmeny *C. glabrata* a *C. krusei*, není fluconazol vhodnou iniciální léčbou. Do definitivního určení kmene kvasinky jsou proto doporučovány jako iniciální volba echinokandiny nebo amphotericin-B deoxycholát ve výše uvedených dávkách. Echinokandiny jsou doporučovány opět především u jedinců s neutropenií a orgánovým poškozením, zejména s poškozením renálních funkcí, a to pro své minimální nežádoucí účinky. Při izolovaném zhoršení ledvinných funkcí lze zvážit také lipidové formy amphotericinu-B, vždy však s vědomím, že jejich nefrotoxicita není na rozdíl od echinokandinů nulová.

Na druhou stranu je nutno brát v úvahu, že ve studiích prokazujících účinnost jednotlivých echinokandinů je jen malý počet nemocných s neutropenií. Z těchto důvodů, i když lze předpokládat podobný účinek celé lékové skupiny, není anidulafungin oficiálně indikován v léčbě IC u neutropenických jedinců.^{24–27}

Léčba invazivní kandidózy po identifikaci kmene kandidy

Při infekci vyvolané *C. krusei* jsou lékem volby echinokandiny nebo amphotericin-B deoxycholát (event. jeho lipi-

dové formy). Následně, pokud je kmen *in vitro* citlivý na voriconazol, lze použít také tento triazol.

Jde-li o infekci vyvolanou *C. glabrata* a nebyla testována citlivost na antimykotika, je opět indikována léčba echinokandiny nebo amphotericinem-B deoxycholátem (event. jeho lipidovými formami). Pokud je tato kvasinka *in vitro* citlivá na fluconazol nebo voriconazol, pak je možné, zejména u nemocného, jehož stav je stabilní, změnit léčbu na tyto triazoly.

U infekcí vyvolaných *C. parapsilosis* jsou lékem volby fluconazol nebo amphotericin-B deoxycholát (event. jeho lipidové formy). U tohoto druhu totiž není z důvodu snížené citlivosti *in vitro* doporučováno použití echinokandinů.²⁸

Další doporučení

Odstranění žilního katetru

U všech non-hematologických nemocných s kandidemií je vždy doporučována výměna centrálního žilního katetru (CŽK) jako možného primárního zdroje kandidové infekce. U hematologických nemocných může být dále zdrojem infekce poškození gastrointestinálního traktu protinádorovou léčbou a následný průnik kolonizujících kandid do cirkulace. Síla důkazů pro odstranění CŽK je zde proto menší. Avšak i přesto, vzhledem k riziku následného osídlení katetru, se všeobecně doporučuje jeho vytažení.²⁴

Optimální délka léčby

Standardní délka léčby absolutně nejčastější formy IC – kandidemie – je 14 dní od poslední pozitivní hemokultury s průkazem *Candida* spp. a současného vymizení klinických příznaků infekce. U hematologických pacientů je navíc před ukončením léčby vyžadováno vymizení neutropenie.

Při orgánovém postižení kvasinkovou infekcí se léčba ukončuje až po úplném vymizení mikrobiologických, radiologických a klinických příznaků postižení.²⁴

Význam určování citlivosti na antimykotika *in vitro*

Výsledky studií, v nichž je zkoumán vztah mezi citlivostí kmenů kvasinek *in vitro* a klinickým účinkem léku *in vivo*, sice nejsou jednoznačné, avšak všeobecně se toto testování doporučuje (zejména vzhledem k riziku rezistence kandid non-albicans na azolová antimykotika).

Určení citlivosti *in vitro* může pomoci vysvětlit nedostačující účinek iniciálně zvoleného antimykotika a usnadnit volbu cílené antimykotické léčby. Dále pak testování citlivosti *in vitro* (obrázek 1) umožňuje eventuální změnu intravenózní antimykotické léčby za perorální terapii azoly u nemocných, u kterých je zjišťováno zlepšování klinického obrazu, ale léčba dosud nedosáhla doporučené délky.²⁴ (tabulka 6)

Léčba invazivní aspergilózy

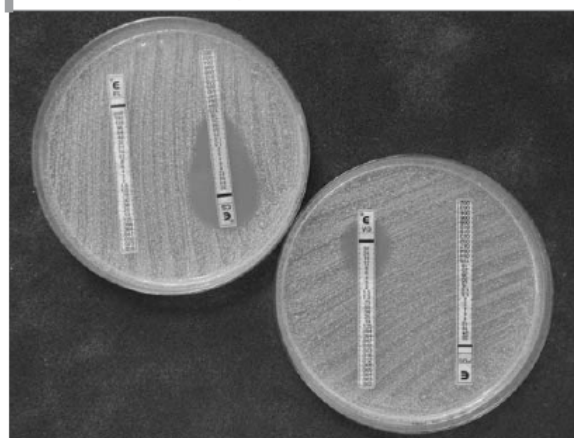
Mezi léky s účinkem na kmeny aspergilů patří amphotericin-B a jeho formy na lipidovém nosiči, itraconazol, voriconazol, posaconazol a echinokandiny. Dosud bylo provedeno pouze pět randomizovaných studií, v nichž byly tyto přípravky sledovány v primární léčbě nejčastější invazivní mykózy u hematologických nemocných – invazivní aspergilózy (IA) (tabulka 7).

Většina informací o léčbě IA (jak primární, tak záchranné) tedy pochází z různě velkých nerandomizovaných kohort nemocných a z retrospektivních analýz.

Primární léčba invazivní aspergilózy

Donedávna byl zlatým standardem v léčbě IA amphotericin-B deoxycholát v dávce 1,0–1,25 mg/kg/den. Tato léčba však měla úspěch nanejvýš u třetiny nemocných, a navíc podávání C-AMB, které v indikaci IA bylo často dlouhodobé, bylo spojeno s vysokým rizikem nefrotoxicity.²⁹ Od roku 2002 se po publikaci Herbrechta spol. stal standardem v primární léčbě IA voriconazol. Voriconazol prokázal v této indikaci nejen větší účinnost než C-AMB (53 % vs. 32 %), ale navíc bylo jeho podání spojeno s menším rizikem nefrotoxicity a po iniciální intravenózní léčbě je u tohoto přípravku možný přechod na perorální formu.³⁰ Dosud není dostatek informací, zda je možné léčbu zahájit ihned per-

obrázek 1 *Candida glabrata in vitro* rezistentní k triazolům a citlivá k echinokandinům (testováno pomocí E-testu)



orální formou léku, a proto je stále doporučeno iniciálně podávat formu intravenózní. Vzhledem ke korelaci mezi plazmatickou koncentrací léku a účinkem léčby IA je stále častěji poukazováno na nutnost monitorování koncentrací léku v plazmě a eventuální úpravu dávkování podle výsledku. Takový postup sice zatím není běžný, může však dále zvýšit pravděpodobnost úspěchu léčby této život ohrožující infekce.³¹

Voriconazol je také lékem volby při diseminaci IA do CNS. Ve studii Schwartze a spol. bylo léčebné odpovědi v tomto případě dosaženo u 35 % pacientů.³²

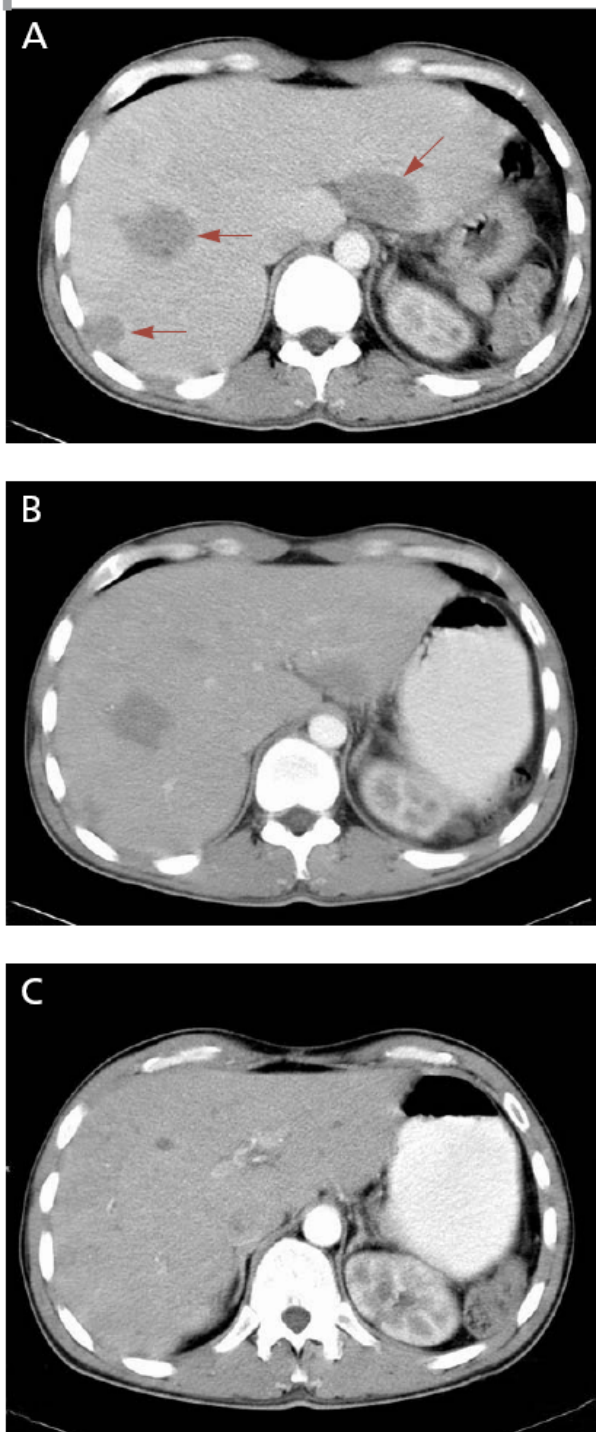
Je-li voriconazol kontraindikován, je alternativou v primární léčbě IA liposomální amphotericin-B (L-AMB), který však v ČR není dostupný, nebo amphotericin-B lipidový komplex (ABLC).²⁴ Jejich účinnost v této indikaci byla 50 % respektive 47 %.^{33,34} Naopak třetí amphotericin na lipidovém nosiči – amphotericin-B koloidní disperze – obecně není v této indikaci doporučován, a to zejména na základě výsledků práce Bowdena a spol.^{24,35}

Informace o podání echinokandinů v monoterapii při iniciální léčbě IA jsou omezené a nejsou to léky volby v této

tabulka 7 Souhrn randomizovaných studií srovnávajících účinnost jednotlivých antimykotik v primární léčbě invazivní aspergilózy

	Srovnávané léky	Počet nemocných	Léčebný úspěch	Přežití	Signifikantní rozdíl
Herbrecht a spol. 2002 ³⁰	VORI	144	53 %	71 %	Ano (p = 0,02)
	C-AMB	133	32 %	58 %	
Bowden a spol. 2002 ³⁵	ABCD	88	13 %	40 %	Ne
	C-AMB	86	15 %	27 %	
Leenders a spol. 1998 ⁶²	L-AMB	26	69 %	81 %	Ne
	C-AMB	29	59 %	62 %	
Ellis a spol. 1998 ⁶³	L-AMB 1 mg/kg	41	58 %	41 %	Ne
	L-AMB 4 mg/kg	46	54 %	33 %	
Cornely a spol. 2007 ³³	L-AMB 3 mg/kg	107	50 %	72 %	Ne
	L-AMB 10 mg/kg	94	46 %	59 %	

obrázek 2 Pacient s diseminovanou invazivní aspergilózou s postižením jater – CT obraz jater s ložisky infekce (šipky) před zahájením léčby (A) a po 1 měsíci (B), respektive 3 měsících (C) antimykotické léčby kombinací voriconazolu s caspofunginem



indikaci. V nedávno uveřejněné práci Viscoliho a spol. prokázal caspofungin v primoléčbě IA jen omezenou účinností (33 %).³⁶ Výjimkou jsou nemocní s multiorgánovým postižením – zde může být caspofungin (popřípadě v budoucnu také ostatní echinokandiny) díky své vysoké bezpečnosti prakticky jediným použitelným antimykotikem. Zpráva o ostatních echinokandinech je jen poskrovnu. Velmi podobně je tomu u itraconazolu a u posaconazolu, kde údaje dokonce zcela chybějí. Tyto léky tedy nelze doporučit v primární léčbě IA.²⁴

Třebaže v literatuře přibývá údajů o použití kombinované antimykotické léčby (především voriconazolu, posaconazolu nebo lipidových amphotericinů spolu s echinokandiny) již v primární léčbě IA a tyto zprávy jsou často velmi povzbudivé, zatím není takový postup všeobecně přijímán.^{24,37}

Záchranná léčba invazivní aspergilózy

Volba antimykotik při selhání primární léčby je složitá. Prakticky všechny informace o účinnosti jednotlivých léků v tomto případě pocházejí pouze z nekomparativních nebo retrospektivních analýz. Navíc dosud chybějí širší informace o nevhodnější léčbě při selhání voriconazolu jako antimykotika první volby. Jediné dostupné údaje jsou o použití voriconazolu, posaconazolu, L-AMB, ABL, ABCD, caspofunginu a micafunginu v záchranné léčbě a účinnost těchto léků se pohybuje mezi 30 a 50 %.^{19,24,34,38-41}

Pro pacienty s IA, kteří jsou primárně rezistentní na základní léčbu nebo ji netolerují, je (na rozdíl od primární léčby) mnohem více informací o možnosti kombinované antimykotické léčby. Kombinace především triazolů druhé generace s echinokandiny (event. amphotericinů na lipidových nosičích s echinokandiny) jsou v této indikaci již možností volby, a některé práce dokonce poukazují na prodloužení doby přežívání takto léčených nemocných.⁴² (Obrázek 2)

Další doporučení

Délka léčby

V léčbě IA nelze stanovit přesnou a optimální délku léčby. Léčba musí trvat tak dlouho, dokud úplně neodezní klinické, mikrobiologické a radiologické známky infekce a současně nevymizí eventuálně přítomný imunodeficit, který ke vzniku infekce přispěl (např. neutropenie, reakce štetu proti hostiteli, velké dávky imunosupresiv apod.).²⁴

Chirurgická léčba

Všeobecně nelze chirurgický výkon v terapii IA doporučit. Je nutno jej přísně individuálně zvážit v případech, kdy je velké plicní ložisko v těsném kontaktu s velkou cévou nebo je příčinou hemoptýzy. Mohl by být zvažován také při přítomnosti lokalizovaného ložiska mimo plicní tkáň, a to i v případě postižení CNS.²⁴

Testování citlivosti na antimykotika

Ve většině případů IA u onkologických nemocných není výsledek kulturačního vyšetření pozitivní a diagnóza je velice

tabulka 8 Doporučení pro léčbu invazivní aspergilózy

Primární léčba	Poznámky	Délka léčby
Voriconazol	Iniciálně i. v.; vhodné měření plazmatických koncentrací	Dokud nedojde ke kompletnímu odeznění klinických, mikrobiologických a radiologických známek infekce a současně neodezní eventuálně přítomný imunodeficit
L-AMB nebo ABLC	Lék volby při nemožnosti použití voriconazolu	
Záchranná léčba	Poznámky	Délka léčby
Voriconazol	Nebyl-li použit v primární léčbě	Dokud nedojde ke kompletnímu odeznění klinických, mikrobiologických a radiologických známek infekce a současně neodezní eventuálně přítomný imunodeficit
Posaconazol		
L-AMB, ABLC		
Caspofungin		
Kombinace caspofungin s voriconazolem/posaconazolem nebo ABLC/L-AMB		

Vysvětlivky

ABLC – amphotericin B lipidový komplex; L-AMB – liposomální amphotericin B

často stanovena na základě zobrazovacích metod v kombinaci s pozitivitou galaktomananu. Pokud se podaří etiologické agens vykultivovat, pak je vždy doporučeno dourčení druhu. Tato informace je důležitá pro volbu antimykotik především u infekcí vyvolaných kmenem *Aspergillus terreus*, u nichž vzhledem k přirozené rezistenci může selhávat léčba polyeny.⁴³

Rutinní testování citlivosti vláknitých hub k antimykotikům však doporučeno není. Dosud chybí jednoznačné údaje o korelaci mezi rezistencí *in vitro* a *in vivo*.²⁴ (tabulka 8)

Léčba vzácných invazivních mykotických infekcí

Léčba invazivní zygomykózy

Zygomycety patří mezi houby řádu *Mucorales* a tvoří široké, řídké septované nebo vůbec neseptované hyfy. Invazivní infekci mohou způsobovat rody *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Absidia* spp. a další. Invazivní zygomykóza je charakterizovaná rychlou angioinvasí s následnou trombotickou okluzí cév a tkáňovou nekrózou. Mezi typické formy invazivní zygomykózy patří plicní, rhinocerebrální a diseminovaná infekce. V současné době není k dispozici žádný spolehlivý nekultivační test pro časnou detekci této život ohrožující infekce, a proto je veškerá diagnostika založena na kombinaci klinického obrazu (infiltrace paranazálních dutin s destrukcí skeletu nebo plicních infiltrátů se známkami angioinvasí na CT) s pozitivním mikroskopickým nebo kultivačním nálezem z bioptované, velmi často již nekrotické tkáně u nemocného se zvýšeným rizikem (nemocní s dlouhodobou neutropenií, s diabetem, léčení chelátory železa).⁴⁴ Zygomycety jsou *in vitro* citlivé k amphotericinu-B a posaconazolu a rezistentní vůči ostatním azolům a echinokandinům.⁴⁵

Základem terapie invazivní zygomykózy je včasné rozpoznání možné infekce u ohroženého jedince. Především při známkách infekce v sinoorbitální oblasti (nereagující na konvenční antibiotickou léčbu) by mělo být velmi časně provedeno zobrazovací vyšetření následované chirurgickým

odběrem materiálu k histologickému, respektive kulturačnímu potvrzení možné mykotické infekce. Ve druhém kroku je nutné eliminovat rizikové faktory – úprava ketoacidózy, vysazení chelatační léčby nebo maximálně možné snížení imunosuprese.

Vlastní léčba invazivní zygomykózy spočívá v rychlé a razantní chirurgické resekcii postižených tkání v kombinaci s antimykotickou léčbou. Lékem volby jsou zde lipidové formy amphotericinu-B, především L-AMB (v ČR však není dostupný), eventuálně ABLC. Někteří autoři doporučují vysoké dávky těchto antimykotik (10–15 mg/kg/den), jednoznačný přínos vysokých dávek však prokázán nebyl.⁴⁶ Při použití ABLC (místo L-AMB) a současném postižení CNS touto infekcí je nutno zvažovat horší průnik léku do mozkové tkáně ve srovnání s C-AMB. Alternativou lipidových forem polyenů je dnes nejnovější z azolových antimykotik posaconazol, který v dávce 800 mg/den v záchranné léčbě invazivní zygomykózy vedl v 60 % případů k léčebné odpovědi.¹⁸

Terapie invazivní fusariózy

Fusarium spp. patří mezi vláknité houby s větvenými septovanými hyfy, mikroskopicky podobnými hyfám aspergilů. Invazivní fusarióza je velmi ojedinělá infekce a probíhá většinou pod obrazem diseminovaného procesu, s horečkami nejasného původu, s možností postižení jakéhokoliv orgánu, s mnohočetnými kožními noduly a velice často s pozitivním mikroskopickým nebo kultivačním nálezem z hemokultury.⁴⁷

Tyto houby patří k patogenům nejvíce rezistentním vůči dostupným antimykotikům. Časté jsou rezistence vůči polyenům a v menší míře také vůči novým triazolům.⁴⁷ Echinokandiny jsou *in vitro* neúčinné.⁴⁸ Lékem volby při fusariové infekci je v současné době voriconazol ve standardních dávkách, v záchranné léčbě měl pak dobrý účinek také posaconazol.^{47,49} Především u infekcí vyvolaných *F. solani* mohou být účinné rovněž liposomální formy amphotericinu-B.⁴⁷ Při selhávání dostupné léčby jsou pak popsány případy, kdy bylo dosaženo úspěchu při podávání kombinace voriconazolu s amphotericiny na lipidových nosičích.

Léčba invazivní kryptokokové infekce

Infekce vyvolané druhem *Cryptococcus neoformans* se rozvíjejí obvykle po inhalaci basidiospor této kvasinky. Primární plicní infekce většinou probíhá subklinicky, méně často pod obrazem pneumonie. Při následné diseminaci má patogen afinitu k CNS, proto je nejtypičtějším projevem invazivní kryptokokózy meningitida. Mnohem méně obvyklé je postižení kůže, kostí a viscerálních orgánů. Ve střední Evropě je kryptokoková infekce u nemocných s malignitami velmi vzácná, můžeme se s ní však setkat tam, kde je použita protinádorová léčba vedoucí k deficitu CD4+ lymfocytů.

Standardním léčebným postupem v terapii kryptokokové meningitidy je v současné době kombinace C-AMB v dávce 0,7–1 mg/kg/den s flucytosinem v dávce 100–150 mg/kg/den (rozděleno do 4 dávek) po dobu 2 týdnů s následnou udržovací terapií fluconazolem v dávce 400 mg/den, a to v celkové délce minimálně 10 týdnů. Celková délka udržovací terapie je dána především individuálním posouzením imunitního stavu nemocného.

Dochází-li k selhávání iniciální léčby, lze volit vyšší až vysoké dávky fluconazolu (800 mg/den i více) event. amphotericiny-B na lipidovém nosiči (s vědomím omezeného průniku do CNS při podání jiných přípravků než L-AMB) v dávce 3–6 mg/kg/den po dobu celkem 6–10 týdnů.⁵⁰

Při izolované kryptokokové pneumonii lze u lehčích forem použít fluconazol nebo C-AMB v monoterapii. U těžších forem je léčba stejná jako u kryptokokové meningitidy.⁵⁰

Závěr

V současné době jsme svědky narůstajícího počtu případů invazivních mykotických infekcí současně s rostoucím počtem vnímavých jedinců v populaci. Původci invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných jsou i v současnosti ve většině případů kandidy a aspergily, stále častěji se však setkáváme se vzácnými mykotickými patogeny, často obtížně diagnostikovatelnými a rezistentními na dostupná antimykotika.

V posledních letech bylo dosaženo zcela zásadního pokroku v diagnostice hlubokých mykóz (zavedení HRCT) a detekce galaktomananu u invazivní aspergilózy) a současně se významně rozšířila nabídka antimykotik. Velmi významné zlepšení léčebných možností přinesla především dostupnost nových širokospektrálních triazolů a echinokandinů a eventuálně použití jejich kombinace. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí a následně včasné podání účinné léčby tak umožňuje alespoň částečně snížit mortalitu těchto infekcí.⁵¹

Přes tyto nesporné pokroky je před námi ještě mnoho úkolů především na poli diagnostiky a rovněž léčby non-aspergilových vláknitých mykóz, jejichž mortalita je stále nepřijatelně vysoká.

Literatura

- Maschmeyer G. The changing epidemiology of Invasive fungal infections: new threats. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(Suppl):13–6.
- Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 2005;41:521–6.
- O'Brien SN, Bljlevens NMA, Mahfouz TH, et al. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003;438–72.
- van Burik JH, Lelienting W, Myerson D, et al. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:246–54.
- Groll AH, Shah PM, Mentzel C, et al. Trends in the postmortem epidemiology of Invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 1996;33:23–32.
- Yamazaki T, Kume H, Murase S, et al. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol* 1999;37:1732–8.
- Marr KA, Carter RA, Boeckh M, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002;100:4358–66.
- Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:909–17.
- Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, et al. Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clin Infect Dis* 2003;37:415–25.
- Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. *Med J Aust* 2007; 187:404–9.
- Mayer J, Doubek M, Doubek J, et al. Reduced nephrotoxicity of conventional amphotericin B therapy after minimal nephroprotective measures: animal experiments and clinical study. *J Infect Dis* 2002; 186:379–88.
- Sawaya BP, Briggs JP, Schnemann J. Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:154–64.
- Peleg AY, Woods ML. Continuous and 4h infusion of amphotericin B: a comparative study involving high-risk haematology patients. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:803–8.
- Pfaller MA. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. *Clin Infect Dis* 2006;43(Suppl 1):S3–14.
- Prentice AG, Glasmacher A. Making sense of Itraconazole pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(Suppl 1): 117–22.
- Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, et al. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata* 10.1128/JCM.44.5.1740–1743.2006. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1740–3.
- Pascual A, Calandra T, Bolay S, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008;46:201–11.
- van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, et al. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis* 2006;42:e61–5.
- Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, et al. Treatment of Invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis* 2007;44:2–12.
- von Mach MA, Burhenne J, Wellemann LS. Accumulation of the solvent vehicle sulphobutylether beta cyclodextrin sodium in critically ill patients treated with intravenous voriconazole under renal replacement therapy. *BMC Clin Pharmacol* 2006;6:6.
- Scott U, Simpson D. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs* 2007;67:269–98.
- Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, et al. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis* 2005;5:775–85.
- Onishi J, Meinz M, Thompson J, et al. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:368–77.
- Herbrecht R, Fluckiger U, Gachot B, et al. Treatment of Invasive *Candida* and Invasive *Aspergillus* Infections in adult haematological patients. Guidelines from the First European Conference on Infections in Leukaemia: *ECIL1*. *Eur J Cancer Suppl* 2007;5:49–59.
- Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2002;347:2020–9.
- Kuse ER, Chethotsktd P, da Cunha CA, et al. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and Invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet* 2007;369:1519–27.
- Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, et al. Anidulafungin versus fluconazole for Invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2007; 356:2472–82.
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al. In vitro susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008;46:150–6.
- Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001;32: 358–66.
- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of Invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347:408–15.
- Trifilo S, Pennick G, Fl J, et al. Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer* 2007;109:1532–5.
- Schwartz S, Ruhnk M, Ribaud P, et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood* 2005;106:2641–5.
- Cornely OA, Maertens J, Bressan M, et al. Liposomal amphotericin B as initial therapy for Invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBLoad trial). *Clin Infect Dis* 2007;44:1289–97.
- Chandrasekar PH, Ito JI. Amphotericin B lipid complex in the management of Invasive aspergillosis in Immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2005;40(Suppl 6):S392–400.
- Bowden R, Chandrasekar P, White MH, et al. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of Invasive aspergillosis in Immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2002;35:359–66.
- Viscoli C, Herbrecht R, Akan H. Caspofungin (C) as first-line therapy of Invasive aspergillosis (IA) in haematological patients (pts): a study of the EORTC Infectious Diseases Group. 3th Trends in Medical Mycology 2007. Turin, Italy 2007.

- 37 Singh N, Limaye AP, Forrest G, et al. Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study. *Transplantation* 2006;81:320–6.
- 38 Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis* 2003;36:1122–31.
- 39 Maertens J, Raad I, Petrikkos G, et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 2004;39:1563–71.
- 40 White MH, Anaissie EJ, Kusne S, et al. Amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B as therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1997;24:635–42.
- 41 Denning DW, Marr KA, Lau WM, et al. Micafungin (FK463), alone or in combination with other systemic antifungal agents, for the treatment of acute invasive aspergillosis. *J Infect* 2006;53:337–49.
- 42 Marr KA, Boeckh M, Carter RA, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2004;39:797–802.
- 43 Walsh TJ, Petraitis V, Petraitene R, et al. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis* 2003;188:305–319.
- 44 Rogers TR. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(Suppl 1):i35–40.
- 45 Sabatelli F, Patel R, Mann PA, et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2009–15.
- 46 Spellberg B, Edwards J, Jr, Ibrahim A. Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:556–69.
- 47 Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(Suppl 1):67–75.
- 48 Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:487–95.
- 49 Raad II, Hachem RY, Herbret R, et al. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin Infect Dis* 2006;42:1398–403.
- 50 Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000;30:710–8.
- 51 Pagano L, Cairn M, Picardi M, et al. Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality—SEIFEM-C Report. *Clin Infect Dis* 2007;44:1524–5.
- 52 Courtney R, Pal S, Laughlin M, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2788–95.
- 53 Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet* 2006;45:649–63.
- 54 Hebert MF, Smith HE, Marbury TC, et al. Pharmacokinetics of micafungin in healthy volunteers, volunteers with moderate liver disease, and volunteers with renal dysfunction. *J Clin Pharmacol* 2005;45:1145–52.
- 55 Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:739–45.
- 56 Dowell JA, Knebel W, Ludden T, et al. Population pharmacokinetic analysis of anidulafungin, an echinocandin antifungal. *J Clin Pharmacol* 2004;44:590–8.
- 57 Pappas PG, Rotstein CM, Betts RF, et al. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2007;45:883–93.
- 58 Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, et al. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med* 1994;331:1325–30.
- 59 Anaissie EJ, Vartivarian SE, Abi-Said D, et al. Fluconazole versus amphotericin B in the treatment of hematogenous candidiasis: a matched cohort study. *Am J Med* 1996;101:170–6.
- 60 Phillips P, Shafran S, Garber G, et al. Multicenter randomized trial of fluconazole versus amphotericin B for treatment of candidemia in non-neutropenic patients. Canadian Candidemia Study Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:337–45.
- 61 Kullberg BJ, Sobel JD, Ruhnke M, et al. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2005;366:1435–42.
- 62 Leenders AC, Daenen S, Jansen RL, et al. Liposomal amphotericin B compared with amphotericin B deoxycholate in the treatment of documented and suspected neutropenia-associated invasive fungal infections. *Br J Haematol* 1998;103:205–12.
- 63 Ellis M, Spence D, de Pauw B, et al. An EORTC International multicenter randomized trial (EORTC number 19923) comparing two dosages of liposomal amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;27:1406–12.

2. Výzkum na poli diagnostiky a terapie invazivních mykotických infekcí na IHOK LF MU a FN Brno

Výzkum na poli oportunních infekcí u hematoonkologických nemocných má na Interní hematoonkologické klinice LF MU a FN Brno dlouhodobou tradici. V roce 2003 byla na tomto pracovišti založena „Pracovní skupina pro oportunních infekce“, jejímž vedoucím je od počátku autor této práce. Toto multioborové uskupení řeší problematiku všech typů infekcí u hematoonkologických nemocných. Nicméně – změny v epidemiologii a zvýšení incidence život ohrožujících hlubokých houbových onemocnění vedly k vyprofilování výzkumných aktivit této Pracovní skupiny směrem k časné diagnostice a optimalizaci terapie těchto infekcí. Interní hematoonkologická klinika LF MU je jedním z klíčových hematoonkologických pracovišť v ČR, které se zaměřuje na invazivní mykózy a rovněž organizuje pravidelná Česko-Slovenská mezioborová setkání odborníků k této problematice. Výsledkem těchto snah jsou doporučení pro diagnostiku a léčbu (cílenou, empirickou, preemptivní a profylaktickou) invazivních mykóz, publikovaná v renomovaných českých časopisech. Mezi úspěchy Pracovní skupiny pro oportunní infekce patří i přidělení 3 výzkumných projektů s podporou Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR, z nichž jeden již byl velmi úspěšně dořešen. Z pracoviště také na toto téma vzešlo několik původních prací publikovaných ve významných zahraničních impaktovaných časopisech.

Obsahově je výzkum zaměřen zejména na možnosti časné diagnostiky invazivních mykóz, což je vzhledem k jejich vysoké mortalitě a morbiditě při pozdní diagnostice klíčový bod, na kterém závisí do značné míry prognóza pacientů s těmito život ohrožujícími infekcemi.

Výzkum lze rozdělit do několika hlavních oblastí a těmto oblastem pak odpovídá členění další části práce.

- A) Zatímco před rokem 2000 byla nejčastější invazivní mykotickou infekcí na našem pracovišti invazivní kandidóza, po roce 2000 (zcela v souladu s celosvětově publikovanými daty) začal narůstat počet případů hlubokých mykotických infekcí vyvolaných vláknitými houbami, zejména rodem *Aspergillus*. I výskyt ostatních (vzácných) houbových rodů stoupá, ale počet případů za rok je mnohem menší. Přes velkou snahu našich i světových pracovišť se zatím nepodařilo vytvořit optimální PCR metodiku pro rutinní skríníng. Zásadní postavení v časné diagnostice invazivní aspergilózy má proto standardizovaná sérologická metoda – detekce galaktomannanu. Metodou a našimi výsledky se zabývá kapitola **3. Detekce galaktomannanu v časné diagnostice invazivní aspergilózy (str. 57)**.
- B) Jistou limitací při detekci galaktomannanu je možnost falešných pozitivit testu, které ztěžují interpretaci výsledku. Naše pracoviště významně přispělo k výzkumu v této oblasti, což blíže popisuje kapitola **4. Identifikace možných příčin falešné positivity Platelia Aspergillus ELISA testu (str. 78)**.
- C) Kromě detekce galaktomannanu pomocí Platelia Aspergillus ELISA testu, je k dispozici pro diagnostiku invazivní aspergilózy nová sérologická metoda – detekce 1,3-β-D glukanu. Glukan je panfungální marker, což pochopitelně znamená, že jeho pozitivita je spojena nejen s invazivní aspergilózou, ale také kandidózou, fusariózou ev. infekcemi způsobenými dalšími houbami. Pracoviště autora má tento test rutinně k dispozici jako jediný v ČR. Zkušenostmi s tímto testem se podrobně zabývá kapitola **5. 1,3-β-D glukan v diagnostice invazivní aspergilózy a jiných invazivních mykotických infekcí hematologických nemocných (str. 91)**.
- D) Vedle změn v epidemiologii došlo zejména díky možnostem časné diagnostiky a dostupnosti nových léčebných postupů ke změnám i v léčebných výsledcích. Analýzou epidemiologie, přínosnosti diagnostických metod a léčebných výsledků na pracovišti autora se zabývá kapitola **6. Epidemiologie, diagnostika a léčebné výsledky případů**

invazivních aspergilových infekcí na Interní hematologické klinice LF MU a FN Brno (str. 121).

- E) Invazivní infekce vyvolané patogeny ze třídy Zygomycet jsou velmi vzácné, nicméně jejich počty stále narůstají. Diagnostika je extrémně obtížná a v časném přístupu se – na rozdíl od zbytku houbových infekcí – uplatňují pouze molekulárně-biologické metody. Výzkum na tomto poli je analyzován v kapitole **7. Časná diagnostika invazivní zygomykózy (str. 136).**

3. Detekce galaktomannanu v časně diagnostice invazivní aspergilózy

V této kapitole jsou shrnuty literární informace o galaktomannanu a jeho detekci. Její součástí je přehledná práce autora podávající podrobné informace a vlastní zkušenosti s metodou na IHO K LF MU a FN Brno.

Až donedávna byla diagnostika invazivní aspergilózy velmi obtížná a pozdní, neboť jedinou možností byl histologický nebo kultivační průkaz ve sterilních tkáních získaných biopsií. Rutinní zavedení detekce galaktomannanu v séru do diagnostického algoritmu u nemocných v riziku bylo zásadní změnou k lepšímu v časně diagnostice invazivní aspergilózy.

3.1. Detekce galaktomannanu – literární data

Galaktomannan: struktura, uvolňování a možnosti detekce antigenu

Zástupci rodu *Aspergillus* uvolňují při svém růstu do okolí exoantigeny, které mohou být následně detekovány v tělesných tekutinách. Jedním z těchto exoantigenů je polysacharid, který je součástí buněčné stěny houby – galaktomannan. Pro jeho detekci je možno použít několik imunochemických metod - latexovou aglutinaci, radioimunoanalýzu a ELISu. Liší se způsobem provedení, detekčním limitem i senzitivitou. Komerčního užití dosáhly pouze dvě – latexová aglutinace (Pastorex *Aspergillus*, BioRad, Francie) a sendvičová ELISA (Platelia *Aspergillus*, BioRad, Francie). Oba komerční sety využívají při detekci vazbu antigenu s králičí monoklonální protilátkou EB-A2.

Latexová aglutinace (Pastorex *Aspergillus*, BioRad, Francie) se v současné době používá spíše zřídka (zejména tam, kde je toto vyšetření prováděno spíše příležitostně). Pro rutinní diagnostiku u hematoonkologických pacientů je mnohem vhodnější metoda ELISA, zejména pro vyšší citlivost - je 10 až 15krát (při použití cut off 1,5) a nebo až 30krát (při použití cut off 0,5) citlivější než latexová aglutinace. Je tedy schopna detekovat více nemocných s invazivní aspergilózou a rovněž

pozitivita je při použití této metody časnější ⁽²¹⁾. Reakce je semikvantitativní a výsledek je udáván jako index positivity (IP) – tj. poměr mezi optickou denzitou testovaného vzorku a optickou denzitou kontrolního séra obsahujícího přibližně 1ng galaktomannanu/ml. Jako pozitivní se označuje vzorek s $IP > 0,5$ a pozitivní pacient je každý s více než dvěma po sobě jdoucími pozitivními odběry.

Využití detekce galaktomannanu pro diagnózu invazivní aspergilózy

Studie sledující přítomnost galaktomannanu u nemocných s rizikem vzniku invazivní aspergilózy ukázaly, že Platelia Aspergillus test má vysokou specifitu pohybující se od 81% do 100%. Extrémně vysoká je také negativní prediktivní hodnota testu, která je v absolutní většině studií nad 95%. Negativní výsledek testu tedy s velmi vysokou pravděpodobností vylučuje invazivní aspergilózu a falešné negativy jsou vzácné ⁽²⁸⁻³⁶⁾.

Na druhou stranu senzitivita a pozitivní prediktivní hodnota (PPV) jsou bohužel do určité míry slabými místy tohoto testu. Senzitivita testu v různých pracích značně kolísá a to od 30% do 100% a velmi podobně je tomu i u PPV, která se pohybuje od 50% do 100% ⁽²⁸⁻³⁶⁾.

Podrobná analýza literárních dat o galaktomannanu, metodách (zejména ELISA) pro jeho detekci a jejich klinickém využití je provedena v následující přehledné práci: (Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer, J.: Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 13, 2007, 5, 176-183)

- 3.1.1. Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J.: Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 13, 2007, 5, 176-183**

Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy

Z. RÁČIL¹, I. KOCMANOVÁ², B. WAGNEROVÁ¹, J. WINTEROVÁ¹, J. MAYER¹

¹Interní hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

²Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

SOUHRN

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J.: Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy

Invazivní aspergilóza představuje závažnou a často letální mykotickou infekci imunokompromitovaných pacientů, jejíž incidence v posledních letech narůstá. Vysoká mortalita infekce je dána na jedné straně tíží imunosuprese nemocných, ale na druhé straně především obtížností stanovit diagnózu této infekce časně. Rozvoj neinvazivních nekultivačních metod v posledních letech představuje zásadní změnu v časné diagnostice invazivní aspergilové infekce. Ovšem jediná z nich má v současnosti své jasné postavení a to je stanovení galaktomannanu ELISA metodikou. Test má především excelentní negativní prediktivní hodnotu a umožňuje s vysokou pravděpodobností infekci vyloučit. Na druhou stranu jeho velmi dobrá senzitivita pomůže často stanovit diagnózu ještě před jasnou klinickou manifestací infekce. Nicméně hlavními limitacemi testu jsou kolísání senzitivity ovlivnitelné celou řadou faktorů a možnost falešných pozitivit. Cílem této práce je souhrn dosavadních znalostí o využití galaktomannanu v časné diagnostice invazivní aspergilózy.

Klíčová slova: invazivní mykotické infekce, invazivní aspergilóza, sérologická diagnostika, galaktomannan

SUMMARY

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J.: Contribution of galactomannan antigen detection to early diagnosis of invasive aspergillosis

Invasive aspergillosis is a serious and often lethal fungal infection in immunocompromised patients, with increasing incidence in recent years. The high mortality is related not only to severe immunosuppression but especially to difficulties in early diagnosis. The development of noninvasive nonculture diagnostic methods in recent years is a major advance in the early diagnosis of invasive aspergillosis, but the only method with a clear position is currently galactomannan detection by sandwich ELISA. The test has an excellent negative predictive value and is able to exclude invasive aspergillosis with high probability. In addition, its good sensitivity often allows diagnosis of the condition before it is clinically manifested. However, variations in sensitivity due to numerous factors and potential false-positive results in certain populations are the main limitations to its use. The purpose of this review is to summarize the current knowledge of the use of galactomannan in the early diagnosis of invasive aspergillosis.

Keywords: invasive fungal infections, invasive aspergillosis, serological diagnosis, galactomannan

Klin mikrobiol inf lék 2007;13(5):176–183

Adresa: MUDr. Zdeněk Ráčil, Interní hematoonkologická klinika Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, 62500 Brno, e-mail: zracil@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 3. 7. 2007

Přijato k tisku: 5. 9. 2007

Úvod

V posledních dvou dekadách jsme svědky nárůstu incidence invazivních mykotických infekcí a hlavní skupinou nemocných, které postihují, jsou pacienti s hematologickou malignitou. U hematoonkologických nemocných je absolutně nejčastější mykózou invazivní aspergilóza, která se vyskytuje s incidencí 8–20 % u nejvíce rizikových skupin (pacienti léčení pro akutní leukémii a po transplantaci krvetvorné tkáně) [1, 2]. Mortalita invazivní aspergilové infekce je u těchto imunosuprimovaných pacientů vysoká a pohybuje se v současné době kolem 40 % [1]. Vysoká mortalita je dána nejen závažným deficitem imunitního systému nemocných, ale velice často především obtížností časně stanovit

správnou diagnózu. Na podkladě správné diagnózy časně zahájená cílená antimykotická léčba je jedním z klíčových faktorů zlepšujících prognózu nemocných s invazivní aspergilózou [3].

Konvenční diagnostické přístupy bohužel velmi často selhávají. Kultivace nebo histologie ze sterilního materiálu vyžaduje biopsii, která však u pacientů s koagulopatií a trombocytopenií není možná. Navíc, je-li biopsie provedena, je senzitivita vlastního kultivačního a histologického vyšetření omezená. Kultivace a cytologie materiálu z dýchacích cest má opět omezenou senzitivitu a pozitivní výsledek kultivace je navíc většinou pozdní. Pravděpodobná diagnóza invazivní aspergilózy je tedy nejčastěji v klinické

praxi prováděna na základě kombinace klinického obrazu a nálezu „halo“ nebo „air crescent“ na HRCT. Tyto nálezy jsou však nejen málo senzitivní (obraz invazivní aspergilózy může být na HRCT velmi pestrý a ne vždy lze nalézt „halo“ nebo air crescent“), ale také málo specifické (obraz „halo“ můžeme nacházet i u celé řady jiných plicních patologií) [4,5].

Výše zmíněné obtíže v časné a senzitivní diagnostice invazivní aspergilózy vedly k rozvoji nekultivačních diagnostických metod. Pokud využívají detekci antigenů, protilátek nebo metabolitů, hovoříme o metodách sérologických a pokud detekují nukleové kyseliny, jsou označovány jako metody molekulárně biologické.

Ze všech nekultivačních metod má v současné době jednoznačně definované a zásadní místo v diagnostice invazivní aspergilózy detekce galaktomannanu. Cílem této souhrnné práce je podání přehledné informace o využití detekce galaktomannanu pro diagnózu invazivní aspergilové infekce.

Galaktomannan: struktura, uvolňování a možnosti detekce antigenu

Kmeny aspergilů uvolňují při svém růstu do okolí exoantigeny, které jsou pak detekovatelné v malém množství v tělesných tekutinách. V roce 1978 Lehmann a Weiss našli v séru imunokompromitovaných laboratorních zvířat infikovaných kmeny aspergilů a následně také v séru a moči pacientů s invazivní aspergilózou antigen, který byl poté identifikován jako galaktomannan (GM), což je termostabilní heteropolysacharid buněčné stěny aspergilů [6,7]. Molekula GM o velikosti 25–75kDa se skládá z neimunní mannanové korové části a imunoreaktivních bočních řetězců zakončených galaktofuranosylovými jednotkami [7,8]. In vitro studie ukazují, že různé kmeny aspergilů uvolňují různá množství GM, klinická závažnost této rozdílnosti se však nezdá být významná. Na druhou stranu vedle aspergilových kmenů uvolňují GM také kmeny penicilíí a při invazivní infekci tímto patogenem (která je však velmi vzácná) může být tedy galaktomannan v séru také detekován [9]. Na zvířecích modelech byla prokázána korelace mezi mykotickou náloží ve tkáních a množstvím uvolněného, respektive detekovatelného GM v séru [10]. Kromě toho je to fáze růstu hyf, mikroprostředí ve kterém probíhá infekce, imunitní stav jedince, stav renálních funkcí a konečně antimykotická léčba, které ve svém konečném bodě mohou ovlivnit definitivní množství GM v cirkulaci [11].

Pro detekci GM je možno použít několik imunochemických metod – latexovou aglutinaci, radioimunoanalýzu a sendvičovou ELISu. Liší se detekčním limitem i senzitivitou (tabulka 1). Komerčního užití dosáhly pouze dvě – latexová aglutinace (Pastorex Aspergillus, BioRad, France) a sendvičová ELISA (Platelia Aspergillus, BioRad, France). Oba komerční sety využívají pro detekci králičí monoklonální protilátku EB-A2, která rozpoznává $\beta(1-5)$ vázané galaktofuranosylové zbytky na molekule GM. Pro pozitivitu testu je nezbytná přítomnost minimálně 4 těchto epitopů [11].

Latexová aglutinace (Pastorex Aspergillus, BioRad, France) se ještě místy používá (zejména tam, kde je vyšetření prováděno spíše příležitostně) – v rutinní diagnostice je ale v současné době nahrazena sendvičovou ELISA metodikou,

která je 10 až 15krát (při použití cut off 1,5) a nebo až 30krát (při použití cut off 0,5) senzitivnější. Je tedy schopna detekovat více nemocných s invazivní aspergilózou a rovněž pozitivita je při použití této metody časnější [12]. Reakce je semikvantitativní a její výsledek je udáván jako index pozitivity (IP) – poměr mezi naměřenou optickou denzitou a optickou denzitou kontrolního séra obsahujícího přibližně 1ng GM/ml. Jako pozitivní se označuje vzorek s IP > 0,5 a jako pozitivní pacient pak nemocný s více než dvěma po sobě jdoucími pozitivními odběry.

Využití detekce galaktomannanu pro diagnózu invazivní aspergilózy

Studie sledující detekci galaktomannanu jako markeru invazivní aspergilózy u nemocných s rizikem vzniku této infekce ukázaly, že Platelia Aspergillus test má vysokou specifitu pohybující se od 81 % do 100 %. Extrémně vysoká je také negativní prediktivní hodnota testu, která je v absolutní většině studií nad 95 %. Negativní výsledek testu tedy s velmi vysokou pravděpodobností vylučuje invazivní aspergilózu a falešné negativy jsou vzácné [13,14,15,16,17,18,19,20,21].

Na druhou stranu senzitivita a pozitivní prediktivní hodnota (PPV) jsou bohužel do určité míry slabými místy tohoto testu. Senzitivita testu v různých pracích značně kolísá a to od 30 % do 100 % a velmi podobně je tomu i u PPV, která se pohybuje od 50 % do 100 % [13,14,15,16,17,18,19,20,21]. Přímé porovnání výsledků jednotlivých studií je však velmi obtížné, ne-li nemožné, neboť oba dva zmiňované parametry mohou být ovlivněny celou řadou faktorů [22] (tabulka 2).

Faktory ovlivňující senzitivitu testu

Typ a závažnost imunosuprese

Nedávno publikovaná metaanalýza studií sledujících tento problém poukázala na značné rozdíly v senzitivitě metody v závislosti na studované populaci nemocných. Zatímco poolovaná senzitivita testu pro nemocné s hematologickou malignitou byla 70 %, pro nemocné po transplantaci orgánu byla jen 22 %. Tyto výsledky potvrzují fakt, že test je více přínosný pro nemocné s nádorovým onemocněním než pro jiné skupiny pacientů. Ale i mezi onkologickými pacienty lze najít významné rozdíly. Ve studiích do kterých bylo zařazeno velké procento pacientů s tzv. „low-risk“ neutropenií (solidní tumory, lymfomy, autologní transplantace krvetvorné tkáně) je senzitivita nižší, než ve studiích s vysoce rizikovými nemocnými (alogenní transplantace krvetvorné tkáně, akutní leukémie) [15,17].

Výše zmíněné nálezy odpovídají nedávno rozpoznávaným rozdílům v patogenezi invazivní aspergilózy u jedinců s a bez neutropenie [23]. U neutropenických zvířecích modelů je aspergilová plicní infekce charakterizována intenzivním růstem hyf, vysokou fungální náloží a velkou angioinvasí. Výsledkem je pak vysoká nálož GM v plicní tkáni i v séru. Naopak, jestliže byla imunosuprese zvířecího modelu navozena kortikoidy, byla hlavní příčinou progresu choroby intenzivní zánětlivá infiltrace plicních parenchymu. Fungální nálož a angioinvasze byly nízké a výsledkem tedy byla i koncentrace GM v séru těsně při hranici detekce.

Manifestace aspergilové infekce

Manifestace invazivní aspergilózy představuje kontinuum stavů s odlišnými histopatologickými a radiologickými nálezy, jejichž rozvoj je dán především imunitním stavem jedince. Spektrum postižení sahá od angioinvasivní formy u těžce imunosuprimovaných až po alergickou bronchopulmonální aspergilózu u hypersenzitivních nemocných [24]. Je zřejmé, že přechod antigenů (včetně GM) do cirkulace se bude u různých stupňů angioinvasivní lišit. Zatímco lokální nekrotizace plicního parenchymu u angioinvasivní formy bude průchod GM usnadňovat, u lokalizovaných nebo ohraničených forem aspergilové infekce (např. tracheobronchitida u pacientů po transplantaci plic nebo ohraničený aspergilom) bude průnik GM menší nebo dokonce žádný a výsledek detekce Platelia Aspergillus testu pak bude negativní [25].

Předchozí podání antimykotik

Podávání antimykotik s efektem na kmeny aspergilů léčebně nebo profylakticky omezuje velikost a rychlost nárůstu mykotické nálože, stejně tak jako intenzitu její angioinvasivní. Tento mechanismus je pak pravděpodobnou příčinou snížené senzitivity Platelia Aspergillus testu u této skupiny pacientů. V práci Maarové et al. byla senzitivita detekce GM u nemocných po transplantaci krvetvorné tkáně léčených profylakticky antimykotiky s efektem na vláknité houby pouze 20% ve srovnání se senzitivitou 80% ve skupině pacientů bez profylaxe [26].

Cut-off

Velice důležitým faktorem ovlivňujícím senzitivitu testu je hodnota tzv. cut-off indexu pozitivity (cut-off IP), tedy hodnota indexu pozitivity, od které je vzorek označen jako pozitivní. Maertens et al. a i další autoři prokázali, že snížení původně výrobcem doporučeného cut-off z hodnoty IP = 1,5 na hodnotu IP = 0,5 vede k výraznému zvýšení senzitivity testu při současném jen mírném zhoršení jeho specifity (82,7 % x 96,5 %) [27]. Toto snížení cut-off indexu pozitivity je důležité především u nemocných, kteří dostávají profylakticky antimykotika s efektem na vláknité houby a u nemocných po transplantaci krvetvorné tkáně s reakcí štěpu proti hostiteli (GvHD) léčenou imunosupresivou. U obou těchto skupin pacientů je jak výše zmíněno mykotická nálož nízká a proto při užití vyšších hodnot cut-off IP by tyto nemocní byli falešně označeni za negativní a naopak při cut-off IP = 0,5 je test dokáže správně označit za pozitivní [26,28].

Frekvence prováděných odběrů

Frekvence a pravidelnost odběrů krve pro detekci galaktomannanu významně ovlivňují senzitivitu metody a její schopnost časně detekce invazivní aspergilózy. Zatímco v práci Maertense et al. byl průměrný počet odběrů na epizodu 11,2 ve studii Herbrechta et al. pouze 4,1. Senzitivita metody pak byla v první práci 89,7 % ve druhé pak pouhých 31,6 % [4,14]. Progrese invazivní aspergilózy může být u těžce imunosuprimovaných jedinců velmi rychlá a ke změně z negativních do pozitivních hodnot tak může dojít během několika dnů. Nedostatečná frekvence odběrů a nebo nepravidelnost v jejich provádění pak může vést ke zmeškání okamžiku, kdy hodnota indexu pozitivity (IP) těsně přesáhne 0,5 a vzorek se stane časně pozitivním. Obecně se doporučuje provádět pravidelný rutinní skrínění rizikových nemocných (nemocní s akutní leukémií nebo po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně) 2–3krát týdně, v rizikových obdobích (febrilní neutropenie nereagující na antibiotickou léčbu, nález infiltrátů na HRCT plic) eventuelně i častěji [12]. Podle našich zkušeností však více než jeden odběr za den (při použití cut-off IP 0,5) již senzitivitu testu dále nezvýší [29] (tabulka 3).

Tabulka 1
Detekční limit jednotlivých metod pro diagnostiku galaktomannanu v séru [31]

Metoda	Detekční limit
Latexová aglutinace	15 ng/ml
Radioimunoanalýza	10 ng/ml
Sendwichová ELISA	0,5–1 ng/ml

Tabulka 2
Nejvýznamnější studie sledující význam detekce galaktomannanu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematologických nemocných

Práce	celkový počet pac./počet pac. s IA	GM cut-off index	senzitivita (%)	specifita (%)	PPV (%)	NPV (%)
Maertens (1999)[13]	243/33	1,0	92,6	95,4	93	95
Maertens (2001)[14]	362/95	1,0	89,7	98,1	87,5	98,4
Maertens (2002)[15]	100/27	1,0	97,4	98,8	94,4	98,8
Sulahians(2001)[16]	797/53	1,5	90,5	94	52	98,7
Herbrecht(2002)[17]	797/153	1,5	29,4	94,8	57,7	84,9
Maertens (2004)[27]	104/29	2*0,5	96,5	98,6	98,6	98,4
Pinel(2003)[18]	807/48	1,0	50	99,6	85	96,8

GM – galaktomannan, IA – invazivní aspergilóza, PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

Faktory ovlivňující PPV testu

Druhým slabým místem testu je pozitivní prediktivní hodnota (PPV) testu (čili pozitivní výsledek správně označí nemocného s invazivní aspergilózou). Opět se setkáváme s celou řadou faktorů, které PPV testu ovlivňují.

Prvním z těchto faktorů je incidence IA ve vyšetřované skupině pacientů. Pravděpodobnost, že pozitivní výsledek testu označí skutečně nemocného pacienta je nejvyšší ve skupinách nemocných s nejvyšší incidencí invazivní aspergilózy a těmi jsou především nemocní s akutní leukémií a pacienti po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně (incidence IA je zde 10 %, resp. 20 %). U ostatních skupin pacientů, kde je incidence IA nízká (nemocní s ostatními hematologickými malignitami a nebo po autologní transplantaci krvetvorné tkáně, pacienti po transplantaci solidních orgánů), je významně nižší i PPV testu [30].

Druhým faktorem ovlivňujícím PPV a specifitu Platelia Aspergillus testu je kritérium, které označí pacienta jako pozitivního (jednorázová versus opakovaná/konsekutivní pozitivita vzorku). Maertens et al. využil test k prospektivnímu

sledování nemocných s vysokým rizikem invazivní aspergilózy a prokázal, že jak při použití cut-off indexu positivity 1,0 tak 0,5 specifita testu významně narůstá, pokud je ne-

Tabulka 3
Faktory ovlivňující senzitivitu Platelia Aspergillus

Faktory snižující senzitivitu
Pacienti bez hematologické malignity/bez neutropenie [63]
Lokalizovaná forma aspergilové infekce [64]
Vysoká hodnota cut-off indexu positivity [27]
Nízká frekvence odběrů [22]
Předchozí podávání antimykotik [26]
Přítomnost protilátek proti galaktomannanu [17]
Dlouhodobé uchovávání vzorků v zamraženém stavu [12]

Tabulka 4
Příčiny falešné positivity Platelia Aspergillus testu

Falešná pozitivita	Mechanismus	Poznámky	Ref.
1. Kontaminace vzorku při odběru nebo zpracování vzorku			
Kontaminace vzdušnými spórami <i>Aspergillus</i> sp. a <i>Penicillium</i> sp.	detekce GM z kontaminujících vláken aspergilů a penicilií	sporadické positivity; k odlišení slouží retest vzorku v laboratoři a vyšetření opakovaného odběru	[44]
Kontaminace vatou (např. při desinfekci místa odběru)	zkřížená reakce s glukopyranozovými zbytky		[47]
2. Průnik antigenu z GIT při postižení nebo nezralosti GIT			
Předčasně narozené děti, novorozenci	průnik antigenů z <i>Bifidobacterium</i> sp. přes nezralou mukózu a zkřížená reaktivita polysacharidů buněčné stěny bifidobaktérií EB-A2		[43]
Mukozitida, střevní GVHD	průnik GM ze stravy přes poškozenou mukózu	GM obsažen v celé řadě potravin (těstoviny, rýže, kyselé zelí a další); většinou současně nutný alespoň částečně zachovaný perorální příjem stravy	[41,42]
3. Reakce s antigeny v cirkulaci			
Infekce <i>Penicillium</i> sp.	zkřížená reakce s polysacharidem penicilií		[65]
Plasma-Lyte (infuzní roztok)	reakce s GM kontaminujícím roztok. Ke kontaminaci dochází při výrobě kalcium glukonátu, který je součástí roztoku	klinicky jedna z nejčastějších a nejvýznamnějších příčin falešných pozitivit	[40]
Penicilinová ATB (piperacilin/tazobaktam, ampicillin, co-amoxicillin od některých výrobců)	reakce s GM kontaminujícím semisyntetická penicilinová ATB falešných pozitivit	klinicky jedna z nejčastějších a nejvýznamnějších příčin	[30,33]
4. Ostatní - zmiňované, ale neověřené příčiny			
Cyklofosfamid; Bakteriémie; Paraproteinémie; Transfuzní přípravky a krevní deriváty			[9,46,65]

mocný označen za skutečně pozitivního až při pozitivitě 2 vzorků jdoucích za sebou (85,4 % vs. 98,8 % a 98,6 % vs. 85,1 %) [15,27].

Konečně nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím PPV testu je možnost falešných pozitivit. I přes používání konsektivní pozitivita je až 20 % pozitivních výsledků falešně pozitivních [30]. Izolované falešné pozitivita mohou být způsobeny kontaminací vzorku při odběru nebo při zpracování vzdušnými spórami aspergilů nebo penicilií. Tyto izolované falešné pozitivita však lze jednoduše odlišit retestem pozitivního vzorku (negativní výsledek retestu svědčí pro kontaminaci při zpracování vzorku) a provedením kontrolního odběru vzorku séra (negativní výsledek pak svědčí pro kontaminaci při odběru vzorku). Retest prvního pozitivního vzorku a především odběr kontrolního séra by měl být proveden co možná nejdříve (do 24–48 hodin), aby nedošlo k prodlužení v časné stanovení diagnózy invazivní aspergilózy.

Klinicky závažnějším problémem jsou však falešné pozitivita testu přetrvávající i v opakovaných odběrech, které pak imitují obraz nalezený při skutečné infekci. Odlišení falešné a skutečné pozitivita je především u vysoce rizikových nemocných, kde lze infekci vzhledem k imunodeficitu očekávat, velmi obtížné. Pro klinika je tedy nezbytná dobrá znalost možných příčin falešné pozitivita testu, jednak pro jeho správnou interpretaci, ale především pro nutnost v maximální míře tyto faktory u pravidelně monitorovaných nemocných eliminovat. Nejčastější příčiny falešné pozitivita Platelia Aspergillus testu jsou zmíněny v následujícím textu [11,12,22,30,31].

Intravenózní podání penicilinových antibiotik

Aplikace penicilinových antibiotik – piperacillinu, piperacillinu/tazobactamu, některých co-amoxicillinů a ampicillinu – je jedním z nejčastějších příčin falešné pozitivita při detekci GM [32,33,34,35]. Důvodem je pravděpodobně kontaminace antibiotik GM při jejich semisyntetické výrobě. Tento proces využívá kmenů penicilií a GM z jejich buněčných stěn se pak pravděpodobně dostává do finálního výrobku [22]. Množství kontaminujícího GM kolísá jednak mezi jednotlivými antibiotiky, ale také mezi jednotlivými šaržemi jednoho výrobku a proto intenzita falešné pozitivita (tj. IP séra nemocných) při podávání těchto preparátů kolísá [36]. Vzhledem k odlišné kinetice kontaminujícího GM od kinetiky vlastního antibiotika dochází při podávání léku ke kumulaci GM a tak i k nárůstu měřeného IP v séru nemocných [37]. Navíc po ukončení podávání antibiotika falešná pozitivita testu vzhledem k pomalejší eliminaci kontaminujícího GM přetrvává ještě téměř 6 dnů [38].

Eliminace falešných pozitivit při podávání výše zmíněných preparátů je složitá. Ideální je vyloučení používání těchto antibiotik u nemocných, u kterých probíhá monitoring GM. Toto je možné u ampicillinu a co-amoxicillinu, ale velmi obtížné u piperacillinu/tazobactamu. V těchto případech je pak doporučován odběr vzorku séra pro vyšetření GM těsně před podáním další dávky antibiotika, kdy by měla být koncentrace kontaminujícího GM nejnižší [39]. Nicméně vzhledem ke zmíněné kumulaci kontaminujícího GM lze tohoto mechanismu využít pouze v prvních dvou dnech podávání léku, neboť následně je i ustálená koncentrace

kontaminujícího GM vysoká [37]. Podle našich zkušeností lze minimalizovat falešné pozitivita při podávání piperacillinu/tazobactamu testováním jednotlivých šarží a používáním pouze šarží GM negativních. K velmi podobným názorům pak dochází také Bart-Delabesse et al. [35].

Přítomnost GM nebyla potvrzena v celé řadě dalších antibiotik (cefalosporiny, karbapenemy, aminoglykosidy, chinolony, vankomycin) a podávání těchto léků nemocným nevedlo k rozvoji falešných pozitivit Platelia Aspergillus testu [37,39].

Aplikace roztoku Plasma-Lyte

Hage et al. publikoval falešnou pozitivitu při detekci GM z tekutiny získané bronchoalveolární laváží (BAL) při současném použití infuzního roztoku Plasma-Lyte (Baxter) jako lavážní tekutiny [40]. Vysoký index pozitivita byl zjištěn také při testování jednotlivých šarží roztoku. Příčinou falešné pozitivita je opět pravděpodobně kontaminující GM, který se do roztoku dostává při výrobě – Plasma-Lyte totiž obsahuje kalcium glukonát, který se vyrábí fermentací pomocí kmenů aspergilů. Autoři však nepředpokládali, že by při podání roztoku intravenózně (což je ale jeho hlavní použití) po distribuci v cirkulaci mohlo množství kontaminujícího GM způsobit falešnou pozitivitu. Naše zkušenosti však ukazují, že právě intravenózní podávání roztoku Plasma-Lyte je vedle penicilinových antibiotik jednou z hlavních příčin falešné pozitivita Platelia Aspergillus testu (nepublikovaná data). Řešením této příčiny falešných pozitivit testu je pak používání jiných infuzních roztoků pro hydrataci nemocných, u kterých probíhá rutinní skrínění GM.

Průnik antigenu z gastrointestinálního traktu

GM ze stěny aspergilů a penicilií byl prokázán v celé řadě potravin a nápojů a je běžně nalezen ve stolici [41]. Menší molekuly GM ze střeva tedy mohou teoreticky přecházet do cirkulace při narušení integrity střevní mukózy. Předpokládá se, že tento mechanismus je jednou z možných příčin falešné pozitivita Platelia Aspergillus testu u nemocných s mukozitidou a současně alespoň částečně zachovaným perorálním příjmem stravy [42]. V klinické praxi se však s touto situací u onkologických nemocných příliš často nesetkáváme. Na druhou stranu však právě průchod polysacharidů ze stěny bakterií *Bifidobacterium* sp. (zkříženě reagující s protilátkou EB-A2 použitou v Platelia Aspergillus testu) ze zažívacího traktu přes nezralou mukózu je jednou z hlavních příčin falešné pozitivita Platelia Aspergillus testu u předčasně narozených dětí [43].

Infekce jinými patogeny

Vzácnou příčinou falešné pozitivita při detekci GM může být infekce mykotickými patogeny, které nesou zkříženě reagující epitopy s kmeny aspergilů, jako jsou infekce vyvolané *Penicillium* sp. a *Cryptococcus neoformans* [44,45]. Tyto infekce jsou však naštěstí velmi raritní. Někteří autoři spekulují také o falešné pozitivitě testu při infekci některými z běžných bakterií (*E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp.), nicméně Swanink et al. neprokázal reaktivitu kmenů s testem in-vitro a falešné pozitivita Platelia Aspergillus testu u nemocných s bakteriemi nebyly v žádné korelaci s výsledky kultivace [9].

Ostatní příčiny falešné pozitivivity

V literatuře lze najít celou řadu možných příčin falešných pozitivit Platelia Aspergillus testu. Nicméně jde spíše o popisy jednotlivých případů, než že by se jednalo o klinicky významné a frekventní příčiny falešných pozitivit. Navíc většinou nejsou potvrzeny více autory a jejich mechanismus není většinou jednoznačně vysvětlen. Jsou popsány falešné pozitivivity testu při autoimunitních stavech a přítomnosti paraproteinu, při dialýze, při použití cyklofosfamidů a při kontaminaci vzorku vatou [46,47,48,49] (tabulka 4).

Detekce galaktomannanu umožňuje časnější diagnózu IA

Pravidelný a rutinní monitoring GM umožňuje zkrátit časový interval do stanovení diagnózy invazivní aspergilózy. Ve studii Maertense et al. předcházela antigenémií diagnóza IA stanovená na základě radiologických abnormalit o 8 dní v 80 % případů a diagnóza stanovená na základě pozitivního kultivačního vyšetření pak o 9 dní u 89 % nemocných [15]. Podobně i několik dalších prací prokázalo předcházení pozitivivity GM přibližně o 7 dní pozitivitu zobrazovacích metod [16,50]. Navíc v prospektivní studii Maertense et al. byla antigenémie primárním impulzem pro

provedení HRCT plic u 84 % hematologických nemocných s febrilní neutropenií a tento „impulz“ předcházel klasickým důvodům k provedení HRCT [51]. Je však zřejmé, že pravděpodobnost časné pozitivivity GM bude ovlivněna frekvencí prováděných odběrů a hodnotou zvoleného cut-off indexu pozitivivity (IP). Při použití dnes doporučeného cut-off IP 0,5 předcházela pozitivita testu v práci Marrové et al. rozvoji klinických příznaků a definitivnímu stanovení diagnózy o 6 respektive 10 dní. Naopak při použití cut off IP 1,0 nebo 1,5 pozitivita testu výše zmíněné parametry nepředcházela vůbec [26].

Galaktomannan jako marker léčebné odpovědi IA

Z klinického pohledu je velmi důležité časné zhodnocení odpovědi IA na léčbu antimykotiky. Klinický obraz, ale ani nález na HRCT však nemohou v první 2 týdnech léčby k tomuto hodnocení sloužit [22,52]. Jak bylo zmíněno výše, při studiích na zvířecích modelech byla prokázána korelace mezi fungální náloží v plicích a množstvím GM v plicním parenchymu, respektive hladinou GM v séru [10].

Tato zjištění jsou pak vysvětlením pro nálezy klinické a celá řada autorů prokázala využití detekce GM v séru jako markeru léčebné odpovědi. Při úspěšné léčbě IA dochází te-

Tabulka 5
Detekce galaktomannanu – Platelia Aspergillus – souhrn

Indikace
Pravidelný monitoring minimálně 2–3krát za týden indikován u pacientů s nejvyšším rizikem IA (alogenní HSCT, GvHD, neutropenie při léčbě AML)
U ostatních onkologických nemocných a jinak imunosuprimovaných pacientů (např. po transplantaci solidních orgánů) je indikován odběr při febriliích nereagujících na antibiotika nebo rozvoji plicních infiltrátů
Interpretace
Jako pozitivní je se označuje vzorek s IP > 0,5
Jako pozitivní se označuje nemocný s minimálně s dvěma vzorky s IP > 0,5
Každý první vzorek s IP > 0,5 by měl být v laboratoři retestován pro odlišení laboratorní kontaminace
Každá první pozitivita by měla být ověřena odběrem dalšího vzorku v co nejkratším časovém intervalu
Využití
Časná detekce invazivní aspergilózy
Diferenciální diagnostika plicních infiltrátů
Monitorace léčebné odpovědi na antimykotika
Rizikové body: a) možnost falešných pozitivit b) falešné negativity jsou spíše vzácné c) nízké (hraniční) hodnoty výsledků lze očekávat u nemocných s profylaxí antimykotiky s účinkem na vláknité houby
Další materiály vhodné k testování
Tekutina získaná z BAL – diferenciální diagnostika plicních infiltrátů, možnost časnější pozitivivity ve srovnání s detekcí GM v séru
Mozkomišní mok – diagnostika postižení CNS invazivní aspergilózou
IA – invazivní aspergilóza, HSCT – transplantace krvetvorné tkáně, GvHD – reakce štepů proti hostiteli, AML akutní myeloidní leukémie, IP – index pozitivivity, BAL bronchoalveolární laváž, CNS – centrální nervový systém

dy k poklesu hladin GM a naopak s trvale rostoucí hladinou GM a nebo rekurencí nárůstu po předchozím poklesu se setkáváme u pacientů, u kterých léčba selhává [14,16,50]. Vzestup GM IP o více jak 1,0 po 7 dnech léčby je s více jak 90% pozitivní prediktivní hodnotou spojen se selháním terapie a měla by být zvažena její změna [53]. Za určitých okolností se však můžeme setkat s paradoxním vzestupem GM IP i přes dobrou léčebnou odpověď infekce. K paradoxnímu vzestupu GM může docházet při současném závažném renálním selhání eventuelně i s nutností hemodialýzy (porucha klírens vysokomolekulárního GM, který není eliminován ani hemodialýzou) a v prvních několika málo dnech léčby echinokandiny (poškození a rozpad buněčné stěny obsahující GM) [54,55,56].

Ostatní materiály

Přestože je Platelia Aspergillus test určen primárně k vyšetřování séra, lze pomocí něj detekovat GM i v jiných tělesných tekutinách eventuelně v tkáních [57].

Protože invazivní aspergilóza je ve většině případů inhalací infekcí a primárně jsou postiženy plíce, není překvapivím, že nejčastěji vyšetřovaným materiálem jiným než sérum je tekutina získaná bronchoalveolární laváží (BAL). Detekce GM z tekutiny získané BAL je spojena se senzitivitou pohybující se od 60–100%. Senzitivita je opět vyšší jestliže je použit jako cut-off dnes doporučovaný IP 0,5, přičemž specifická testu zůstává stále vysoká (94 %) [58]. Výhodou detekce GM z tekutiny získané BAL je především významně vyšší senzitivita a časnější pozitivita ve srovnání s konvenčními mikrobiologickými metodami používanými k detekci IA z materiálu získaného BAL (kultivace, mikroskopie). Jsou popsány případy, kdy pozitivita GM z tekutiny získané BAL předcházela pozitivitu GM v séru. Tyto nálezy odpovídají patogenetice plicní formy invazivní aspergilózy. V běžné klinické praxi, kdy většinou provádíme BAL v případě nálezu plicních infiltrátů na zobrazovacích metodách, je časový rozdíl mezi pozitivním záchytem GM z krve a z BAL většinou minimální. Podobně jako při testování séra se i v případě detekce GM v tekutině z BAL můžeme setkat s falešnou pozitivitou i negativitou. Zejména u níže rizikových nemocných je možná falešná pozitivita při kolonizaci dýchacích cest kmeny aspergilů. Nicméně podobně jako je tomu při interpretaci pozitivního kultivačního záchytu aspergilů z materiálu z dýchacích cest je i PPV Platelia Aspergillus testu v tomto případě tím vyšší, čím je nemocný rizikovější. Falešně negativní pak může být detekce GM z tekutiny z BAL u nemocných, u kterých je BAL proveden více než 3 dny od zahájení účinné antimykotické léčby [59].

Dalším materiálem, ve kterém může být GM detekován, je mozkomíšní mok. Postižení centrálního nervového systému je většinou součástí diseminace plicní formy IA, spíše výjimečně jde o izolované postižení. Detekce GM z mozkomíšního moku u nemocných s postižením CNS je spojena, na rozdíl od velmi často negativní kultivace, s velmi vysokou senzitivitou pohybující se mezi 80–100 % [60,61]. Pozitivita GM z mozkomíšního moku (samotná nebo spolu s pozitivitou GM v séru) je tak vedle klinického a eventuelně i radiologického nálezu jediný mikrobiologický marker, který může vést k diagnóze postižení CNS invazivní asper-

gilózou [60]. Je však nutné si uvědomit, že i při plicní formě IA (bez postižení CNS) může část sérového GM pronikat přes hematoencefalickou bariéru a stejně tak může dojít ke „kontaminaci“ mozkomíšního moku GM z krve při hemoragickém odběru vzorku likvoru. IP pozitivita GM v mozkomíšním moku však v těchto případech bývají výrazně nižší [60,62].

Detekce GM z jiných tělesných tekutin eventuelně z tkání byla sice testována, nicméně interpretace výsledků není v současné době jednotná [62].

Závěr

Až donedávna byla diagnostika invazivní aspergilózy velmi obtížná a pozdní, neboť často jedinou možností stanovení diagnózy byl histologický nebo kultivační průkaz hyf ze sterilních tkání získaných biopsií. Rutinní zavedení detekce galaktomannanu do diagnostického algoritmu u nemocných v riziku invazivní aspergilózy představuje zásadní změnu v časné diagnostice IA. Přestože test není zcela jistě naprosto ideální, pravidelný skríníng nemocných v riziku umožňuje zkrácení doby do stanovení diagnózy infekce a tak i zlepšení prognózy nemocných s IA. Vysoká negativní prediktivní hodnota testu naopak usnadňuje rozhodnutí o ukončení empiricky podané drahé antimykotické léčby, respektive umožňuje vyčkat s jejím zahájením. Rutinní monitoring GM ELISA metodikou dovoluje zacylit podání moderních, ale drahých antimykotik na nemocné s vysoce pravděpodobnou IA (tzv. preemptivní podání antimykotik) a tak alespoň částečně snížit celkovou cenu této léčby.

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR8452-3/2005.

Literatura

- Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006;91(8):1068–1075.
- Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34(7):909–917.
- von Eiff M, Roos N, Schulten R, et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 1995;62(6):341–347.
- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 2002;347(6):408–415.
- Lee YR, Choi YW, Lee KJ, et al. CT halo sign: the spectrum of pulmonary diseases. *Br J Radiol*. 2005;78(933):862–865.
- Lehmann PF and Reiss E. Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits. *Infect Immun*. 1978;20(2):570–572.
- Reiss E and Lehmann PF. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun*. 1979;25(1):357–365.
- Latge JP, Kobayashi H, Debeauvais JP, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 1994;62(12):5424–5433.
- Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, et al. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J Clin Microbiol*. 1997;35(1):257–260.
- Petratis V, Petraitiene R, Solomon J, et al. Multidimensional volumetric imaging of pulmonary infiltrates for measuring therapeutic response to antifungal therapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1510–1517.
- Mennink-Kersten MA, Donnelly JP and Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(6):349–357.
- Aquino VR, Goldani LZ and Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia*. 2007;163(4):191–202.
- Maertens J, Verhaegen J, Demuyck H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Asper-

- gilliosis. *J Clin Microbiol*. 1999;37(10):3223–3228.
14. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, et al. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood*. 2001;97(6):1604–1610.
 15. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis*. 2002;186(9):1297–1306.
 16. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, et al. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*. 2001;91(2):311–318.
 17. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2002;20(7):1898–1906.
 18. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):2184–2186.
 19. Rovira M, Jimenez M, De La Bellacasa JP, et al. Detection of Aspergillus galactomannan by enzyme immunoabsorbent assay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. *Transplantation*. 2004;77(8):1260–1264.
 20. Quindos G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12 Suppl 740–52.
 21. McLintock LA and Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol*. 2004;126(3):289–297.
 22. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, et al. Advances in the serological diagnosis of invasive Aspergillus infections in patients with haematological disorders. *Mycoses*. 2007;50 Suppl 12–17.
 23. Balloy V, Huerre M, Latge JP, et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*. 2005;73(1):494–503.
 24. Hope WW, Walsh TJ and Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to Aspergillus spp. *Med Mycol*. 2005;43 Suppl 1S207–238.
 25. Husain S, Kwak EJ, Obman A, et al. Prospective assessment of Platelia Aspergillus galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004;4(5):796–802.
 26. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*. 2004;190(3):641–649.
 27. Maertens J, Theunissen K, Verbeke E, et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*. 2004;126(6):852–860.
 28. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, et al. Antifungal therapy decreases sensitivity of the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2005;40(12):1762–1769.
 29. Racil Z, Kocmanova I, Kubicova E, et al. Variation of galactomannan level during 24-hour period in haematooncological patients with/without invasive aspergillosis (Paper 729). Abstract of the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID). 2006; Nice, France. European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2006
 30. Wheat LJ. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2005;27(7):51–57.
 31. Verdager V, Walsh TJ, Hope W, et al. Galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(1):21–32.
 32. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False-positive galactomannan platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):913–916.
 33. Adam O, Auperin A, Wilquin F, et al. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive Aspergillus galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):917–920.
 34. Mattei D, Rapezzi D, Mordini N, et al. False-positive Aspergillus galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5362–5363.
 35. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, et al. Detection of Aspergillus galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5214–5220.
 36. Machetti M, Furfaro E and Viscoli C. Galactomannan in piperacillin-tazobactam: how much and to what extent? *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(9):3984–3985.
 37. Walsh TJ, Shoham S, Petraitene R, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4744–4748.
 38. Aubry A, Porcher R, Bottero J, et al. Occurrence and kinetics of false-positive Aspergillus galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):389–394.
 39. Singh N, Obman A, Husain S, et al. Reactivity of platelia Aspergillus galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):1989–1992.
 40. Hage CA, Reynolds JM, Durkin M, et al. Plasmalyte as a cause of false-positive results for Aspergillus galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):676–677.
 41. Ansorg R, van den Boom R and Rath PM. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997;40(9–10):353–357.
 42. Blijlevens NM, Donnelly JP, Meis JF, et al. Aspergillus galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl Infect Dis*. 2002;4(2):64–65.
 43. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3925–3931.
 44. Kappe R and Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex Aspergillus antigen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*. 1993;31(9):2489–2490.
 45. Dalle F, Charles PE, Blanc K, et al. Cryptococcus neoformans Galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with Aspergillus Galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2929–2931.
 46. Knight F and Mackenzie DW. Aspergillus antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*. 1992;339(8786):188.
 47. Dalle F, Lopez J, Caillot D, et al. False-positive results caused by cotton swabs in commercial Aspergillus antigen latex agglutination test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21(2):130–132.
 48. Kwak EJ, Husain S, Obman A, et al. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):435–438.
 49. Hashiguchi K, Niki Y and Soejima R. Cyclophosphamide induces false-positive results in detection of aspergillus antigen in urine. *Chest*. 1994;105(3):975–976.
 50. Pazos C, Ponton J and Del Palacio A. Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):299–305.
 51. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis*. 2005;41(9):1242–1250.
 52. Brodoefel H, Vogel M, Hebart H, et al. Long-term CT follow-up in 40 non-HIV immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis: kinetics of CT morphology and correlation with clinical findings and outcome. *AJR Am J Roentgenol*. 2006;187(2):404–413.
 53. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis*. 2002;34(7):939–943.
 54. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, et al. Paradoxical increase in circulating Aspergillus antigen during treatment with caspofungin in a patient with pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2006;43(3):e23–25.
 55. Maertens J, Glasmacher A, Selleslag D, et al. Evaluation of serum sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for circulating galactomannan during caspofungin therapy: results from the caspofungin invasive aspergillosis study. *Clin Infect Dis*. 2005;41(1):e9–14.
 56. El Saleeby CM, Allison KJ, Knapp KM, et al. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving Aspergillus, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3560–3563.
 57. Klont RR, Mennink-Kersten MA and Verweij PE. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis*. 2004;39(10):1467–1474.
 58. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, et al. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5517–5522.
 59. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, et al. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol*. 2003;121(3):448–457.
 60. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, et al. Aspergillus galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1496–1499.
 61. Kami M, Ogawa S, Kanda Y, et al. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain reaction, latex agglutination test, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol*. 1999;106(2):536–537.
 62. Wheat L. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2005;27(8):59–63.
 63. Pfeiffer CD, Fine JP and Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1417–1427.
 64. Maertens J, Theunissen K, Deeren D, et al. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol*. 2006;44 Suppl173–178.
 65. Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transpl Infect Dis*. 2003;5(4):158–166.

3.2. Detekce galaktomannanu – vlastní zkušenosti

Z literárního přehledu vyplývá, že přestože Platelia Aspergillus není testem naprosto spolehlivým, pravidelný skrínig nemocných v riziku umožňuje jednoznačně vyšší a časnější záchyt pravděpodobné invazivní aspergilózy. Vysoká negativní prediktivní hodnota testu také usnadňuje rozhodnutí o ukončení empiricky podané antimykotické léčby, respektive umožňuje vyčkat s jejím zahájením. Rutinní monitoring galaktomannanu ELISA metodikou dovoluje zacílit podání moderních, ale drahých antimykotik na nemocné s vysoce pravděpodobnou invazivní aspergilózou (tzv. preemptivní podání antimykotik).

Pracoviště autora bylo jedním z prvních v České republice, kde byl test ve spolupráci s Oddělením klinické mikrobiologie FN Brno zaveden a používán v klinické praxi. Test zásadním způsobem změnil diagnostiku invazivní aspergilózy na pracovišti autora.

Mnohaleté používání testu bylo podrobně analyzováno v následující původní práci (Ráčil, Z., Kocmanová, I., Wagnerová, B., Winterová, J., Lengerová, M., Moulis, M., Mayer, J.: Využití detekce galaktomannanu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematologických nemocných. Vnitřní lékařství, 54, 2008, 1: 45-52)

- 3.2.1. Ráčil, Z., Kocmanová, I., Wagnerová, B., Winterová, J., Lengerová, M., Moulis, M., Mayer, J.: Využití detekce galaktomannanu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematoonkologických nemocných. Vnitřní lékařství, 54, 2008, 1: 45-52**

Využití detekce galaktomananu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematologických nemocných

Z. Ráčil¹, I. Kocmanová², B. Wagnerová¹, J. Winterová¹, M. Lengerová¹, M. Moulis³, J. Mayer¹

¹ Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

² Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, pracoviště Bohunice, prim. MUDr. Alena Ševčíková

³ Ústav patologie Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jirka Mačák, CSc.

Souhrn: *Východiska a cíle:* Pro prognózu nemocných s invazivní aspergilózou (IA) má zásadní význam včasně stanovená diagnóza. V posledních několika letech získala na významu včasné diagnostice IA detekce galaktomananu ELISA metodikou. Cílem této práce je analýza využitelnosti této metody v běžné klinické praxi hematologického oddělení. *Pacienti a metody:* V období od května roku 2003 do října roku 2006 byl u nemocných v riziku IA prováděn odběr krve pro detekci galaktomananu (GM) v séru ELISA metodikou. Výšetření nemocných bylo následně na základě výsledků konvenčních diagnostických metod a sekčních nálezů klasifikováno dle pravděpodobnosti přítomnosti IA. *Výsledky:* Celkem bylo vyšetřeno na přítomnost GM 11 360 vzorků séra od 911 dospělých pacientů. IA (pravděpodobná/prokázaná) byla diagnostikována u 42 (4,6 %) z nich. Souhrnně byla senzitivita, specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota detekce galaktomananu pro diagnostiku IA na našem pracovišti 95,2 %, 90,0 %, 31,5 % a 99,7 %. Jako hlavní příčiny omezené pozitivní prediktivní hodnoty testu byly identifikovány jednak velké procento falešných pozitivit testu (především způsobené současným podáváním některých penicilinových antibiotik nebo infuzního roztoku Plasma-Lyte) a jednak fakt, že velké procento námi vyšetřovaných nemocných spadá do skupiny pacientů s hematologickou malignitou, u nichž je prevalence IA velmi nízká. *Závěr:* Detekce GM v séru je spojena s vysokou senzitivitou a excelentní negativní prediktivní hodnotou v diagnostice IA u hematologických nemocných. Pro ještě vyšší výtěžnost testu je nezbytná znalost a eliminace možných příčin falešných pozitivit, stejně tak jako zacílení screeningu na nemocné nejvíce ohrožené touto infekcí.

Klíčová slova: invazivní aspergilóza – sérologické metody – aspergilový antigen – galaktomanan – časná diagnóza – hematologické malignity

The use of galactomannan detection in diagnosing invasive aspergilosis in hemato-oncological patients

Summary: *Premises and objectives:* Timely diagnosis is of critical importance for the prognosis of invasive aspergilosis (IA) patients. Over recent years, IA detection of galactomannan using the ELISA method has assumed growing importance. The objective of the study was to analyse the usability of the method in current clinical practice of a hemato-oncological ward. *Patients and methods:* From May 2003 to October 2006, blood samples were taken from patients at IA risk to detect galactomannan (GM) in serum using the ELISA method. The patients who underwent the tests were classified by the probability of IA presence on the basis of the results of conventional diagnostic methods and section findings. *Results:* A total of 11,360 serum samples from 911 adult patients were tested for GM presence. IA (probable/proven) was diagnosed in 42 (4.6 %) of them. The rates of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of galactomannan detection for IA diagnosis in our ward were, respectively, 95.2 %, 90.0 %, 31.5 % and 99.7 %. The principal causes of the limited positive predictive value of the test were the high percentage of false-positive test results (mainly caused by concomitant administration of some penicillin antibiotics or Plasma-Lyte infusion solution), as well as the fact that a large percentage of patients we examined fell within the group of patients with hematological malignity with a very low prevalence of IA. *Conclusion:* GM detection in serum is associated with high sensitivity and excellent negative predictive value in IA diagnosis in hemato-oncological patients. Knowledge and elimination of possible causes of false-positive results as well as focusing the screening on patients at greatest risk of infection are necessary for an even better exploitation of the test.

Keywords: invasive aspergilosis – serologic methods – aspergillus antigen – galactomannan – timely diagnosis – hematological malignity

Úvod

Invazivní aspergilóza (IA) je v současné době nejčastější invazivní mykózou u hematologických nemocných,

a to především u pacientů podstupujících intenzivní chemoterapii pro akutní leukemii nebo alogenní transplantaci krvetvorné tkáně (HSCT – hematopoie-

tic stem cell transplantation) [1–4]. I přes to, že jsou v současné době k dispozici nová, velmi účinná systémová antimykotika, zůstává mortalita IA

u hematologických pacientů velmi vysoká a přesahuje 50 % [5]. Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících mortalitu nemocných s IA je včasnost zahájení účinné antimykotické léčby, která však vyžaduje včasné stanovení diagnózy [6]. Bohužel právěčasné stanovení přesné diagnózy je u IA velice komplikované. Klinické příznaky infekce jsou nespecifické, konvenční mikrobiologické metody málo senzitivní a dávají opožděný výsledek. Konečné histologický průkaz hyf ve sterilní tkáni vyžaduje biopsii, která je však často u kritických nemocných s trombocytopenií a koagulopatií neproveditelná. Přestože má pro časnou diagnostiku IA velký význam pravidelně prováděné vysoce rozlišovací CT plic (HRCT – High Resolution CT), má toto vyšetření své limity. Obraz „halo sign“, který je velice často popisován u neutropenic- kých nemocných s IA, není specifický pouze pro IA [7], je pozorovatelný jen krátkodobě, ale především pravidelné a rutinní provádění HRCT není na všech pracovištích schůdné. Obtížnost časné diagnostiky IA vedla k rozvoji tzv. nekultivačních diagnostických metod využívajících detekci mykotických antigenů (galaktomanan, 1,3 β-D glukán) a nebo fungálních nukleových kyselin (různé varianty PCR) [8,9].

S detekcí 1,3 β-D glukánu v diagnostice IA je dosud jen relativně málo zkušeností a různé varianty PCR (vzhledem k heterogenitě používaných metod) nemohou být dosud v žádném případě použity jako kritérium IA [10]. Naopak jednoznačně zásadního významu pro časnou diagnostiku IA doznala sérologická metoda využívající detekci antigenu specifického pro buněčnou stěnu *Aspergillus sp.* – galaktomananu (GM) – a to pomocí komerčně dostupného testu Platelia® *Aspergillus* (Bio-Rad, Francie), se kterou jsou rovněž nejrozsáhlejší zkušenosti. Jedná se o sandwichovou ELISu (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), která využívá vazby krycích monoklonálních protilátek EB-A2 s β-1,5-galaktofura-

nosylovými konci galaktomananu. V posledních několika letech celá řada prací prokázala její velmi dobrou senzitivitu, negativní prediktivní hodnotu a schopnost zkrátit dobu do stanovení diagnózy IA i o řadu dní ve srovnání s konvenčními diagnostickými metodami [11–14]. Z druhé strany však existuje řada faktorů, které mohou využitelnost metody ovlivnit: cut-off indexu pozitivity (hodnota indexu pozitivity, od kterého je vzorek označen jako pozitivní), frekvence odběrů, izolovaná nebo konsektivní pozitivita jako požadavek pro označení nemocného za GM pozitivní, možnost falešných pozitivit testu a další [15].

Cílem naší práce je retrospektivní analýza využitelnosti detekce galaktomananu v séru pomocí Platelia® *Aspergillus* testu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy, a to po 3,5letém extenzivním používání metody v běžné klinické praxi na hematologickém oddělení.

Pacienti a metody

Sledovaná populace a design

V období května roku 2003 do září roku 2006 byla u všech dospělých léčených na našem pracovišti především z důvodů hematologické malignity při současném riziku rozvoje IA prováděn rutinní monitoring detekce GM v krvi. Odběry krve pro záchyt GM byly u pacientů podstupujících indukční a reindukční léčbu akutní leukemie anebo alogenní transplantaci krevetvorné tkáně prováděny pravidelně 2–3krát týdně, ev. častěji, a to od začátku chemoterapie do propuštění. U ostatních nemocných byl monitoring zahájen v případě vzniku klinické pravděpodobnosti nebo rizika invazivní mykotické infekce (nejčastěji v případě febrilní neutropenie nereagující na 5denní podávání širokospektrých antibiotik anebo v případě rozvoje abnormalit na HRCT nebo konvenčním RTG snímku plic) a prováděn opět 2–3krát týdně po dobu trvání rizika.

Nemocní byli obvykle hospitalizováni na standardním třílůžkovém po-

koji s centrální úpravou vzduchu, ovšem kromě pacientů podstupujících alogenní transplantaci krevetvorné tkáně, kteří byli ve většině případů umístěni na jednolůžkovém pokoji s úpravou vzduchu pomocí HEPA filtru až do doby přihojení štěpu (absolutní počet neutrofilních granulocytů $> 1,0 \times 10^9/l$). Po dobu neutropenie, respektive u pacientů po alogenní transplantaci krevetvorné tkáně také po dobu intenzivní imunosuprese pro reaktivaci štěpu proti hostiteli (Graft Versus Host Disease – GVHD) byla podávána antimykotická profylaxe flukonazolem v dávce 400 mg/den.

Během hospitalizace byli pacienti sledováni z hlediska rozvoje příznaků invazivní mykotické infekce. Denně bylo prováděno klinické vyšetření lékařem. Konvenční snímek srdce a plic byl indikován vstupně a následně v průběhu febrilní neutropenie minimálně 1krát týdně, ev. častěji. V týdenním intervalu byla prováděna surveillance bakteriologického a mykologického osídlení v moči, stěru z rekta a dutiny ústní. Odběr hemokultur a kultivační a mikroskopické vyšetření ostatních klinických materiálů (především sputum) bylo prováděno v případě rozvoje febrilií, respektive klinických příznaků infekce.

V případě zvýšené pravděpodobnosti vzniku invazivní mykotické infekce (febrilní neutropenie nereagující na 5 dnů antibiotické léčby, rozvoj plicních infiltrátů na konvenčním RTG snímku plic, pozitivní kultivace s průkazem vláknité houby z materiálu z dýchacích cest) nastoupila série vyšetření s cílem maximálního možného průkazu vyvolávajícího agens. Bylo provedeno HRCT plic a v případě pozitivity pak bronchoalveolární laváž (lavážní tekutina byla vyšetřována kultivačně, cytologicky, imunofluorescenčně pro průkaz *Pneumocystis jiroveci* a molekulárně biologicky pro průkaz virových patogenů, mykoplazmat, chlamydií a *Pneumocystis jiroveci*).

Empirická antibiotická léčba febrilní neutropenie zahrnovala monoterapii

cefepimem, piperacilin/tazobaktamem, výjimečně meropenemem. V případě klinické indikace byl do kombinace přidán vankomycin nebo aminoglykosid. Pro empirickou antimykotickou léčbu byl v absolutní většině případů zvolen konvenční amfotericin B, výjimečně kaspofungin nebo vorikonazol.

V případě úmrtí nemocného byla v maximálně možné míře a při souhlasu rodiny provedena patologicko-anatomická pitva. Ve sledovaných letech byla sekce provedena průměrně u 56 % nemocných zemřelých na našem pracovišti.

Retrospektivně byla analyzována zdravotnická dokumentace vyšetřovaných pacientů s cílem určit pravděpodobnost invazivní aspergilózy a zjistit možnou jinou příčinu pozitivitu GM v séru.

Detekce galaktomananu

Srážlivá krev odebraná nemocným byla ihned (při provedení odběru v pracovní dobu) nebo nejpozději následující den ráno (byl-li odběr proveden v nočních hodinách) transportována na mikrobiologické oddělení ke zpracování. Do odeslání byla srážlivá krev na hematologickém pracovišti uchovávána na vyčleněném místě při pokojové teplotě. Na mikrobiologickém oddělení bylo po centrifugaci vzorku (3 min/3 000 otáček) odděleno sérum a přeneseno po 300 µl do sterilních Ependorfových zkumavek. V případě, že se materiál nevyšetřoval tentýž den, byly zkumavky zmrazeny na -20 °C, a takto uchovávány do okamžiku zpracování (maximálně 72 hod).

Galaktomanan byl detekován pomocí komerční soupravy Platelia® Aspergillus (BioRad, France). Vzorky byly v laboratoři zpracovány podle doporučení výrobce tohoto setu.

Výsledek testu byl vydáván jako bezrozměrný index positivity (IP), který odpovídá poměru naměřené optické denzity (OD) vzorku a OD kontrolního séra o koncentraci 1 ng GM/ml. Jako pozitivní byly označeny séra s $IP > 0,5$. Pro označení nemocného za „galak-

tomanan pozitivního“ bylo zvoleno kritérium $IP > 0,5$ ve 2 po sobě jdoucích (konsekutivních) vzorcích. Pro vyloučení laboratorní kontaminace byl vždy první pozitivní vzorek u každého pacienta retestován. Při pozitivitě retestu byl vyžádán a následně otestován další vzorek séra od nemocného.

Definice pravděpodobnosti invazivní aspergilózy

Jako pacienti s prokázanou IA byli označeni nemocní s pozitivním histologickým/kultivačním průkazem *Aspergillus* sp. ze sterilního místa nebo ze sekce. Nemocným byla závěrem stanovena klinická diagnóza – vysoce pravděpodobná IA a na základě této diagnózy byli také tak léčeni; byli zahrnuti do skupiny pravděpodobné IA (nejčastěji kombinace rizikových faktorů, febrilií nereagujících na antibiotika a vysoce pravděpodobného nálezu na zobrazovacích metodách – nejčastěji HRCT). Ostatní nemocní byli označeni jako pacienti s možnou IA (většinou pacienti s nízkými faktory a febriliemi nereagujícími na antibiotika, ale se zcela nespecifickým nálezem na zobrazovacích metodách) a nebo bez IA (jedinci zcela asymptomatictí bez nálezu na zobrazovacích metodách, kteří nebyli léčeni antimykotiky ani empiricky).

Vzhledem k charakteru analýzy, která zcela vychází z každodenní reálné praxe na hematologickém oddělení, nebyla použita pro klasifikaci nemocných EORTC/MSG kritéria. Tato kritéria mají v rutinní praxi jen omezené použití a většina nemocných by při jejich aplikaci byla v analýze označena za pacienty s maximálně možnou invazivní mykotickou infekcí [16,17].

Statistická analýza

Statistické zpracování bylo provedeno na úrovni pacienta (per patient analysis). Pacienti s prokázanou a pravděpodobnou IA byli označeni jako skutečně pozitivní. Ostatní nemocní pak jako skutečně negativní. Senzitivita, specifická, pozitivní a negativní

Tab. 1. Základní onemocnění a typ protinádorové léčby GM pozitivních pacientů.

Počet GM pozitivních pacientů	n
Základní diagnóza	
Akutní leukemie	43
Non Hodgkinův lymfom	30
Mnohočetný myelom	22
Chronická lymfatická leukemie	12
Myelodysplastický syndrom	5
Hodgkinův lymfom	5
Vlasatobuněčná leukemie	2
Ostatní	8
Protinádorová léčba	
Alogenní HSCT	11
Autologní HSCT	29
Léčba akutní leukemie	31
Ostatní	43
Bez léčby	13

prediktivní hodnota byly vypočítány pomocí 2 × 2 tabulky.

Výsledky

Souhrnná analýza

Od května roku 2003 do října roku 2006 bylo celkem odebráno a na přítomnost GM vyšetřeno 11 360 vzorků séra od 911 dospělých nemocných léčených na našem pracovišti (průměr 12,5 vzorků/pacienta).

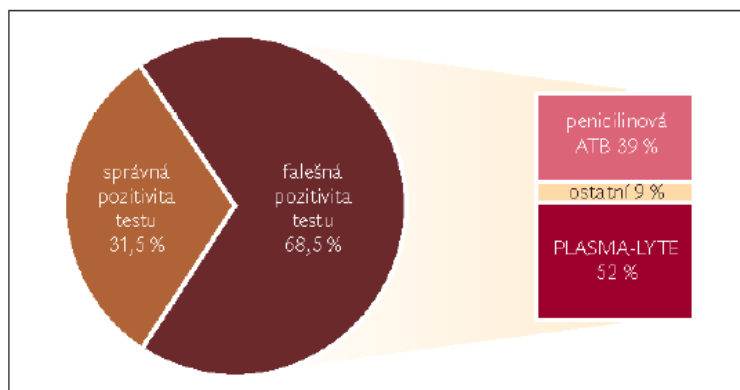
IA byla diagnostikována u 42 (4,6 %) pacientů z našeho souboru – z toho prokázána IA u 7 (17 %) pacientů a pravděpodobná IA u 35 (83 %) nemocných.

Z celkového počtu vyšetřených vzorků sér byl index positivity vyšší než 0,5 naměřen u 890 (7,8 %) z nich.

Kritéria pro označení za GM pozitivní ($IP > 0,5$ v minimálně 2 konsekutivních vzorcích) splnilo 127 (13,9 %) nemocných.

Základní onemocnění a typ protinádorové léčby GM pozitivních pacientů ukazuje tab. 1.

Souhrnně byla senzitivita, specifická, pozitivní a negativní prediktivní hodnota detekce GM pro diagnostiku IA na našem pracovišti 95,2 %, 90,0 %, 31,5 % a 99,7 % (tab. 2).



Graf 1. Rozdělení GM pozitivních pacientů dle správnosti pozitivity Platelia® Aspergillus testu a procentuální zastoupení jednotlivých příčin falešných pozitivit.

Detekce GM pomocí Platelia® Aspergillus testu díky vynikající senzitivitě umožnila zachytit 40 ze 42 případů pravděpodobně/prokázané invazivní aspergilové infekce, ke kterým došlo ve sledovaném období. U obou GM negativních nemocných s IA byl výsledek GM testu sice také pozitivní, ale pouze v 1 vzorku séra, a tak nebyla splněna kritéria pro označení pacientů za GM pozitivní.

782 pacientů ze 784 označených testem za GM negativní nemělo invazivní aspergilovou infekci a tedy díky excellentní NPV dokázal Platelia® Aspergillus test s vysokou pravděpodobností IA vyloučit.

Určitým limitem metody však byla její nízká pozitivní prediktivní hodnota. Tato skutečnost má několik hlavních

příčin – jednak velké procento falešných pozitivit testu a rovněž fakt, že velké procento námi vyšetřovaných nemocných spadá do skupiny pacientů s velmi nízkou prevalencí IA.

Falešné pozitivivity Platelia® Aspergillus testu

Z celkového počtu 127 GM pozitivních pacientů byla pravděpodobná nebo prokázaná IA dle výše popsaných kritérií stanovena u 40 z nich (31,5 %). V 68,5 % případů (87 pacientů) byla pozitivita testu falešná i přesto, že pro označení nemocného za GM pozitivního byla vyžadována konsektivní pozitivita.

39 % (n = 34) případů falešné pozitivivity bylo způsobeno podáváním penicilinových antibiotik. Testováním

Tab. 2. Souhrnná analýza přínosnosti detekce GM pomocí Platelia® Aspergillus testu.

	2 * IP > 0,5
senzitivita	95,2 %
specifická	90,0 %
PPV	31,5 %
NPV	99,7 %

jednotlivých penicilinových antibiotik byly jako příčina identifikovány některé šarže piperacilinu/tazobaktamu, ampicilinu a konečně amoxicilin/klavulanátu (a to pouze od některých výrobců), tab. 3. Falešné pozitivivity při detekci GM u hematologických nemocných kumulovaly v obdobích, kdy zmíněná antibiotika, respektive jejich nekontrolované šarže, byly na našem pracovišti podávány (do poloviny roku 2004), graf 2. Od druhé poloviny roku 2004 byl z používání vyloučen ampicilin. GM pozitivní amoxicilin/klavulanát byl nahrazen GM negativním preparátem od jiného výrobce. Konečně všechny šarže piperacilin/tazobaktamu jsou od té doby před distribucí testovány pomocí Platelia® Aspergillus testu a použity jsou výlučně šarže GM negativní, tzn. takové, které nejlépe v koncentrované podobě a nebo alespoň v naředění na koncentraci odpovídající dosažené koncentraci antibiotika v séru mají IP < 0,5. Tato opatření (s výjimkou krátkého období v roce 2005, kdy nebyly k dispozici GM negativní šarže piperacilin/tazobaktamu) vedla k eliminaci falešných pozitivit Pla-

Tab. 3. Testování přítomnosti GM (pozitivita Platelia® Aspergillus testu) v jednotlivých šaržích penicilinových antibiotik v koncentrované podobě a po naředění na plazmatickou koncentraci.

	Počet testovaných šarží ATB	koncentrované ATB		ATB naředěné na plazmatickou koncentraci	
		Průměrný IP	Počet šarží GM pozitivní (IP > 0,5)	Průměrný IP	Počet šarží GM pozitivní (IP > 0,5)
piperacilin/tazobaktam (Tazocin®)	20	2,38 (0,02–8,35)	12 (60 %)	0,29 (0,03–1,3)	3 (15 %)
amoxicilin/klavulanát (Augmentin®)	11	5,41 (4,24–6,97)	11 (100 %)	0,4 (0,08–2,03)	4 (36 %)
amoxicilin/klavulanát (Amoksiklav®)	10	0,15 (0,03–0,85)	1 (10 %)	0,08 (0,03–0,18)	0
ampicilin (Ampicilin Pliva®)	3	4,85 (0,2–7,45)	2 (66 %)	0,87 (0,08–1,82)	2 (66 %)
ampicilin/sulbaktam (Unasyn®)	8	0,09 (0,07–0,12)	0	0,08 (0,07–0,09)	0

Tab. 4. Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) Platelia® Aspergillus testu u jednotlivých skupin hematologických nemocných s odlišnou prevalencí IA.

Protinádorová léčba	PPV
Celý soubor	31,5 %
Alogenní HSCT	73 %
Indukce akutní leukemie	46 %
Konzolidace akutní leukemie	33 %
Ostatní protinádorová léčba (BEACOPP, CHOP, VAD, FC, CODOX/IVAC, ostatní)	29 %
Autologní HSCT	14 %

Tab. 5. Charakter postižení u nemocných s pravděpodobnou/prokázanou IA u kterých bylo provedeno HRCT a byli označeni za GM pozitivní (n = 30).

Nález na HRCT	n	%
Air crescent	2	6,7 %
Halo	1	3,3 %
Intersticiální proces	2	6,7 %
Konzolidace	14	46,7 %
Makronoduly > 1 cm	6	20,0 %
Mikronoduly < 1 cm	5	16,7 %

telia® Aspergillus testu způsobených penicilinovými antibiotiky (graf 2).

52 % (n = 45) případů falešných pozitivit bylo způsobeno podáváním infuzního roztoku Plasma-Lyte a jejich výskyt a počet koreloval se zvyšující se spotřebou tohoto infuzního roztoku na našem pracovišti (graf 2).

U 9 % (n = 8) případů falešné positivity Platelia® Aspergillus testu nelze příčinu přesně identifikovat. U 2 pacientů z této skupiny lze zvažovat jako příčinu těžkou mukozitidu s následným průchodem antigenu ze zažívacího traktu, u ostatních nemocných je však falešná pozitivita testu zcela nevysvětlena.

Testování nemocných s nízkou prevalencí IA

Pouze 33 % GM pozitivních nemocných z našeho souboru spadalo do skupiny s vysokým výskytem IA (alogenní HSCT a léčba akutní leukemie). Ostatní GM pozitivní pacienti tedy patří do skupiny s nízkou prevalencí IA. Tento fakt je také jednou z příčin nízké PPV Platelia® Aspergillus testu. Jestliže PPV testu v celém souboru nemocných byla 31,5 %, u nejvíce rizikových pacientů byla výrazně vyšší (alogenní HSCT – 73 %, indukce akutní leukemie 46 %), a naopak u nejméně rizikových nemocných ještě nižší (autologní HSCT – 14 %, ostatní léčba 29 %), tab. 4.

Detekce galaktomananu a vztah k HRCT

U 30 ze 40 (75 %) GM pozitivních nemocných s IA bylo provedeno HRCT.

První pozitivita GM předcházela pozitivitu na HRCT průměrně o 2 dny (minimum –20 dní; maximum +14 dní) a velice často právě pozitivita GM byla u rizikových nemocných indikací k provedení HRCT.

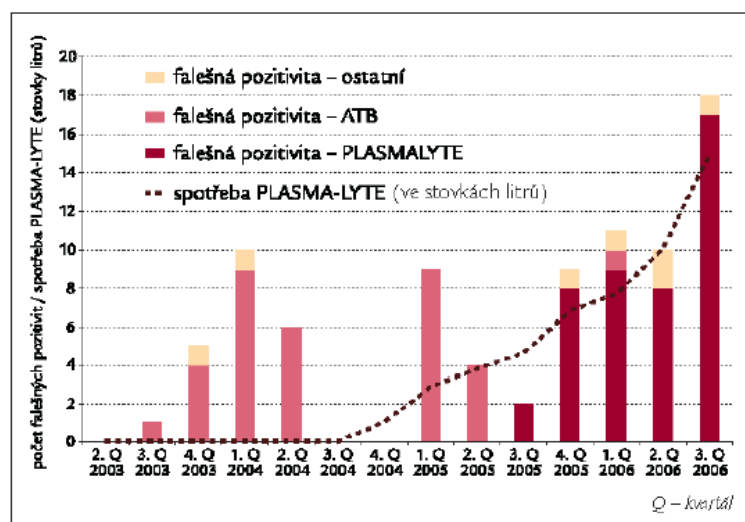
Vedle schopnosti GM předcházet pozitivitu na HRCT měla v našem souboru pozitivita GM v séru zásadní význam pro diferenciální diagnostiku abnormalit identifikovaných na HRCT. Pouze u 3 nemocných (10 %) byl obraz na HRCT považován za „charakteristický“ pro angioinvazivní formu mykózy (air crescent nebo halo). U zbývajících 27 pacientů (90 %) byl nález na HRCT nespecifický, a právě současná pozitivita GM v séru umožnila označit tyto nálezy za abnorma-

lity vyvolané invazivní aspergilovou infekcí (tab. 5).

Diskuse

Správná a časná diagnostika invazivní aspergilózy, nejčastější invazivní mykózy hematologických nemocných současné doby, je velice obtížná. Konvenční diagnostika je málo senzitivní a dává opožděný výsledek. Nežádka je diagnóza stanovena až post mortem [18].

V posledních letech došlo ke 2 zásadním pokrokům v diagnostice této život ohrožující infekce – rutinnímu používání HRCT a zavedení detekce antigenu buněčné stěny aspergilů (galaktomananu) pomocí Platelia® Aspergillus testu.



Graf 2. Počet a časování výskytu falešných pozitivit Platelia® Aspergillus testu dle jednotlivých příčin.

V literatuře existuje několik prací poukazujících na velmi dobrou senzitivitu a časnost pozitivitu galaktomananu (GM) v séru ve skupině hematologických nemocných, je-li používán jako cut-off indexu pozitivitu (IP) 0,5 a odběry krve jsou prováděny 2–3krát týdně [14,19].

Cílem námi předkládané práce bylo zhodnocení využitelnosti detekce GM v séru pro diagnózu invazivní aspergilózy v běžné rutinní praxi na hematologickém oddělení. Velikostí souboru s více jak 11 000 odběry od 900 nemocnými je tato práce podle našich znalostí největší dosud publikovanou na toto téma.

Při hodnocení výsledků jsme vycházeli z klinických kritérií pravděpodobnosti invazivní aspergilózy, a nikoliv z velice často používaných EORTC/MSG kritérií [16], která jsou doporučována jako referenční pro klinické studie. Bohužel však většinou neodpovídají běžné rutinní praxi. Ve stanovení diagnózy prokázané IA se EORTC/MSG a námi použitá klinická kritéria neliší, rozdílné však bylo hodnocení pravděpodobné IA. Pacienti označení v našem souboru za nemocné s pravděpodobnou IA nemuseli vždy splňovat kritéria EORTC/MSG. Tento přístup k hodnocení, přestože může být určitým limitem naší analýzy, však daleko více odpovídá běžné klinické praxi.

Výsledek naší studie prokázal vysokou senzitivitu testu pro diagnostiku IA u hematologických nemocných a zachytil 40 ze 42 případů IA (senzitivita 95 %). U jednoho z GM negativních nemocných z našeho souboru vznikla IA při profylaktickém podávání vorikonazolu – u pacientů léčených antimykotiky s efektem na kmeny aspergilů mohou být vzhledem k nižší mykotické náloži hodnoty GM v séru hraniční [19]. Předpokládáme, že právě tento jev byl příčinou pouze jednorázové a nikoliv již opakované positivity GM v séru u našeho pacienta, který tak musel být označen za GM negativního (díky zvolenému kritériu 2 pozitivních konsekutivních vzorků séra).

Dalším velkým přínosem testu, který vyplynul z naší analýzy, je jeho velmi vysoká negativní prediktivní hodnota. S pravděpodobností 99,7 % dokázal při negativitě test vyloučit přítomnost IA. V klinické praxi je právě schopnost s vysokou pravděpodobností vyloučit IA u rizikových skupin nemocných velmi přínosná a umožňuje zacílit diagnostické a léčebné postupy dalšími směry.

Naše analýza také prokázala velký význam kombinace detekce GM a včasné provedení HRCT plic u nemocných v riziku IA. Pozitivita GM v séru sice v průměru předcházela pozitivitu HRCT plic o 2 dny a byla ve většině případů signálem k provedení HRCT, na druhou stranu u 9 nemocných (30 %) naopak abnormalita na HRCT předcházela pozitivitu GM v séru. Kombinace obou metod tedy umožní rozšířit počet pacientů, u kterých bude diagnóza IA stanovena časně.

Jednou z nejdůležitějších výhod kombinace obou dvou zmíněných metod je však možnost pomocí GM odlišit etiologii infiltrátů na HRCT plic. V našem souboru pouze 10 % pacientů mělo na HRCT obraz „specifický“ pro IA. Ve všech ostatních případech to byla právě pozitivita GM v séru, která etiologii nespecifických plicních nálezů odlišila, respektive umožnila stanovit diagnózu IA (tab. 5).

Slabým místem detekce GM v séru je podle našich zkušeností velmi nízká pozitivní prediktivní hodnota (PPV) – tedy pravděpodobnost, že pozitivní výsledek testu bude odpovídat přítomnosti invazivní aspergilózy. Při PPV 31,5 % tedy téměř 70 % pozitivit Platelia® Aspergillus testu nebylo způsobeno IA.

PPV každého testu závisí na prevalenci hodnoceného onemocnění ve sledované populaci [20]. A právě vysoké zastoupení pacientů s nízkým rizikem IA v našem souboru (2/3 GM pozitivních pacientů představovali nemocní s nízkou pravděpodobností IA) je jedním z důležitých faktorů,

kteří vedl k tak nízké PPV. Zacílení pravidelného screeningu GM pouze na nemocné s nejvyšším rizikem IA (alogenní HSCT, indukční a reindukční léčba AML) pak jednoznačně zvýší přínosnost testu, respektive zvýší jeho PPV. PPV testu ve skupině nemocných po alogenní HSCT v našem souboru byla 73 % (tab. 4).

Hlavní příčinou tak nízké PPV Platelia® Aspergillus testu však bylo vysoké procento falešně pozitivních výsledků.

Izolované falešné positivity testu (způsobené především kontaminací vzorku aspergilovými, ev. penicilinovými vlákny při odběru nebo zpracování vzorku) lze eliminovat opakováním odběru a vyžadováním konsekutivní positivity pro to, aby byl nemocný označen jako GM pozitivní. Velký problém představují opakované falešné positivity, které lze u rizikových nemocných často jen velmi obtížně odlišit od pozitivit skutečných.

Podobně jako je popisováno v literatuře, i v našem souboru bylo jednou z hlavních příčin podávání některých penicilinových antibiotik. 39 % všech falešných pozitivit testu v našem souboru bylo způsobeno podáváním těchto antibiotik. Penicilinová antibiotika (piperacilin/tazobaktam, amoxicilin/klavulanát a ampicilin) jsou vyráběna semisynteticky s pomocí *Penicillium sp.* GM ze stěn penicilí následně kontaminuje vlastní výrobek a vede k falešné pozitivitě Platelia® Aspergillus testu při vyšetřování séra nemocných léčených zmíněnými preparáty [8]. Množství kontaminujícího GM je v jednotlivých šaržích antibiotik různé. Proto řešením, které vedlo k eliminaci falešných pozitivit způsobených podáváním penicilinových antibiotik na našem pracovišti, bylo:

- a) ukončení podávání ampicilinu;
- b) náhrada amoxicilin/klavulanátu za GM negativní přípravek od jiného výrobce;
- c) pravidelné měření množství GM ve všech nových šaržích piperacilin/tazobaktamu určených pro naše pra-

coviště a použití pouze šarží „GM negativních“ (IP < 0,5), nejlépe již v koncentrované podobě antibiotika, ev. pokud není jiná volba, ale po naředění na obvyklou plazmatickou koncentraci léku (tab. 3 a graf 2).

Nově byl identifikován jako zdroj falešné positivity Platelia® Aspergillus testu infuzní roztok Plasma-Lyte (Baxter, USA) [21–23]. Tento infuzní roztok obsahuje kalcium glukonát, který je vyráběn fermentací na kmenech aspergilů, a GM pak opět kontaminuje finální výrobek. Index positivity při testování jednotlivých šarží přípravku v Platelia® Aspergillus testu je obvykle vysoký [22]. Spotřeba infuzního roztoku Plasma-Lyte na našem pracovišti od konce roku 2004 velmi prudce stoupala a s navyšující se spotřebou následně koreloval i prudký vzestup počtu falešných pozitivit při detekci GM v séru u nemocných hydratovaných tímto roztokem. 68,5 % případů všech falešných pozitivit v našem souboru bylo způsobeno podáváním výše zmíněného roztoku. Falešné positivity při detekci GM v séru způsobené podáváním roztoku Plasma-Lyte lze velice snadno eliminovat vyloučením používání Plasma-Lyte k hydrataci u hematologických nemocných s předpokladem vyšetřování GM v séru.

Pokud bychom vyloučili z analýzy falešné positivity při detekci GM způsobené podáváním penicilinových antibiotik a roztoku Plasma-Lyte (neboť obě příčiny jsou pomocí výše zmíněných opatření eliminovatelné), počet GM falešně pozitivních pacientů by klesl z 87 na 8 a pozitivní prediktivní hodnota testu (PPV) by stoupla z 31,5 % na 83,3 %.

Závěr

Výsledky naší práce představují největší dosud publikovanou analýzu sledující význam detekce GM u hematologických nemocných pomocí sandwichové ELISy (Platelia® Asper-

gillus, Bio-Rad, Francie) v diagnostice invazivní aspergilové infekce. Prokázali jsme její excelentní senzitivitu a negativní prediktivní hodnotu stejně tak jako velký význam její kombinace s HRCT plic. V běžné klinické praxi je však nutno myslet na možnost falešně pozitivních výsledků a tak omezenou pozitivní prediktivní hodnotu testu. Znalost a eliminace dvou hlavních příčin těchto falešných pozitivit – podávání některých penicilinových antibiotik a aplikace infuzního roztoku Plasma-Lyte – však umožňuje tyto falešné positivity testu významnou měrou minimalizovat.

Poděkování

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR8452-3/2005 a VZ MSM6198959223.

Literatura

- Pagano L, Caira M, Candoni A et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068–1075.
- Fukuda T, Boeckh M, Carter RA et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after non-myeloablative conditioning. *Blood* 2003; 102: 827–833.
- Subira M, Martino R, Franquet T et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies: survival and prognostic factors. *Haematologica* 2002; 87: 528–534.
- Mayer J. Nahradí transplantace periferních kmenových buněk krevetorby definitivně transplantace kostní dřeně? *Vnitř Lék* 2000; 46: 785–793.
- Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358–366.
- von Eiff M, Roos N, Schulten R et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995; 62: 341–347.
- Brodofel H, Vogel M, Hebart H et al. Long-term CT follow-up in 40 non-HIV immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis: kinetics of CT morphology and correlation with clinical findings and outcome. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 404–413.

8. Aquino VR, Coldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 2007; 163: 191–202.

9. Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B et al. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék* 2007; 53: 645–654.

10. Donnelly JP. Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis: Getting Closer but Still a Ways to Go. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 487–489.

11. Maertens J, Verhaegen J, Demuyck H et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223–3228.

12. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K et al. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001; 97: 1604–1610.

13. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002; 186: 1297–1306.

14. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and hematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004; 126: 852–860.

15. Pfeiffer CD, Fine JB, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1417–1427.

16. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B 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: 7–14.

17. Subira M, Martino R, Rovira M et al. Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol* 2003; 82: 80–82.

18. Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B et al. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgrad Med* 2007; 9: 240–252.

19. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190: 641–649.

20. Loong TW. Understanding sensitivity and specificity with the right side of the brain. *BMJ* 2003; 327: 716–719.

21. Hage CA, Reynolds JM, Durkin M et al. Plasmalyte as a cause of false-positive results for Aspergillus galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 676–677.

22. Ráčil Z, Kocmanová I, Lengerová M et al. Intravenous PLASMA-LYTE as a Major Cause of False-Positive Results of Pla-

telia Aspergillus Test for Galactomannan Detection in Serum. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3141–3142.

MUDr. Zdeněk Ráčil
www.fnbrno.cz
e-mail: zracil@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 22. 8. 2007
Přijato po recenzi: 3. 10. 2007

www.csnn.eu

4. Identifikace možných příčin falešné positivity Platelia Aspergillus ELISA testu

Klinicky závažným problémem testu jsou falešné positivity, které přetrvávají i v opakovaných odběrech a imitují skutečnou infekci. Odlišení falešné a skutečné positivity je především u vysoce rizikových nemocných, kde lze infekci vzhledem k imunodeficitu očekávat, velmi obtížné. Pro klinika je tedy nezbytná dobrá znalost možných příčin falešné positivity testu, jednak kvůli správné interpretaci výsledku, ale především pro nutnost v maximální míře tyto faktory u pravidelně monitorovaných nemocných eliminovat. Nejčastější příčiny falešné positivity Platelia Aspergillus testu jsou zmíněny v následujícím textu ^(18, 21, 26, 37, 38).

4.1. Intravenózní podání penicilinových antibiotik

Aplikace penicilinových antibiotik – piperacillinu, piperacillinu/tazobactamu, některých co-amoxicillinů a ampicillinu – je jedním z nejčastějších příčin falešné positivity při detekci galaktomannanu ⁽³⁹⁻⁴²⁾. Důvodem je pravděpodobně kontaminace antibiotických preparátů zmíněným polysacharidem při jejich semisyntetické výrobě. Při tomto procesu se totiž využívá fermentačních schopností hub (zejm. penicilií) a galaktomannan z jejich buněčných stěn se pravděpodobně může dostat do finálního výrobku ⁽¹⁸⁾. Dlužno říci, že přítomnost polysacharidu nemůže nijak ohrozit pacienta, jemuž je lék podáván. Množství kontaminujícího galaktomannanu je různé nejen pro jednotlivé druhy antibiotik, ale i u stejného preparátu se hodnoty různí mezi jednotlivými šaržemi. Proto také intenzita falešné positivity (tj. IP séra nemocných) při podávání těchto preparátů kolísá ⁽⁴³⁾, což potvrdila i práce z našeho pracoviště ⁽⁶⁾. Vzhledem k odlišné kinetice kontaminujícího polysacharidu a kinetice vlastního antibiotika, dochází při podávání léku ke kumulaci galaktomannanu a tak i k nárůstu měřeného IP v séru nemocných ⁽⁴⁴⁾. Navíc po ukončení podávání antibiotika může falešná pozitivita testu vzhledem k pomalejší eliminaci polysacharidu přetrvávat až 6 dnů ⁽⁴⁵⁾.

Eliminace falešných pozitivit způsobených podáváním výše zmíněných preparátů je složitá. Ideální je jejich vyloučení z terapie u nemocných, u kterých probíhá monitoring galaktomannanu, což je možné u ampicillinu a co-amoxicillinu, ale velmi obtížné u piperacillinu/tazobactamu. V těchto případech je pak doporučován odběr vzorku séra těsně před podáním další dávky antibiotika, čili v okamžiku, kdy by měla být koncentrace kontaminujícího galaktomannanu nejnižší ⁽⁴⁶⁾. Nicméně vzhledem ke zmíněné kumulaci polysacharidu lze tohoto mechanismu využít pouze v prvních dvou dnech podávání léku ⁽⁴⁴⁾. Podle našich zkušeností lze minimalizovat falešné positivity při podávání piperacillinu/tazobactamu testováním jednotlivých šarží a používáním pouze šarží galaktomannan negativních. K velmi podobným názorům pak dochází také Bart-Delabesse et al. ⁽⁴²⁾.

Celá řada dalších antibiotik (cefalosporiny, chinolony, vankomycin, aminoglykosidy, karbapenemy) je „galaktomannan – negativní“ a jejich podávání nemocným nevedlo k falešným pozitivitám Platelia Aspergillus testu ^(44, 46).

4.2. Aplikace roztoku Plasma-Lyte

Hage et al. publikoval falešnou pozitivitu při detekci galaktomannanu z tekutiny získané bronchoalveolární laváží (BAL) při současném použití infuzního roztoku Plasma-Lyte (Baxter) jako lavážní tekutiny ⁽⁴⁷⁾. Vysoký index positivity byl zjištěn také při testování jednotlivých šarží roztoku. Příčinou falešné positivity je opět pravděpodobně kontaminující galaktomannan, který se do roztoku dostává při výrobě – Plasma-Lyte totiž obsahuje kalcium glukonát, který se vyrábí fermentací pomocí kmenů aspergilů. Autoři však nepředpokládali, že by při podání roztoku intravenózně (což je ale jeho hlavní použití) po distribuci v cirkulaci mohlo množství kontaminujícího galaktomannanu způsobit falešnou pozitivitu.

Na pracovišti autora této práce však proběhly in vitro a in vivo analýzy, stejně tak jako retrospektivní přehodnocení všech nemocných, kterým byl infuzní roztok podáván. Analýza identifikovala Plasma-Lyte podávaný intravenózně jako hlavní příčinu falešné positivity testu na pracovišti. Tento prioritní nález byl publikován jako původní práce v Journal of Clinical

Microbiology (**Racil, Z., Kocmanova, I., Langerova, M., Wintrova, J., Mayer, J.: Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia Aspergillus test for Galactomannan detection in serum. Journal of Clinical Microbiology, 45, 2007, 9: 3141–3142**), která je přílohou této kapitoly. Odstranění této příčiny falešných pozitivit testu je jednoduché – používání jiných infuzních roztoků pro hydrataci nemocných, u kterých probíhá rutinní skrining galaktomannanu.

4.3. Průnik antigenu z gastrointestinálního traktu

Přítomnost galaktomannanu byla prokázána v celé řadě potravin a nápojů a je také běžně nalézán v lidské stolici ⁽⁴⁸⁾. Menší molekuly polysacharidu by tedy teoreticky mohly ze střeva přecházet do cirkulace při narušení integrity střevní mukózy. Právě průchod polysacharidů, obsažených ve stěně bakterií *Bifidobacterium* spp. (zkříženě reagující s protilátkou EB-A2), ze zažívacího traktu přes nezralou mukózu, je jednou z hlavních příčin falešné positivity Platelia Aspergillus kitu u předčasně narozených dětí ⁽⁴⁹⁾.

Předpokládalo se, že tento mechanismus by mohl být příčinou falešné positivity Platelia Aspergillus testu u nemocných s mukozitidou a současně alespoň částečně zachovaným perorálním příjmem stravy ⁽⁵⁰⁾. V klinické praxi se však s touto situací u onkologických nemocných příliš často nesetkáváme. Na pracovišti autora byla proto provedena rozsáhlá studie, která analyzovala reaktivitu s Platelia Aspergillus testem ve stolici a současně v plazmě nemocných v různých stádiích mukozitidy. Výsledky byly publikovány jako původní práce v European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease (**Racil, Z., Kocmanova, I., Weinbergerova, B., Toskova, M., Winterova, J., Lengerova, M., Buresova, L., Timilsina, S. & Mayer, J. Mucositis does not lead to false-positivity of the Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 29, 2010, 7: 851-855**). Práce jasně prokázala, že i přes přítomnost velkého množství antigenů ve stolici (silně reagujících s testem) u nemocných s totální parenterální výživou, tyto antigeny neprocházejí přes poškozenou mukózu do cirkulace. Toto je důležité zjištění

zejména pro pacienty po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně, protože pokud pozitivita testu nemůže být způsobena mukozitidou je nutné počítat s možností pravděpodobné invazivní mykózy.

Ostatní příčiny falešné positivity testu

Ostatní příčiny falešné positivity testu jsou již velmi raritní. Může jít o infekce jinými mykotickými patogeny, které v testu zkříženě reagují (*Penicillium sp.* a *Cryptococcus neoformans*)^(51, 52). Spíše ve formě kasuistik jsou popsány falešné positivity testu při autoimunitních stavech a přítomnosti paraproteinu, při dialýze, při použití cyklofosfamidu a při kontaminaci vzorku vatou⁽⁵³⁻⁵⁶⁾.

4.4. Přílohy ke kapitole

- 4.4.1. Racil, Z., Kocmanova, I., Langerova, M., Wintrova, J., Mayer, J.: Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia Aspergillus test for Galactomannan detection in serum. Journal of Clinical Microbiology, 45, 2007, 9: 3141-3142**

Fast-Track Communication

Intravenous PLASMA-LYTE as a Major Cause of False-Positive Results of Platelia *Aspergillus* Test for Galactomannan Detection in Serum[▽]

Received 10 May 2007/Returned for modification 17 July 2007/Accepted 20 July 2007

Galactomannan (GM) detection by the Platelia *Aspergillus* (PA) enzyme immunoassay (Bio-Rad, France) is a test widely used for the early diagnosis of invasive aspergillosis (IA) in hematological patients. False-positive results for this test were reported by several authors, associated mainly with the use of the beta-lactam antibiotics piperacillin-tazobactam and amoxicillin-clavulanic acid (1, 4). Recently, the intravenous hydration fluid PLASMA-LYTE (Baxter) was identified as the cause of false-positive results with the PA test when it was used for bronchoalveolar lavage (3). However, regarding the serum concentration following intravenous administration, the authors speculated that it would be below the detection limit of the PA assay (due to dilution in the intravascular compartment).

The PA test has been used in our department since May 2003 for regular screening (twice a week) of patients with hematological malignancy who are at risk for IA. Between January 2005 and March 2007, a total of 1,137 patients were tested with the PA assay, and 172 of them had more than two positive blood samples (optical density index above 0.5 within 7 days). Fifty-five (32%) positive patients had proven or probable IA, according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group criteria (2). For 117 (68%) patients, the test results were finally assessed as false positives. A gradual increase in the number of false-positive results among patients tested for GM in sera was observed during the year 2006 and at the beginning of 2007. False positivity due to the use of beta-lactam antibiotics was excluded, as all batches of piperacillin-tazobactam and amoxicillin-clavulanic acid used at our department have been tested for the presence of GM since July 2005. Only negative batches (PA assay optical density index of <0.5) were administered to our patients.

After the report about the possible influence of PLASMA-LYTE on PA assay results had been published, we tested the four different batches of PLASMA-LYTE solution available at our institution. All of these were highly GM positive, with a mean optical density index of 7.73 (range, 7.15 to 8.53).

Therefore, we decided to perform a study with healthy volun-

teers to confirm our hypothesis that the intravenous administration of PLASMA-LYTE can also lead to false-positive results with the PA assay when serum is tested. Four lots (1,000 ml each) from two different batches were given to four healthy volunteers in 1-h infusions. Blood samples for GM detection using the PA test were obtained by separate venipunctures before administration, then immediately after the end of infusion, and then after 5, 7, 10, 24, and 34 h. In all healthy subjects, PLASMA-LYTE administration led to positive PA assay results that persisted for 24 h after infusion (Table 1).

The validation of PLASMA-LYTE as the cause of false positivity in healthy volunteers made us reevaluate the clinical and medical histories of all patients with false-positive results with the PA test in order to trace the possible source of GM contamination. When we focused on PLASMA-LYTE, which has been used in our hematological department since October 2004, we found that the administration of this solution could account for 80% of false-positive results with the PA test for our patients tested between January 2005 and March 2007 and, more precisely, 90% of those for patients given only negative batches of beta-lactam antibiotics (July 2005 to March 2007). Moreover, an increase in the number of false-positive results correlated well with the increased consumption of the PLASMA-LYTE solution. Data concerning false and true PA test positivity, the cause of false positivity, and PLASMA-LYTE consumption are summarized in Fig. 1.

To the best of our knowledge, this is the first report of false-positive results with the PA test, using PLASMA-LYTE as an intravenous hydration and testing the serum used. PLASMA-LYTE solution has been retrospectively identified as the most probable cause of a false-positive result with the PA assay in over 80% of samples from patients without clinical evidence of invasive aspergillosis. This observation has also been confirmed with healthy volunteers. Our findings are very important for routine practice, and such information could avoid the unnecessary pre-emptive use of mold-active antifungal drugs.

This work was supported by a research grant from the Ministry of Health, Czech Republic, IGA NR 8452-3/2005, and partly by CELL, the Czech Leukemia Study Group for Life.

TABLE 1. Results of the Platelia *Aspergillus* test after PLASMA-LYTE infusion in healthy volunteers

Samples used	Optical density index		
	Mean	Min	Max
PLASMA-LYTE lots	7.78	7.67	7.88
Blood sampled before infusion	0.11	0.09	0.13
Blood sampled after infusion (h)			
0	2.74	2.52	3.1
5	1.52	1.04	1.81
7	1.37	0.84	1.71
10	0.92	0.56	1.06
24	0.53	0.28	0.66
34	0.40	0.18	0.57

REFERENCES

1. Adam, O., A. Anperin, F. Wilquin, J. H. Bourhis, B. Gachot, and E. Chachaty. 2004. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin. Infect. Dis.* 38:917–920.
2. Ascioglu, S., J. H. Rex, B. de Pauw, J. E. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D. W. Denning, J. P. Donnelly, J. E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J. F. Meis, T. F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P. M. Shah, D. A. Stevens, and T. J. Walsh. 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis.* 34:7–14.
3. Hage, C. A., J. M. Reynolds, M. Durkin, L. J. Wheat, and K. S. Knox. 2007. Plasmalyte as a cause of false-positive results for *Aspergillus* galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Microbiol.* 45:676–677.
4. Viscoli, C., M. Machetti, P. Cappellano, B. Bucci, P. Bruzzi, M. T. Van Lint, and A. Bacigalupo. 2004. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin. Infect. Dis.* 38:913–916.

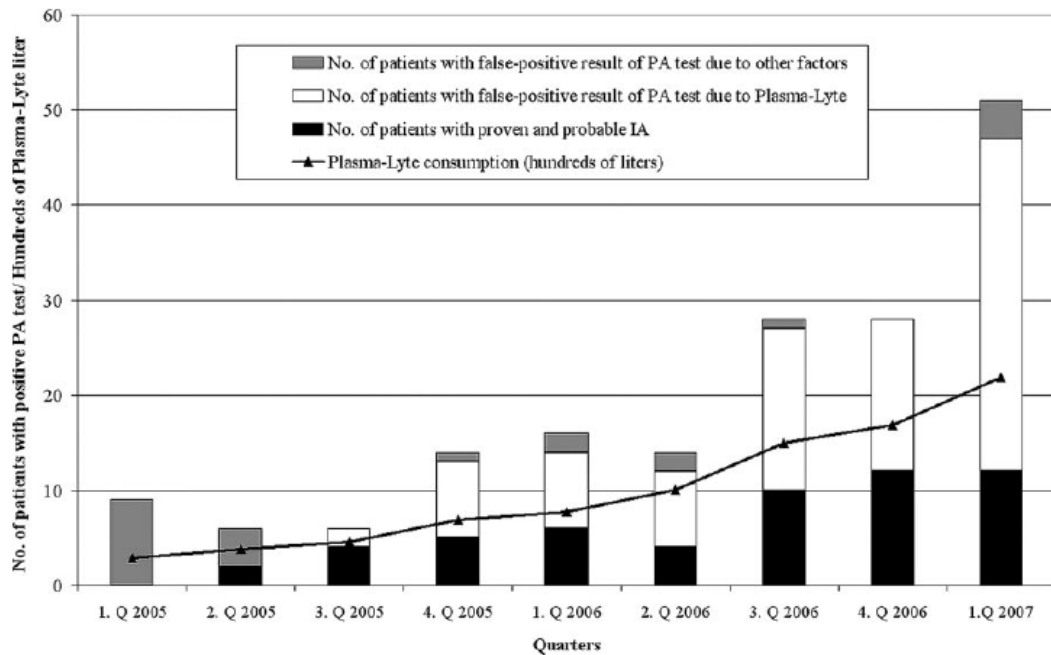


FIG. 1. Number of patients who tested positive with the Platelia *Aspergillus* test (column depth) and the cause of positivity in relation to PLASMA-LYTE consumption. Q, quarter.

Zdenek Racil
 Department of Internal Medicine-Hemato-Oncology
 University Hospital
 Brno 625 00
 Czech Republic

Iva Kocmanova
 Department of Microbiology
 University Hospital
 Brno 625 00
 Czech Republic

Martina Lengerova
 Center of Molecular Biology and Gene Therapy
 Department of Internal Medicine-Hemato-Oncology
 University Hospital
 Brno 625 00
 Czech Republic

Jana Winterova
 Department of Internal Medicine-Hemato-Oncology
 University Hospital
 Brno 625 00
 Czech Republic

Jiri Mayer*
 Department of Internal Medicine-Hemato-Oncology
 University Hospital
 Brno 625 00
 Czech Republic

*Phone: 420532233642
 Fax: 420532233603
 E-mail: jmayer@fnbrno.cz

† Published ahead of print on 1 August 2007.

- 4.4.2. Racil, Z., Kocmanova, I., Weinbergerova, B., Toskova, M., Winterova, J., Lengerova, M., Buresova, L., Timilsina, S. & Mayer, J. Mucositis does not lead to false-positivity of the Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 29, 2010, 7: 851-855**

Mucositis does not lead to false-positivity of the *Platelia Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay

Z. Racil · I. Kocmanova · B. Weinbergerova ·
M. Toskova · J. Winterova · M. Lengerova ·
L. Buresova · S. Timilsina · J. Mayer

Received: 10 November 2009 / Accepted: 3 April 2010 / Published online: 30 April 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract We are reporting a study evaluating the crossover of antigens reacting in *Platelia Aspergillus* (PA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from faeces to vessels during mucositis as a possible cause of false-positivity of this test. In our series of 102 episodes of different grades of mucositis, we found strong reactivity of faeces in the PA ELISA test irrespective of the grade of mucositis, the percentage of oral food intake or the presence of total parenteral nutrition. However, none of the patients included in the study were positive in the serum (when the criterion of two samples with cut-off index of positivity [IP]>0.5 was used).

Introduction

The detection of the circulating galactomannan (GM) antigen is of high importance in the early diagnosis of invasive

aspergillosis (IA) in patients with a haematological malignancy. Its regular monitoring in the serum using *Platelia Aspergillus* (PA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test (BioRad, France) is standard in most haematooncological units. A meta-analysis noted the test's sensitivity of 79%, specificity 86% and overall accuracy of 89% [1]. However, false-positive results are one of the major limits of this assay. During recent years, two major factors contributing to this false-positivity of GM ELISA test were well defined—the administration of some antimicrobials (piperacillin/tazobactam, amoxicillin and ampicillin) and Plasma-Lyte solution (Baxter). These represent >90% of GM false-positive results in some centres [2, 3]. Mucositis and the passage of dietary GM or exoantigens from bacteria or fungi into the blood circulation via mucosal lesions of the gastrointestinal tract has been hypothesised by some investigators to be another source of false-positivity of the test [4, 5]. However, till now, there have not been any studies evaluating this theory. We, therefore, conducted a study to evaluate the clinical relevance of mucositis and its severity, as well as the amount of oral intake during the period of mucositis, to GM ELISA test performance in patients with a haematological malignancy.

Z. Racil (✉) · B. Weinbergerova · M. Toskova · J. Winterova ·
M. Lengerova · J. Mayer
Department of Internal Medicine Hemato-Oncology,
Masaryk University and University Hospital Brno,
Jihlavská 20,
625 00 Brno, Czech Republic
e-mail: zracil@fnbrno.cz

I. Kocmanova
Department of Microbiology, University Hospital Brno,
Brno, Czech Republic

L. Buresova
Institute of Biostatistics and Analyses,
Faculty of Medicine and the Faculty of Science,
Masaryk University,
Brno, Czech Republic

S. Timilsina
Medical Faculty, Masaryk University,
Brno, Czech Republic

Patients and methods

Between December 2007 and August 2009, 75 patients treated with chemotherapy with the risk of mucositis occurrence were enrolled in our study. All patients signed their written informed consent for inclusion in the study. Any time during the episode of a certain degree of mucositis, two consecutive blood samples and one stool sample for GM detection were obtained within a 24-h interval in patients with different grades of mucositis. A patient could be included in the study several times if the grade of mucositis

progressed. The severity of oral mucositis was scored according to the World Health Organization (WHO) scale [6] and for the grading of intestinal mucositis the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) Version 3.0 scale for non-infectious diarrhoea was used [7].

At the time of sampling, none of the included patients had signs of IA (according to the European Organization for Research and the Treatment of Cancer/Mycosis Study Group) [8] or any other invasive fungal disease and had prophylaxis or empirical treatment with a mould-active drug. All patients received oral or intravenous co-trimoxazole as *Pneumocystis jiroveci* prophylaxis and 97% of patients had anti-fungal prophylaxis with fluconazole at the time of sampling. Antibiotics used for the empirical treatment of febrile neutropaenia (if present) consisted of: piperacillin/tazobactam (only GM-negative batches were used for treating our patients), cefepime, amikacin and meropenem. The percentage of standard oral food intake (regularly monitored by nursing staff) and the presence of total parenteral nutrition at the time of sampling were collected.

PA ELISA kit was used for GM detection. Analysis of serum samples was performed according to the manufacturer's recommendation. For the analysis of stool samples, 1 g of faeces was disintegrated in 1 ml of distilled water and then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. If there was diarrhoea, 2 ml of faecal material were directly centrifuged. After centrifugation, 300 µl of supernatant was tested in the PA ELISA test. Reactivity of the assay was expressed as an index of positivity (IP) per stool sample. Faecal specimens were tested within 48 h after collection and were stored at 2–8°C until the time of analysis.

Results

Two hundred and four blood and 102 stool samples obtained in 102 episodes of mucositis in 75 patients (1.4 episode per patient) with different haematological malignancies were analysed for GM presence (blood samples) and PA ELISA reactivity (stool samples), respectively. Baseline haematological disease, as well as anti-cancer treatment are shown in Table 1.

Stool samples were highly reactive in the PA ELISA assay, with a median IP of 3.52 (range 0.07–14.4). The reactivity of faeces in the PA ELISA assay was not significantly influenced by the mucositis grade, percentage of standard daily oral intake or the presence of total parenteral nutrition (Table 2, Fig. 1). The difference between the median reactivity of faecal samples obtained during different grades of mucositis in the PA ELISA assay was not statistically significant ($p=0.416$; Kruskal–Wallis analysis of variance [ANOVA]). The medians of IPs of stool samples obtained during episodes with various percen-

Table 1 Demographic data

	No. (%) [range]
No. of patients	75
Male/female	39 (52%)/36 (48%)
Median age (years)	56 [20–71]
Baseline disease	
Acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome	11 (15%)
Acute lymphoblastic leukemia	14 (19%)
Multiple myeloma	22 (29%)
Non-Hodgkin's lymphoma	19 (25%)
Hodgkin's lymphoma	5 (7%)
Other	4 (5%)
Type of anti-cancer treatment	
Allogeneic HSCT	11 (15%)
Related/unrelated	6 (7%)/5 (8%)
Myeloablative/non-myeloablative conditioning	8 (11%)/3 (4%)
Autologous HSCT	38 (51%)
Induction/re-induction chemotherapy of acute leukemia/myelodysplastic syndrome	5 (7%)
Consolidation chemotherapy of acute leukemia	8 (10%)
Convention chemotherapy of lymphoma	10 (13%)
Other	3 (4%)
No. of monitored episodes of mucositis	102
Oral mucositis	21 (21%)
Intestinal mucositis	42 (41%)
Oral and intestinal mucositis	39 (38%)

HSCT = haematopoietic stem cell transplantation

tages of standard daily food intake were not different: 100% to 75% of daily amount, median IP 3.52; 74% to 50%, 4.53; 49% to 25%, 4.47; 24% to 0%, 3.02 ($p=0.666$; Kruskal–Wallis ANOVA). Finally, the median IP in faeces from episodes with total parenteral nutrition were slightly lower compared to other samples, but this was not statistically significant (2.15 vs. 3.98; $p=0.090$; Mann–Whitney).

In contrast, GM levels in serum samples were independent of GM in faeces and grade of mucositis (Table 1). The median GM IP in serum samples was 0.11 (range 0.04–2.48). When criterion for the test positivity of one sample with IP > 0.5 was used, only one patient (moreover, without mucositis) would be marked as GM-positive. However, a consecutive sample from the same patient had GM IP < 0.5 and using common clinical criterion for PA ELISA test positivity (two samples with IP > 0.5), the patient was identified as GM-negative.

Discussion

In the presented study, we have found no false-positive results of the PA ELISA test (defined as GM IP > 0.5 in two

Table 2 Median and 25–75% interquartile range of *Platelia Aspergillus* (PA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay index of positivity (IP) in the serum and stool samples, percentage of daily oral intake and percentage of patients with total parenteral nutrition

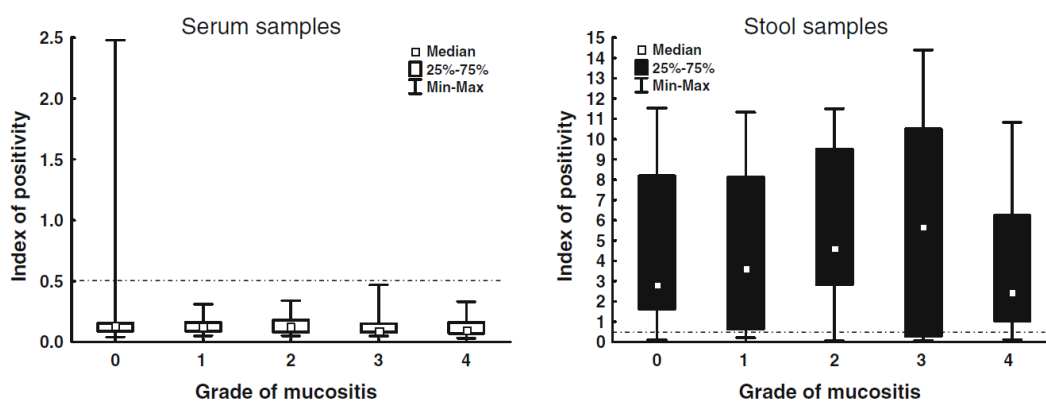
Grade of mucositis (no. of tested episodes)	Median IP (25–75% interquartile range): serum samples	No. of episodes with single/consecutive IP>0.5 in serum samples (positive result)	Median IP (25–75% interquartile range): stool samples	Median % of standard daily oral intake	% of patients with total parenteral nutrition
0 (<i>n</i> =22)	0.13 (0.09–0.16)	1/0	2.80 (1.62–8.19)	100	0%
1 (<i>n</i> =19)	0.13 (0.09–0.16)	0/0	3.59 (0.64–8.12)	90	0%
2 (<i>n</i> =22)	0.12 (0.08–0.18)	0/0	4.61 (2.83–9.51)	50	0%
3 (<i>n</i> =19)	0.09 (0.08–0.15)	0/0	5.69 (0.28–10.5)	10	16%
4 (<i>n</i> =20)	0.10 (0.07–0.16)	0/0	2.42 (1.04–6.24)	0	100%

IP = index of positivity

consecutive serum samples) in 75 patients with haematological malignancies during 102 episodes of different grades of mucositis. However, 102 matched stool samples obtained in the same period revealed strong reactivity of faeces in this assay with a median IP of 3.5. This intensive reactivity of faeces was not influenced by the grade of mucositis, daily oral food intake amount or nourishment with total parenteral nutrition. Thus, our study did not confirm the possibility of crossover of these faecal antigens during a period of mucositis to the serum and their influence on the outcome of the assay reaction when testing these serum samples.

The specificity of the PA ELISA test for the early diagnosis of IA is hampered by the occurrence of false-positive results. Although a majority of these events could be explained by the administration of penicillin antimicrobials or gluconate containing electrolyte solutions, till now, almost every review of the literature concerning GM detection also reports mucositis and passage of the antigen through damaged mucosa as a possible source of the false-positivity of the assay.

However, there have been only very limited data published so far concerning and supporting this hypothesis. Ansorg et al. studied the presence of GM antigen using a latex agglutination (LA) test in foods and faeces and found 79% of hospital meals and all faeces samples from haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients and healthy volunteers to be reactive in this GM LA assay [4]. The authors assume that, during the period of mucosal damage, these faecal antigens obtained from food could cross through mucosal lesions and, henceforth, cause test positivity. Mennink-Kersten et al. hypothesised that the false-positivity of the PA ELISA assay in premature neonates with immature intestinal mucosa might be due to the presence of a lipoteichoic acid of *Bifidobacterium* spp. colonising the neonatal gut [9]. Tested neonatal faeces strongly reacted with the PA ELISA assay [10]. Since bifidobacteria or their components could pass across the damaged mucosa, they can hypothetically also be the cause of false-positive reactivity in immunocompromised patients with mucositis [10]. However, clinical studies confirming

**Fig. 1** Median, 25–75% interquartile range, minimal and maximal index of positivity (IP) of *Platelia Aspergillus* (PA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serum and stool samples during

different grades of mucositis according to the World Health Organization (WHO) and National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) scales

the hypothesis and laboratory findings of these two authors have not been performed till now.

Herbrecht et al. found a lower positive predictive value (PPV) of the PA ELISA test caused by a high frequency of false-positive results in the group of adult patients after allogeneic HSCT (42.9%). According to their previous findings with high amounts of GM in the foods supplied to children with positive tests, the same hypothesised mechanism could be the explanation for the false-positivity of the assay during the first month after allogeneic HSCT when mucosal damage is frequent [5]. However, other investigators have failed to prove this theory [11].

Finally, Blijlevens et al. found no false-positivity of the PA ELISA assay in their study of patients after HSCT during the period of severe mucositis if they were fed exclusively by total parenteral nutrition. However, they disclosed that, if the damaged digestive tract is exposed to food containing GM, the translocation of the antigen can potentially occur, but no study has been done on this field [12].

To our knowledge, this is the first study analysing faeces (as a major part of gut compartment) and blood for PA ELISA reactivity in explicitly defined stages of mucositis in haematological patients. In accordance with Ansorg et al., a vast majority of stool samples from our patient group were found to be strongly reactive in the PA ELISA test. The reason for this positivity could be antigens of food origin, as Ansorg et al. described. However, because the stool samples were also strongly reactive in patients with total parenteral nutrition, there must be other sources of GM or antigens reacting with the assay (e.g. bifidobacteria, but this was not analysed in our study). Blijlevens et al. mentioned the necessity of taking food consumption into account when monitoring GM in patients (especially with mucositis), because this could be a source of GM for possible mucosal translocation. However, our data showed that, if their hypothesis would be correct, GM (or other antigens reacting with the test) will cross damaged mucosal barriers also in their group of patients with total parenteral nutrition, because faeces are strongly reactive in the PA ELISA assay, irrespective of food intake.

In all accounts, our study showed that there is no crossover of GM or other antigens reacting with the PA ELISA assay from strongly reactive stool to the serum through differently damaged mucosa and the previous hypothesis of other authors [4, 10, 12] were not confirmed. If this antigen cross would have happened, it would have been very occasional, because in 58 serum samples obtained in 29 episodes of severe mucositis (grade 3 and 4) in our study, none had GM IP>0.5. The only positive serum sample in our study was acquired from a patient without

mucositis and this positivity was probably caused by GM contamination of the sample, because a paired serum sample from the same day was negative in the assay (IP 0.17).

Finally, a high frequency of false-positive results of the PA ELISA assay and low PPV in Herbrecht et al.'s study is impossible to explain by the presence of mucositis. It must be known that this mentioned study was performed several years before the information about the most important reasons for false-positivity of the PA ELISA test (antibiotics and Plasma-Lyte solution) was identified. It is very likely that these factors, but not mucositis, are of a higher probability to have caused the mentioned results.

Our results could have several limitations. Firstly, patients could be included several times in the study, when their grade of mucositis changed. However, only 27 episodes occurred in patients already included in the study, and in half of them, the first sample had been obtained during the period of mucositis grade 0 or 1. Thus, this could not have influenced results from the most important group of samples obtained during severe mucositis, when the possibility of crossover of antigens from the intestinal tract to the serum would be expected. Secondly, the PA ELISA test is not validated for faecal samples and, thus, the results from stool samples must be considered as indicative. However, the main goal of our study was to show a strong reactivity of faecal samples in the PA ELISA test that is not influenced by oral food intake. Thirdly, in our study, we have not analysed the source of PA ELISA test reactivity of faeces. However, we build on the knowledge of the conclusions of Mennink-Kersten et al.'s and Ansorg et al.'s studies, which describe several reasons for this reactivity, and we have concentrated on the confirmation or exclusion of crossover of these antigens via damaged mucosa.

In summary, our study showed high reactivity of faeces (irrespective of the amount of oral food intake) in the PA ELISA assay and, for the first time, it has been confirmed that there is no or very limited crossover of GM or other antigens causing reactivity of the PA ELISA test (e.g. lipoteichoic acid of *Bifidobacterium* spp.) via the damaged mucosa in adult patients with haematological malignancy. Thus, the presence of antigens reacting with this assay in faeces during mucositis is not likely to have influenced the performance of the PA ELISA assay when serum samples are tested.

Acknowledgements Part of the study has been presented during the 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, California, September 12–15, 2009.

The Ministry of Health (IGA NS10442–3/2009 and IGA NS10441–3/2009) of the Czech Republic and the Ministry of Education, Youth and Sports (MSMT6198959223 and MSMT0021622430) of the Czech Republic supported this work.

Potential conflicts of interest All authors: no conflict.

References

1. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N (2006) Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 42(10):1417–1427
2. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaher A, Murray H, Mya-San C, Bacher J, Petraitis V (2004) Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug–antigen interaction. *J Clin Microbiol* 42(10):4744–4748
3. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J (2007) Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia *Aspergillus* test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol* 45(9):3141–3142
4. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM (1997) Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 40(9–10):353–357
5. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, Villard O, Liu KL, Natarajan-Amé S, Lutz P, Dufour P, Bergerat JP, Candolfi E (2002) *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 20(7):1898–1906
6. World Health Organization (WHO) (1979) WHO handbook for reporting results of cancer treatment. WHO, Geneva, pp 15–22
7. National Cancer Institute (2006) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0. 2006. Available online at: <http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>. Accessed 9 November 2009
8. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ (2002) Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 34(1):7–14
9. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE (2004) Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 4(6):349–357
10. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJ, Verweij PE (2005) Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol* 43(8):3925–3931
11. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M (2002) Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 186(9):1297–1306
12. Blijlevens NM, Donnelly JP, Meis JF, Verweij PE, de Pauw BE (2002) *Aspergillus* galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl Infect Dis* 4(2):64–65

5. 1,3-β-D glukán v diagnostice invazivní aspergilózy a jiných invazivních mykotických infekcí hematoonkologických nemocných

Úvodní část této kapitoly obsahuje literární informace o 1,3-β-D glukánu a jeho detekci, rovněž ve formě přehledné práce autora k tomuto tématu. Ve druhé části jsou popsány vlastní zkušenosti autora se zmíněnou metodikou na IHOK LF MU a FN Brno.

Detekce 1,3-β-D glukánu jako „panfungálního“ markeru umožňuje pomocí jednoho testu včasné diagnostikovat nejen invazivní aspergilózu, ale také invazivní kandidózu a další vzácné houbové infekce, snad s výjimkou zygomykózy a kryptokokózy⁽¹⁸⁾.

5.1. Detekce 1,3-β-D glukán – literární data

1,3-β-D glukán – struktura, uvolňování a možnosti detekce

Glukany jsou polymery složené z různě vázaných glukóz, které se dále liší dle druhu této glykosidické vazby – v buněčné stěně většiny hub se nachází 1,3-beta-D glukán.

Pro laboratorní diagnostiku se využívá schopnosti glukánu reagovat s lyzátem amébocytů ostrorepa *Limulus polyphemus* nebo *Tachypleus tridentatus*. V těchto buňkách je obsažen tzv. faktor G (serinová proteáza), který se v přítomnosti 1,3-beta-D glukánu aktivuje (specificky pro tuto glykosidickou vazbu) a spouští krátkou kaskádovou reakci, která je vizualizovaná buď odštěpením barevného produktu z přidaného chromogenního substrátu a nebo změnou turbidity média (dle použitého setu)^(57, 58).

V současné době jsou dostupné tři komerčně vyráběné sety založené na tomto principu se liší použitím amébocytů z různých krabů, cut-off a typem reakce. Zkušenosti s dvěma japonskými sety jsou omezeny takřka výhradně na Japonsko – v Americe či Evropě je používán americký set Fungitell™^(57, 58).

Všechny sety umožňují kvantitativní stanovení koncentrace polysacharidu v séru pacientů a to v řádu pg/ml. Jako pozitivní je označován vzorek s koncentrací glukanu > 80 pg/ml a podobně jako u galaktomannanu se jako pozitivní označí pacient s alespoň dvěma po sobě jdoucími pozitivními vzorky. Doporučovaná frekvence odběrů je alespoň 2x týdně. Při interpretaci výsledků je ovšem nutné vzít v úvahu, že na rozdíl od galaktomannanu je glukan „panfungální“ antigen, což znamená, že pozitivní jsou vzorky séra nejen u pacientů s invazivní aspergilózou, ale rovněž při invazivní kandidóze, fusarióze, pneumocystóze, histoplazmóze atp. Naopak při infekcích kryptokoky a zygomycetami jsou výsledky tohoto obvykle testu negativní – tyto oportunní patogeny neuvolňují glukan z buněčné stěny hub v dostatečném množství a není tedy detekovatelný^(57, 58).

Využití detekce 1,3-β-D glukanu pro diagnózu invazivních mykotických infekcí

Literární zkušenosti s detekcí glukanu jsou však omezené a navíc jsou data značně heterogenní. Tato heterogenita je dána kromě jiného různým designem studií, kdy jen malá část sleduje přínos metody ve skríningu invazivních mykotických infekcí. Dalším faktorem by mohlo být různé technické řešení tří komerčně dostupných testů (Fungitell, Associates of Cape Cod, USA; Fungitec G, Seikagaku Kogyo, Japan; Wako test, Wako Pure Chemical Industries, Japan)⁽⁵⁹⁾. Nedostatek zkušeností lze do jisté míry vysvětlit rovněž relativně velkou finanční náročností testu – při doporučeném duplicitním testování stojí analýza jednoho vzorku asi 1000 Kč (bez nákladů na provoz laboratoře). Navíc vzhledem k uspořádání testu je nutné čekat na naplnění celé destičky vzorky, což může v rutinní diagnostice způsobit časový skluz.

V literatuře můžeme tedy najít jen několik obsáhlejších publikací – práce Obayashiho et al.⁽⁶⁰⁾, Senna et al.⁽⁶¹⁾, Ostrosky-Zeichnera et al.⁽⁶²⁾, Persatové et al.⁽⁶³⁾, Odabasiho et al.⁽⁵⁹⁾. První z nich detekuje hladinu glukanu pomocí v Evropě málo používaného testu Fungitec G (Seikagaku Kogyo) s cut off 20 pg/ml. Ve velmi recentní práci Senna et al.⁽⁶¹⁾ je k diagnostice použit další (v našich podmínkách málo častý) Wako test (Wako Pure Chemical Industries) s cut off 7 pg/ml. V autory prezentovaném souboru je však atypicky vysoké procento invazivních mykotických infekcí –

invazivní mykózu zde prodělalo přes 60 % sledovaných nemocných ^(61, 64). Ostrosky-Zeichner et al. ⁽⁶²⁾ využívá testu Fungitell™ (Associates of Cape Cod), ale jeho soubor negativních kontrol se skládá ze zdravých dárců a nemocných zcela bez rizika invazivních mykotických infekcí. Persatová et al. ⁽⁶³⁾ pracuje se stejným testem (Fungitell™) v případech prokázané či pravděpodobné invazivní mykotické infekce.

Senzitivita v práci Odabasiho et al. ⁽⁵⁹⁾ byla při izolované pozitivitě > 60 pg/ml 100 % a ve studii Ostrosky-Zeichnera ⁽⁶²⁾ pak při stejném cut off 69,9 % respektive při hodnotě 80 pg/ml pak 64,4 % a v analýze Persetové et al. ⁽⁶³⁾ při stejném vyšším cut off dokonce 77,8 %: specificita testu byla v práci Odabasiho et al. ⁽⁵⁹⁾ – 90 %, Ostrosky-Zeichner et al. ⁽⁶²⁾ – 87,1 % respektive 92,4 %, Persatová et al. ⁽⁶³⁾ – 92,5 %.

Nicméně publikovaná data mají mnoho limitací a ve zprávách z běžné klinické praxe se jako zásadní limit jeví nízká pozitivní prediktivní hodnota testu, způsobená vysokou frekvencí falešných pozitivit.

Podrobný literární přehled o testu a jeho využití podává následující přehledný článek - Kocmanová, I., Ráčil, Z., Koukalová, D., et al.: Laboratorní stanovení 1,3-b-D glukanu a jeho využití v diagnostice invazivních mykóz. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 14, 2008, 3: 88-92.

- 5.1.1. Kocmanová, I., Ráčil, Z., Koukalová, D., et al.: Laboratorní stanovení 1,3-b-D glukanu a jeho využití v diagnostice invazivních mykóz. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 14, 2008, 3: 88-92**

LABORATORNÍ STANOVENÍ 1,3- β -D-GLUKANU A JEHO VYUŽITÍ V DIAGNOSTICE INVAZIVNÍCH MYKÓZ

I. KOCMANOVÁ¹, Z. RÁČIL², D. KOUKALOVÁ³, J. MAYER¹

¹Oddělení klinické mikrobiologie, FN Brno, ²Interní hematologická klinika, FN Brno,

³Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci

SOUHRN

Kocmanová I., Ráčil Z., Koukalová D., Mayer J.: **Laboratorní stanovení 1,3- β -D-glukanu a jeho využití v diagnostice invazivních mykóz**

Invazivní mykotické infekce jsou stále častější infekční komplikací u imunokompromitovaných nemocných. Pro snížení mortality pacientů s tímto onemocněním je důležité určit diagnózu co nejdříve. Včasné diagnostice se zatím nejvíc osvědčují sérologické metody, tedy stanovení houbových antigenů (event. protilátek proti nim) v séru nemocných pomocí nekultivačních metod. Kromě dnes již rutinně používaných antigenů, jako je galaktomanan a manan, se nově objevuje možnost využít 1,3- β -D-glukan, polysacharid obsažený v buněčné stěně řady mikroskopických hub. Tento antigen lze stanovit komerčně vyráběnými testy a může být vhodným doplněním do panelu ostatních markerů rychlé diagnostiky invazivních mykóz, nebo lze s jeho pomocí vyloučit falešně pozitivní výsledky z ostatních metod.

Klíčová slova: invazivní mykotická infekce, sérologická diagnostika, 1,3- β -D-glukan

SUMMARY

Kocmanová I., Ráčil Z., Koukalová D., Mayer J.: **1,3- β -D glucan measurement and its usefulness in the diagnosis of invasive fungal infections**

The incidence of deep fungal infections has increased in immunocompromised patients. Prompt and reliable diagnosis is crucial for improving the outcome of this life-threatening disease. Non-culture-based diagnostic methods, such as antigen (antibody) detection, are very often used. Detection of 1,3-beta-D glucan, a panfungal antigen from fungal cell walls, is one of the new commercially available diagnostic techniques that appear to be useful for patients with suspicion of fungal infection (aspergillosis, candidiasis and infection with rare species). This test can be used directly for early diagnosis of invasive fungal infection or as a tool to identify false positive results of other methods.

Keywords: invasive fungal infection, serological diagnosis, 1,3-beta-D glucan

Klin mikrobiol inf lék 2008;14(3):88–92

Adresa: Mgr. Iva Kocmanová, Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, Jihlavská 20, 62500 Brno, email: ikocmanova@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 17. 12. 2007

Přijato k tisku: 26. 6. 2008

Úvod

Invazivní mykotické infekce (IFI) jsou závažnou infekční komplikací nejen u nemocných imunokompromitovaných nádorovým onemocněním nebo HIV-pozitivitou, ale v poslední době i u nemocných dlouhodobě hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče, po těžkých chirurgických zákrocích apod. V porovnání s bakteriálními infekcemi je jejich výskyt méně častý, nicméně jejich incidence narůstá a jsou spojeny s vysokou mortalitou. Kromě toho se mění epidemiologie tohoto onemocnění, neboť každým rokem se rozšiřuje spektrum hub, které jsou nově izolovány z humánních materiálů jako etiologická agens. Houby, které byly dříve považovány za saprofyty nebo původce povrchových infekcí, se začínají uplatňovat jako invazivní patogeny (*Cladophialophora* spp., *Alternaria* spp., *Malassezia* spp. a další) [1,2].

Rovněž se mění poměr mezi onemocněními způsobenými skupinou kandid a jim podobných mykoorganismů, jako je *Trichosporon* spp., *Malassezia* spp., *Saccharomyces* spp.

a skupinou vláknitých hub. Incidence invazivních kandidóz se ve všeobecné populaci v posledních letech ustálila, ale roste počet infekcí způsobených vláknitými nebo vzácnými houbami [3]. Tyto skutečnosti odpovídají za poměrně bouřlivý vývoj diagnostických metod v klinické mykologii v posledních letech, neboť rychlejší a spolehlivější stanovení diagnózy a včasné nasazení odpovídající léčby zvyšují pacientovu šanci na přežití [4].

Možnosti mikrobiologické diagnostiky invazivních mykotických infekcí

Pro laboratorní určení diagnózy invazivní mykózy se obvykle používá kombinace více metod: od klasické mikroskopie a kultivace nejlépe z primárně sterilních materiálů, přes průkaz antigenu nebo protilátek v různých tělesných tekutinách až po stanovení specifických sekvencí DNA (PCR metodiky) [5].

Konvenční diagnostické metody jsou sice velmi specifické a patří ke „zlatému“ standardu diagnostiky, avšak jejich

citlivost při průkazu IFI je poměrně malá [6]. Mnohem větší citlivost vykazují metody sérologické, kterými lze pomocí imunologických nebo biochemických postupů stanovit houbové antigeny cytoplazmatické nebo stěnové, event. protilátky proti nim. Pro některé z těchto markerů již existují standardizované a komerčně dostupné soupravy, běžně používané je stanovení galaktomananu v diagnostice invazivní aspergilózy (Platelia Aspergillus EIA, Bio-Rad Laboratories, Francie) nebo mananu v invazivní kandidóze (Platelia Candida Ag, Bio-Rad Laboratories, Francie). Interpretace hladiny protilátek (antigalaktomananu a antimananu) v diagnostice IFI je přinejmenším diskutabilní [7] a jejich využití je pochopitelně omezeno na non-neutropenické pacienty [8]. Nověji lze rovněž detekovat antigen 1,3-β-D-glukan, který umožňuje „panfungální“ diagnostiku.

1,3-beta-D-glukan: struktura, uvolňování a možnosti detekce

Obecně jsou glukany polymery složené z různě vázaných glukóz, které se dále liší podle druhu této glykosidické vazby. V buněčné stěně většiny medicínsky významných patogenních hub včetně aspergilů se nachází 1,3-beta-D-glukan. Tento polysacharid je v přírodě široce rozšířen, kromě hub je nalézán rovněž v řasách, bakteriích nebo vyšších rostlinách, naopak se nenachází v lidských ani virových buňkách [9].

Mennink-Kersten zkoumala dynamiku jeho uvolňování na *in vitro* modelu s kmenem *A. fumigatus* a prokázala, že polysacharid je (stejně jako další aspergilový antigen galaktomanan) detekovatelný v médiu během logaritmické fáze růstu houby. Glukan se ovšem vylučuje o něco později než galaktomanan a jeho koncentrace je nižší [10]. Zároveň se tyto hodnoty liší u různých druhů rodu *Aspergillus*.

Pro laboratorní diagnostiku 1,3-beta-D-glukanu se využívá tzv. G-testu, který byl vyvinut v roce 1992 Obayashim na základě podobnosti s limulus testem, používaným na detekci endotoxinu gramnegativních bakterií [11,12]. G-test je založen na schopnosti 1,3-beta-D-glukanu reagovat s lyzátem amébocytů krabů *Limulus polyphemus* nebo *Tachypleus tridentatus*. Polysacharid aktivuje v amébocytech obsažený tzv. faktor G (proenzym serinové proteázy), který spouští krátkou kaskádovou reakci, specifickou pro glukany obsahující právě tuto 1,3-beta-D glykosidickou vazbu. Tato kaskáda je vizualizovaná buď odštěpením barevného produktu z přidaného chromogenního substrátu anebo změnou turbidity média (lišší se dle použitého setu) [7,13]. Kvůli specifitě testu je v komerčních soupravách z lyzátu amébocytů buď odstraněn nebo alespoň inhibován tzv. faktor C, který spouští tuto reakci pro endotoxin. Tím je zabráněno možným zkříženým pozitivitám v případě, že by ve vzorku byly přítomny bakterie produkující endotoxin (obr. 1).

V současné době dostupné a komerčně vyráběné sety, založené na uvedeném principu, jsou buď japonské nebo americké proveniencí. Rozdíl mezi nimi spočívá v použití amébocytů z různých krabů, v různé hraniční hodnotě a typu reakce (tabulka 1).

Zkušenosti s japonskými sety jsou omezeny takřka výhradně na Japonsko. V USA a Evropě je používána souprava Fungitell™ (Associates of Cape Cod, USA), která byla také v roce 2004 uznána FDA (Food and Drug Administra-

tion – Správa potravin a léčiv USA) jako vhodná pro diagnostiku invazivní mykózy u rizikových pacientů [12,14].

Tímto setem lze stanovit koncentraci polysacharidu v séru pacientů v řádu pg/ml. Jako pozitivní je označován vzorek s koncentrací glukanu > 80 pg/ml a podobně jako u galaktomananu se jako pozitivní označí pacient, který má minimálně dva po sobě jdoucí pozitivní vzorky. Doporučovaná frekvence odběrů je alespoň dvakrát týdně, nicméně jejich ideální četnost není známa vzhledem k malému množství informací o kinetice antigenu [14]. Vzorky séra musí být před vstupem do reakce ošetřeny alkalickou reagentií, která zajistí konverzi trojitě šroubovice polysacharidu na mnohem reaktivnější jednořetězcové glukany. Vysoké pH dále inaktivuje serinové proteázy a jejich inhibitory v krvi, jako možné příčiny falešné positivity i negativity testu.

Při interpretaci výsledků je nutné vzít v úvahu, že na rozdíl od galaktomananu je glukan „panfungálním“ antigenem, což znamená, že pozitivní výsledky vykazují vzorky séra nejen od pacientů s invazivní aspergilózou, ale rovněž při invazivní kandidóze, fusarióze, pneumocystóze, histoplazmóze atd. [15]. Naopak při infekcích kryptokoky a zygomycetami jsou výsledky testu negativní, neboť tyto oportunní patogeny neobsahují v buněčné stěně glukan v dostatečném a detekovatelném množství [16].

Klinické využití – výhody a nevýhody testu

Vzhledem k již zmiňovaným problémům se správnou a hlavně časnou diagnostikou IFI (malá senzitivita konvenčních diagnostických metod, mnohdy nemožnost odebrat validní materiál pro tato vyšetření apod.) je každá další standardní metodika přínosem.

Velkou výhodou testu je jeho pozitivita v časných stádiích invaze houby, z toho plynoucí možnost včasné reakce na infekci antimykotickou léčbou a tím zlepšení prognózy pacienta. Dokáže tedy zkrátit interval do definitivního stanovení diagnózy, respektive do podání účinné antimykotické léčby [16]. Další výhodou, na druhou stranu však při interpretaci výsledků současně nevýhodou, je široké spektrum patogenů, které lze detekovat pomocí 1,3-beta-D-glukanu (*Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. atd.) [13]. Proto se jako nejvýhodnější jeví využívat tento test zejména v kombinaci s dalšími nekultivačními postupy, které identifikují specifické houbové antigeny event. protilátky proti nim (galaktomanan, manan, glukuronoxylomanan atd.) [7,14,17].

Dále lze pomocí glukanu monitorovat stav infekce (uvolňuje se v logaritmické fázi růstu houby, což svědčí pro aktivní infekci) a léčebnou odpověď (úspěšnou léčbu vs. její selhání). Pazos et. al například poukazují na pokles glukanu (i galaktomananu) u pacienta s invazivní aspergilózou úspěšně léčeného kombinací amfotericinu B s kaspofunginem a naopak zvýšení hladiny glukanu u nemocného nereagujícího na léčbu amfotericinem B [18].

Nezanedbatelnou výhodou testu by rovněž mohla být skutečnost, že v pokusu na myším modelu kolonizace kandidami neovlivňovala hladinu glukanu, na rozdíl od navýšení kandidového markeru mananu [19]. Výsledky u kolonizovaných pacientů jsou ovšem nejednoznačné [20,21].

Naopak nevýhodami jsou, kromě vysoké ceny vyšetření a relativní laboratorní náročnosti (Fungitell™ vyžaduje

spektrofotometr umožňující číst a vyhodnotit kinetickou reakci prováděnou při teplotě 37 °C), hlavně falešně pozitivní či negativní výsledky.

Falešné pozitivivity

Nejčastěji jsou falešné pozitivivity způsobeny léčbou antibiotiky (amoxicilinem-klavulanátem, event. imipenemem, gentamicinem), dále pak dialýzou s celulózovou membránou, kontaminací gázou, uváděné jsou i při bakteriální sepsi [7,16,22]. Otázkou zůstává vliv kolonizace pacienta mykotickým agens.

Nově testovala Mennink-Kersten ve Fungitell™ kultury některých gramnegativních i grampozitivních bakterií suspendovaných v glukán negativním lidském séru obohaceném glukózou, přitom jako glukán pozitivní vyšly vzorky s *Alcaligenes faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. S ostatními vybranými bakteriemi byly výsledky testu negativní (*Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. atd.) [23]. Přestože zatím nejsou jednoznačné zkušenosti u pacientů, je možné předpokládat, že sepsa uvedenými bakteriemi by mohly způsobit falešně pozitivní výsledek, je tedy vhodné při hodnocení k současnému bakteriálnímu nálezu přihlížet.

V neposlední řadě je možná laboratorní kontaminace. Souprava je schopná detekovat pikogramová množství ubikvitního glukánu, proto je náročná na kvalitu laboratorních pomůcek a přesnost práce. Pickering et al. popisují u dvou

negativních vzorků dokonce několikanásobné zvýšení koncentrace beta-glukánu po pouhém přepipetování materiálu do nových zkumavek [16].

Falešné negativity

Vysoké koncentrace bilirubinu a triglyceridu mohou reakci inhibovat [16]. Rovněž malá frekvence odběrů (doporučená frekvence je dvakrát týdně) může podobně jako u galaktomananu způsobit, že výsledek testu bude falešně negativní.

1,3-beta-D-glukan v diagnostice invazivních mykotických infekcí

V současné době nejsou dostatečné zkušenosti s využitím glukánu jako jednoznačného markeru IFI v běžné klinické praxi.

Publikované studie různých autorů uvádějí senzitivitu testu pro diagnostiku invazivních mykóz v rozmezí 55–93 %, specifitu mezi 77–100 %, tyto výsledky však nejsou mezi sebou objektivně porovnatelné. Vyšetřovaní pacienti byli v různém riziku invazivní mykózy, porovnávané infekce byly odlišné houbové etiologie, rovněž se lišila kritéria pro pozitivitu, použité sety, počty vzorků na pacienta apod. [13,16,17,18,20,24,27] (tabulka 2).

V roce 1995 publikovali Obayashi et al. výsledky detekce glukánu u 179 pacientů většinou s hematologickou malignitou (202 febrilních epizod). S testem FungiTec G a hraniční

Tabulka 1
Možnosti stanovení 1,3-beta-D-glukánu – komerční kity

Název	Fungitell™	Fungitec G™	Wako WB003	B-G Star
Výrobce	Associates of Cape Cod (USA)	Seikagaku Kogyo Corp. (Japonsko)	Wako Pure Chem.Ind. (Japonsko)	Maruha Corporation (Japonsko)
Hraniční hodnota	80 pg/ml	20 pg/ml	11 pg/ml	20 pg/ml
Krab	<i>L. polyphemus</i>	<i>T. tridentatus</i>	<i>L. polyphemus</i>	<i>T. tridentatus</i>
Reakce	kinetická kolorimetrická	kinetická kolorimetrická	kinetická turbidimetrická	end-point kolorimetrická

Tabulka 2
1,3-beta-D-glukan jako marker pro diagnostiku IFI podle publikovaných studií

Autor	Set	HH	Počet pacientů	SE	SP	PPV	NPV
Miyazaki (1995)	Fungitec G	20	60	Ne	Ne	Ne	Ne
Obayashi (1995)	Fungitec G	20	179	90	100	59	97
Kawazu (2004)	Wako	11	149	55	98	67	96
Odabasi (2004)	Glucatell	60	283	70	96	79	93
Pazos (2005)	Glucatell	120	40	88	90	70	96
Ostrosky-Zeichner (2005)	Fungitell	80	333	64	92	89	73
Pickering (2005)	Fungitell	80	76	93	77	52	98

Legenda: HH – hraniční hodnota, SE – senzitivita, SP – specifita, PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

hodnotou 20 pg/ml dosáhli v diagnostice IFI senzitivity 90 % (37 glukán pozitivních epizod ze 41 u mikrobiologicky nebo histologicky prokázané IFI), pozitivní prediktivní hodnota byla 59 %. Všichni pacienti bez IFI byli negativní (specifita 100 %). Rovněž žádný z nemocných kolonizovaných nějakou houbou nevykazoval vzestup koncentrace glukánu nad 20 pg/ml [20].

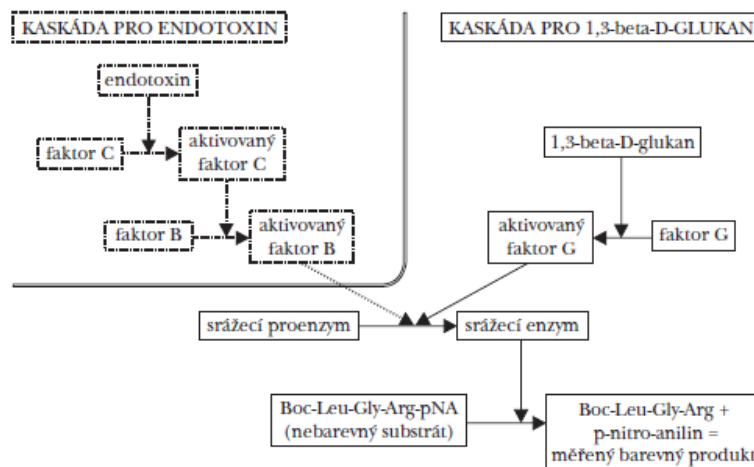
Do studie Ostrosky-Zeichnera bylo zařazeno 333 pacientů, 163 z nich mělo prokázanou nebo pravděpodobnou invazivní mykózu (kandidózu, aspergilózu, fusariózu, zygomycózu nebo kryptokokózu). Udávaná senzitivita, specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty testu byly 64,4 %, 92,4 %, 89 %, respektive 73 % a to při hraniční hodnotě 80 pg/ml (test FungitellTM). Většina nemocných se zygomycózou a kryptokokózou měla hodnoty glukánu pod 60 pg/ml (byli tedy označeni jako negativní) [24]. Upton et al. ovšem upozorňují, že složení skupin v této studii, kontrolní a s IFI, není z hlediska rizika vzniku IFI srovnatelné, což může ovlivnit pozitivní i negativní prediktivní hodnoty [25].

Za použití stejného setu (FungitellTM), ale při hraniční hodnotě 60 pg/ml otestovali američtí autoři 283 pacientů s akutní myeloidní leukémií nebo myelodysplastickým syndromem. Ve skupině nemocných s prokázanou a pravděpodobnou invazivní mykózou vykazoval test excelentní negativní prediktivní hodnotu (100 %). Pozitivní prediktivní hodnota při použití pouze 1 séra byla 43 %, pro 3 následně odebrané vzorky se ale zvýšila na 80 %. Detekce glukánu předcházela stanovení diagnózy průměrně o 10 dní (rozmezí -32 až +2 dny) a profylaktická nebo empirická léčba antitumorky neovlivňovala výsledky testu [13].

Pazos et al. prováděli retrospektivní analýzu vzorků od 40 neutropenických dospělých ve vysokém riziku invazivní aspergilózy, ve které porovnávali výsledky dvou nekultivačních diagnostik, detekce galaktomananu a glukánu. Sedm z pacientů mělo prokázanou nebo pravděpodobnou mykózu dle EORTC-MSG kritérií (European Organization for Research and Treatment of Cancer – Mycoses Study Group, tj. Evropská organizace pro výzkum a léčbu rakoviny – Skupina pro studium mykóz). Senzitivita, specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota byla pro jednotlivý test (galaktomanan a glukán) stejná, tj. – 87,5 % a 89,6 %, 70 % respektive 96,3 %. Při kombinaci obou testů stoupla pozitivní prediktivní hodnota na 100 %, ostatní dva ukazatele přitom zůstaly stejné [18].

Dosud neexistuje mnoho zkušeností s detekcí glukánu u non-neutropenických pacientů. Digby et al. prezentovali výsledky u 46 pacientů s bakteriální nebo mykotickou infekcí na jednotce intenzivní péče. Vzhledem k velkému počtu falešných pozitivit doporučují využít glukán spíše jako negativní prediktor IFI [26]. Zkušenosti s monitorováním glukánu u dětí zatím publikovány nebyly.

Obr. 1
Princip stanovení 1,3-beta-D-glukánu pomocí FungitellTM



Závěr

Stanovení 1,3-beta-D-glukánu má své místo v panelu metod pro diagnostiku invazivních mykóz. Jeho využití pro prospektivní sledování infekcí způsobených *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Acremonium* spp. event. ostatními mykotickými agens vyjma kryptokoků a zygomycet, je zatím pro nedostatek většiny počtu klinických studií nejednoznačné. Může však být užitečné při verifikaci infekcí způsobených vzácnými houbami nebo pro confirmaci falešně pozitivních nálezů ostatních nekultivačních metod (zejména galaktomananu). Naděje tedy vzbuzuje zejména v kombinaci s dalšími nekultivačními postupy.

Poděkování

Práce byla podpořena IGA NR 8452-3/2005 a VZ MSM6198959223.

Literatura

- Zhirong Y, Wanqing L. Fungal respiratory disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2006;12(3):222–227.
- Devlin RK. Invasive fungal infections caused by *Candida* and *Malassezia* species in the neonatal intensive care unit. *Adv Neonatal Care*. 2006;6(2):68–77.
- Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet*. 2005;366(9490):1013–1025.
- von Eiff M, Zuhlsdorf M, Roos N, et al. Pulmonary fungal infections in patients with hematological malignancies—diagnostic approaches. *Ann Hematol*. 1995;70(3):135–141.
- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék*. 2007;53(9):990–999.
- Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis*. 2006;43,Suppl 1:15–27.
- Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, et al. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. *Mycoses*. 2007;50 Suppl 12–17.
- Cornillet A, Camus C, Nimubona S, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: A 6-year survey. *Clin Infect Dis*. 2006;43(5):577–584.
- Kedzierska A. (1->3)-beta-D-glucan – a new marker for the early serodiagnosis of deep-seated fungal infections in humans. *PoJ Microbiol*. 2007;56(1):3–9.
- Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Wasi N, et al. *In vitro* release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1711–1718.
- Obayashi T, Yoshida M, Tamura H, et al. Determination of plasma (1->3)-beta-

- D-glucan: A new diagnostic aid to deep mycosis. *J Med Vet Mycol.* 1992;30(4):275–280.
12. Yoshida M. Usefulness of determination of beta-D-glucan in the diagnosis of deep mycosis – experience in Japan. *Med Mycol* 2006;44(6),Suppl 1:185–189.
 13. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004;39(2):199–205.
 14. Wheat LJ. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, part I. *Clin Microbiol Newslett.* 2005;27(7):51–57.
 15. Yoshida M, Obayashi T, Iwama A, et al. Detection of plasma (1->3)-beta-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium fungaenias*. *J Med Vet Mycol.* 1997;35(5):371–374.
 16. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, et al. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):5957–5962.
 17. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2733–2741.
 18. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: A comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):299–305.
 19. Nichterlein T, Buchheidt D, Hein A, et al. Comparison of glucan detection and galactomannan enzyme immunoassay in gastrointestinal and systemic murine candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;46(2):103–108.
 20. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet.* 1995;345(8941):17–20.
 21. Ponton J, del Palacio A. Influence of *Candida* colonization on the (1->3) beta-D-glucan assay. *Clin Infect Dis.* 2006;43(2):263–264.
 22. Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE. 1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med.* 2006;354(26):2834–2835.
 23. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij PE. Reactivity of bacteria with the 1,3-beta-glucan assay (M-568). Abstract of the 47th ICAAC 2007:65.
 24. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis.* 2005;41(5):654–659.
 25. Upton A, Leisenring W, Marr KA. (1->3) beta -D-glucan assay in the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis.* 2006;42(7):1054–1056; author reply 1056.
 26. Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, et al. Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(5):882–885.
 27. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma (1->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol.* 1995;33(12):3115–3118.

5.2. Detekce 1,3-β-D glukán – vlastní zkušenosti

Ve spolupráci s IHOK LF MU a FN Brno byla metodika na stanovení hladin glukánu zavedena v roce 2005 na Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno a pracoviště autora má jedny z nejobsáhlejších zkušeností s testem u hematologických nemocných v České republice, ale i v Evropě.

Nejprve proběhla rozsáhlá studie, která měla za primární cíl zjistit reálnou klinickou využitelnost testu pro časnou detekci invazivních mykotických infekcí při rutinním skrínungu rizikových hematologických nemocných. Díky své „panfungalitě“ byl předpoklad značného potenciálu testu – v ideálním případě by jedna metoda mohla diagnostikovat nejen nejčastější invazivní mykózy – invazivní aspergilózu a kandidózu, ale i event. některé vzácné patogeny.

Výzkum probíhající za podpory grantové projektu IGA MZ ČR však ukázal, že při rutinním skrínungu se díky velmi vysoké citlivost testu setkáváme s extrémně vysokou frekvencí falešných pozitivit a pozitivní prediktivní hodnota testu pak klesá k nízkým hodnotám. Naše výsledky byly recentně publikovány v *Journal of Medical Microbiology* a práce je přílohou této kapitoly (**Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I. & Mayer, J. Difficulties in using 1,3-beta-D glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal diseases in patients with hematological malignancies - high frequency of false positive results and their analysis. J Med Microbiol., 59, 2010, 9: 1016-1022**). Lze předpokládat, že práce velmi významně ovlivní reálné používání testu na hematologických pracovištích.

V rámci našeho výzkumu jsme také velmi detailně studovali velké množství možných příčin falešných pozitivit. Z celého panelu analyzovaných situací, se však ani jedna neukázala jako jednoznačná příčina. Avšak prokázalo se, že každá ze studovaných okolností, které jsou ale zcela běžné při léčbě hematologických nemocných, může anekdotárně výsledek testu ovlivnit. Jejich

kombinace může být příčinou takto nízké PPV testu. Veškeré analyzované situace jsou detailně popsány ve výše zmíněné práci.

Zatímco skrínigové použití u hematoonkologických nemocných se nejeví jako zcela ideální, náš další výzkum ukázal, že velmi významnou roli může mít stanovení glukanu jako konfirmační test pro pozitivní galaktomannan. V případě, že zvýšení cirkulujícího galaktomananu způsobila skutečně invazivní aspergilóza, pak by i hodnoty 1,3- β -D glukanu měly být zvýšené a test být pozitivní.

Naše práce, která je další přílohou této kapitoly (**Racil, Z., Kocmanova, I., Weinbergerova, B., Winterova, J., Lengerova, M., Hrcirova, K., Mayer, J.: Detekce 1,3- β -D glukanu v diagnostice invazivních mykotických infekcí u nemocných s hematologickou malignitou: přínos metody ve skrínigu invazivních mykóz a v konfirmaci galaktomannan pozitivních. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 15, 2009, 2: 48-57**) tyto výsledky skutečně potvrdila a v současné době je také test na našem pracovišti v této indikaci používán.

- 5.2.1. Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I. & Mayer, J. Difficulties in using 1,3-beta-D glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal diseases in patients with hematological malignancies - high frequency of false positive results and their analysis. J Med Microbiol., 59, 2010, 9: 1016-1022**

Difficulties in using 1,3- β -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies – high frequency of false-positive results and their analysis

Zdenek Racil,¹ Iva Kocmanova,² Martina Lengerova,¹
Barbora Weinbergerova,¹ Lucie Buresova,³ Martina Toskova,¹
Jana Winterova,¹ Shira Timilsina,⁴ Isa Rodriguez⁴ and Jiri Mayer¹

Correspondence
Zdenek Racil
zracil@fnbrno.cz

¹Department of Internal Medicine Hemato-Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

²Department of Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

³Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine and Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

We have evaluated the contribution of the 1,3- β -D-glucan (BG) assay for the screening of invasive fungal infections (IFIs) in patients with haematological malignancies. Serum samples from patients at risk of IFI were collected twice a week and retrospectively tested using the BG assay. BG screening was performed on 1143 samples from 91 patients during 104 anticancer treatment cycles. Proven and probable cases of IFI occurred in 9 (8.7%) treatment cycles. Depending on the criterion of positivity used ($1\times >60\text{ pg ml}^{-1}$, $1\times >80\text{ pg ml}^{-1}$, $2\times >60\text{ pg ml}^{-1}$ or $2\times >80\text{ pg ml}^{-1}$) the sensitivity and specificity were 89, 89, 67 and 44%, and 20, 48, 33 and 56%, respectively. Although the test was marked as positive in 82, 68, 54 and 45% of all the treatment cycles, in the majority of cases, these positivities were probably false. The major limit of the BG test was an extremely low positive predictive value (10 to 12%). We have analysed mucositis, candida colonization, bacteraemia, use of antimicrobials, erythrocyte and thrombocyte filtered blood products, collecting tubes or sampling via venous catheters. Even though no factor is a major source of BG, it could at least partially influence BG assay performance. Thus, BG detection has a limited usefulness as a screening method for IFIs in patients with haematological malignancies.

Received 31 January 2010
Accepted 18 May 2010

INTRODUCTION

Invasive fungal infections (IFIs) are serious and often a life-threatening complication in patients with haematological malignancies (Marr *et al.*, 2002; Pagano *et al.*, 2006). Invasive aspergillosis (IA) and invasive candidiasis (IC) represent the majority of IFIs with an attributable mortality of 30–40% (Pagano *et al.*, 2006). Early diagnosis and the initiation of efficacious antifungal treatments are major

factors in contributing to the prognosis of patients with IFIs (Garey *et al.*, 2006; von Eiff *et al.*, 1995). Since conventional microbiological methods often lack sensitivity in the diagnostics of IFI, non-culture-based tests are used for an early noninvasive diagnosis of these infections. While galactomannan (GM) has an undoubted role in the diagnosis of IA (Maertens *et al.*, 2002, 2004, 2005), the utility of mannan and antimannan detection is somewhat limited (Sendid *et al.*, 2002), and PCR methods have not yet been standardized (Mengoli *et al.*, 2009).

1,3- β -D-glucan (BG) is a fungal-cell-wall polysaccharide that is released into the bloodstream of patients with IC, IA and some other IFIs, except for invasive zygomycosis and cryptococcosis (Kedzierska *et al.*, 2007). Thus, the detection of BG seems to be a very interesting tool for IFI

Abbreviations: AUC, area under the curve; BG, 1,3- β -D-glucan; CVC, central venous catheter; EORTC/MSG, European Organization for Research and the Treatment of Cancer/Mycosis Study Group; GM, galactomannan; HSCT, haematopoietic stem cell transplantation; IA, invasive aspergillosis; IC, invasive candidiasis; IFI, invasive fungal infection; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; ROC, receiver operating characteristic; WHO, World Health Organization.

diagnostics in haemato-oncological patients – making early diagnosis possible for the two major IFIs in one test. Several commercial kits with different reactivity have now been made available for BG detection (Obayashi *et al.*, 2008). Most of the available studies have used the detection of BG in samples from patients with proven or probable IFIs (Hachem *et al.*, 2009; Obayashi *et al.*, 2008; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2005; Persat *et al.*, 2002, 2008; Pickering *et al.*, 2005) and there is only limited data about the use of BG detection in IFI screening (Ellis *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009; Odabasi *et al.*, 2004; Pazos *et al.*, 2005; Senn *et al.*, 2008). This should be the main role of all tests used for the guiding of the pre-emptive antifungal treatment – therapy of a suspected or presumed fungal infection in advance of confirmation. We therefore conducted a study to evaluate the clinical usefulness of BG detection for the screening and early diagnosis of IFI in routine clinical settings in patients with haematological malignancies.

METHODS

Patients. Between September 2004 and June 2007, 91 patients who had undergone 104 anticancer treatment cycles with an intermediate [high dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell transplantation (HSCT)] and high risk (induction/reinduction for acute myelogenous leukaemia or allogenic HSCT) of IFI were enrolled in our study. Furthermore, in 37 patients, paired blood samples were collected for excluding the central venous catheter (CVC) as a source of BG contamination. All patients signed their written informed consent for sample and data collection, and the study was approved by the Institutional Review Board.

Clinical management. Patients were hospitalized in standard air-controlled rooms or in high-efficiency particular air-filtered single rooms. All patients received antifungal prophylaxis (89% of treatment cycles with fluconazole and 11% with oral voriconazole). Regular (twice a week) monitoring of *Candida* spp. colonization (in the throat, rectum and urine) and GM antigenaemia (Platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad) was performed on all patients. If febrile neutropenia not responding to antibiotics occurred, the patient received empirical antifungal treatment mostly with conventional amphotericin B, and then a routine full diagnostic work up for IFI was performed.

Definitions. The new anticancer treatment cycle has been defined as the period from beginning a distinct cycle of chemotherapy until discharge, to the beginning of a new chemotherapy cycle or until day +100 after transplantation (in the case of patients after allogenic HSCT). The diagnosis of IFI was assessed according to the European Organization for Research and the Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) criteria and definitions published in 2002 (the criteria available at the time of the study) (Ascioglu *et al.*, 2002). The BG results have not been used for diagnostic categorization of IFI. If mucositis was present, the severity was scored at the time of the serum sample collection according to the World Health Organization (WHO) scale (WHO, 1979).

Blood sampling. Blood samples for BG analysis were taken twice a week. Collection was performed mostly through venous catheters using routine plastic test tubes (7.5 ml Monovette; Sarstedt). Samples were allowed to clot for at least 1 h, and then the serum was harvested by aspiration and stored frozen at -20°C (2004–2006) or at -80°C

(starting in 2006). Sterile storage tubes (Sarstedt) and sterile pipette tips (Eppendorf) were used.

BG detection assay. BG was detected with the Fungitell test kit as recommended by the manufacturer (Associates of Cape Cod). A total of 5 μl of serum were briefly pretreated with 20 μl alkaline reagent (0.125 M KOH/0.6 M KCl) for 10 min at 37°C and then 100 μl reconstituted Fungitell reagent was added. The reaction was incubated for 40 min at 37°C and the optical density was measured at 405/490 nm every 20 s (iEMS MF reader; Labsystems). Correlation coefficients were >0.98 in all reactions. All specimens were tested in duplicate. The concentration of BG in each sample was calculated using a calibration curve. BG results were not used for the management or classification of IFI.

Tests for false positivity. Plastic blood collection tubes (Monovette 7.5 ml; Sarstedt) were analysed for BG contamination. Each tube was shaken for 60 min with 2 ml reagent grade water (Associates of Cape Cod) that had been tested. Antibiotics were tested as a routinely prepared intravenous solution and then after dilution to a common serum concentration by reagent grade water. Erythrocytes and platelet concentrates were centrifuged and acellular liquid supernatant was tested in the same way as the serum.

Statistical analysis. Per test analysis was performed as published elsewhere (Maertens *et al.*, 2007; Marr *et al.*, 2004). Fisher's exact test was used for binary outcomes, the Mann-Whitney test was used for the comparison of cycles with and without IFI in continuous variables, and for pair wise comparison the Wilcoxon test was used. A two-sided P value <0.05 was considered statistically significant. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated when cycles without IFI were considered as being true negatives, and cycles with proven and probable IFI as true positives. The receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the curve (AUC) were used to estimate the discriminatory capability of the BG assay for IFI screening in haemato-oncological patients. PPV was estimated for different values of prevalence using the obtained value of sensitivity and specificity. For statistical analysis, the software Statistica, version 8.0 (StatSoft), and R (R Development Core Team) were used.

RESULTS AND DISCUSSION

BG in screening of IFI

During 104 anticancer treatment cycles (44%, treatment of acute myelogenous leukaemia; 39%, allogenic HSCT; 16%, autologous HSCT; 1%, other) in 91 patients (63% male, 37% female) 9 cases of possible IAs, 8 probable IAs and 1 proven IC occurred. The incidence of all IFIs was 17.3%; proven and probable IFIs occurred in 8.7% of cycles. BG was measured in 1143 blood samples – median 9 samples per treatment cycle (minimum 3, maximum 46) – and in 422 (37%) and 308 (27%) BG values were >60 and >80 pg ml^{-1} , respectively.

The test detected 8/9 (89%) of proven and probable cases of IFIs if the criterion one/single samples >60 or >80 pg ml^{-1} were used, and only 6/9 (67%) and 4/9 (44%) when criterion two/consecutive samples >60 and >80 pg ml^{-1} , respectively, were used. Interestingly, the BG values in the only case of proven IFI (candidaemia caused by *Candida krusei*) did not reach any of these cut-offs and the test

remained negative. However, the BG detection was not performed with the same blood sample as the one that was *Candida* culture positive, although the sample used was collected at the same time.

The sensitivity, specificity, PPV and NPV of the assay in our study population for different criteria of positivity are shown in Table 1. There could be several factors affecting the sensitivity of the assay in our study: relatively low incidence of proven and probable IFIs; using GM as part of the criteria for probable IA (possibility of false-positive results – but all known causes were eliminated); administration of antifungal prophylaxis (however, fluconazole was used in 89% of cycles, thus probably only sensitivity for IC cases could be decreased); and finally early and prompt administration of pre-emptive antifungal treatment when the criteria for IFI were fulfilled.

However, the major limitation of using BG detection for IFI screening in our study was an extremely low PPV (varying from 10 to 12%), regardless of the cut-off and single or consecutive positivity that was used. PPV depends on the prevalence of IFIs in the study and this was only 8.7% in our analysis. This could be one of the major limitations in our study but this number is appropriate for a combined group of patients with an intermediate and a high risk of IFI. Moreover, the PPV remained low, even if the results were recalculated for a hypothetical higher prevalence of IFIs. For cut-off 2 values $>60 \text{ pg ml}^{-1}$ and a prevalence of IFI 10, 15 and 20%, the corresponding PPV would be 12, 18 and 24%, and for cut-off one positivity $>80 \text{ pg ml}^{-1}$ PPV 14, 21 and 27%.

The other explanation for a high number of BG-positive cycles could be the high sensitivity of the test. It detects IFI at a very early stage before being detected clinically and could be covered and treated by empirical antifungal treatment. However, we did not confirm this hypothesis of cryptic IFI. The percentage of anticancer treatment cycles with systemic antifungal treatment (empirical, pre-emptive or specific) were not different between BG-positive and BG-negative cycles, irrespective of the criterion of a positive cycle used. Using the criterion for the BG-positive treatment cycle of one sample with a BG value $>60 \text{ pg ml}^{-1}$, the frequency of systemic antifungal therapy was 32% in BG positive as well as 32% in BG negative treatment cycles ($P=1.0$). Similarly, for the criterion of one

sample with BG value $>80 \text{ pg ml}^{-1}$ these frequencies were 35 and 26%, respectively ($P=0.53$).

Thus, the major reason for the extremely low PPV in our study [also described by other authors (Digby *et al.*, 2003; Mattiuzzi *et al.*, 2007)] was a high frequency of clinically false-positive results (positive test results without clinical correlates). A total of 76% out of 422 and 75% out of 308 BG-positive samples with a BG level >60 and $>80 \text{ pg ml}^{-1}$, respectively, were clinically false positive. Similarly, approximately only 20% of all BG-positive cycles (irrespective of the criterion used) had any sign of IFI. Frequent false positivities are an explanation for the absence of any statistically significant differences in mean, median and peak BG levels, as well as in the number of BG-positive samples between the treatment cycles with and without IFI (Table 2) and for the ROC curve showing with AUC 0.562 minimal discriminatory capability of the BG assay for IFI screening (Fig. 1).

Analysis of the possible causes of clinically false-positive results in the BG assay

We have performed subsequent analysis of data obtained from our patient group together with further *in vitro* tests, to identify the influence of all the major known factors described in the literature as a possible source of BG causing clinical false positivity in the BG assay. Mucositis, possibly leading to cross-over of *Candida* spp. or its antigens through damaged mucosa (Ellis *et al.*, 2008), and candida colonization (Pazos *et al.*, 2005) as the cause of clinically false-positive results of the BG assay are not likely. Considering only cycles without IFI, there wasn't a statistically significant difference in the frequency of mucositis, severe mucositis (WHO grade III and IV) or candida colonization between BG-positive and BG-negative cycles. (The criterion for a BG-positive treatment cycle for one value $>60 \text{ pg ml}^{-1}$: the incidence of mucositis – 48% in BG-positive cycles vs 47% in BG-negative cycles, $P=1.0$; the incidence of severe mucositis – 23% vs 29%, $P=0.753$; the incidence of candida colonization – 46% vs 41%, $P=0.789$. The criterion for a BG-positive cycle for one value $>80 \text{ pg ml}^{-1}$: the incidence of mucositis – 48 vs 48%, $P=1.0$; the incidence of severe mucositis – 24 vs 25%, $P=1.0$; the incidence of candida colonization – 47% vs 43%, $P=0.789$).

Table 1. Performance of the BG assay – per cycle analysis

	One value $>60 \text{ pg ml}^{-1}$ (%)	Two values $>60 \text{ pg ml}^{-1}$ (%)	One value $>80 \text{ pg ml}^{-1}$ (%)	Two values $>80 \text{ pg ml}^{-1}$ (%)
Sensitivity	88.89	66.67	88.89	44.44
Specificity	19.77	47.67	32.56	55.81
PPV	10.39	11.76	12.12	9.52
NPV	94.44	93.18	96.55	90.57

Table 2. Differences in BG levels and the number of BG-positive samples in cycles with and without IFI (Mann–Whitney test)

	Cycles without IFI	Cycles with proven and probable IFI	P
Median (minimum–maximum) BG concentration in positive samples (pg ml^{-1})			
Cut-off of 60 pg ml^{-1}	115 (60–1380)	97 (62–1000)	0.521
Cut-off of 80 pg ml^{-1}	141 (80–1380)	143 (80–1000)	0.276
Median (minimum–maximum) of peak BG concentrations (pg ml^{-1}) during cycles	143 (0–1380)	177 (44–1000)	0.552
Median no. of BG-positive samples per cycles			
Cut-off of 60 pg ml^{-1}	3.0	5.5	0.224
Cut-off of 80 pg ml^{-1}	3.0	4.0	0.825

During six cycles, without signs of IFI, false GM positivity (two samples with the index of positivity >0.5) occurred (four – administration of Plasmalyte solution (Baxter Czech), one – administration of piperacillin/tazobactam, one – unknown). Except for the patient with unknown GM positivity, all patients were BG negative in this period.

Antigens of some bacterial strains could react with the test and lead to false positivity (Digby *et al.*, 2003; Mennink-Kersten *et al.*, 2007; Pickering *et al.*, 2005). Thus we have analysed 10 episodes of bacteraemia (excluding positive blood culture for coagulase-negative *Staphylococcus*) that occurred in 8 out of 104 treatment cycles during our study. However, only in six of these bacteraemias, BG positivity

could be possibly considered as related. Three infections were caused by *Enterococcus* spp., two by *Pseudomonas* spp. and one by *Klebsiella* sp. infection. We did not identify any case of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in our patient population during the study (Desmet *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009).

We have tested several batches of four of the most commonly used antibiotics in our department as a known possible source of BG - cefepime, piperacillin/tazobactam, meropenem, amoxicillin/clavulanate (Marty *et al.*, 2006). All antibiotics except cefepime had a BG value $<80 \text{ pg ml}^{-1}$ when the vials of a stock solution were analysed. All five different batches of cefepime were strongly BG positive before dissolving (median 602 pg ml^{-1}), but after dilution to the common serum concentration the solution was negative in the BG assay (median 18 pg ml^{-1}). During 16 out of 38 BG-positive treatment cycles (defined as two consecutive samples with a BG level $>80 \text{ pg ml}^{-1}$) without IFI, cefepime was administered. In 14 out of these 16 cycles, cefepime could possibly have contributed to false-positive results. Thus, its administration could have at least partially contributed to false positive BG results significantly frequently (Table 3), especially if the serum sample was obtained shortly after the drug administration (Marty *et al.*, 2006). The use of intravenous immunoglobulin and albumin was very rare in our study population (Usami *et al.*, 2002) and none of our patients underwent dialysis during the period of BG monitoring (Koo *et al.*, 2009).

Leukocyte removing filters could be the source of BG (Kedzierska *et al.*, 2007; Nagasawa *et al.*, 2003). We have tested thrombocyte and erythrocyte concentrates, with and without using these filters. Only 1 out of 11 filtered transfusions had a BG level $>60 \text{ pg ml}^{-1}$ (median 27 pg ml^{-1} , minimum 7 pg ml^{-1} , maximum 72 pg ml^{-1}). Interestingly 3 out of 11 non-filtered blood products had BG $>60 \text{ pg ml}^{-1}$ (median 50 pg ml^{-1} , minimum 21 pg ml^{-1} , maximum 80 pg ml^{-1}).

We hypothesized that the inserted CVC could potentially be contaminated by a fungal species (mainly *Candida* spp.) and thus any blood samples obtained through CVCs could

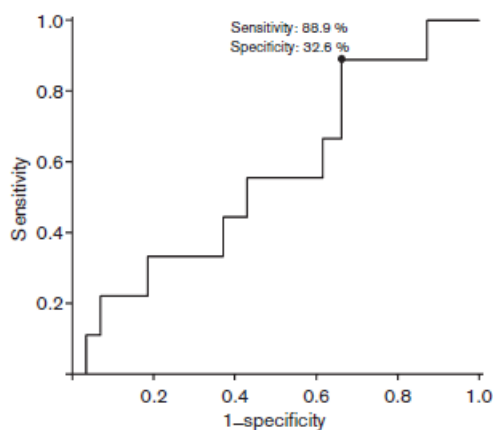


Fig. 1. ROC curve of sensitivity (true-positive results) versus 1-specificity (false-positive results) using different peak values of BG during the treatment cycle as cut-off values to define positivity. For a ROC curve with good discriminatory ability the value of the AUC should be ≥ 0.75 ; however, for the ROC curve presented in this study this value is only 0.562. Thus the peak value of BG during the treatment cycle isn't a useful indicator for detecting IFI. It is impossible to estimate a good cut-off value (with high sensitivity and specificity) for the test because in our ROC curve the increase in sensitivity means almost the same decrease in specificity.

Table 3. Details of 25 out of 38 treatment cycles without signs of IFI and with a BG level >80 pg ml⁻¹ in two consecutive samples where a possible explanation for BG positivity was identifiedBG-positive cycles defined as two consecutive samples with BG level >80 pg ml⁻¹.

Patient initials	Patient's anticancer treatment cycle	BG results (pg ml ⁻¹)	Possible influence of BG performance
J. A.	2	8, 130, 111*, 51*, 80*, 136	(*) Cefepime administration
Z. D.	1	0, 129*, 184*, 163*, 22, 51, 101	(*) Bacteraemia (<i>Enterobacter</i> sp.)
L. H.	1	0, 212, 76, 97, 97, 67, 0*, 49*, 90*	(*) Cefepime administration
F. H.	1	0, 353, 23, 162, 41, 176*, 101*, 174*, 190*, 139*,	(*) Bacteraemia (<i>Enterococcus</i> spp.)
A. J.	1	62, 0*, 189*, 611*, 31, 117*, 51*, 71, 45, 23, 36, 118, 33	(*) Cefepime administration
M. L.	1	82, 65, 74, 63, 43, 12, 84, 21, 14, 69, 104, 62, 33, 110, 28, 0, 40, 6, 45, 33, 0, 56, 76, 85, 0, 43, 36, 0, 91, 37, 149*†, 87*, 75*	(*) Intestinal GvHD and (†) cefepime administration
M. M.	1	0*, 1380*, 96*, 94*, -, 205*, 924*, 392*, 88*	None –however, (*) all the period also false positivity of GM of unknown origin
J. M.	2	46, 74, 75, 17, 17, 52, 21, 0, 10, 248*, 124*, 103*, 207*, 71*, 232*, 0, 64	(*) Very severe intestinal GvHD with severe mucosal damage; BG decrease after empirical antifungal treatment
A. M.	1	75, 48, 90, 75, 186, 71, 141, 120, 311, 216, 0, 64, 61, 55, 118*, 696*, 101*, 159*, 58, 161, 44, 20, 278, 69, 79, 63, 52, 0	(*) Administration of intravenous immunoglobulin
M. N.	1	508*, 139*, 98*, 1209, 49†, 101†, 67†, 118†, 224, 190*	(*) False GM positivity caused by Plasmalyte administration and (†) administration of cefepime
M. P.	1	217, 302, 214, 115*	(*) Cefepime administration
M. R.	1	20, 19, 0, 26*, 160*, 155, 0, 0, 44, 141, 44	(*) Cefepime administration
M. S. 1	1	9, 129, 13*, 130*, 91*, 0, 0, 0, 131, 41, 12, 31, 31, 100	(*) Cefepime administration
M. S. 2	1	0, 0, 0, 0*, 132*, 297*, 104	(*) Cefepime administration
D. S.	1	26, 80, 33, 74, 1072*, 301*, 14*, 140*, 0, 12, 0, 36	(*) Febrile neutropenia with clinical improvement after empirical antifungal therapy
E. S.	1	405*, 274*, 131*, 53, 47, 117, 0, 48, 0, 12, 176, 4, 27, 203†, 278†, 59†, 209†, 213†, 59†, 113†, 55, 68, 24, 62,	(*) Bacteraemia (<i>Enterobacter</i> sp.) and (†) paraoesophageal abscess (culture positive for <i>Enterococcus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp. and <i>Candida</i> sp.)
F. S.	1	120, 266, 115*, 72*, 127*, 61*, 145, 149, 321	(*) Cefepime administration
J. S. 1	1	50, 22, 0, 26, 44, 66, 61, 34, 0, 0, 111*, 110*, 260*, 8, 32, 0	(*) Bacteraemia (<i>Pseudomonas</i> sp.)
J. S. 2	1	62, † 68†, 47†, 125*, 222, 209, 88, 90, 107, 224, -, 203, -, 79, -, 133, 127†	(*) Bacteraemia (<i>Klebsiella</i> sp.) and (†) cefepime administration
K. S.	1	13, 182, 168, 184*, 372*	(*) Cefepime administration
M. S.	1	0, 0, 0, 66, 219, 339*, 742*, 72	(*) Cefepime administration
J. V. 1	1	47, 161, 74, 19, 80*, 128*, 94*, 14*, 137*, 167*, 82*, 78*, 21, 46, 77, 0, 61, 26, 0, 130, 25, 0, 177, 15, 0, 68, 75, 69, 28, 95, 120, 74, 73, 55, 0, 53, 0, 131, 65, 486, 9, 64, 82, 64	(*) Intestinal GvHD
D. V.	1	58, 0, 133, 61, 0, 114*, 223*, 78, 165, 751, 169, 93	(*) Cefepime administration
Z. W.	1	18, 380*, 305*, 415*, 193*, 202*, 20*, 638*, 550*, 4*, 0*, 384*, 72, 670	(*) Severe typhlitis; also mannan repeatedly positive

GvHD, Graft versus host disease.

*, Important samples in the BG column and the corresponding possible explanation for the BG positivity as indicated on the right.

†, Important samples in the BG column and the corresponding possible explanation for the BG positivity as indicated on the right.

contain BG. To test this hypothesis, paired blood samples (one sample from CVC and one from a peripheral venepuncture) were taken from 37 patients out of the presented study – 20 patients without any signs of infection

and 17 with uncomplicated febrile neutropenia. However, only three blood samples obtained via CVC had BG >80 pg ml⁻¹ and in two of them the venepuncture samples were also positive with this cut-off.

Because BG could contaminate blood collection tubes, 40 plastic collection tubes (Monovette 7.5 ml; Sarstedt) used in our department were tested for BG. The BG concentration was >80 pg ml⁻¹ in only three (7.5%) cases. Thus, the vast majority of collecting tubes can be marked as BG negative. Furthermore, any kind of clustering of false-positive results into specific collection or processing dates have not been identified, hence the important factor of contamination of the storage tubes or pipette's tips can be excluded.

All *in vitro* tests mentioned above and performed for the reason of identification of possible sources of BG contamination were performed after the end of the study. However, all production batches of antibiotics, filtered blood products, CVCs and tubes available at the time of analysis were tested. Thus the probability of large differences in results between these two periods, if the same supplier and brand were used, is relatively small.

Although none of the studied factors was identified as the major reason for clinically false-positive results of the BG test, each of them could at least partially influence some patient results. Individual patient data were reviewed in 38 BG-positive treatment cycles (defined as two consecutive samples with a BG level >80 pg ml⁻¹) without IFI (clinically BG-false-positive cycles) in order to find a possible reason for BG positivity during the period. There were only 13 cycles where no clear explanation was found. In the remaining 25 (Table 3), at least some clinically false-positive results during the cycle could be explained.

Conclusions

In summary, although the BG assay can correctly identify patients with IFI, when it is used for screening, the sensitivity of the assay is relatively limited. Moreover, the major limitation of this test is the high frequency of false-positive results. With its extremely low PPV, the positive result of the test in the majority of cases does not mean the presence of IFI. Moreover, in contrast to the GM assay, there wasn't a single or even a small number of causes for these false positivities that could be easily eliminated after their identification. On the contrary, practically all factors and situations that were analysed in our study could partially contribute to the positivity of the test in patients without signs of IFI. Thus, in summary, a combination of all the possible sources of BG that were analysed in our study and possibly others yet unknown lead to such a high rate of false-positive results in often severely ill patients with haematological malignancies. Hence, according to our results, BG positivity cannot be used as a marker for the beginning of a pre-emptive antifungal treatment in this group of patients, and also the inclusion of BG positivity into the new EORTC/MSG criteria for IFI, published in 2008 (De Pauw *et al.*, 2008), thus may need to be reconsidered. The only contribution of the assay in our study was its high NPV. However, this raises the question of the value of a relatively expensive test requiring specific

laboratory equipment. Hence, in the described group of high-risk hosts where IA is until now a major pathogen with double incidence compared to IC, we propose that the BG assay used as a part of the surveillance strategy does not bring any major advantage compared to the GM ELISA test.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Ministry of Health (NS10442-3/2009 and NS10441-3/2009) and the Ministry of Education, Youth and Sports (MSM0021622430 and MSM16198959223) of the Czech Republic supported this work.

REFERENCES

- Ascioglu, S., Rex, J. H., de Pauw, B., Bennett, J. E., Bille, J., Crokaert, F., Denning, D. W., Donnelly, J. P., Edwards, J. E. & other authors (2002). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 34, 7–14.
- De Pauw, B., Walsh, T. J., Donnelly, J. P., Stevens, D. A., Edwards, J. E., Calandra, T., Pappas, P. G., Maertens, J., Lortholary, O. & other authors (2008). Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46, 1813–1821.
- Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeke, E., De Munter, P., Meersseman, W., Van Meensel, B., Van Eldere, J. & other authors (2009). Serum (1→3)- β -D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. *J Clin Microbiol* 47, 3871–3874.
- Digby, J., Kalbfleisch, J., Glenn, A., Larsen, A., Browder, W. & Williams, D. (2003). Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 882–885.
- Ellis, M., Al-Ramadi, B., Finkelman, M., Hedstrom, U., Kristensen, J., Ali-Zadeh, H. & Klingspor, L. (2008). Assessment of the clinical utility of serial β -D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol* 57, 287–295.
- Garey, K. W., Rege, M., Pai, M. P., Mingo, D. E., Suda, K. J., Turpin, R. S. & Bearden, D. T. (2006). Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* 43, 25–31.
- Hachem, R. Y., Kortoyiannis, D. P., Chemaly, R. F., Jiang, Y., Reitzel, R. & Raad, I. (2009). Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) β -D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol* 47, 129–133.
- Kedzierska, A., Kochan, P., Pietrzyk, A. & Kedzierska, J. (2007). Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosis of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1→3)- β -D-glucan antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26, 755–766.
- Koo, S., Bryar, J. M., Page, J. H., Baden, L. R. & Marty, F. M. (2009). Diagnostic performance of the (1→3)- β -D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis* 49, 1650–1659.
- Maertens, J., Van Eldere, J., Verhaegen, J., Verbeke, E., Verschakelen, J. & Boogaerts, M. (2002). Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis

- in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 186, 1297–1306.
- Maertens, J., Theunissen, K., Verbeken, E., Lagrou, K., Verhaegen, J., Boogaerts, M. & Eldere, J. V. (2004). Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 126, 852–860.
- Maertens, J., Theunissen, K., Verhoef, G., Verschakelen, J., Lagrou, K., Verbeken, E., Wilmer, A., Verhaegen, J., Boogaerts, M. & other authors (2005). Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 41, 1242–1250.
- Maertens, J. A., Klontz, R., Masson, C., Theunissen, K., Meersseman, W., Lagrou, K., Heinen, C., Crepin, B., Van Eldere, J. & other authors (2007). Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 44, 1329–1336.
- Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A. & Corey, L. (2002). Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34, 909–917.
- Marr, K. A., Balajee, S. A., McLaughlin, L., Tabouret, M., Bentsen, C. & Walsh, T. J. (2004). Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 190, 641–649.
- Marty, F. M., Lowry, C. M., Lempitski, S. J., Kubiak, D. W., Finkelman, M. A. & Baden, L. R. (2006). Reactivity of (1→3)- β -D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3450–3453.
- Mattiuizi, G., Kantarjian, H., Odabasi, Z., Alvarado, G., Paetznick, V., Rodríguez, J., Chen, E. & Ostrosky-Zeichner, L. (2007). Diagnostic performance of serum galactomannan (GM) and β -glucan (BG) in a cohort of 395 patients (pts) with acute leukemia on antifungal prophylaxis. In *Program and Abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL*, abstract M-578. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Mengoli, C., Cruciani, M., Barnes, R. A., Loeffler, J. & Donnelly, J. P. (2009). Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9, 89–96.
- Mennink-Kersten, M. A., Ruegebrink, D. & Verweij, P. E. (2007). Reactivity of bacteria with the 1,3- β -glucan assay. In *Program and Abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL*, abstract M-568. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Nagasawa, K., Yano, T., Kitabayashi, G., Morimoto, H., Yamada, Y., Ohata, A., Usami, M. & Horiuchi, T. (2003). Experimental proof of contamination of blood components by (1→3)- β -D-glucan caused by filtration with cellulose filters in the manufacturing process. *J Artif Organs* 6, 49–54.
- Obayashi, T., Negishi, K., Suzuki, T. & Funata, N. (2008). Reappraisal of the serum (1→3)- β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections – a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* 46, 1864–1870.
- Odabasi, Z., Mattiuizi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R. J., Ketchum, P. A., Finkelman, M. A., Rex, J. H. & other authors (2004). β -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 39, 199–205.
- Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B. D., Kett, D. H., Vazquez, J., Pappas, P. G., Saeki, F., Ketchum, P. A., Wingard, J., Schiff, R. & other authors (2005). Multicenter clinical evaluation of the (1→3)- β -D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 41, 654–659.
- Pagano, L., Caira, M., Candoni, A., Offidani, M., Fianchi, L., Martino, B., Pastore, D., Picardi, M., Bonini, A. & other authors (2006). The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 91, 1068–1075.
- Pazos, C., Ponton, J. & Del Palacio, A. (2005). Contribution of (1→3)- β -D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 43, 299–305.
- Persat, F., Topenot, R., Piens, M. A., Thiebaut, A., Dannaoui, E. & Picot, S. (2002). Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidosis. *Mycoses* 45, 455–460.
- Persat, F., Ranque, S., Derouin, F., Michel-Nguyen, A., Picot, S. & Sulhian, A. (2008). Contribution of the (1→3)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 46, 1009–1013.
- Pickering, J. W., Sant, H. W., Bowles, C. A., Roberts, W. L. & Woods, G. L. (2005). Evaluation of a (1→3)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 43, 5957–5962.
- Sendid, B., Poirot, J. L., Tabouret, M., Bonnin, A., Caillot, D., Camus, D. & Poulain, D. (2002). Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol* 51, 433–442.
- Senn, L., Robinson, J. O., Schmidt, S., Knaup, M., Asahi, N., Satomura, S., Matsuura, S., Duvoisin, B., Bille, J. & other authors (2008). 1,3- β -D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 46, 878–885.
- Usami, M., Ohata, A., Horiuchi, T., Nagasawa, K., Wakabayashi, T. & Tanaka, S. (2002). Positive (1→3)- β -D-glucan in blood components and release of (1→3)- β -D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion* 42, 1189–1195.
- von Eiff, M., Roos, N., Schulten, R., Hesse, M., Zuhlsdorf, M. & van de Loo, J. (1995). Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 62, 341–347.
- Watanabe, T., Yasuoka, A., Tanuma, J., Yazaki, H., Honda, H., Tsukada, K., Honda, M., Gatanaga, H., Teruya, K. & other authors (2009). Serum (1→3)- β -D-glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 49, 1128–1131.
- WHO (1979). *WHO Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*, 1st edn, pp. 15–22. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

- 5.2.2. Racil, Z., Kocmanova, I., Weinbergerova, B., Winterova, J., Lengerova, M., Hrcirova, K., Mayer, J.: Detekce 1,3- β -D glukanu v diagnostice invazivních mykotických infekcí u nemocných s hematologickou malignitou: přínos metody ve skríníngu invazivních mykóz a v konfirmaci galaktomanan pozitivních. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 15, 2009, 2: 48-57**

Detekce 1,3- β -D glukanu v diagnostice invazivních mykotických infekcí u nemocných s hematologickou malignitou: přínos metody ve skrínungu invazivních mykóz a v konfirmaci galaktomanan pozitivních vzorků

Z. RÁČIL¹, I. KOČMANOVÁ^{2,3}, B. WEINBERGEROVÁ¹, J. WINTEROVÁ¹,
M. LENGEROVÁ¹, K. HRNČIŘOVÁ¹, J. MAYER¹

¹Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská Fakulta Masarykovy Univerzity v Brně

²Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

³Ústav mikrobiologie FN a LF UP Olomouc

SOUHRN

Ráčil Z., Kocmanová I., Weinbergerová B., Winterová J., Langerová M., Hrnčířová K., Mayer J.: Detekce 1,3- β -D glukanu v diagnostice invazivních mykotických infekcí u nemocných s hematologickou malignitou: přínos metody ve skrínungu invazivních mykóz a v konfirmaci galaktomanan pozitivních vzorků

Východiska a cíle: 1,3- β -D glukán (BG) je antigenem buněčné stěny mykotických patogenů a lze jej detekovat jedním z komerčně dostupných testů určených k časné diagnostice invazivních mykóz (IFI). Hlavní deklarovanou výhodou testu je jeho široké pokrytí různých původců IFI. Naším cílem byla v první řadě retrospektivní analýza využitelnosti monitoringu BG ve skrínungu hlubokých mykóz a v druhé řadě ověření možnosti konfirmovat pomocí tohoto markeru pozitivní výsledek detekce aspergilového antigenu – galaktomananu (GM) – a tak zvýšit pravděpodobnost správné diagnózy invazivní aspergilózy (IA).

Pacienti a metody: V období od ledna 2005 do června 2007 byl u pacientů ve středním a vysokém riziku rozvoje IFI prováděn odběr krve na detekci BG pro skrínung hlubokých mykóz. Navíc pak od února do října 2007 byli všichni nemocní, kteří splňovali kritérium pozitivní GM v rámci pravidelného monitoringu, vyšetřeni současně na BG.

Výsledky: V rámci skrínungu bylo odebráno a na přítomnost BG vyšetřeno 1 154 vzorků séra v průběhu 104 léčebných cyklů. Incidence IFI v souboru byla 17,3 % (n = 18) z toho pravděpodobná a prokázaná invazivní mykóza byla zjištěna v 9 případech (8,6 %). Jako nejprínosnější ve smyslu senzitivity, specifity, PPV a NPV byl identifikován cut off při koncentraci BG v 1 vzorku nad 80 pg/ml, kdy výše zmíněné hodnoty byly 88,9 %, 40,7 %, 13,6 % a 97,2 %. Klinicky relevantnější však byla limitní hodnota dvou konsekutivních vzorků s koncentrací BG nad 60 pg/ml (66,7 %, 47,7 %, 11,8 % a 93,2 %). Největším omezením metody byla nízká PPV způsobená velice častou falešnou pozitivitou testu. Metoda při kritériích 1 vzorek nad 80 pg/ml označila 65 cyklů a při dvou vzorcích nad 60 pg/ml 58 cyklů za pozitivní – v 51 případech (78,4 %), respektive 45 (77,5 %) však šlo o pozitivitu falešnou. V naší práci jsme neprokázali vztah pozitivní výsledku testu k vyšší frekvenci podání empirické antimykotické léčby, k přítomnosti a stupni mukozitidy, ke kolonizaci kvasinami, aplikaci vybraných antibiotik a infuzních roztoků, stejně tak k bakteriemiím. Při ověřování pozitivity (konfirmaci) GM bylo identifikováno 40 epizod u 39 nemocných. V 31 (78 %) případech byla pozitivita GM falešná a nebyla spojena s klinickými příznaky IA. Senzitivita GM v diagnostice IA byla 100 %, ale PPV pouze 18 %. Konfirmace výsledků konsekutivní pozitivity GM s použitím hraničního IP > 0,5 konsekutivní pozitivitou BG při cut off nad 60 pg/ml se jeví pro diagnostiku IA jako nejvýhodnější – při zachování maximální senzitivity byla eliminována většina falešných pozitivit GM a PPV při kombinaci stoupla na 88 %.

Závěr: Naše analýza vycházející z rutinního použití detekce BG pro skrínung IFI prokázala omezenou použitelnost této metody. Při limitované senzitivě jsou výsledky spojeny s velmi nízkou PPV, způsobenou častými falešnými pozitivitami.

Detekce BG je ale výhodným doplňujícím vyšetřením u nemocných s konsekutivní pozitivitou GM, kde současná pozitivita GM a BG dokáže zvýšit pozitivní prediktivní hodnotu kombinace testů v diagnostice IA a tak eliminovat většinu falešných pozitivit GM.

Klíčová slova: invazivní mykotická infekce, sérologické metody, 1,3- β -D glukán, hematologické malignity

SUMMARY

Ráčil Z., Kocmanová I., Weinbergerová B., Winterová J., Langerová M., Hrnčířová K., Mayer J.: Detection of 1,3- β -D glucan for diagnosis of invasive fungal infections in hematological patients: usefulness for screening of invasive mycosis and for confirmation of galactomannan positive results

Background and aims: 1,3- β -D glucan (BG) – the antigen of fungal cell wall can be detected by a commercially available test for early detection of invasive fungal infections (IFI). The main advantage of this test is its broad coverage of fungal species. The aim of our study was to evaluate usefulness of BG detection for screening of IFI and for confirmation of galactomannan (GM) positive blood samples. Combination of the results of both tests could lead to correct and early diagnosis of invasive aspergillosis (IA).

Patients and methods: Between January 2005 and July 2007 blood samples were collected in patients from intermediate to high risk of IFI. Moreover, between February and October 2007 all patients that had consecutive positive results of GM had their positive samples tested also for BG.

Results: In BG screening study, 1154 of blood samples from 104 treatment cycles were tested for BG. The incidence of IFI was 17,3% (n = 18) and probable or proven IFI was detected in 9 cases (8,6%). The highest sensitivity, specificity, PPV and NPV (88, 9%, 40, 7%, 13, 6% and 97, 2%) were obtained when as criteria for positivity cut off 80 pg/ml and one positive result were used. When consecutive positivity of the test was applied as criterion, cut off 60 pg/ml was found more useful (sensitivity 66,7%, specificity 47,7%, PPV 11,8% and NPV 93,2%). Low PPV, caused by frequent false positive results, was identified as main limitation of this assay. 65 treatment cycles were positive if 1 sample above 80 pg/ml was used as a cut off for positivity. If consecutive positivity with cut off 60 pg/ml was used,

58 treatment cycles were positive. But in 51 (78,4%) and 45 (77,5%) cases, respectively, the positivity was not associated with IFI (false positivity). We did not find any correlation between positive BG assay result and frequency of empirical antifungal treatment, mucositis, yeast colonization, administration of selected antibiotics or infusion solutions or bacteraemia.

In our confirmation study, 40 GM positive episodes in 39 patients were identified. In 31 (78%) GM positivity was false and was not associated with clinical signs and symptoms of IA. Sensitivity of GM detection in IA was 100% but PPV only 18%. Confirmation of consecutive GM positive samples (using cut off index positivity 0,5) by consecutive positivity of BG (with cut off 60 pg/ml) was found very useful for diagnosis of IA – most of GM false positive results were eliminated and PPV increased to 88%.

Conclusions: Our analysis focused on routine use of BG test for panfungal screening of IFI in patients with hematological malignancy and confirmed limited usefulness of this test in such setting. Low sensitivity together with low PPV are major limits of this test. On the other hand, BG testing seems to be a promising tool for confirmation of consecutive GM positive result in serum in patients with IA. Positivity of both tests could increase their PPV of tests and eliminate false positive results.

Keywords: Invasive fungal infections, serological methods, 1,3-β-D glucan, hematological malignancy

Klin mikrobiol inf lék 2009;15(2):49–58

Adresa: MUDr. Zdeněk Ráčil, Interní hematologická klinika FN Brno, Jihlavská 20, 62500, Brno, e-mail: zracil@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 10. 3. 2008

Přijato k tisku: 12. 5. 2009

Úvod

Incidence invazivních mykotických infekcí (IFI) u hematologických nemocných stále narůstá. Je to následek zvyšující se agresivity chemoterapeutických režimů, používání nových léků (alemtuzumab, rituximab), navýšení počtu alogenních transplantací krvetvorné tkáně (především od nepřibuzného dárce) a transplantací u starších a nebo velmi předléčených pacientů, stejně tak jako používání nových imunosupresiv v léčbě reakce štěpu proti hostiteli (GvHD = Graft versus Host Disease) [1]. IFI jsou spojené s vysokou morbiditou a mortalitou [2] a často bývají diagnostikovány pozdě a nebo vůbec vzhledem k malé senzitivě konvenčních diagnostických metod [1]. V diagnostice většiny případů invazivní kandidózy (IC) je základním kamenem kultivace původce z krve nebo jiných sterilních materiálů, která ale bývá pozitivní přibližně v 50 % případů. Nové zobrazovací metody (vysoce rozlišovací CT – HRCT) dokáží s velkou senzitivou zachytit plicní patologii u invazivní aspergillové infekce (IA), ale obraz je většinou nespecifický. K definitivní diagnóze IA je nutné provedení bronchoalveolární laváže nebo plicní biopsie s histopatologickým a kultivačním vyšetřením, jejichž senzitivita je však bohužel omezená a navíc provedení může být často nemožné pro kritický stav nemocného [3,4]. Tyto důvody limitují použitelnost konvenčních postupů a vedou k rozvoji tzv. „nekultivačních“ diagnostických metod s cílem zvýšit počet zachycených případů invazivních mykóz a maximálně zkrátit dobu do zahájení cílené antimykotické léčby a tak zlepšit prognózu nemocných s IFI.

První ze skupiny „nekultivačních“ metod jsou molekulárně biologické testy – zejména různé varianty polymerázové řetězové reakce (PCR), která detekuje nukleové kyseliny hub. Vzhledem k jejich velké heterogenitě jsou v současné době využitelné spíše k výzkumným účelům.

Druhá skupina je pak zastoupena metodami sérologickými, pomocí kterých můžeme stanovit fungální antigeny nebo protilátky proti nim v tělesných tekutinách. Zatímco monitoring galaktomananu (Platelia® Aspergillus, Bio-Rad)

má již dnes pevné místo v časné diagnostice IA, s monitorováním mananu (Platelia® Candida Ag, BioRad) a protilátek proti němu – antimananu (Platelia® Candida Ab/Ak/Ac, BioRad) v diagnostice IC tak rozsáhlé zkušenosti dosud nejsou [5,6].

K sérologickým metodám patří rovněž monitoring 1,3-β-D-glukanu (BG). BG je polysacharid, který obsahuje buněčná stěna prakticky všech mykotických patogenů. Může být detekován v tělesných tekutinách při invazivní infekci způsobené jak kmeny kandid a aspergilů, tak při infekci způsobené vzácnými patogeny jako je *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces* spp. a také *Pneumocystis jirovecii*. Vzhledem k malému množství BG ve stěně kryptokoků a zygomycet (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp.) a k minimálnímu uvolňování z ní není BG detekovatelný při infekci vyvolané těmito patogeny [7,8,9]. K záchytu antigenu se používá kolorimetrického testu založeného na schopnosti BG reagovat s amébocyty získanými z klepítkačů *Ostrorepa* amerického (*Limulus polyphemus*) nebo *Ostrorepa* východoasijského (*Tachypleus tridentatus*) [10]. Existuje několik komerčně dostupných setů lišících se technickým provedením, nicméně v Evropě a USA je rozšířen jen jeden z nich – Fungitell™ (Associates of Cape Code, USA).

Cílem této práce bylo ověřit využitelnost detekce BG pro časnou „panfungální“ diagnostiku IFI při pravidelném skríningu vysoce rizikových hematologických nemocných a také ověřit možnost konfirmovat galaktomanan pozitivní vzorky a tak zpřesnit diagnostiku invazivní aspergillozy.

Pacienti a metody

Sledovaná populace a design

V období od ledna 2005 do června 2007 probíhal na Interní hematologické klinice FN Brno rutinní monitoring detekce 1,3-β-D glukanu (BG) v krvi: pro skrínění byli vybráni pacienti s hematologickou malignitou a současně vysokým rizikem rozvoje invazivní mykotické infekce (nemocní podstupující alogenní transplantaci krvetvorné tkáně,

pacienti s akutní leukémií léčení indukční/reindukční chemoterapií a jedinci po aplikaci vysokodávkované chemoterapie s následnou podporou autologní transplantací krvetvorné tkáně. Odběry krve byly prováděny pravidelně dvakrát týdně a to od příjmu do propuštění, respektive po propuštění ještě jednou týdně do dne +100 u nemocných po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně.

Nemocní byli obvykle hospitalizováni na standardním třílůžkovém pokoji s centrální úpravou vzduchu. Výjimku tvořili pacienti podstupující alogenní transplantaci krvetvorné tkáně, kteří byli umístěni na jednolůžkových pokojích s úpravou vzduchu pomocí HEPA filtru až do doby přihojení štěpu (absolutní počet neutrofilních granulocytů $> 1,0 \times 10^9/l$). Po dobu neutropenie, respektive u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně také po dobu intenzivní imunoprese pro reaktivaci štěpu proti hostiteli (Graft Versus Host Disease – GvHD), byla podávána antimykotická profylaxe flukonazolem v dávce 400 mg/den a méně často vorikonazolem v dávce 400 mg/den.

Během hospitalizace bylo u pacientů denně prováděno klinické vyšetření lékařem a sledován rozvoj příznaků invazivní mykotické infekce. Konvenční snímek srdce a plic byl indikován vstupně a následně v průběhu febrilní neutropenie minimálně jednou týdně, eventuelně častěji. V týdenním intervalu byla prováděna bakteriologická a mykologická surveillance v moči, stěru z rekta a dutiny ústní. Dva až třikrát týdně byl prováděn odběr krve pro detekci galaktomananu (GM) ELISA metodikou (Platelia® Aspergillus, Bio-Rad). Odběry hemokultur a mikrobiologická vyšetření ostatních klinických materiálů (především sputa) byly prováděny v případě rozvoje febrilií, respektive klinických příznaků infekce. Při zvýšené pravděpodobnosti vzniku invazivní mykotické infekce (febrilní neutropenie nereagující na 5 dnů antibiotické léčby, rozvoj plicních infiltrátů na konvenčním rentgenovém snímku plic, pozitivní kultivace s průkazem vláknité houby v materiálu z dýchacích cest) následovala série vyšetření s cílem maximálního možného průkazu vyvolávajícího agens – HRCT plic a v případě pozitivity pak bronchoalveolární laváž.

Empirická antibiotická léčba febrilní neutropenie zahrnovala monoterapii cefepimem, piperacilin/tazobaktamem výjimečně meropenemem. V případě klinické indikace byl do kombinace přidán vankomycin nebo aminoglykosid. Pro empirickou antimykotickou léčbu byl v absolutní většině případů zvolen konvenční amfotericin B, výjimečně kaspofungin nebo vorikonazol. Při úmrtí nemocného byla v maximálně možné míře a po souhlasu rodiny provedena patologicko-anatomická pitva.

Od února do října 2007 pak navíc byli „galaktomanan pozitivní“ pacienti potvrzováni pomocí detekce glukanu. Indikace k vyšetření GM byly různé – nejčastěji se však jednalo o skrínig invazivní aspergilózy (IA) u vysoce rizikových nemocných a nebo o diferenciální diagnostiku plicních infiltrátů zjištěných na zobrazovacích metodách. K laboratorním výsledkům byla retrospektivně analyzována zdravotnická dokumentace s cílem určit pravděpodobnost IA.

Zpracování materiálů

Srážlivá krev odebraná nemocným byla ihned (při provedení odběru v pracovní dobu) nebo nejpozději následující

Tabulka 1

Charakteristika souboru s využitím detekce 1,3- β -D glukanu pro skrínig invazivních mykóz (HSCT – transplantace krvetvorné tkáně, GvHD – reakce štěpu proti hostiteli, IFI – invazivní mykotická infekce)

	n	%
Počet pacientů	91	
Muži/Ženy	57/ 34	63/ 37
Počet léčebných cyklů	104	
Počet vzorků krve	1 154	
Průměrný počet vzorků na léčebný cyklus	11,1	
Základní onemocnění	91	
Akutní myeloidní leukémie	45	49,5
Non Hodgkinský lymfom	12	13,2
Akutní lymfoblastická leukémie	9	9,9
Chronická myeloidní leukémie	9	9,9
Mnohočetný myelom	8	8,8
Chronická lymfatická leukémie	5	5,5
Hodgkinský lymfom	2	2,2
Aplastická anémie	1	1,0
Charakter léčebných cyklů	104	
Akutní leukémie indukční/ reindukční léčba	45	43,3
Alogenní nepříbuzenecká HSCT	20	19,2
Alogenní příbuzenecká HSCT	17	16,3
Autologní HSCT	17	16,3
Léčba GvHD	3	2,9
Konsolidační léčba akutní leukémie	1	1,0
Ostatní	1	1,0
Pravděpodobnost invazivní mykózy dle EORTC/MSG v léčebném cyklu	104	
Bez invazivní mykotické infekce	86	82,7
Možná invazivní mykotická infekce	9	8,7
Pravděpodobná invazivní mykotická infekce	8	7,7
<i>z toho invazivní aspergilóza</i>	<i>8</i>	
<i>z toho invazivní kandidóza</i>	<i>0</i>	
<i>z toho ostatní invazivní mykózy</i>	<i>0</i>	
Prokázaná invazivní mykotická infekce	1	0,9
<i>z toho invazivní aspergilóza</i>	<i>0</i>	
<i>z toho invazivní kandidóza</i>	<i>1</i>	
<i>z toho ostatní invazivní mykózy</i>	<i>0</i>	

den ráno (byl-li odběr proveden v nočních hodinách) transportována na mikrobiologické oddělení ke zpracování. Do odeslání byl materiál na hematologickém pracovišti uchovávan na vyčleněném místě při pokojové teplotě. Na mikrobiologickém oddělení byl vzorek zcentrifugován (3 minuty/2 000–3 000 otáček), odděleno sérum a přeneseno po 300 µl do sterilních označených šroubovacích zkumavek typu Eppendorf. Zkumavky byly zamrazeny na –20 °C a takto uchovávány do okamžiku zpracování, což bylo v případě testování galaktomananu maximálně 72 hodin. V případě testování BG byly k dispozici při této teplotě až do ukončení projektu (testováno bylo vždy jen 5 µl séra).

Detekce 1,3-β-D glukanu pomocí komerční soupravy Fungitell™ (Associates of Cape Cod, USA)

Laboratorní diagnostika 1,3-beta-D glukanu pomocí Fungitell™ využívá tzv. G-testu, který je založen na schopnosti 1,3-beta-D glukanu reagovat s lyzátem amébocytů kraba *Limulus polyphemus*. Polysacharid aktivuje v amébocyttech obsažený faktor G (proenzym serinové proteázy), který spouští krátkou kaskádovou reakci, specifickou pro glukany obsahující právě tuto 1,3-beta-D glykosidickou vazbu. Tato kaskáda je vizualizována odštěpením barevného produktu z přidaného chromogenního substrátu.

Sérum ošetřené alkalickou reagentií bylo po 10 minutové inkubaci při 37 °C v mikrotitrační destičce smícháno s rekonstituovanými amébocytami a chromogenním substrátem. Kinetická reakce probíhala při teplotě 37 °C (tato teplota byla udržována po celou dobu měření) a absorbance v jamkách (narůstající vlivem tvorby barevného produktu) byla měřena ve 20 vteřinových intervalech po dobu 40 mi-

nut při 405/490 nm za použití automatického readeru iEMS MF se softwarovým vybavením Ascent Version 2.6 (Lab-systems, Finland).

Výsledná změna absorbance v čase byla pro každý vzorek dosazena do současně testované kalibrační křivky s rozmezím 31,25 pg/ml až 500 pg/ml a odvozena koncentrace polysacharidu ve vzorku. Dle doporučení výrobce byla za pozitivní považována séra s koncentrací vyšší než 80 pg/ml a za negativní séra pod 60 pg/ml. Séra s koncentrací 60–80 pg/ml byla označena jako „hraniční“.

Detekce galaktomananu pomocí komerčního setu Platelia® Aspergillus EIA (BioRad)

Galaktomanan byl vyšetřován metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Šlo o jedнокrokovou sendvičovou reakci, která s využitím krysích monoklonálních protilátek EBA-2 detekuje volný galaktomanan v séru. Platelia® Aspergillus EIA je semikvantitativní reakce – výsledky jsou uváděny pomocí tzv. indexu pozitivivity (IP) – což je poměr optické denzity vzorku a optické denzity kontrolního séra o koncentraci 1 ng galaktomananu/ml. Toto bezrozměrné číslo tedy zhruba odpovídá koncentraci polysacharidu ve vzorku.

Výsledky testu byly hodnoceny takto: séra s IP > 0,7 byla považována za pozitivní, s IP = 0,5–0,7 za hraniční a s IP < 0,5 za negativní. Jako „galaktomanan pozitivní“ byl označen pacient se dvěma po sobě jdoucími vzorky s IP > 0,5.

Pro vyloučení laboratorní kontaminace byl první pozitivní vzorek u každého pacienta vždy retestován. Při pozitivitě retestu byl vyžádán a následně otestován další vzorek séra.

Tabulka 2

Senzitivita, specifická, pozitivní prediktivní hodnota (PPV) a negativní prediktivní hodnota (NPV) detekce 1,3-β-D glukanu (BG) pro skrínění invazivních mykotických infekcí.

	1 vzorek > 60 pg/ml	1 vzorek > 80 pg/ml	2 vzorky > 60 pg/ml	2 vzorky > 80 pg/ml
Senzitivita (%)	88,9	88,9	66,7	44,4
Specifická (%)	18,6	40,7	47,7	53,5
PPV (%)	10,3 %	13,6 %	11,8 %	9,1 %
NPV (%)	94,1 %	97,2 %	93,2 %	90,2 %

Tabulka 3

Podíl nemocných léčených preemptivně a empiricky antimykotiky ve skupině nemocných BG pozitivních a negativních při různých cut off (BG – 1,3 β-D glukán, ns – není významné)

Cut off	Léčení antimykotikem v průběhu cyklu		statistická významnost
	u BG pozitivních (%)	u BG negativních (%)	
1 vzorek > 60 pg/ml	40	28	ns
1 vzorek > 80 pg/ml	43	28	ns
2 vzorky > 60 pg/ml	45	28	ns
2 vzorky > 80 pg/ml	41	35	ns

Definice pravděpodobnosti invazivní mykotické infekce

Všechny léčebné cykly byly klasifikovány na základě pravděpodobnosti invazivní mykotické infekce (IFI) pomocí EORTC/MSG (European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group) kritérií [11].

Jako „prokázaná“ IFI byl označen stav u nemocných s pozitivním histologickým/kultivačním průkazem *Aspergillus* spp., *Candida* spp. event. jiných mykotických patogenů z primárně sterilního místa. „Pravděpodobná“ IFI (prakticky pouze IA) byla přiřazena pacientům s kombinací rizikových faktorů, klinických příznaků (nález na zobrazovacích metodách současně s příznaky orgánového poškození) a mikrobiologických kritérií (průkaz *Aspergillus* spp. v materiálu z dýchacích cest nebo pozitivita GM v séru eventuelně v tekutině z BAL). „Možná“ IFI (opět prakticky pouze IA) byla charakterizována izolovanou přítomností buď klinických nebo mikrobiologických faktorů u rizikového nemocného. V ostatních případech se jednalo o léčebné cykly bez IFI.

Statistická analýza

Statistické zpracování bylo provedeno na úrovni léčebného cyklu (per patient analysis). Na základě práce Mennink-Kerstenové et al. [12] byli jako skutečně pozitivní označeni pouze nemocní s prokázanou a pravděpodobnou IFI a naopak jako skutečně negativní pak případy bez IFI. Senzitivita, specifická, pozitivní a negativní prediktivní hodnota byly vypočítány pomocí 2 x 2 tabulky. Hodnocení statistické významnosti četnosti empirického a preemprvního podávání antimykotik v jednotlivých skupinách léčebných cyklů bylo provedeno pomocí binomického testu.

Výsledky**1,3-β-D glukán ve skríningu invazivních mykotických infekcí****Základní charakteristika souboru**

Od ledna 2005 do června 2007 jsme provedli skrínung invazivních mykotických infekcí (IFI) pomocí detekce 1,3-β-D glukánu (BG) u 91 vysoce rizikových nemocných s hematologickou malignitou podstupujících 104 léčebných cyklů. Celkem bylo odebráno a na přítomnost BG vyšetřeno 1 154 vzorků séra (průměr 11,1 vzorku/léčebný cyklus).

Absolutní většina z celkového počtu monitorovaných léčebných cyklů proběhla bez známek IFI dle EORTC/MSG kritérií. Incidence IFI (možné, pravděpodobné, prokázané) v souboru byla 17,3 % (n = 18). Pravděpodobná a prokázaná invazivní mykóza však byla diagnostikována jen v 9 případech (8,6 %) – z toho v 8 případech pravděpodobná invazivní aspergilóza a v jednom případě prokázaná invazivní kandidóza (kandidémie).

Charakteristiku nemocných, léčebných cyklů a případů invazivních mykotických infekcí ukazuje *tabulka 1*.

Během všech léčebných cyklů bylo podáváno profylakticky antimykotikum – v 96 (92 %) cyklech se jednalo o flukonazol a v 8 (8 %) o vorikonazol.

Využitelnost BG pro skrínung IFI

Z celkového počtu vyšetřených vzorků sér vykazovalo 422 (37 %) obsah BG v koncentraci vyšší než 60 pg/ml a 308 (27 %) z nich pak v koncentraci vyšší než 80 pg/ml.

V 86 (83 %), respektive v 65 (63 %) ze 104 léčebných cyklů byla alespoň v jednom odebraném vzorku v jeho prů-

Tabulka 4

Kolonizace kvasinkami během léčebných cyklů, které byly bez známek IFI a současně BG pozitivní při různých limitních hodnotách testu (BG – 1,3-β-D glukán, IFI – invazivní mykotické infekce)

Bez známek IFI a současně BG pozitivní	n	Z toho kolonizováno kmeny kvasinek (%)
2 vzorky > 60 pg/ml	Ano	45
	Ne	41
1 vzorek > 80 pg/ml	Ano	51
	Ne	35

Tabulka 5

Přítomnost mukozitidy jakéhokoliv stupně a stupně III a IV dle WHO během léčebných cyklů, které byly bez známek invazivní mykotické infekce a současně BG pozitivní při různých limitních hodnotách testu (BG – 1,3 β-D glukán, IFI – invazivní mykotické infekce)

Bez známek IFI a současně BG pozitivní	n	Přítomna mukozitida (%)	Přítomna mukozitida gr. III a IV dle WHO (%)
2 vzorky > 60 pg/ml	Ano	45	47
	Ne	41	49
1 vzorek > 80 pg/ml	Ano	51	43
	Ne	35	54

běhu naměřena koncentrace glukanu > 60 pg/ml, respektive > 80 pg/ml. V 58 (56 %) (při cut off 60 pg/ml) respektive ve 49 (47 %) (při cut off 80 pg/ml) léčebných cyklech byly tyto hodnoty naměřeny minimálně ve 2 vzorcích jdoucích po sobě (konsekutivní pozitivita).

Senzitivitu, specifickou, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu při použití cut off 60 a 80 pg/ml u izolovaných nebo konsekutivních pozitivit ukazuje *tabulka 2*.

Při použití izolované positivity byla senzitivita testu v detekci IFI shodná jak pro cut off 60 pg/ml tak pro hodnotu cut off 80 pg/ml a to 88,9 % – test dokázal zachytit 8 z 9 pravděpodobných a prokázaných IFI (v obou případech nebyla zachycena invazivní kandidóza). Vzhledem k extrémně nízké specifitě (18,6 %) při cut off 60 pg/ml se zdá relevantnější použití vyšší hodnoty cut off (80 pg/ml), kdy při stejné senzitivě významně narostla specifita testu z 18,6 % na 40,7 %.

Tabulka 6
Základní charakteristika souboru s využitím 1,3 β-D
glukanu pro konfirmaci GM pozitivních vzorků
(HSCT – transplantace krvetvorné tkáně)

	n	%
Počet pacientů	39	
Počet léčebných cyklů	40	
Základní onemocnění	39	
Akutní myeloidní leukémie	16	41,0
Non Hodgkinský lymfom	5	12,8
Akutní lymfoblastická leukémie	3	7,7
Mnohočetný myelom	5	12,8
Chronická lymfatická leukémie	4	10,3
Hodgkinský lymfom	2	5,1
Ostatní	4	10,3
Charakter léčebných cyklů	40	
Akutní leukémie indukční/reindukční léčba	13	33
Alogenní nepřibuzenecká HSCT	5	12
Alogenní přibuzenecká HSCT	4	10
Autologní HSCT	8	20
Kortikoterapie	2	5
Rituximab/alemtuzumab (+/- chemoterapie)	3	7,5
Ostatní (CHOP, MINE)	3	7,5
Bez léčby	2	5
Pravděpodobnost invazivní aspergilózy dle EORTC/MSG v léčebném cyklu	40	
Bez invazivní mykotické infekce	31	77,5
Možná invazivní mykotická infekce	2	5
Pravděpodobná invazivní mykotická infekce	7	17,5
Prokázaná invazivní mykotická infekce	0	0

V situaci, kdy byl za pozitivního označen nemocný s konsekutivní pozitivitou, vedlo použití hraniční hodnoty 80 pg/ml k velmi výraznému snížení senzitivity testu až na 44,4 % (test označil jako pozitivní pouze 4 z 9 pravděpodobných/prokázaných IFI) a to jen při malém zvýšení specifity. Ovšem při vyžadování konsekutivní positivity vychází z našich výsledků jako výhodnější limitní hodnota 2krát nad 60 pg/ml, která byla spojena s vyšší senzitivou – 66,7 % (pozitivních bylo 6 z 9 pravděpodobných/prokázaných IFI).

Nezávisle na použitém cut off nebo konsekutivní pozitivitě byla v našem souboru významně nízká pozitivní prediktivní hodnota testu (PPV) pohybující se mezi 9,1–13,6 %. Pozitivní výsledek testu tedy v absolutní většině případů neznamenal, že nemocný prodělává invazivní mykózu. Při limitní hodnotě 1krát nad 80 pg/ml bylo pozitivních 65 léčebných cyklů a z toho pouze v 8 respektive 6 případech byla splněna kritéria pravděpodobné respektive možné IFI. V 51 léčebných cyklech (78,4 % z BG pozitivních) nebyly přítomny žádné známky invazivní mykózy. Podobné výsledky byly zjištěny pro cut off 2krát nad 60 pg/ml – z 58 BG pozitivních cyklů byla pravděpodobná IFI detekována u 6, možná invazivní mykóza u 7 a žádné známky hluboké mykotické infekce u zbývajících 45 cyklů (77,5 %).

Negativní prediktivní hodnota metody se pak pohybovala v rozmezí 90,2–97,2 % dle zvoleného cut off. Test tak umožnil při negativním výsledku s vysokou pravděpodobností označit nemocné, kteří invazivní mykotickou infekci neměli.

Vztah antimykotické léčby k pozitivitě testu

Vzhledem k relativně malému počtu pravděpodobných a prokázaných mykóz v souboru byla provedena analýza nemocných, kteří byli léčeni antimykotiky (empiricky a nebo preemptivně) a to ve vztahu k výsledku testu.

I když v léčebných cyklech s pozitivním BG bylo procento podání antimykotika vyšší (dle cut off se procento pohybovalo od 40 %–45 % ve srovnání s 28 %–35 % ve skupinách BG negativních) nebyl tento rozdíl statisticky významný (viz *tabulka 3*).

Možné faktory vedoucí k falešně pozitivním výsledkům testu

Hlavní příčinou již zmíněné velmi nízké PPV testu byl vysoký počet falešných pozitivit. Tři čtvrtiny z BG pozitivních cyklů v naší studii bylo pozitivních falešně.

V analýze možné etiologie tohoto jevu jsme se zaměřili na potenciální faktory popsané v literatuře.

První z nich je kolonizace kvasinkami. V našem souboru byla z BG pozitivních (1 vzorek s koncentrací > 80 pg/ml) léčebných cyklů bez známek invazivní mykotické infekce dle EORTC/MSG kritérií nalezena kolonizace ve 41 % případů a z BG negativních dokonce v 50 %. Velmi podobných výsledků jsme pak dosáhli v případě dvou konsekutivních vzorků s koncentrací > 60 pg/ml – kolonizace kvasinkami byla nalezena u 40 % BG pozitivních a u 50 % BG negativních cyklů bez příznaků IFI (*tabulka 4*). Naše analýza tedy neprokázala vztah mezi falešnou pozitivitou testu a kolonizací kandidami.

Protože poškození integrity zažívacího traktu by mohlo vést k průniku zejména kandidových antigenů přes defektní sliznici a tak způsobit falešnou pozitivitu Fungitell™ testu, zaměřili jsme se také na výskyt falešně pozitivních výsledků v průběhu rozvoje mukozitidy. Jak při použití limitní hodnoty 2krát nad 60 pg/ml tak při cut off 1krát nad 80 pg/ml jsme však neprokázali vyšší zastoupení léčebných cyklů s mukozitidou (a to ani těžkého stupně) mezi nemocnými s falešně pozitivním výsledkem testu (tabulka 5).

Vzhledem k prokázané reaktivitě testu s kmeny *Alcaligenes faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* in vitro [13] byla u všech nemocných bez známek IFI provedena retrospektivní analýza bakteriologických nálezů z hemokultur. Ve dvou případech byla nalezena bakteriémie způsobená *Pseudomonas aeruginosa*, pouze v jednom však byla spojena s opakovanou pozitivitou BG a to jak při cut off 60 pg/ml tak 80 pg/ml. Pneumokoková infekce krevního řečiště byla prokázána pouze v jednom případě a nebyla spojena s pozitivitou testu.

Žádný z nemocných ve sledovaném souboru neměl infekci *Pneumocystis jiroveci*, která rovněž způsobuje pozitivitu BG.

Součástí analýzy bylo také stanovení hladiny BG v nejčastěji používaných antibiotických a infuzních roztocích. Na základě některých in vitro dat [14] a především v návaznosti na zkušenosti s falešnou pozitivitou Platelia® Aspergillus testu způsobenou antibiotiky [15], jsme chtěli v maximální míře vyloučit vliv těchto látek na hladiny BG ve vzorcích a tak eventuálně objektivizovat možnost falešné positivity testu. Antibiotika v koncentrované podobě obsahovala BG v množství > 80 pg/ml (naměřené průměrné hodnoty BG byly následující): cefepim – 103,5 pg/ml; meropenem – 176 pg/ml; piperacilin/tazobaktam 165 pg/ml; amoxicilin/klavulanát – 309 pg/ml). Po naředění na sérové koncentrace však byla všechna testovaná antibiotika negativní.

Z infuzních roztoků byl testován přípravek Plasma – Lyte (Baxter) a fyziologický roztok. Zatímco Plasma – Lyte obsahoval malé množství BG (průměrná hodnota byla 65 pg/ml), které je však vzhledem k naředění po intravenózním podání zanedbatelné, fyziologický roztok byl zcela bez přítomnosti BG.

Využití 1,3-β-D glukanu pro potvrzení pozitivních výsledků galaktomananu v diagnostice invazivní aspergilózy

Od února do října 2007 byli všichni nemocní, kteří v rámci pravidelného monitoringu galaktomananu (GM) splnili kritérium positivity (dva konsektivní vzorky s IP > 0,5), vyšetřeni současně na 1,3-β-D glukán.

Celkem bylo identifikováno 40 epizod dvojnásobné positivity GM v séru u 39 nemocných. Základní onemocnění pacientů a jejich onkologickou léčbu ukazuje tabulka 6.

Ze 40 léčebných cyklů s nálezem konsektivní positivity GM v séru byla splněna ve 2 (5 %) případech kritéria možné, v 7 (18 %) pravděpodobně a v žádném cyklu pak kritéria prokázané IA dle EORTC/MSG. V 31 (78 %) případech byla pozitivita GM falešná a nebyla spojena s klinickými příznaky IA.

Senzitivita GM v diagnostice IA byla 100 %, ale PPV pouze 18 %. Většina pozitivních výsledků tedy byla falešně pozitivních. Současné vyšetření BG dokázalo procento falešných pozitivit GM eliminovat a PPV při kombinované pozitivitě GM i BG v závislosti na zvoleném cut off významně stoupla. Kombinace konsektivní positivity GM s použitím hraničního IP > 0,5 a konsektivní positivity BG při cut off 60 pg/ml se jeví pro diagnostiku IA jako nejvýhodnější. Při zachování maximální senzitivity tak byla eliminována většina falešných pozitivit GM (tabulka 7). Jako hlavní příčina velkého počtu vzorků s IP > 0,5 v tomto období byla retrospektivně identifikována falešná pozitivita způsobená aplikací roztoku Plasma Lyte (Baxter) [16].

Diskuze

Vysoká morbidita a mortalita IFI u nejvíce rizikových nemocných a zlepšení jejich prognózy při včasné zahájení antimykotické léčby vedly v posledních letech k rozvoji nekultivačních diagnostických metod – sérologických a molekulárně biologických [17]. Z těchto metod dosáhla spolehlivosti v rutinní diagnostice pouze detekce galaktomananu v diagnostice IA (Platelia® Aspergillus, Bio-Rad) [6]. Další sérologické metody (detekce mananu a antimiananu), stejně tak jako různé varianty polymerázové řetězové reakce jednoznačně postavení v diagnostice IFI dosud nemají [6].

Tabulka 7

Senzitivita a pozitivní prediktivní hodnota samostatného galaktomananu a v kombinaci s BG při různých limitních hodnotách tohoto testu (GM – galaktomanan, BG – 1,3-β-D glukán, PPV – pozitivní prediktivní hodnota, IA – invazivní aspergilóza)

	GM pozitivní (= vzorky IP > 0,5)	GM pozitivní + 1 vzorek s BG > 60 pg/ml	GM pozitivní + 1 vzorek s BG > 80 pg/ml	GM pozitivní + 2 vzorky s BG > 60 pg/ml	GM pozitivní + 2 vzorky s BG > 80 pg/ml
Celkem pozitivních cyklů v testu/v kombinaci testů	40 (100 %)	21 (52 %)	18 (45 %)	10 (25 %)	9 (22,5 %)
Počet cyklů s IA (pravděpodobná, prokázaná)	7	7	7	7	7
PPV testu/kombinace testů	18 %	37 %	44 %	88 %	71 %
Senzitivita testu/kombinace testů	100 %	100 %	100 %	100 %	71 %

GM pozitivní = 2 konsektivní vzorky s IP > 0,5

Detekce 1,3- β -D glukanu jako „panfungálního“ markeru je novou diagnostickou metodou, která umožňuje pomocí jednoho testu včasné diagnostikovat nejen invazivní aspergilózu, ale také invazivní kandidózu a některé vzácné houbové infekce s výjimkou zygomycózy a kryptokokózy [5].

Literární zkušenosti s detekcí BG jsou však omezené a navíc jsou data značně heterogenní. Tato heterogenita je dána kromě jiného různým designem studií, kdy jen malá část sleduje přínosnost metody ve skríningu IFI. Dalším faktorem by mohlo být různé technické řešení tří komerčně dostupných testů (Fungitell, Associates of Cape Code, USA; Fungitec G, Seikagaku Kogyo, Japane; Wako test, Wako Pure Chemical Industries, Japane) [18]. Nedostatek zkušeností s tímto antigenem lze do jisté míry vysvětlit rovněž relativně velkou finanční náročností testu – při doporučeném duplicitním testování stojí analýza jednoho vzorku asi 1 000 Kč (bez nákladů na provoz laboratoře). Navíc vzhledem k uspořádání testu je nutné čekat na naplnění celé destičky vzorky, což může v rutinní diagnostice způsobit časový skluz.

Naši práci, využívající BG pro skrínung IFI u rizikových hematologických nemocných, je možné přirovnat pouze k několika málo dosud prezentovaným studiím – práci Obayashiho et al. [19], Senna et al. [20], Ostrosky-Zeichnera et al. [21], Persatové et al. [22], Odabasiho et al. [18]. První z nich využívá v Evropě nepoužívaný test Fungitec G (Seikagaku Kogyo) s cut off 20 pg/ml. Ve velmi recentní práci Senna et al. [20] je k diagnostice použit další (v našich podmínkách málo častý) Wako test (Wako Pure Chemical Industries) s cut off 7 pg/ml. Přestože se designem naší analýzy velmi blíží, hlavním rozdílem je atypicky vysoké procento IFI v jimi prezentovaném souboru – invazivní mykózu zde prodělalo přes 60 % sledovaných nemocných [20,23]. Ostrosky-Zeichner et al. [21] sice využívá stejného testu (Fungitell™, Associates of Cape Code) jako my, ale jeho soubor negativních kontrol se skládá ze zdravých dárců a nemocných zcela bez rizika IFI. Také Persatová et al. [22] sleduje především využitelnost Fungitell™ testu u případů prokázané či pravděpodobné IFI. Podmínky nejpodobnější našim má studie Odabasiho et al. [18].

V naší analýze byla s nejvyšší senzitivitou (88,9 %) spojena pozitivita jednoho vzorku > 60 pg/ml, bohužel specifita testu byla v tomto případě nepříjemně nízká – pouze 18,6 %. Protože stejné senzitivity bylo dosaženo také při koncentraci BG ve vzorku > 80 pg/ml za výrazně vyšší specifity (40,7 %), jeví se tato hodnota cut off jako klinicky relevantnější. Zatímco senzitivitou lze předkládané výsledky přirovnat k literárním datům (senzitivita v práci Odabasiho et al. [18] byla při izolované pozitivitě > 60 pg/ml 100 % a ve studii Ostrosky-Zeichnera [21] pak při stejném cut off 69,9 % respektive při hodnotě 80 pg/ml pak 64,4 % a v analýze Persatové et al. [22] při stejném vyšším cut off dokonce 77,8 %), je specifita testu podle našich zkušeností výrazně nižší (Odabasi et al. [18] – 90 %, Ostrosky-Zeichner et al. [21] – 87,1 % respektive 92,4 %, Persatová et al. [22] – 92,5 %). Hlavní příčinou extrémně nízké specifity je velmi vysoké procento pozitivních výsledků – 83 % respektive 63 % léčebných cyklů obsahovalo alespoň jeden vzorek s množstvím BG nad 60 respektive nad 80 pg/ml – což je číslo vysoce překračující pravděpo-

dobnost výskytu invazivních mykotických infekcí.

Cut off jednorázové pozitivity BG > 80 pg/ml by se jeví jako optimální, v klinické praxi však ve většině případů není možné provést rozhodnutí nebo stanovení diagnózy na základě izolované pozitivity testu. Pokud bychom požadovali následnou pozitivitu BG v minimálně dvou vzorcích, pak se naopak jeví jako optimální cut off 60 pg/ml neboť při hodnotě 80 pg/ml výrazně klesá senzitivita testu a to z 66,7 % na 44,4 %. Specifita je při konsektivní pozitivitě přirozeně vyšší – 47,7 % respektive 53,3 % (tabulka 2).

Velmi dobře vychází z naší analýzy negativní prediktivní hodnota testu. Jestliže použijeme deklarovanou „optimální“ hodnotu cut off – jeden vzorek nad 80 pg/ml nebo 2 vzorky nad 60 pg/ml – pak negativní výsledek s pravděpodobností 97,2 % respektive 93,2 % správně označil pacienta bez přítomnosti IFI.

Největším limitem testu je extrémně nízká pozitivní prediktivní hodnota, která se dle cut off pohybuje od 9,1–13,6 %. Přestože i jiné práce poukazují na nižší PPV testu – Odbasi et al. [18] uvádí 43 % při izolované a 57 % při konsektivní pozitivitě BG nad 60 pg/ml – hodnoty PPV v našem souboru, který však svým designem odpovídá běžné klinické praxi, jsou velmi nízké.

PPV je do značné míry závislá na prevalenci onemocnění v populaci. I když prevalence pravděpodobně a prokázané IFI v našem souboru byla relativně nízká – 8,6 %, zcela odpovídá současnému trendu ve výskytu IFI ve skupině středně až vysoce rizikových hematologických nemocných a nijak nevybočuje z literárně dostupných dat [2].

Hlavní příčinou nízké PPV jsou (podobně jako u nízké specifity) falešně pozitivní výsledky. Faktorů, které vedly k tak vysokému procentu pozitivních výsledků testu ovšem bez spojení s dokumentovanou invazivní mykózou, bude jistě větší počet.

Podobně jako Obayashi et al. [19] jsme ani my neprokázali vztah mezi falešnou pozitivitou testu a kolonizací kmeny kvasinek. Dokonce bylo kvasinkami kolonizováno více pacientů ze skupiny BG negativních (tabulka 4).

Navíc jsme se zaměřili na přítomnost a stupeň mukozitidy, která by mohla vést k průniku BG ze zažívacího traktu (součást stěny kolonizujících kmenů kvasinek a jiných mikroorganismů, respektive součást stravy) a tak být jednou z příčin falešné pozitivity metody. Procentuální zastoupení výskytu mukozitidy a to i těžké formy však opět nebylo odlišné u nemocných s negativním nebo falešně pozitivním výsledkem Fungitell™ testu.

Ve studii Pickeringa et al. [24] autoři identifikovali 11 z 15 nemocných s bakteriemií vyvolanou grampozitivními koky a 3 z 10 pacientů s infekcí krevního řečiště způsobenou gramnegativními tyčkami, kteří měli minimálně jeden vzorek krve falešně pozitivní. Mennink-Kerstenová však ve své práci potvrdila in vitro zkříženou reaktivitu testu pouze s kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* a *Streptococcus pneumoniae* [13]. Kultury ostatních testovaných kmenů nevedly k reaktivitě testu a je tedy možné, že pozitivita BG během bakteriemií ve studii Pickeringa et al. byla vyvolána jinými příčinami. V naší analýze pouze jeden nemocný ze tří, kteří měli bakteriemií způsobenou výše zmíněnými kmeny, měl také současně pozitivní BG. Dá se

tedy předpokládat, že bakteriémie vyvolané kmeny reagujícími in vitro s Fungitell™ testem nebudou hlavní příčinou falešných pozitivit.

K pozitivě testu může vést i jiná invazivní mykotická infekce, než pouze invazivní aspergilóza a kandidóza [21,22]. V naší práci jsme však žádný takový případ neidentifikovali (včetně infekce vyvolané *Pneumocystis jirovecii*).

Marty et al. testovali pomocí Fungitell™ testu 44 různých antibiotik [14]. Sedm z nich obsahovalo v koncentrované podobě množství BG větší než 60 pg/ml, ale po naředění na maximální koncentraci dosažitelnou v séru byly zjištěné hodnoty negativní a nemělo by tedy docházet k falešné pozitivě při jejich podávání. K podobným závěrům jsme dospěli při testování antibiotik a infuzních roztoků nejčastěji podávaných na našem pracovišti. Falešné positivity z těchto příčin jsou tedy opět méně pravděpodobné.

V literatuře se dále můžeme setkat s falešnou pozitivitou BG při dialýze s celulózovou kapslí [25], která však u nás není používána.

Další možností je kontaminace při odběru vzorku nebo jeho zpracování. Nicméně u relativně velkého počtu nemocných byla pozitivita opakovaná (i po dobu několika týdnů), což by svědčilo spíše proti kontaminaci. Určitý vliv na naše výsledky by mohl mít také fakt, že nebyl používán glukanu prostý negativní laboratorní materiál. Vzhledem k tomu, že na jednom testovaném panelu (při jednom běhu) byla obvykle pozitivní jen malá část vzorků, k zásadnímu ovlivnění výsledků touto cestou by také docházet nemělo.

Z výše popsaného tedy vyplývá, že jsme neidentifikovali jednoznačný zdroj falešných pozitivit BG. Jeho odstranění by umožnilo významně zvýšit PPV testu, podobně jako k tomu bylo u GM po odstranění některých antibiotik a infuzních roztoků z používání [16].

Na druhou stranu je možné, že vzhledem k vysoké senzitivě metody mohlo u části nemocných (zvláště pak v případě mukozitidy, nebo střevní GvHD) dojít k určité tranzitní fungemii, jejímž výsledkem by mohla být pozitivita testu i přes nedostatek jasných klinických známek IFI (s výjimkou „pouhé“ izolované horečky nejasného původu). V tomto případě bychom však alespoň očekávali, že ve skupině BG pozitivních nemocných bude signifikantně větší procento empirického a preemptivního podání systémových antimykotik. Tuto hypotézu, pravděpodobně opět z důvodu falešných pozitivit, jsme však nebyli schopni potvrdit.

Použití detekce BG pro rutinní „panfungální“ skríníng IFI u hematologických pacientů má tedy zřejmě jenom omezený přínos, na rozdíl od možnosti konfirmovat pozitivní výsledky při detekci galaktomananu v séru. Detekce GM – dnes již rutinní a základní metoda v časně diagnostice IA [5] – může být i přes velké zkušenosti spojená s výskytem falešně pozitivních výsledků. Pazos et al. [26] prokázali zvýšení specifity a PPV při kombinovaném vyšetření GM i BG a jejich současné pozitivě. V námi prezentované práci pak konfirmace konsektivních, galaktomanan pozitivních vzorků pomocí 1,3- β -D gluknanu z uchovaných alikvotů umožnila výrazným způsobem odlišit nemocné s falešnou pozitivitou Platelia® Aspergillus testu a zvýšit tak PPV při detekci IA z 18 % na 88 %. Při současném zachování vysoké senzitivity tento přístup umožnil minimalizovat riziko nadužívání drahých systémových anti-

mykotik, které může být s falešnou pozitivitou GM velmi často spojeno.

Závěr

Přestože prvotní práce využívající 1,3- β -D gluknanu v diagnostice IFI poukazují na velmi uspokojivou přínosnost testu, naše analýza vycházející z rutinního použití metody pro „panfungální“ skríníng nemocných s hematologickou malignitou v riziku IFI tento fakt nepotvrdila. Nejvyšší senzitivity jsme dosáhli při jednorázové pozitivě vzorku s koncentrací nad 80 pg/ml. V běžné praxi, kdy ve většině případů pro potvrzení diagnózy vyžadujeme konsektivní pozitivitu, je pak nejvýhodnější použití cut off 60 pg/ml. V tomto případě však již senzitivita metody klesá. Jednoznačně velkým problémem je značně vysoké procento falešně pozitivních výsledků a s tím spojená extrémně nízká pozitivní prediktivní hodnota.

Podle našich zkušeností tedy není metoda dostatečně „robustní“ pro rutinní skríníng IFI v klinické praxi. V současné době, kdy na hematologických pracovištích jednoznačně dominují případy invazivní aspergilózy, je výhodnější používat pro skríníng propracovanou a cenově přijatelnější detekci galaktomananu ELISA metodikou. Samozřejmě s vědomím, že časná diagnostika je tímto omezena pouze na případy invazivní aspergilózy.

Detekce 1,3- β -D gluknanu je výhodným doplňujícím vyšetřením u nemocných s konsektivní pozitivitou galaktomananu, kde současná pozitivita GM a BG dokáže zvýšit pozitivní prediktivní hodnotu a tak eliminovat možné falešné positivity galaktomananu.

Souhrnně lze říci, že rutinní používání Fungitell™ testu bude ještě vyžadovat další klinické studie zahrnující větší počet nemocných z běžné klinické praxe. Jedině touto cestou – podobně jako tomu bylo při postupném získávání informací během používání Platelia® Aspergillus testu – si metoda může najít své místo v každodenní praxi lékařů pečujících o nemocné s rizikem vzniku invazivních mykóz.

Poděkování

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR8452-3/2005 a VZ MSM619895223.

Literatura

- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgrad Med*. 2007; 9(3):240-252.
- Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006;91(8):1068-1075.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(10):609-622.
- Ellepol AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol*. 2005;43 Spec No65-84.
- Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, et al. Advances in the serological diagnosis of invasive Aspergillus infections in patients with haematological disorders. *Mycoses*. 2007;50 Suppl 12-17.
- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř. Lék*. 2007;53(9):645-654.
- Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. 1,3-beta-D-glucan in culture fluid of fungi activates factor G, a limulus coagulation factor. *J Clin Lab Anal*. 1995;9(5):334-339.
- Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma 1,3-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol*. 1995;33(12):3115-3118.

9. Yoshida M, Obayashi T, Iwama A, et al. Detection of plasma 1,3-beta-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. *J Med Vet Mycol*. 1997;35(5):371–374.
10. Quindos G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12 Suppl 740–52.
11. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, 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.
12. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(6):349–357.
13. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij PE. Reactivity of Bacteria with the (1-3)- β -Glucan Assay (Paper M-568). Abstract of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2007 September 17–20; Chicago, IL, USA: American Society for Microbiology; 2007.
14. Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, et al. Reactivity of 1,3-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(10):3450–3453.
15. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False-positive galactomannan platelet Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):913–916.
16. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, et al. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelet Aspergillus test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):3141–3142.
17. von Eiff M, Roos N, Schulden R, et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 1995;62(6):341–347.
18. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*. 2004;39(2):199–205.
19. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma 1,3-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*. 1995;345(8941):17–20.
20. Senn L, Robinson JO, Schmidt S, et al. 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis*. 2008;46(6):878–885.
21. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the 1,3-beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005;41(5):654–659.
22. Persat F, Ranque S, Derouin F, et al. Contribution of the 1,3-(beta)-D-Glucan Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol*. 2007.
23. Herbrecht R, Berceanu A. Beta-D-glucan detection test: a step toward preemptive therapy for fungal infections in leukemic patients? *Clin Infect Dis*. 2008;46(6):886–889.
24. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, et al. Evaluation of a 1,3-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43(12):5957–5962.
25. Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma 1,3-beta-D-glucan level. *Kidney Int*. 2001;60(1):319–323.
26. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of 1,3-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):299–305.

6. Epidemiologie, diagnostika a léčebné výsledky případů invazivních aspergilových infekcí na Interní hematoonkologické klinice LF MU a FN Brno

V této kapitole je prezentován souhrnný výzkum na poli diagnostiky a terapie invazivní aspergilózy na pracovišti autora.

Jak již bylo zmíněno, invazivní aspergilózy jsou v současné době jednoznačně nejčastější hlubokou mykózou u hematoonkologických nemocných. V předchozích kapitolách byl předložen detailní přehled literatury a zkušeností pracoviště autora s dvěma nejvýznamnějšími metodami používanými pro časnou diagnostiku této hluboké mykózy.

Nicméně vedle změny v časnosti diagnostiky invazivní aspergilové infekce je zásadní změnou i dostupnost nových účinných antimykotik, eventuelně jejich použití v kombinaci.

Součástí této kapitoly je původní práce autora, která analyzuje případy hlubokých aspergilových infekcí na Interní hematoonkologické klinice LF MU a FN Brno v letech 2000-2006 (**Ráčil, Z., Mayer, J., Kocmanová, I., Wagnerová, B., Winterová, J., Folber, F., Lengerová, M., Moulis, M., Žáčková, D., Šmardová, L., Janíková, A., Navrátil, M., Dvořáková, D., Vorlíček, J.: Invazivní aspergilové infekce u hematoonkologických nemocných: význam jednotlivých diagnostických metod, léčebných postupů a nástin finanční náročnosti léčby. Vnitřní lékařství, 54, 2008, 2: 24-36**).

Práce je prioritní publikací v české literatuře, která analyzuje takto rozsáhlý soubor pacientů a to nejen po stránce přínosu jednotlivých diagnostických metod a výsledků různých typů antimykotické léčby a sleduje rovněž i finanční náročnost léčby. Bylo jednoznačně prokázáno, že i přes výrazné zvýšení frekvence těchto infekcí, celková mortalita i mortalita na vlastní infekci se vzhledem k časnosti diagnózy a kombinované antimykotické léčbě zásadním způsobem snížila.

Na publikaci navázal společný Česko-Slovenský projekt „Databáze případů invazivních aspergilových infekcí“, jehož koordinací byl pověřen autor této práce.

- 6.1.1. Ráčil, Z., Mayer, J., Kocmanová, I., Wagnerová, B., Winterová, J., Folber, F., Lengerová, M., Moulis, M., Žáčková, D., Šmardová, L., Janíková, A., Navrátil, M., Dvořáková, D., Vorlíček, J.: Invazivní aspergilové infekce u hematologických nemocných: význam jednotlivých diagnostických metod, léčebných postupů a nástin finanční náročnosti léčby. Vnitřní lékařství, 54, 2008, 2: 24-36**

Invazivní aspergilové infekce u hematologických nemocných: význam jednotlivých diagnostických metod, léčebných postupů a nástin finanční náročnosti léčby

Z. Ráčil¹, J. Mayer¹, I. Kocmanová², B. Wagnerová¹, J. Winterová¹, F. Folber¹, M. Lengerová¹, M. Moulis³, D. Žáčková¹, L. Šmardová¹, A. Janíková¹, M. Navrátil¹, D. Dvořáková¹, J. Vorlíček¹

¹ Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

² Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prim. MUDr. Alena Ševčíková

³ Ústav patologie Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jirka Mačák, CSc.

Souhrn: *Východiska a cíle:* Invazivní aspergilóza (IA) představuje nejvýznamnější invazivní mykózu u hematologických nemocných. Cílem předkládané práce je analýza výskytu, diagnostiky a léčby IA na hematologickém pracovišti v České republice. Tato data dosud chybí. *Pacienti a metody:* Byla provedena retrospektivní analýza zdravotnické a laboratorní dokumentace za období od ledna roku 2000 do prosince roku 2006 u nemocných z našeho pracoviště s diagnózou pravděpodobné/prokázané IA. *Výsledky:* Celkem bylo diagnostikováno 52 případů IA u 51 nemocných (17,3 % prokázaná IA/82,7 % pravděpodobná IA). Ve sledovaném období došlo k výraznému nárůstu počtu případů IA diagnostikovaných v jednom roce (1 IA v roce 2000 vs 21 IA v roce 2006) a většina (61,5 %) infekcí byla nozokomiálního původu. Ve 46 případech (88,5 %) se jednalo o izolovanou plicní formu IA. Nejrizikovějšími nemocnými byli pacienti léčení pro akutní leukemii nebo podstupující alogenní transplantaci krvetvorné tkáně (dohromady 52 %). V klinickém obraze dominovala přetrvávající horečka (92,3 % případů) a příznaky postižení plicního parenchymu (69,2 % případů). Konvenční diagnostické metody včetně autopsie dokázaly zachytit IA pouze v 15 (28,8 %) případech. Ve všech ostatních případech (71,2 %) umožnila stanovení diagnózy IA detekce galaktomananu (GM). Její zavedení také zkrátilo zahájení účinné antimykotické léčby o 4 dny. Iniciální léčba IA vedla souhrnně k dosažení léčebné odezvy (kompletní a parciální remise) u 18 (34,6 %) infekcí – nejvyšší procento léčebné odezvy bylo zaznamenáno při monoterapii vorikonazolem (42 %) a při použití kombinace kaspofunginu s vorikonazolem (83 %). Pro selhání iniciální léčby byla u 21 (40,3 %) případů IA podávána terapie záchranná. Nejčastěji byla zvolena kombinace kaspofunginu s vorikonazolem anebo monoterapie vorikonazolem s léčebnou odpovědí 55 %, resp. 50 %. Zavedení nových antimykotik spolu se zvýšením počtu případů IA vedlo k výraznému nárůstu roční ceny antimykotické léčby a to z 11,5 tisíce Kč v roce 2000 na 6,2 miliónu Kč v roce 2006. *Závěr:* IA je stále častější infekční příčinou úmrtí u nemocných s hematologickou malignitou. Rutinní zavedení a používání nových nekultivačních metod v diagnostice IA spolu s časnou aplikací nových, účinných antimykotik však umožňuje významně zlepšit prognózu nemocných s touto závažnou infekcí.

Klíčová slova: invazivní mykóza – *Aspergillus* – invazivní aspergilóza – galaktomanan – časná diagnóza – antimykotická léčba – hematologické malignity

Úvod

Invazivní mykotické infekce patří v současné době mezi jedny z hlavních infekčních příčin mortality nemocných s hematologickou malignitou. V posledních 2 dekádách jsme svědky změn v epidemiologii těchto infekcí – nejčastěji se u této skupiny nemocných objevuje invazivní aspergilóza (IA) s incidencí 10–20 % a s mortalitou 50–90 % u nejvíce rizikových z nich

(pacienti s akutní leukemií a po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně) [1–3].

Od počátku 21. století však dochází k výraznému zlepšení diagnostiky této život ohrožující infekce a to jednak zavedením rutinního provádění vysoce rozlišovacího CT plic (HRCT plic) u febrilních neutropenických pacientů nereagujících na léčbu širokospektrými antibiotiky a především pak rozšíře-

ním pravidelného monitoringu přítomnosti aspergilového antigenu (galaktomananu) v séru nemocných v riziku IA [4,5].

Kromě toho se v posledních několika letech výrazně rozšířily léčebné možnosti u této závažné infekce. K dispozici jsou nové lékové formy polyenů, nové a účinnější azoly a zcela nová třída antimykotik – echinokandiny [6].

Invasive aspergillosis in haematological patients: advantages and disadvantages of various diagnostic methods, treatment options and financial costs of therapy

Summary: *Background:* Invasive aspergillosis (IA) is a leading invasive fungal infection in haematological patients. The aim of this study was to analyse the incidence, diagnostic procedures and treatment of IA in haematological department in large hospital in the Czech Republic. *Patients and methods:* A retrospective analysis of medical and laboratory records from patients hospitalised in our department with proven/probable IA between January 2000 and December 2006 was performed. *Results:* 52 cases of IA in 51 patients were identified (17.3 % proven IA/82.7 % probable IA). Number of IA cases notably increased during study period (1 case of IA in 2000 vs 21 cases of IA in 2006) and majority of them was of nosocomial origin (61.5 %). Pulmonary aspergillosis was diagnosed in 46 cases (88.5 %). Patients treated for acute leukemia or undergoing allogeneic stem cell transplantation represent the group at the highest risk of IA (in total 52 % of cases). Fever and signs of pulmonary involvement were the most common clinical signs of infection (presented in 92.3 % and 69.2 cases respectively). Conventional diagnostic methods including autopsy were able to diagnose only 15 cases of IA (28.8 %). In all other cases (71.2 %) the diagnosis was done by detection of galactomannan (GM) in serum. Introduction of GM monitoring enabled earlier initiation of antifungal treatment by 4 days. Initial therapy of IA led to the treatment response (partial and complete) in 18 (34.6 %) of infections – the highest percentage of response has been seen in voriconazole monotherapy group (42 %) and when combination of voriconazole and caspofungin has been used (83 %). Salvage therapy was initiated due to the failure of initial treatment in 21 (40.3 %) of cases. Patients were treated mostly with combination of voriconazole and caspofungin and/or monotherapy with voriconazole has been used with treatment response 55 % and 50 % respectively. Introduction of new antifungal drugs together with increased number of patients with IA led to the marked increase of total costs spent on treatment of IA per year – from 11,5 thousands CZK in 2000 to 6,2 millions CZK in 2006. *Conclusions:* IA is the most frequent cause of infection-related mortality in patients with haematological malignancies. Routine use of non-culture base methods in diagnosis of IA together with treatment using new, effective antifungals can improve prognosis of patients with this life threatening infection.

Key words: invasive fungal infection – *Aspergillus* – invasive aspergillosis – galactomannan – early diagnosis – antifungal therapy – haematological malignancies

Precizní diagnostika a cílená a současně často razantní léčba umožňují v některých centrech výrazně zlepšit prognózu pacientů [7].

Přestože je k dispozici celá řada publikací analyzujících případy IA na jednotlivých světových pracovištích [8], práce podobného charakteru v české literatuře dosud prezentována nebyla.

Cílem předkládaného sdělení je retrospektivní analýza případů invazivních aspergilových infekcí na jednom z velkých hematologických pracovišť v České republice, zejména posouzení výskytu, rizikových faktorů, klinických projevů, diagnostiky a léčby této hluboké mykózy. Lze se oprávněně domnívat, že obdobná situace může být i na jiných pracovištích.

Pacienti a metody sledovaná populace

Interní hematologická klinika FN Brno-Bohunice má k dispozici 74 lůžek pro léčbu celého spektra hematologických malignit. Průměrná roční obloženost ve sledovaném období 2000 až 2006 byla 93,8 % (91,3–95,4 %). Celkový počet hospitalizací byl 19 514,

což je v průměru 2 788 hospitalizací (2 618–2 920) za rok.

Nemocní byli obvykle hospitalizováni na standardním 3lůžkovém pokoji s centrální úpravou vzduchu, ovšem kromě pacientů podstupujících alogenní transplantaci krvetvorné tkáně, kteří byli ve většině případů umístěni na jednolůžkovém pokoji s úpravou vzduchu pomocí HEPA filtru, a to až do doby příhojení štěpu (absolutní počet neutrofilních granulocytů > 1,0 × 10⁹/l).

Po dobu neutropenie, respektive u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně také po dobu intenzivní imunoprese pro reaktivaci štěpu proti hostitelí (Graft Versus Host Disease – GvHD), byla nemocným podávána antimykotická profylaxe flukonazolem v dávce 400 mg/den.

Během hospitalizace byli pacienti pečlivě sledováni stran rozvoje příznaků invazivní mykotické infekce. Denně lékaři prováděli klinická vyšetření, konvenční snímek srdce a plic byl indikován vstupně a následně v průběhu febrilní neutropenie minimálně 1krát týdně ev. častěji. V týdenním in-

tervalu probíhala surveillance bakteriologického a mykologického osídlení v moči, stěru z rekta a dutiny ústní. Odběr hemokultur a kulturační vyšetření ostatních klinických materiálů bylo prováděno v případě rozvoje febrilií respektive klinických příznaků infekce. Od května roku 2003 také probíhal pravidelný screening nemocných v riziku invazivní aspergilózy pomocí detekce aspergilového antigenu – galaktomannanu (kit Plateliar *Aspergillus*, Bio-Rad, France) v séru, a to nejméně 2krát týdně u rizikových nemocných (alogenní HSCT a léčba akutní leukemie), a u ostatních pacientů pak při febriliích nereagujících na antibiotika a při rozvoji plicních infiltrátů na zobrazovacích metodách. Vzorek séra testovaný v Plateliar *Aspergillus* byl označen jako pozitivní při indexu positivity (IP) vyšším než 0,5. Jako galaktomannan (GM) pozitivní nemocný byl označen pacient s minimálně 2 pozitivními odběry za sebou.

V případě zvýšené pravděpodobnosti vzniku invazivní mykotické infekce (febrilní neutropenie nereagující 5 dnů na antibiotickou léčbu, rozvoj

plicních infiltrátů na konvenčním RTG snímku plic, pozitivní kultivace s průkazem vláknité houby v materiálu z dýchacích cest) proběhla série vyšetření s cílem prokázat etiologické agens. V maximální možné míře bylo provedeno HRCT plic a v případě positivity bronchoalveolární laváž (BAL). Lavážní tekutina byla vyšetřována kulturačně, cytologicky, imunofluorescenčně pro průkaz *Pneumocystis jiroveci* a molekulárně biologicky pro průkaz virových patogenů, mykoplazmat, chlamydií a opět *Pneumocystis jiroveci*. Od září roku 2003 byla tekutina získaná laváží testována na přítomnost galaktomananu.

Spíše výjimečně byla prováděna biopsie plicních infiltrátů nalezených na HRCT plic (tenkojehlová pod CT kontrolou, torakoskopicky nebo torakotomicky) nebo eventuálně biopsie jiných postižených tkání. Získaný materiál byl pak opět vyšetřen histologicky, cytologicky a kulturačně.

Jako empirická antimykotická léčba bývá většinou zvolen konvenční amfotericin B, v indikovaných případech kaspofungin nebo vorikonazol.

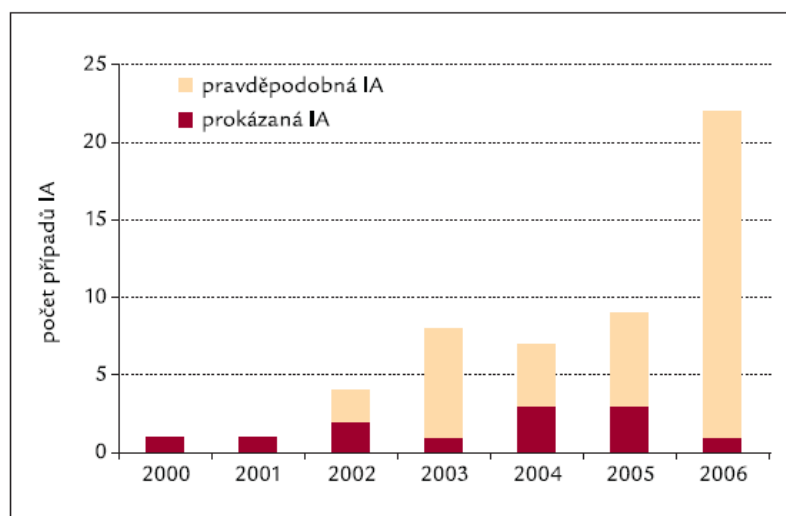
V případě úmrtí nemocného byla v maximálně možné míře a při souhlasu rodiny provedena patologicko-anatomická pitva. Ve sledovaných letech byla sekce provedena průměrně u 63 % (92–44 %) pacientů zemřelých na našem pracovišti. Procento sekcí bylo poněkud vyšší v letech 2000, 2001 a 2005 (92 %, 71 % a 79 %).

Design studie

Tato retrospektivní analýza zahrnuje 7leté období od 1. ledna 2000 do 31. prosince 2006. Případy invazivní aspergilózy byly retrospektivně identifikovány z různých zdrojů – histologické výsledky sekčních a biopsických materiálů, mikrobiologické výsledky (kultivace, mikroskopie, galaktomanan) a zdravotnická dokumentace.

Definice

Do analýzy byli zahrnuti nemocní s prokázanou a pravděpodobnou IA dle EORTC/MSG (European Organi-



Graf 1. Počet případů pravděpodobné/prokázané invazivní aspergilózy (IA) na Interní hematologické klinice FN Brno-Bohunice v letech 2000–2006.

zation for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group) kritérií [9]. Jako pacienti s „prokázanou“ IA byli označeni nemocní s pozitivním histologickým/kultivačním průkazem *Aspergillus* spp. ze sterilního místa nebo ze sekce. „Pravděpodobná“ IA byla přiřazena pacientům s kombinací rizikových faktorů, klinických příznaků (nález na zobrazovacích metodách většinou v kombinaci s příznaky orgánového postižení) a mikrobiologických kritérií (průkaz *Aspergillus* spp. z materiálu z dýchacích cest nebo pozitivita GM v séru, ev. v tekutině z BAL).

Jako nozokomiální byly označeny infekce, u kterých došlo k rozvoji projevů po 7 a více dnech od příjmu na naše pracoviště (pozitivní klinické příznaky z orgánového postižení infekcí, zobrazovací metody, mikrobiologické nebo histologické vyšetření), přestože jednoznačná definice nozokomiálního původu IA není v literatuře přesně vymezena [10]. V ostatních případech byly infekce považovány za získané v komunitě (k projevům infekce došlo do 7 dnů od přijetí) nebo za neklasifikovatelné (diagnóza byla stanovena až sekčně nebo nebylo možno přesně stanovit začátek příznaků).

Při hodnocení léčebné odezvy infekce jsme vycházeli z posouzení pře-

žívání nemocného, jeho klinického stavu, radiologického nálezu a vývoje mikrobiologických parametrů (především galaktomananu). Kompletní a parciální léčebná odezva byly považovány za úspěšný výsledek léčby a nevedly ke změně antimykotické léčby (s výjimkou „step down“, při němž byla dvojkombinace změněna za monoterapii). Naopak stabilní stav infekce, stejně tak jako progresse onemocnění byly považovány za selhání léčby a při příznivé celkové prognóze nemocného byla tato situace indikací ke změně antimykotické léčby. Za selhání antimykotické léčby bylo považováno také úmrtí antimykotiky léčeného nemocného z důvodů progresse IA.

Výsledky

Základní charakteristika souboru

Mezi lety 2000–2006 bylo diagnostikováno 52 případů IA u 51 nemocných. Došlo k významnému nárůstu počtu nově zjištěných onemocnění IA za rok – z 1 případu v roce 2000 na 21 infekcí v roce 2006 (graf 1).

Mezi histologicky prokázané infekce („proven IA“) patřilo 9 (17,3 %) případů IA a zbylých 43 (82,7 %) pak patřilo mezi infekce pravděpodobné („probable IA“).

Tab. 1. Charakteristika souboru.

	n (%)		n (%)
Základní charakteristika		Protinádorová léčba (n = 52)	
- počet pacientů	51	- terapie akutní leukemie	17 (32,7 %)
- počet případů IA	52	- alogenní HSCT	10 (19,2 %)
Typ IA		- autologní HSCT	5 (9,6 %)
- plicní forma IA	46 (88,5 %)	- ostatní	10 (19,2 %)
- diseminovaná forma IA	6 (11,5 %)	- bez léčby	10 (19,2 %)
Původ infekce		Rizikové faktory IA	
- nozokomiální infekce	32 (61,5 %)	- neutropenie 10 a více dnů	41 (78,8 %)
- komunitní infekce	12 (23,1 %)	- kortikoterapie 10 a více dnů	31 (59,6 %)
- nelze určit	8 (15,4 %)	- imunosupresivní léčba	14 (26,9 %)
Základní onemocnění (n = 51)		- GvHD	5 (9,6 %)
- AML	19 (37,3 %)		
- NHL	8 (15,7 %)		
- ALL	6 (11,8 %)		
- CLL	5 (9,8 %)		
- MDS	3 (5,9 %)		
- autoimunitní onemocnění	6 (11,8 %)		
- ostatní	4 (7,8 %)		

IA – invazivní aspergilóza, AML – akutní myeloidní leukemie, NHL – nonhodgkinský lymfom, ALL – akutní lymfoblastická leukemie, CLL – chronická lymfatická leukemie, MDS – myelodysplastický syndrom, HSCT – transplantace krvetvorné tkáně, GvHD – reakce štěpu proti hostiteli

Většina případů (88,5 %) invazivních aspergilových infekcí byla omezena na postižení plic. K diseminaci infekce došlo v 6 (11,5 %) případech – nejčastěji do jater a sleziny (3 případy), izolovaně pak do jiných tkání (tračník, mozek, myokard, ledviny, nadvarle, paranazální dutiny).

Za nozokomiálně získané bylo označeno 32 (61,5 %) případů infekcí, ve 12 (23,1 %) případech se jednalo o infekce komunitní a u 8 (15,4 %) pacientů nebylo možné původ onemocnění určit (tab. 1).

Základní onemocnění a rizikové faktory IA

Základní hematologické onemocnění pacientů s IA ukazuje graf 2. Z grafu je velice dobře vidět rizikovost nemocných s akutní leukemií – téměř polovina (48 %) všech případů byla diagnostikována právě u pacientů s tímto onemocněním.

Graf 3 pak zobrazuje jejich protinádorovou léčbu. K 52% počtu infekcí došlo opět u pacientů léčených chemoterapií pro akutní leukemii anebo podstupujících alogenní transplantaci krvetvorné tkáně.

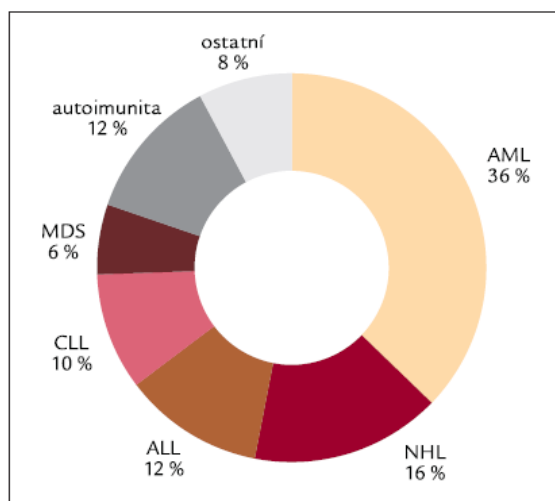
Z analýzy vyplývá vztah výskytu IA k aktivitě základního nádorového onemocnění: 20 případů (38,4 %) bylo diagnostikováno u pacientů, kteří dosud nebyli léčeni nebo právě podstoupili 1. sérii hematologické léčby – tedy s aktivní nádorovou chorobou. Na druhou stranu 23 infekcí (44,2 %) vzniklo u vysoce „předlčených“ jedinců, kteří obdrželi 5 a více sérií protinádorové léčby, z významné části pro recidivy hematologického onemocnění. Opět se tedy často jednalo o pacienty s aktivní základní chorobou. Velká „předlčenost“ je také pravděpodobnou příčinou čtenějšího výskytu případů IA u nemocných s NHL a CLL v našem souboru – 4 (80 %) pacienti s CLL a 4 (50 %) s NHL byli vysoce „předlčení“.

Nejčastějším rizikovým faktorem byla dlouhodobá neutropenie (10 a více dnů), a to u 41 případů (78,8 %), dlouhodobá kortikoterapie (10 a více dnů) u 31 (59,6 %), imunosupresivní léčba u 14 (26,9 %) a GvHD u 5 (9,6 %) případech IA (tab. 1). Neutropenie a imunosupresivní léčba jako závažné rizikové faktory IA mohou být vysvětlením pro vznik infekce u 10 nemocných, kteří neobdrželi protinádoro-

vou léčbu – 5 (50 %) z nich byli pacienti s akutní leukemií nebo MDS, iniciálně neutropeničtí a dosud neléčení, a další 4 (40 %) z výše jmenované skupiny byli nemocní léčení imunosupresivní (většinou kombinovanou) léčbou pro autoimunitní onemocnění.

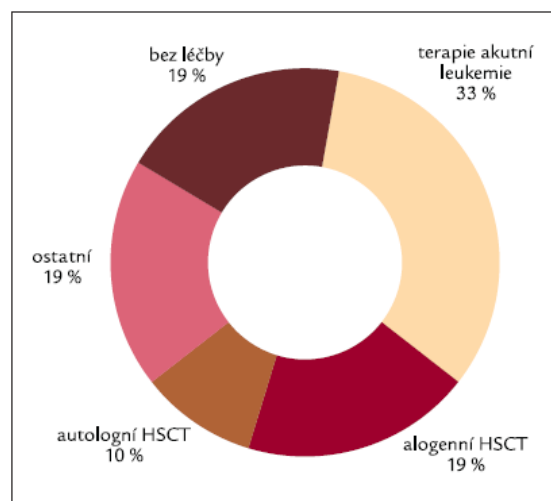
Klinické projevy

Nejčastějším orgánem postiženým invazivní aspergilovou infekcí byly plíce (98 % případů IA mělo postižení plicního parenchymu). U většiny nemocných jsme pak nacházeli klinický obraz, odpovídající pneumonii s dlouhotrvající horečkou nereagující na podávání širokospektrých antibiotik. Febrilie nereagující na antibiotickou léčbu byla přítomna u 92,3 % infekcí a 69,2 % případů mělo minimálně jeden z příznaků plicního postižení při IA, jakými jsou kašel (54 %), dušnost (31 %), torakalgie (6 %), hemoptýza (2 %). Příznaky z postižení mimoplicních tkání se vyskytly u 3 (5,7 %) infekcí (enteroragie a porucha vědomí); 2 nemocní (3,8 %) byli v době diagnózy afebrilní a asymptotičtí (graf 4). V obou případech šlo o pacienty s nově diagnostikovanou akutní leukemií, u kterých byl současně se



Graf 2. Rozdělení případů IA dle základního hematologického onemocnění (n = 51 pacientů).

AML - akutní myeloidní leukemie, NHL - nonhodgkinský lymfom, ALL - akutní lymfoblastická leukemie, CLL - chronická lymfatická leukemie, MDS - myelodysplastický syndrom, autoimunita - autoimunitní onemocnění



Graf 3. Rozdělení případů IA dle typu protinádorové léčby.

HSCT - transplantace krvetvorné tkáně

zahájením protinádorové léčby zahájen také pravidelný monitoring GM. Pozitivní výsledek testu u rizikového nemocného inicioval časné provedení HRCT s pozitivním výsledkem.

Diagnostické metody

Autopsie

Autopsie byla provedena u 16 (64 %) z 25 zemřelých nemocných. U 5 pacientů vedla až sekce ke stanovení diagnózy IA. V 6 případech autopsie potvrdila diagnózu stanovenou již ante mortem (5 případů bylo diagnostikováno na základě detekce GM a 1 pak pomocí HRCT). Naopak u 5 autoptických vyšetření pacientů s pravděpodobnou IA (stanovenou 1krát na základě nálezu na HRCT a 4krát podle výsledků GM) nebyla histologicky ani kulturačně aspergilová infekce zachycena. Všichni nemocní z této skupiny však byli v době úmrtí léčeni antimykotiky a ve 2 případech dokonce několik týdnů.

Biopsie primárně sterilních tkání

Pouze ve 2 (3,8 %) případech byla provedena tkáňová biopsie (plíce;

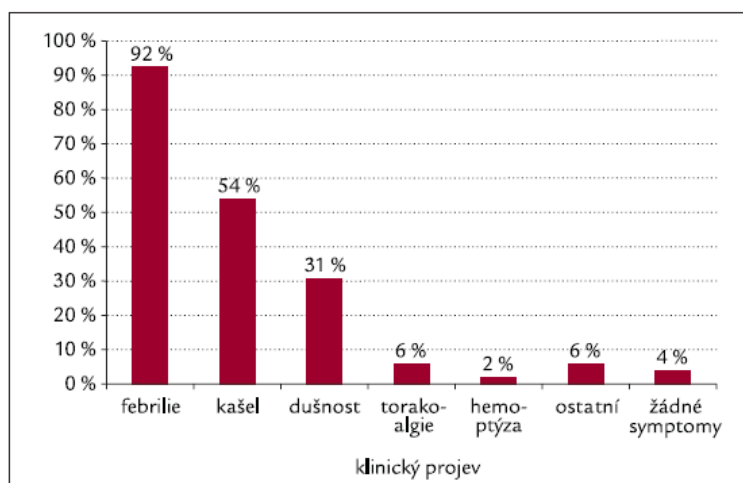
nadvarle a slezina) a v obou případech s pozitivním výsledkem histologického vyšetření. Kultivace naopak byla ze všech biotovaných tkání od obou nemocných negativní.

Konvenční mykologické vyšetření materiálu z dýchacích cest

Sputum bylo odebráno a vyšetřeno konvenčními mykologickými metodami (kultivace, mikroskopie) u 49 nemoc-

ných (94,2 %). Toto mykologické vyšetření však přineslo pozitivní výsledek pouze 3krát (6,1 %). U všech 3 pacientů byla navíc pozitivní pouze kultivace s identickým výsledkem nálezu *Aspergillus fumigatus*. Mikroskopické vyšetření sputa bylo u všech 3 nemocných negativní.

BAL byl proveden ve 30 (57,7 %) případech. Konvenční mykologická diagnostika však byla pozitivní pouze



Graf 4. Klinické projevy IA a jejich výskyt.

Tab. 2. Charakter postižení na RTG plic a HRCT plic v době stanovení diagnózy IA.

	n (%)
RTG plic - nález (n = 48)	
- negativní	14 (29,1 %)
- pozitivní	34 (70,9 %)
Charakter postižení na RTG plic v době diagnózy (n = 34)	
- ložisková infiltrace	25 (73,5 %)
- mnohočetná ložiska	5 (14,7 %)
- intersticiální proces	3 (8,8 %)
- difúzní zastínění	1 (2,9 %)
HRCT plic - nález (n = 42)	
- negativní	0
- pozitivní	42 (100 %)
Charakter postižení na HRCT plic v době diagnózy (n = 42)	
- halo	3 (7,1 %)
- air crescent	3 (7,1 %)
- intersticiální proces	2 (4,7 %)
- konsolidace	19 (45,2 %)
- makronoduly > 1cm	9 (21,4 %)
- mikronoduly < 1cm	6 (14,2 %)

u 2 nemocných (6,7 %). U obou byl vykultivován *Aspergillus fumigatus*, mikroskopické vyšetření lavážní tekutiny bylo pozitivní jen u 1 z těchto 2 případů.

Souhrnně lze říci, že vyšetření materiálu z dýchacích cest konvenčními mikrobiologickými metodami napomohlo stanovení diagnózy IA pouze u 5 (9,6 %) nemocných z našeho souboru.

Zobrazovací metody

Běžné RTG vyšetření plic bylo provedeno u většiny pacientů z našeho souboru (48; 92,3 %). U 14 (29,1 %) z nich byl snímek v době stanovení diagnózy IA zcela negativní. Ve zbývajících 70,9 % případů pak byl sice RTG snímek patologický, ale obraz byl zcela nespecifický s dominantním nálezem ložiskového postižení plicního parenchymu (tab. 2).

Vysoce rozlišovací CT (HRCT) plic bylo provedeno u 42 (80,7 %) infekcí. Na rozdíl od konvenčního snímku bylo abnormální ve všech případech (100 %). HRCT bylo indikováno také u 10 nemocných s negativním nálezem na konvenčním snímku plic a ve všech 10 případech byl nález na HRCT patologický.

HRCT tak prokázalo vysokou (100%) senzitivitu pro diagnostiku plicních abnormalit při IA a schopnost identifikovat tyto abnormality v době, kdy nález na konvenčním snímku je dosud v normálních mezích.

Na druhou stranu však v době diagnózy měl jen velmi malý počet nemocných obraz podezřelý z angioinvasivní formy IA. Pouze ve 3 (7,1 %) případech byl nalezen obraz „halo“ a u dalších 3 (7,1 %) nemocných známky „air crescent“. U absolutní většiny infekcí (85,8 %) byl nález na HRCT zcela nespecifický a pestrý. HRCT tedy poukázalo na přítomnost plicní patologie, nicméně přineslo relativně malou informaci o možné etiologii procesu (tab. 2).

Galaktomanan (GM)

U 43 invazivních aspergilových infekcí bylo vyšetřeno sérum na přítomnost GM. Za GM pozitivní bylo označeno 41 případů (95,3 %). U zbývajících 25 nemocných byl pozitivní pouze 1 vzorek krve a tak nemohli být označeni za pozitivní. Oba pacienti byli v době odběru léčení antimykotiky s účinkem na kmeny aspergilů, což

mohlo ovlivnit množství mykotické nálože, respektive množství uvolňovaného GM.

Vedle excelentní senzitivity umožnila pozitivita tohoto antigenu v séru odlišit etiologii nespecifických abnormalit na HRCT. 35 pacientů mělo současně provedeno HRCT a GM byl v séru pozitivní. Pouze ve 4 (11,4 %) případech byl na HRCT obraz charakteristický pro IA. U zbylých 31 (88,5 %) infekcí byl nález na HRCT nespecifický a právě současná pozitivita GM dokázala identifikovat u těchto abnormalit pravděpodobnou aspergilovou etiologii.

Přínosnost jednotlivých metod pro diagnostiku IA

Konvenční diagnostické metody (včetně autopsie) umožnily stanovit diagnózu IA pouze v 15 (28,8 %) případech z našeho souboru. Zavedení detekce GM zásadním způsobem diagnostiku této život ohrožující infekce změnilo: 37 (71,2 %) případů IA zachycených na našem pracovišti bylo stanovení na základě positivity GM, většinou v kombinaci s nálezem abnormality na zobrazovacích metodách (graf 5).

Vedle zvýšení počtu zachycených invazivních aspergilových infekcí umožnilo zavedení GM také zkrácení doby do stanovení diagnózy respektive do zahájení účinné antimykotické léčby. V období do května roku 2003 byla antimykotická léčba zahajována průměrně 15 dní od prvních klinických příznaků (většinou febrilií). Po zavedení detekce GM, tedy od května roku 2003, byla účinná antimykotika podávána průměrně 11 dní od prvních projevů infekce. Detekce GM tedy zkrátila dobu do startu antimykotické léčby průměrně o 4 dny.

Navíc byla pozitivita GM v séru velice často indikátorem k časnému provedení HRCT. Jestliže v období před zavedením GM byla průměrná doba abnormálního nálezu na HRCT 21 dní od rozvoje klinických projevů, po jeho zavedení se tato doba zkrátila na 11 dní.

Léčba

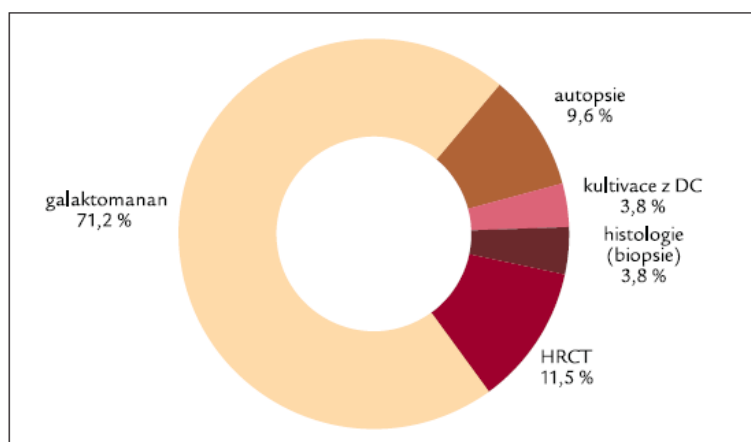
Volba antimykotik a léčebná strategie se v průběhu sledovaného období radikálně změnila. Zatímco do roku 2003 byl používán především konvenční amfotericin B (C-AMB), od této doby byla většina nemocných léčená v primoléčbě vorikonazolem nebo kombinací vorikonazolu a kaspofunginu.

Iniciální léčba vedla souhrnně k dosažení léčebné odpovědi (kompletní a partiální remise) u 18 (34,6 %) infekcí.

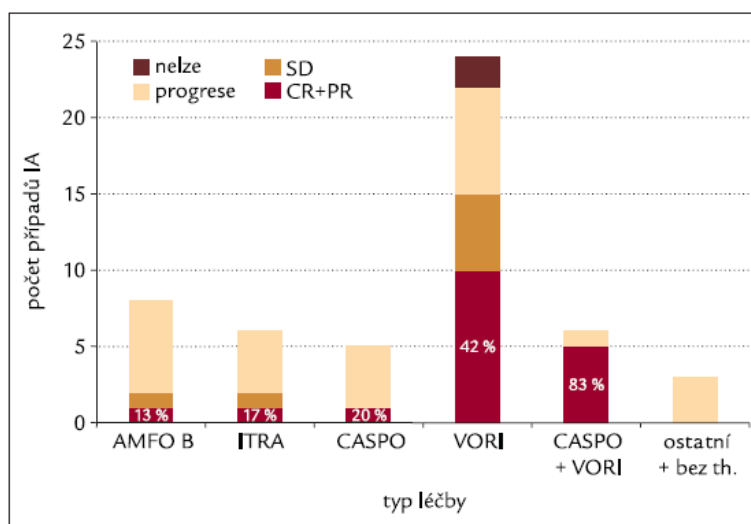
Při monoterapii konvenčním amfotericinem B (n = 8), itrakonazolem (n = 6) a kaspofunginem (n = 5) bylo léčebné odezvy v primoléčbě IA dosaženo maximálně u 20 % nemocných. Nejčastěji však byl v monoterapii použit vorikonazol (n = 24), jehož podávání vedlo u 42 % pacientů k léčebné odpovědi. V 6 případech byla pro vysokou rizikovost nemocných (v 80 % případů se jednalo o nemocné po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně nebo akutní leukemie u mladých pacientů), a to zejména v roce 2006, jako primární terapie zvolena kombinovaná léčba intravenózním kaspofunginem s perorálním vorikonazolem. Přestože jde o malý počet nemocných, je v případech kombinace procento léčebné odezvy významně vyšší než při monoterapii vorikonazolem nebo kaspofunginem, a to 83 % (graf 6).

Pro selhání iniciální léčby byla u 21 (40,3 %) případů IA podávána terapie záchranná. Nejčastěji byla zvolena kombinace kaspofunginu s vorikonazolem (n = 9) s 55% léčebnou odezvou a monoterapie vorikonazolem (n = 4) s podobnou odezvou (50%). Ostatní léky a kombinace pak byly použity jen v izolovaných případech (graf 7).

Zavedení nových účinných antimykotik v letech 2002 a 2003 spolu se zvýšeným počtem včasné diagnostikovaných nemocných s IA vedl k výraznému nárůstu finančního objemu za antimykotickou léčbu této infekce. Za 7leté období činila celkem cena antimykotické léčby IA 17,2 milionů Kč.



Graf 5. Procento případů IA diagnostikovaných pomocí jednotlivých metod. DC – dýchací cesty, HRCT – vysoce rozlišovací CT plic



Graf 6. Počet případů IA léčených jednotlivými antimykotiky/kombinacemi antimykotik a jejich účinnost při použití v primoléčbě IA.

SD – stabilizovaný stav choroby při léčbě, CR – kompletní léčebná odezva, PR – částečná léčebná odpověď, AMFO B – amfotericin B, ITRA – itrakonazol, CASPO – kaspofungin, VORI – vorikonazol

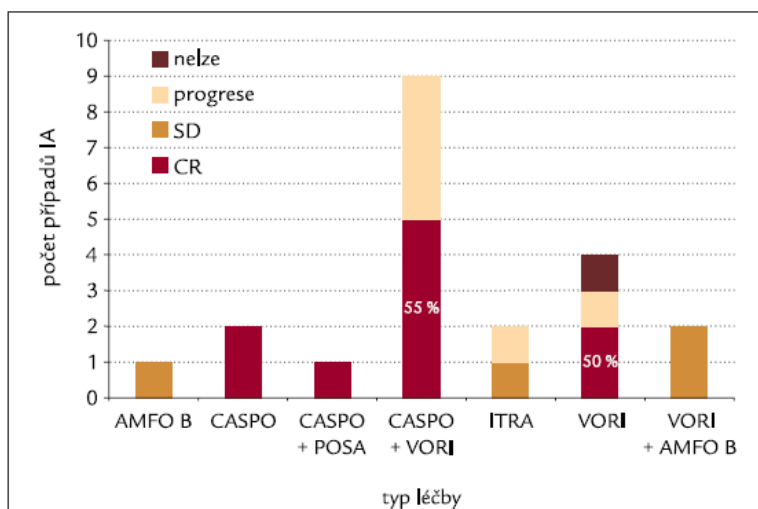
Zatímco v roce 2000 (1 případ IA léčený C-AMB) představovala roční cena antimykotické léčby IA 11 500 Kč, v roce 2006 (22 případů IA léčených novými azoly a echinokandiny) činila tato částka již 6,2 miliónu Kč (graf 8).

Izolovaný vzestup spotřeby za antimykotickou léčbu v roce 2003, který neodpovídá počtu případů IA v tomto roce, byl způsoben komplikovanou léčbou jediného nemocného s dise-

minovanou, a navíc s odstupem času relabující formou IA. Tento nemocný byl téměř 200 dní v roce 2003 léčen kombinovanou antimykotickou léčbou azolu s echinokandinem, která vedla ke kompletní léčebné odezvě.

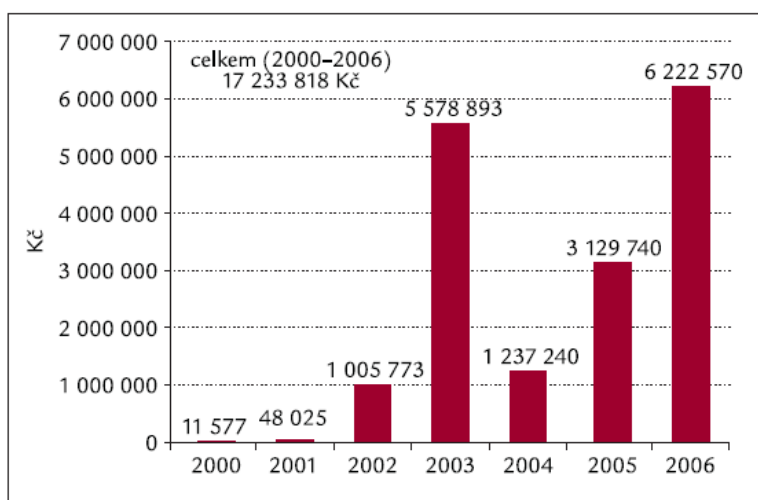
Mortalita

Celková mortalita nemocných ze souboru byla 50,9 % (26 z 51 nemocných). Invazivní aspergilová infekce byla



Graf 7. Počet případů IA léčených jednotlivými antimykotiky/kombinacemi antimykotik a jejich účinnost při použití v záchranné léčbě IA

SD - stabilizovaný stav choroby při léčbě, CR - kompletní léčebná odpověď, PR - částečná léčebná odpověď, AMFO B - amfotericin B, ITRA - itrakonazol, CASPO - kaspofungin, VORI - vorikonazol, POSA - posakonazol



Graf 8. Cena za antimykotickou léčbu IA v letech 2000-2006.

příčinou nebo velmi významným spolupodílejícím se faktorem úmrtí u 16 (31,3 %) pacientů.

Mortalita i výše zmíněná tzv. „attributed“ mortalita byla vyšší u nemocných s prokázanou IA (91,6 % a 83,3 %) ve srovnání s pacienty s pravděpodobnou IA (38,4 % a 12,8 %).

„Attributed“ mortalita také velmi významně klesala v průběhu jednotli-

vých let a to ze 100 % v roce 2000 na 5 % v roce 2006 (graf 9).

Diskuse

Námi předkládaná práce představuje podle našich znalostí první a nejrozsáhlejší analýzu invazivních aspergillových infekcí u hematologických pacientů v České republice.

Pestrost klinického obrazu této infekce a obtížnost její diagnostiky lze

výčist z několika popisů případů IA z našeho pracoviště prezentovaných v tab. 3.

Z práce je velice dobře patrný významně narůstající počet případů IA na našem pracovišti ve sledovaném 7letém období a situace u nás tak kopíruje epidemiologii invazivních mykóz na světových hematologických pracovištích [11].

Rostoucí výskyt IA na naší klinice lze vysvětlit několika faktory.

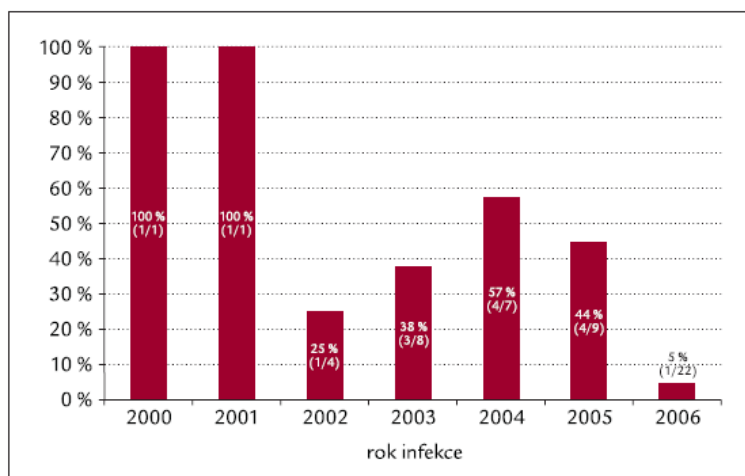
Jistě se uplatnil stále vyšší počet provedených nepřibuzenských alogenních transplantací krevtvočné tkáně (2 v roce 2000 až 13 v roce 2006), což vedlo k nárůstu počtu pacientů nejohroženějších IA. Ostatní parametry, které by mohly ovlivnit nárůst případů IA z pohledu spektra nemocných, zůstávají v jednotlivých letech stejné - počet hospitalizací, počet ostatních nemocných mimo alogenní nepřibuzenskou transplantaci krevtvočné tkáně ve skupině vysoce rizikových pacientů (tj. alogenní příbuzenské transplantace, akutní leukemie, ev. autologní transplantace krevtvočné tkáně), stejně tak jako procento sekci (naopak se od roku 2000 a 2001 mírně snižuje).

Druhým důležitým momentem (zejména v roce 2006), který mohl ovlivnit nárůst případů IA, představují také rozsáhlé stavební úpravy v okolí FN Brno-Bohunice. Na potenciální vliv mykotickými spory kontaminovaného vnitřního prostředí nemocnice upozorňuje také fakt, že většina případů IA na našem pracovišti (61,5 %) byla nozokomiálního původu. Tato hypotéza, přestože její alespoň částečný vliv je na základě literárních dat pravděpodobný [12], nemůže však být vzhledem k chybění pravidelného aeroskopického monitoringu vnitřního prostředí ve FN Brno-Bohunice jednoznačně potvrzena.

Naopak zásadní význam na zvýšení počtu případů IA (zejména pravděpodobné IA) mělo výrazné zlepšení zachytu jednotlivých případů této infekce po zavedení časně diagnostiky pomocí rutinní detekce GM od roku 2003.

Data pro srovnání epidemiologie IA na ostatních hematologických pracovištích v České republice bohužel nejsou k dispozici. Nicméně se dá předpokládat, že ev. nízké počty případů IA zde mohou být způsobeny možným „poddiagnostikováním“ této závažné infekce, zvláště pokud není jednoznačně vypracovaný a zcela rutinní přístup k sérologické diagnostice IA pomocí detekce GM.

V kontextu s publikovanými pracemi představují nejrizikovější skupinu pro postižení IA pacienti s akutní leukémií (48 % případů) [11]. Z pohledu protinádorové léčby pak nemocní podstupující terapii pro akutní leuké-



Graf 8. Cena za antimykotickou léčbu IA v letech 2000–2006.

Tab. 3. Vybrané kazuistiky nemocných s invazivní aspergilózou (IA).

Popis případu

Kazuistika 1 – IA diagnostikována velmi časně pomocí detekce GM a HRCT plic před rozvojem klinické manifestace 32letý muž s nově diagnostikovanou AML v roce 2006, bez neutropenie, léčen kortikoidy (prevence tumor lysis syndromu), afebrilní, asymptomatický. Po zahájení indukční CHT, zahájen monitoring GM 2krát týdně. Již 1. vzorek krve byl pozitivní a tento náleze se potvrdil i v opakovaném vyšetření (maximální IP – 2,54). Pro rizikovost pacienta (nově diagnostikovaná AML zahajující indukční léčbu) indikováno i přes chybění klinického obrazu HRCT plic s překvapivým nálezem několika makronodulů > 1 cm. Byla tak stanovena diagnóza pravděpodobné IA (izolovaná plicní forma) a zahájena kombinovaná antimykotická léčba kaspofunginem s vorikonazolem (15 dnů) s efektem PR a následně vorikonazolem (18 dnů) s efektem CR.

Kazuistika 2 – IA diagnostikovaná pomocí GM a HRCT s negativním nálezem na RTG plic v době jasné patologie na HRCT 59letá žena s nově diagnostikovanou sekundární AML s MDS v roce 2006, s neutropenií trvající déle než 10 dní. V období dřeňového útlumu po indukční CHT došlo k rozvoji febrilní neutropenie. RTG plic bylo s negativním nálezem. Protože febrilie nereagovaly na empirickou ATB terapii, byla 8. den léčby zahájena empirická antimykotická léčba C-AMB. I přes tuto léčbu febrilie pokračovaly a 4. den léčby C-AMB došlo k vzestupu GM > 0,5, a to i v opakovaném vzorku. Provedení HRCT plic prokázalo několik konsolidací v plicním parenchymu. Byla stanovena diagnóza pravděpodobné IA (izolovaná plicní forma) a antimykotická léčba C-AMB změněna za terapii vorikonazolem (53 dnů) s efektem CR.

Kazuistika 3 – Časně diagnostikovaná IA pomocí GM 45letý muž s nově diagnostikovanou sekundární AML v roce 2006 po předchozí léčbě B-CLL a s neutropenií trvající déle než 10 dní. 4. den od zahájení podávání indukční CHT došlo při pravidelném monitoringu k nálezům positivity GM v séru, která byla potvrzena opakovaným vyšetřením (maximální IP – 6,07). Se zpožděním 6 dnů se rozvinuly febrilie a 9 dnů i plicní symptomatologie. HRCT plic provedené 10 dnů od 1. positivity GM a 1 den od rozvoje plicní symptomatologie prokázalo rozsáhlou konsolidaci v plicním parenchymu. Bronchoalveolární laváž mimo positivity GM byla negativní. Byla stanovena diagnóza pravděpodobné IA (izolovaná plicní forma). Kombinovaná antimykotická léčba kaspofunginu s vorikonazolem (64 dnů) vedla k PR a následně dlouhodobá monoterapie vorikonazolem pak k CR onemocnění.

Kazuistika 4 – Diseminovaná forma IA z období před rutinním zavedením detekce GM 18letý muž s nově diagnostikovanou ALL v roce 2003, s neutropenií a kortikoterapií trvající déle než 10 dnů s febriliemi a progredujícím jaterním poškozením pravděpodobně při infiltraci jater základní chorobou. 4 dny od zahájení indukční CHT obsahující kortikoterapii dochází k progresi jaterního poškození, k progredující encefalopatii a k rozvoji bilaterální pneumonie s ložiskovým nálezem na RTG plic a konsolidacemi na HRCT plic. Provedená BAL prokázala pneumocystovou pneumonii (PCR). Kultivačně byla laváž sterilní. Při léčbě vysokodávkovaným co-trimoxazolem dochází k zlepšování febrilií a plicní symptomatologie. Přetrvává však nález infiltrace na RTG plic a proto byla 20. den od zahájení indukční léčby provedena opakovaná BAL se zcela negativním výsledkem všech vyšetření. Na CT mozku (provedené pro progredující kvantitativní poruchu vědomí) byly identifikovány rozsáhlé malacie bilaterálně. Provedená biopsie mozkové tkáně neměla diagnostický přínos. Pro nutnost řízené ventilace indikované z důvodů respiračního selhávání při poruchách vědomí byla provedena necílená BAL s pozitivní kultivací (*Aspergillus fumigatus*), ale výsledek mohl být uzavřen a do rukou kliniků se dostal až 10 dnů od odběru materiálu. V mezidobí (30. den od zahájení protinádorové léčby) však dochází k exitu (multiorganové selhání) a teprve sekční nález překvapivě prokazuje diseminovanou formu IA (postižení plic, mozku, myokardu, ledvin). Diagnóza prokázané IA (diseminované) byla tedy stanovena až ante mortem a jedině pozitivní kultivační vyšetření materiálu ►►

Tab. 3. Vybrané kazuistiky nemocných s invazivní aspergilózou (IA) – pokračování.

ze 3. laváže je k dispozici až po definitivním stanovení diagnózy sekci. Přestože k infekci došlo ještě před zavedením rutinní detekce GM, byl materiál uchován v rámci výzkumného projektu a retrospektivně vyšetřen. Toto vyšetření prokázalo pozitivitu GM jak v tekutině ze všech 3 BAL (1. pozitivita GM 26 dnů před stanovením definitivní diagnózy autopsií), tak v séru (1. pozitivita 8 dní před definitivním stanovení diagnózy autopsií). Tento případ jednoznačně ukazuje na to, jak výrazně by byla zkrácena doba do stanovení diagnózy, kdyby infekce proběhla v době již rutinního vyšetřování GM.

Kazuistika 5 – IA s extrémně rychle progredujícím GM v séru z negativních do pozitivních hodnot s GM jako prognostickým markerem 35letý muž s AA diagnostikovanou v roce 2006 podstupující alogenní nepřibuzenskou HSCT s neutropenií a kortikoterapií > 10 dnů. Časné potransplantační období bylo komplikováno těžkou mukozitidou a epidermolýzou (toxicita přípravného režimu) a febrilní neutropenií iniciálně reagující na ATB terapii. HRCT provedené 3. den po transplantaci pro febrilie a poslechový nález prokázalo konsolidace plicního parenchymu. GM odebraný 3. den po transplantaci byl v krvi negativní. 6. potransplantační den však dochází k prudkému nárůstu hodnot GM do vysokých pozitivit (maximální IP – 7,13). BAL pro těžkou mukozitidu dutiny ústní a obtížně korigovatelnou krvácivou diatezi nebylo možno provést. I přes netypický nález na HRCT byla stanovena diagnóza pravděpodobně IA (izolovaní plicní forma) a zahájena kombinovaná antimykotická léčba kaspofunginu s vorikonazolem. I přes léčbu dochází k prudké progresi hodnot IP GM a nemocný 17. potransplantační den umírá. Autoptické vyšetření (včetně kultivace) potvrdilo rozsáhlou plicní formu IA.

Kazuistika 6 – IA z období před zavedením GM s diseminací, reagující až na kombinovanou antimykotickou léčbu 30letý muž podstupující reindukční chemoterapii pro AML diagnostikovanou v roce 2002, dlouhodobě neutropenický. Již v průběhu podávání CHT došlo k rozvoji febrilní neutropenie s atypickými infiltracemi na RTG a HRCT. BAL nebylo možné provést pro strikturu žvýkacích svalů jako následek těžké odontogenní infekce. Pro pokračující febrilie byl 9. den od zahájení CHT podán C-AMB jako empirická antimykotická léčba s efektem ústupu febrilií, ale perzistencí nálezu intersticiálního procesu na HRCT. Detekce GM v době infekce (rok 2002) nebyla k dispozici. 37 dní od zahájení CHT a 12 dní od ukončení podávání empirické antimykotické terapie C-AMB došlo k rozvoji bolestivosti v levém podžebří a USG vyšetření dutiny břišní prokázalo splenomegalii s mnohočetnými ložisky. 38. den od zahájení CHT byla provedena splenektomie a histologicky byla prokázána mykotická ložiska s morfologií hyf odpovídající IA. Byla tak stanovena diagnóza prokázané diseminované IA (poškození plic a sleziny). Byla zahájena antimykotická terapie kaspofunginem (16 dní) s efektem PR a následně terapie perorální formou vorikonazolu (27 dní) s efektem progresu. V průběhu léčby totiž došlo k rozvoji zduření v oblasti nadvarlete a z histologického vyšetření po provedené orchiektomii byla prokázána opět infiltrace mykotickými vlákny. Současně provedené CT břicha pak prokázalo i několik ložisek v játrech. Proto byla zahájena kombinovaná antimykotická léčba kaspofunginu s vorikonazolem a současně pod touto intenzivní antimykotickou léčbou podány 2 konsolidační CHT s následnou alogenní HSCT. Po 115 dnech kombinované antimykotické léčby i přes současně probíhající protinádorovou léčbu došlo k CR onemocnění.

AML – akutní myeloidní leukemie, CHT – chemoterapie, GM – galaktomanan, IP – index positivity, HRCT – vysoce rozlišovací CT, PR – parciální remise, CR – kompletní remise, MDS – myelodysplastický syndrom, C-AMB – konvenční amfotericin B, B-CLL – B chronická lymfatická leukemie, PCR – polymerázová řetězová reakce, AA – aplastická anémie, USG – ultrasonografie

mii, respektive alogenní HSCT (52 %) [13].

Naše analýza také potvrdila řadu let známý fakt, že dlouhodobá neutropenie a kortikoterapie mají pro riziko IA velký význam – tyto rizikové faktory byly přítomny u 78,8 %, respektive 59,6 % případů IA [14,15].

Absolutně nejvíce invazivních aspergilových infekcí vzniká po inhalaci spor. Proto není překvapením, že většina IA v našem souboru probíhala pod klinickým obrazem plicního poškození (69,2 %), většinou s horečkou nereagující na podávání širokospektrých antibiotik (92,3 %).

Tyto klinické projevy jsou však velice nespecifické.

Konvenční diagnostické metody (včetně stanovení diagnózy ante mortem při autopsii) dokážou v běžné rutinní praxi hematologického pracoviště identifikovat jen velmi malou část případů, a to většinou v již značně pokročilém stadiu [16]. Také v našem souboru dokázaly konvenční mikrobiologické, histologické a radiologické metody identifikovat pouze 15 (28,8 %) případů IA, a to v 5 případech až ante mortem.

Zavedení vysoce rozlišovacího CT plic (HRCT) do algoritmu péče o nemocné s rizikem rozvoje IA výrazně zvýšilo pravděpodobnost časného zachytu této infekce [4]. HRCT dokázalo v našem souboru se 100% senzitivitou zachytit plicní patologii, bohužel

jen ve 14,2 % byl detekován obraz popisovaný jako charakteristický pro IA [4]. Tak jen u velmi malé části nemocných mohlo být vysloveno podezření na mykotickou etiologii na základě nálezu na HRCT plic.

Velmi významný pokrok v časné diagnostice IA znamenalo rozšíření detekce galaktomananu (GM) pomocí ELISA metodiky do rutinní praxe [17].

Senzitivita této metody je vysoká při použití cut-off indexu positivity 0,5 v rutinním monitoringu minimálně 2–3krát týdně [18]. V našem souboru byla 95,3 %. Nález hraničně pozitivních výsledků u 2 zbylých GM negativních pacientů podporuje potřebu užití sníženého cut-off indexu positivity

u nemocných, kteří jsou monitorováni v průběhu podávání antimykotik s účinkem na vláknité mykózy (např. profylakticky nebo empiricky) [19]. Oba 2 zmínění pacienti byli v době stanovení diagnózy léčeni antimykotiky s účinkem na kmeny aspergilů.

Pro klíčový význam pravidelného monitoringu GM svědčí pak především fakt, že 71,2 % případů IA na našem pracovišti bylo diagnostikováno pomocí detekce tohoto antigenu.

Positivita GM nadto zkrátila dobu do stanovení definitivní diagnózy pravděpodobné IA, respektive zkrátila dobu do zahájení podávání účinné antimykotické léčby, a to o 4 dny ve srovnání s historickými kontrolami. Rovněž často iniciovala časné provedení HRCT a pomohla k diferenciální diagnostice nespecifických abnormalit v plicním parenchymu nalezených při tomto vyšetření.

Jistou limitací metody je možnost falešných pozitivit [17]. Jejich znalost lékařem, který výsledek testu hodnotí, však podle našich zkušeností možnost špatné interpretace výsledku dokáže významně minimalizovat.

V současné době je standardní iniciační léčbou IA ve většině center vorikonazol [6]. Také na našem pracovišti byla monoterapie vorikonazolem nejčastěji používanou léčbou první linie. Přestože procento kompletních a parciálních léčebných odpovědí bylo v našem souboru poněkud menší než ve studii Herbrechta et al (42 % v našem souboru vs 52 % v práci Herbrechta) [20], byla léčba vorikonazolem v monoterapii účinnější než ostatní použitá antimykotika. Velmi zajímavým trendem (i když jde o malý počet nemocných) je však 83 % léčebných odpovědí při použití kombinované antimykotické léčby kaspofunginem s vorikonazolem jako léčby první linie.

Značně komplikovanou je pak záchranná léčba IA u nemocných, u kterých terapie první linie selhala. V našem souboru jsme v této indikaci nejčastěji použili opět kombinaci

kaspofunginu s vorikonazolem, a to s léčebnou odpovědí 55 %. Velmi dobrá byla také účinnost monoterapie vorikonazolem (50 %). Nutno však upozornit, že ve většině případů při použití monoterapie vorikonazolem v záchranné léčbě šlo o nemocné, kteří byli léčeni pouze konvenčním amfotericinem B. Pacienti s kombinovanou antimykotickou léčbou byli výrazně častěji „předléčeni“ moderními a účinnými antimykotiky.

Konečně velmi významným momentem vyplývajícím z naší analýzy je změna ve vývoji „attributed“ mortality. Přestože jsme ve sledovaném 7letém období pozorovali výrazný nárůst v prevalenci IA, „attributed“ mortality významně klesla. Tento nálezný, jehož hodnota může být do určité míry limitována retrospektivním charakterem analýzy, lze vysvětlit několika fakty. V průběhu let a především pak v roce 2006 se výrazně zvýšilo procentuální zastoupení případů pravděpodobné IA, která je spojena s nižší mortalitou [10]. Zásadní vliv na zlepšení prognózy našich pacientů s IA však mělo zavedení detekce GM a tak zkrácení doby do stanovení diagnózy spolu se zavedením používání nových účinných antimykotik, ev. ve formě jejich kombinace. Tento trend lze pozorovat i na jiných pracovištích v Evropě [7] a bude zajímavé sledovat, zda-li se na našem pracovišti tendence ve výrazném snižování mortality invazivních aspergilových infekcí potvrdí i v následujících letech. Další snížení morbidity, ale i mortality této život ohrožující infekce (alespoň u nejvíce rizikových pacientů) by mohlo přinést rozšíření profylaktického používání nových antimykotik s účinkem na kmeny aspergilů [21,22].

Nesporné zlepšení péče o pacienty s IA v průběhu naší sledované doby však bylo doprovázeno i výrazným nárůstem finančního objemu spotřebovaného za použitá antimykotika, který se v průběhu 7 let zvýšil o 3 řády (z tisíců Kč na miliony Kč).

Jedním z nejdůležitějších bodů v prevenci IA jako inhalační infekce je

úprava vnitřního prostředí hematologických oddělení (vybudování HEPA filtrace a pozitivní přetlak vzduchu) [12]. Přestože rekonstrukce jednotlivých pracovišť je velice nákladná, je ve světle výše uvedených dat otázkou, zda-li v krátkém časovém horizontu cena za antimykotickou léčbu IA nepřekročí částku za tyto úpravy.

Závěr

Invazivní aspergilóza představuje v současné době nejčastější invazivní mykotickou infekci hematologických nemocných. Ve většině případů jde o infekci nozokomiální, a tak úpravy vnitřního prostředí (HEPA filtrace vzduchu a pozitivní přetlak) mohou její incidenci významně snížit. Námi předkládaná práce velmi detailně poukázala na vysokou rizikovitost pacientů s akutní leukemií a po alogenní transplantaci krevetvorné tkáně, stejně tak na značnou obtížnost diagnostiky této infekce při použití konvenčních diagnostických metod. Zcela zásadní změnou v diagnostice IA bylo zavedení detekce galaktomananu – nejen je možno zachytit větší počet pacientů s touto infekcí, ale diagnostika je častější a v kombinaci s časným podáním účinné antimykotické léčby pak můžeme být svědky zlepšování se prognózy této život ohrožující infekce.

Poděkování

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR8452-3/2005.

Literatura

- O'Brien SN, Blijlevens NMA, Mahfouz TH et al. Infections in Patients with Hematological Cancer: Recent Developments. *Hematology* 2003; 2003: 438–472.
- Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358–366.
- Singh N, Paterson DL. Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 44–69.
- Caillot D, Casasnovas O, Bernard A et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed

- tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 1997; 15: 139–147.
5. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1242–1250.
 6. Patterson TF Treatment of invasive aspergillosis: Polyenes, echinocandins, or azoles? *Medical Mycology* 2006; 44: 357–362.
 7. Pagano L, Caira M, Picardi M et al. Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality-SEIFEM-C Report. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1524–1525.
 8. Upton A, Kirby KA, Carpenter P et al. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 531–540.
 9. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B 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: 7–14.
 10. Cornillet A, Camus C, Nimubona S et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 577–584.
 11. Pagano L, Caira M, Candoni A et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068–1075.
 12. Benet T, Nicolle MC, Thiebaut A et al. Reduction of invasive aspergillosis incidence among immunocompromised patients after control of environmental exposure. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 682–686.
 13. Chamilos G, Luna M, Lewis RE et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989–2003). *Haematologica* 2006; 91: 986–989.
 14. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S et al. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984; 100: 345–351.
 15. Marr KA, Carter RA, Boeckh M et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002; 100: 4358–4366.
 16. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609–622.
 17. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 2007; 163: 191–202.
 18. Maertens JA, Klont R, Masson C et al. Optimization of the cutoff value for the Aspergillus double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1329–1336.
 19. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190: 641–649.
 20. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347: 408–415.
 21. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356: 348–359.
 22. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 335–347.

MUDr. Zdeněk Ráčil
www.fnbrno.cz
e-mail: zracil@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 1. 10. 2007
Přijato po recenzi: 12. 11. 2007

7. Časná diagnostika invazivních zygomykóz

7.1. Epidemiologie a možnosti diagnostiky – literární přehled

Incidence invazivních infekcí vyvolaných ostatními vláknitými houbami, a to především zygomycetami a fusárií je sice nízká, ale během posledních několika let zvláště ve velkých transplantačních centrech významně narostla ⁽¹⁴⁾.

Původcem až 90% všech zygomykóz je *Rhizopus* spp. (vůbec nejčastěji *Rhizopus oryzae*), dále pak *Mucor* spp., *Absidia* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans* a vzácněji některé další druhy.

Invazivní zygomykóza typicky postihuje rhinocerebrální oblast, ale u neutropenických nemocných se nejčastěji setkáme s formou plicní. Méně časté je pak postižení kožní a gastrointestinální. Typickým projevem zygomykózy je vaskulární (především arteriální) invaze a následná trombotizace cév s infarzací a nekrotizací okolních tkání. V okolí postižení se pak vytváří pyogenní reakce. Plicní forma invazivní zygomykózy je doprovázena febrilním stavem a angioinvaze vede k rychlé disseminaci infekce do kontralaterální plíce a dalších orgánů. Velmi charakteristickou vlastností této invazivní mykotické infekce je extrémně rychlá progresse většinou s fulminantním koncem ⁽⁶⁵⁾.

Pro invazivní zygomykózu a fusariózu platí, že nejvýznamnějším rizikovým faktorem je hematologická malignita včetně transplantace krevetvorné tkáně. Riziko invazivní zygomykózy dále zvyšuje GvHD a její léčba, dlouhodobá kortikoterapie, terapie desferoxaminem, diabetická ketoacidóza, renální selhání a expozice rekonstrukčním pracím v nemocnici. Poslední studie také ukazují na určité zvýšené riziko zygomykózy při dlouhodobém podávání vorikonazolu, širokospektrého antimykotika, které však na zygomykózy není účinné ^(4, 66).

Definitivní diagnóza v případě zygomykózy bývá zpravidla stanovena na základě histologického průkazu houbových vláken v postižené tkáni, kultivace umožňuje určení konkrétního druhu

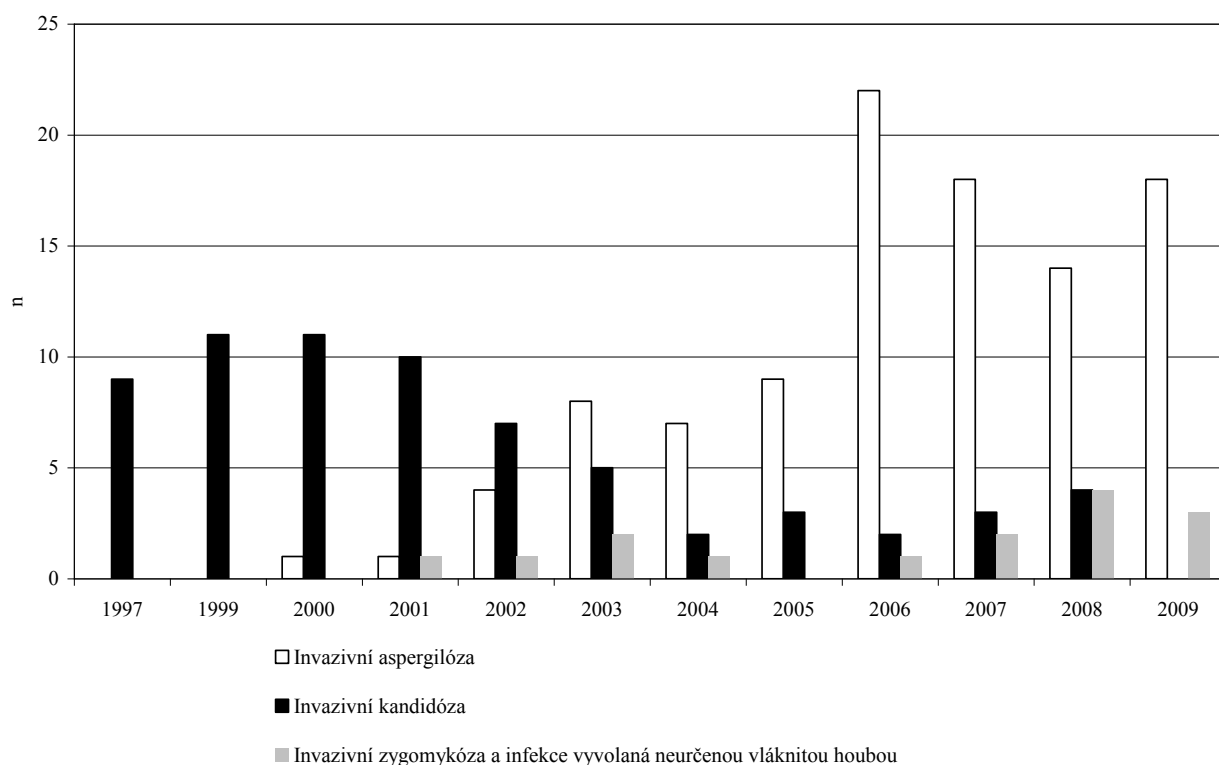
mykotického agens. Pro zygomycety jsou charakteristické široké, tenkostěnné, neseptované nebo velmi řídké septované hyfy větvcí se v úhlu kolem 90°, často v prostředí zbytků rozrušené okolní tkáně.⁽⁶⁷⁾ I přes zřejmý histologický nález však může být kultivace ze vzorku tkáně negativní – díky předchozí antifungální léčbě nebo v důsledku homogenizace vzorků tkáně, které snižují životaschopnost hub.⁽⁶⁸⁾ Pomocí zobrazovacích metod (RTG, HRCT, CT) nelze rozlišit mezi infekcemi způsobenými různými vláknitými houbami. Vzhledem k naprosté absenci sérologických testů pro detekci zygomycetových infekcí, obrací se v posledních letech pozornost k vysoce citlivým molekulárně biologickým metodám.

Tato problematika je ovšem velmi komplikovaná, patogenů bývá ve vzorcích i při masivní infekci malé množství a je zapotřebí velmi účinná metoda izolace fungální DNA. Zároveň je nutno brát v úvahu zvýšené riziko možnosti kontaminace vzorků mikromycetami z prostředí. Velmi vhodné se proto zdá použití specifických metod, které tyto umí prostřed'ové kontaminanty z detekce vyloučit. Kvantifikace nálože houbové DNA ve vzorku pomocí real-time PCR nám pak může pomoci odlišit případnou kontaminaci/kolonizaci od aktivní infekce.

7.2. Invazivní zygomykózy na Interní hematoonkologické klinice LF MU a FN Brno – molekulárně biologická diagnostika

Situace na našem pracovišti kopíruje literární data. Přesto, že infekce vyvolné zygomycetami jsou raritní, jejich incidence narůstá a v posledních letech je jejich výskyt frekventnější než výskyt invazivní kandidózy (Graf 1.)

Graf 1. Výskyt invazivních mykotických infekcí na IHOK LF MU a FN Brno 1997-2009.



Identicky s literárními daty se ve většině případů jedná o diagnózu pozdní, založenou na histologickém/kultivačním vyšetření tkáně z biopsického materiálu (ve většině případů terapeutické resekce ložiska) a nebo z materiálu při autopsii.

Na rozdíl od invazivní aspergilózy, kde sérologická diagnostika dominuje nad diagnostikou molekulárně biologickou, v případě invazivní zygomózy představují molekulárně biologické metody jedinou možnost pro časnou diagnostiku.

V rámci Pracovní skupiny pro oportunní infekce byla zavedena do praxe in house specifická seminested real-time PCR metoda s High Resolution Melt analýzou specifickou pro *Zygomycety* ⁽⁶⁹⁾, která je v případě positivity následována specifickou real-time PCR metodou pro určení konkrétních druhů (pro potvrzení výsledků HRM a přesnější kvantifikaci nálože zygomycetové DNA ve vzorku).

Naše výsledky s použitím této metody na materiálech z tkání získaných biopsií a z tekutiny ztísané bronchoalveolární laváží byly recentně publikovány a práce je přílohou této kapitoly (Hrncirova,

K., Lengerova, M., Kocmanova, I., Racil, Z., Volfova, P., Palousova, D., Moulis, M., Weinbergerova, B., Winterova, J., Toskova, M., Pospisilova, S. & Mayer, J. Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples Using High Resolution Melt Analysis. *J Clin Microbiol.*, 48, 2010, 9: 3392-3394)

- 7.2.1. Hrcirova, K., Lengerova, M., Kocmanova, I., Racil, Z., Volfova, P., Palousova, D., Moulis, M., Weinbergerova, B., Winterova, J., Toskova, M., Pospisilova, S. & Mayer, J. Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples Using High Resolution Melt Analysis. J Clin Microbiol., 48, 2010, 9: 3392-3394**

Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples by Use of High-Resolution Melt Analysis[∇]

Kristyna Hrnčířová,^{1*} Martina Lengerová,¹ Iva Kocmanová,² Zdeněk Račil,³ Pavlina Volfová,¹
Dita Paloušová,¹ Mojmír Moulis,⁴ Barbora Weinbergerová,³ Jana Winterová,³
Martina Tosková,³ Sarka Pospisilová,¹ and Jiri Mayer³

Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic¹;
Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic²; Department of
Internal Medicine—Hematology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno,
Czech Republic³; and Department of Pathology, Masaryk University and
University Hospital Brno, Brno, Czech Republic⁴

Received 2 June 2010/Accepted 21 June 2010

We present a method for rapid and simple detection of clinically relevant mucormycetes in cultures and clinical samples. This seminested real-time PCR uses mucormycete-specific primers and is followed by species identification using high-resolution melt (HRM) analysis. The method is highly suitable for routine clinical diagnostics.

Invasive infections caused by mucormycetes started to occur more frequently in the last decade and are connected with rapid progression and high mortality rates. Early diagnostics and targeted treatment are crucial. Most zygomycosis cases (over 90%) are caused by *Rhizopus* spp., followed by *Mucor* spp., *Lichtheimia* spp., *Rhizomucor pusillus*, and, rarely, some other species (2, 9, 11, 16).

Definitive diagnosis of mucormycosis is usually made after histopathological proof of mucormycete-like hyphae in involved tissue; the causative agent can be determined only by culture (13). So far, no serological test is available and radiological methods are nonspecific.

Molecular detection of mucormycetes is complicated by several factors, and we still do not have any standard protocol. Few methods for the detection of mucormycetes have been published, and only some have been evaluated using clinical samples (1, 5, 10, 14, 15, 17) or samples from animal models (6, 7).

The aim of this study was to develop a rapid and sensitive technique for the detection and identification of clinically important mucormycetes. We adopted primers from a qualitative method previously published by Bialek et al. (1) that is specific for members of the order *Mucorales* targeting 18S ribosomal DNA (rDNA). We modified it to seminested real-time PCR with EvaGreen dye, followed by species distinction by high-resolution melt (HRM) analysis. HRM analysis uses amplification of DNA in the presence of intercalation dye. Fluorescence is measured during a controlled melting of PCR product that results in a melt curve that depends mainly on GC content, length, and sequence of the PCR product. This simple method

can be used for genotyping or mutation scanning without the need for time-consuming sequencing (4, 12).

DNA was isolated from 50 μ l of fungal culture (inoculum was prepared by covering sporulating colonies with approximately 2 ml of sterile 0.85% saline) or a piece of fresh tissue (2 by 1 mm) using the ZR fungal/bacterial DNA kit (Zymo Research). Tissue samples were incubated in lysis buffer overnight, and cultures were immediately processed according to the manufacturer's protocol. Disruption was extended to 15 min (Disruptor Genie; Scientific Industries). DNA from formalin-fixed, paraffin wax-embedded (FFPE) tissue samples was isolated from 2 or 3 scrolls (5 to 10 μ m each) of paraffin block using a DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). Paraffin was dissolved in 1 ml of xylene, and then the tissue was washed two times using 1 ml of 96% ethanol and incubated in 180 μ l of ATL buffer and 20 μ l of proteinase K (600 milliabsorbance units/ml solution) at 55°C overnight and then at 90°C for 1 h. The next steps were done in accordance with the manufacturer's protocol. DNA isolation from clinical samples was done in a biological safety cabinet. An aliquot of sterile water was processed with each set of samples as a control of potential contamination during the isolation process.

Five microliters of DNA was amplified in 25 μ l of amplification mixture that contained a 0.2 μ M concentration each of primers ZM1 and ZM2 (1), 120 μ M deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; Roche, Germany), 2.5 mM MgCl₂, 1 \times GeneAmp PCR Gold buffer, and 1.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The cycling conditions were 10 min at 95°C for 16 cycles (30 s at 94°C, 30 s at 50°C, and 60 s at 72°C) and 7 min at 72°C. One microliter of PCR product from the external round was then amplified in duplicate using Rotorgene 6000 (Corbett Research, Australia). Twenty-five microliters of the amplification mixture contained a 0.4 μ M concentration each of primers ZM1 and ZM3 (1), 12.5 μ l of SensiMix HRM, and 1 μ l of EvaGreen (both SensiMix HRM and EvaGreen from Quantace, United Kingdom). The cycling conditions were 10 min at 95°C for 40 cycles (15 s at 95°C, 20 s

* Corresponding author. Mailing address: Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine—Hematology, University Hospital Brno, Cernopólní 9, 613 00 Brno, Czech Republic. Phone: 420532234641. Fax: 420532234623. E-mail: khrncirova@fnbrno.cz.

[∇] Published ahead of print on 30 June 2010.

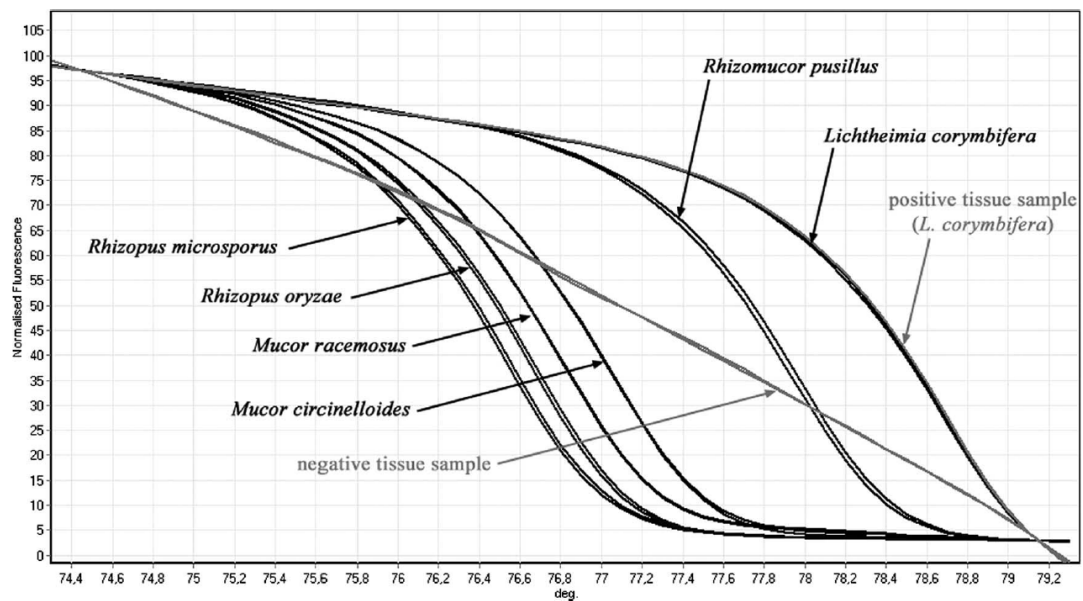


FIG. 1. Representative result of high-resolution melt (HRM) analysis. Shown are HRM curves for six mucormycete isolates (black curves) and one negative and one positive tissue sample (gray curves).

at 60°C, and 30 s at 72°C; acquired on the green channel), followed by HRM analysis (ramp from 74°C to 79.5°C, rising by 0.1°C each cycle, acquired on the HRM channel). Rotorgene 6000 series software (version 1.7) was used for analysis of the results. All positive results were confirmed by sequencing of the PCR product. DNA was purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) and sequenced using a BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using the BLAST alignment program of the GenBank database.

We used DNA extracted from five mucormycete cultures diluted in Tris-EDTA (TE) buffer as positive controls in every run. A DNA isolation control (sterile water processed with clinical samples) and a negative control of PCR (sterile water) were added to each run as well.

In this study, we tested 31 fungal isolates, comprising 10 mucormycete isolates and 21 isolates from other filamentous fungal groups (Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno and Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic). All mucormycete isolates were correctly identified. The melting temperatures (T_m) for each species were as follows: for *Rhizopus microsporus*, 76.46°C; for *Rhizopus oryzae*, 76.59°C; for *Mucor racemosus*, 76.78°C; for *Mucor circinelloides*, 76.98°C; for *Rhizomucor pusillus*, 77.87°C; and for *Lichtheimia corymbifera*, 78.56°C. Representative HRM curves for six different mucormycetes are shown in Fig. 1. All HRM analysis results were confirmed by sequencing. None of the nonmucormycete fungi were positively tested. The results are summarized in Table 1.

We also tested 12 tissue samples, 7 (6 fresh and 1 FFPE) from patients with histopathologically or culture-proven zygomycosis and 5 (3 fresh and 2 FFPE) from patients without zygomycosis (obtained from hemato-oncological patients from

TABLE 1. List of fungal isolates used in this study and results of HRM analysis^a

Organism	Accession no. or source	Result of zygomycete HRM analysis
Mucormycetes		
<i>Rhizopus oryzae</i>	Clinical isolate; DCM CCM 8075	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Rhizopus</i> sp.	Clinical isolate; DCM	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Rhizopus microsporus</i>	Clinical isolate; DCM	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>Rhizomucor pusillus</i>	CCM F-211	<i>Rhizomucor pusillus</i>
<i>Mucor racemosus</i>	CCM 8190	<i>Mucor racemosus</i>
<i>Mucor circinelloides</i>	Clinical isolate; DCM	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	CCM 8077	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
	Clinical isolate; DCM	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
	Clinical isolate; DCM	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
Other filamentous fungi		
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Fusarium proliferatum</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Fusarium solani</i>	CCM 8014	Negative
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Aspergillus niger</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
	CCM 8155	Negative
<i>Aspergillus flavus</i>	CCM 8363	Negative
	CCM F-171	Negative
<i>Aspergillus terreus</i>	CCM 8082	Negative
<i>Aspergillus ustus</i>	CCM F-414	Negative
<i>Aspergillus nidulus</i> (nidulans)	CCM F-266	Negative
<i>Aspergillus sydowii</i>	Environment; DCM	Negative
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	Environment; DCM	Negative
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> f. sp. <i>piscicola</i>	CCM F-348	Negative
<i>Penicillium commune</i>	CCM F-327	Negative
<i>Penicillium brevicompactum</i>	CCM 8040	Negative
	Environment; DCM	Negative
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Environment; DCM	Negative

^a CCM, Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic; DCM, Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Czech Republic.

TABLE 2. List of tissue samples used in this study and results of HRM analysis

Patient	Tissue sample	Histopathology result	Culture result	HRM analysis result
1	Lung	Positive	Negative	<i>Rhizopus microsporus</i>
2	Lung (FFPE)	Positive	Negative	<i>Rhizomucor pusillus/miehei</i>
3	Oral cavity	Positive	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
4	Lung	Positive	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
5	Lung	Positive	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
6	Oral cavity 1	Positive	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
	Oral cavity 2	Positive	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
7	Lung	Negative	Negative	Negative
8	Lung	Negative	Negative	Negative
9	Lung (FFPE)	Negative	Negative	Negative
10	Lung	Negative	Negative	Negative
11	Lung (FFPE)	Negative	Negative	Negative

University Hospital Brno, Czech Republic). All seven tissue samples from patients with proven zygomycosis were PCR positive, and in all cases, we were able to directly determine the mucormycete species: *R. microsporus* ($n = 4$), *L. corymbifera* ($n = 2$), and *R. pusillus/Rhizomucor miehei* (these two species have 100% sequence homology in the target region and therefore cannot be distinguished; $n = 1$). All five tissue samples from patients without zygomycosis were negative. Results are summarized in Table 2, and representative HRM analysis curves are shown in Fig. 1. Amplification of fragmented DNA from FFPE samples can be problematic (8). In this study, we tested one FFPE tissue from a patient with proven zygomycosis, and the result was positive.

The sensitivity of the method was assessed by amplification of dilutions (2×10^7 to 2×10^0 copies/5 μ l) of plasmid DNA (external PCR products of *R. pusillus* and *A. corymbifera* cloned into the pCR2.1 vector; Invitrogen). Reproducible melt curves were obtained for concentrations up to 0.1 fg of plasmid DNA, the detection limit corresponding to the original qualitative method (1), in both species.

To assess potential PCR inhibition, human albumin gene was detected by real-time PCR (3) in all tissue samples. No inhibition was observed.

In conclusion, the HRM assay presented is very simple and enables rapid and accurate detection and identification of mucormycetes in tissue samples and culture isolates. It is able to distinguish the main clinically relevant mucormycetes and shows no cross-reactivity with nonmucormycete filamentous fungi. It is highly sensitive and specific and is suitable for routine clinical diagnostics. Its potential for use in diagnostics with other clinical materials, such as bronchoalveolar lavage fluid, sputum, etc., needs further study but is evident.

Nucleotide sequence accession numbers. Sequences of products from the internal round of PCR were deposited in GenBank under the following accession numbers: for *Rhizopus microsporus*, HM234125; for *Rhizopus oryzae*, HM234126; for *Mucor racemosus*, HM234127; for *Rhizomucor pusillus*, HM234128; and for *Lichtheimia corymbifera*, HM234129.

This study was supported by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic (NS10442-3/2009 and NS10441-3/2009).

REFERENCES

- Bialek, R., F. Konrad, J. Kern, C. Aepinus, L. Cecenas, G. M. Gonzalez, G. Just-Nubling, B. Willinger, E. Presterl, C. Lass-Flörl, and V. Rickerts. 2005. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* **58**:1180–1184.
- Chayakulkeeree, M., M. A. Ghannoum, and J. R. Perfect. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:215–229.
- Chiu, R. W. K., M. F. Murphy, C. Fidler, B. C. Y. Zee, J. S. Waincoat, and Y. M. D. Lo. 2001. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin. Chem.* **47**:667–672.
- Erali, M., K. V. Voelkerding, and C. T. Wittwer. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp. Mol. Pathol.* **85**:50–58.
- Hata, D. J., S. P. Buckwalter, B. S. Pritt, G. D. Roberts, and N. L. Wengenack. 2008. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2353–2358.
- Ibrahim, A. S., J. C. Bowman, V. Avanesian, K. Brown, B. Spellberg, J. E. Edwards, Jr., and C. M. Douglas. 2005. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3- β -D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:721–727.
- Kasai, M., S. M. Harrington, A. Francesconi, V. Petraitis, R. Petraitis, M. G. Beveridge, T. Knudsen, J. Milanovich, M. P. Cotton, J. Hughes, R. L. Schaufele, T. Sein, J. Bacher, P. R. Murray, D. P. Kontoyiannis, and T. J. Walsh. 2008. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3690–3702.
- Lehmann, U., and H. Kreipe. 2001. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* **25**:409–418.
- Malani, A. N., and C. A. Kauffman. 2007. Changing epidemiology of rare mold infections: implications for therapy. *Drugs* **67**:1803–1812.
- Nagao, K., T. Ota, A. Tanikawa, Y. Takae, T. Mori, S. Udagawa, and T. Nishikawa. 2005. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. *J. Dermatol. Sci.* **39**:23–31.
- Pfaller, M. A., P. G. Pappas, and J. R. Wingard. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* **43**:S3–S14.
- Reed, G. H., J. O. Kent, and C. T. Wittwer. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**:597–608.
- Ribes, J. A., C. L. Vanover-Sams, and D. J. Baker. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:236–301.
- Rickerts, V., G. Just-Nubling, F. Konrad, J. Kern, E. Lambrecht, A. Bohme, V. Jacobi, and R. Bialek. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:8–13.
- Rickerts, V., S. Mousset, E. Lambrecht, K. Tintelnot, R. Schwerdtfeger, E. Presterl, V. Jacobi, G. Just-Nubling, and R. Bialek. 2007. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* **44**:1078–1083.
- Roden, M. M., T. E. Zaoutis, W. L. Buchanan, T. A. Knudsen, T. A. Sarkisova, R. L. Schaufele, M. Sein, T. Sein, C. C. Chiou, J. H. Chu, D. P. Kontoyiannis, and T. J. Walsh. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin. Infect. Dis.* **41**:634–653.
- Spieß, B., W. Seifarth, M. Hummel, O. Frank, A. Fabarius, C. Zheng, H. Morz, R. Hehlmann, and D. Buchheidt. 2007. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3743–3753.

8. Závěr

Tato habilitační práce dokumentuje výzkumné projekty a zkušenosti na poli diagnostiky a terapie hlubokých mykotických infekcí vzniklé v rámci Pracovní skupiny pro oportunní infekce Interní hematoonkologické kliniky LF MU a FN Brno. Habilitační práce poukazuje na systematickosti výzkumu a dlouhodobé plnění zvolených cílů – tzn. zvýšit záchyt invazivních mykóz, zkrátit dobu do definitivní diagnózy, zoptimalizovat léčbu a tak významným způsobem zlepšit prognózu nemocných.

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí je velmi komplikovaná problematika, na které pracuje více či méně úspěšně celá řada světových pracovišť.

Výsledky našeho výzkumu a naše zkušenosti na poli sérologických metod významným způsobem přispěly k rozšíření detekce galaktomannanu na ostatní hematoonkologická pracoviště v České a Slovenské republice. Navíc naše práce v oblasti možných příčin falešné positivity tohoto testu mají jednoznačně mezinárodní dopad. Výzkum a zkušenosti s detekcí 1,3-β-D glukanu na našem pracovišti jsou jedny z největších v mezinárodním měřítku a námi publikovaná práce jistě ovlivní další výzkum a používání tohoto testu. Velmi významná je i prezentovaná systematická práce na poli molekulárně biologické diagnostiky klinicky velmi závažných a obtížně diagnostikovatelných invazivních zygomykóz.

Prognóza nemocných s invazivními mykotickými infekcemi se v České a Slovenské republice za posledních několik let významně zlepšila. Jde nepochybně o výsledek celonárodní aktivity na tomto poli. Naše pracoviště a pracovní skupina se svým mezioborovým přístupem hrají v těchto snahách důležitou roli a v řadě pohledů je náš program a výzkum prezentovaný v této habilitační práci příkladem pro ostatní centra.

9. Literatura (která není součástí publikovaných prací začleněných do textu)

1. FERNANDEZ, H. F., SUN, Z., YAO, X., et al. *Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2009, 361, p. 1249-1259
2. NEUBURGER, S., MASCHMEYER, G. *Update on management of infections in cancer and stem cell transplant patients*. Ann Hematol, 2006, 85, p. 345-356
3. O'BRIEN, S. N., BLIJLEVENS, N. M. A., MAHFOUZ, T. H., et al. *Infections in Patients with Hematological Cancer: Recent Developments*. Hematology, 2003, 2003, p. 438-472
4. PFALLER, M. A. *Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends*. Clin Infect Dis, 2006, 43 Suppl 1, p. S3-14
5. RUHNKE, M., MASCHMEYER, G. *Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer -- review of the literature*. Eur J Med Res, 2002, 7, p. 227-235
6. RÁČIL, Z. *Optimalizace diagnostiky a terapie závažných oportunních mykotických infekcí u nemocných s hematologickými malignitami a po transplantaci krvetvorných buněk - dizertační práce*. LF MU Brno 2008, p.
7. PAGANO, L., CAIRA, M., CANDONI, A., et al. *The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study*. Haematologica, 2006, 91, p. 1068-1075
8. VAN BURIK, J. H., LEISENRING, W., MYERSON, D., et al. *The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients*. Medicine (Baltimore), 1998, 77, p. 246-254

9. GROLL, A. H., SHAH, P. M., MENTZEL, C., et al. *Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital*. J Infect, 1996, 33, p. 23-32
10. YAMAZAKI, T., KUME, H., MURASE, S., et al. *Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan*. J Clin Microbiol, 1999, 37, p. 1732-1738
11. MORGAN, J., ALEXANDER, B., WANNEMUEHLER, K. *Quantification of Risk for Invasive Fungal Infection (IFI) among Transplant (TX) Recipients Reporting to TRANSNET*. Program and abstracts of the 45th ICAAC, October 30-November 2, 2004, Washington, D.C., USA, p. Abstract M-1058
12. MARR, K. A., CARTER, R. A., BOECKH, M., et al. *Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors*. Blood, 2002, 100, p. 4358-4366
13. GAVALDA, J., LEN, O., ROVIRA, M. *Epidemiology of Invasive Fungal Infections (IFI) in Solid Organ (SOT) and Hematopoietic Stem Cell (HSCT) Transplant Recipients: a Prospective Study from RESITRA*. 46th ICAAC. San Francisco, CA.; 2006:Abstract M-990
14. MARR, K. A., CARTER, R. A., CRIPPA, F., et al. *Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients*. Clin Infect Dis, 2002, 34, p. 909-917
15. ALEXANDER, B. D., PFALLER, M. A. *Contemporary Tools for Diagnosis and Management of Invasive Mycoses*. Clin Infect Dis, 2006, 43 Suppl 1, p. S15-27
16. SHAO, P. L., HUANG, L. M., HSUEH, P. R. *Invasive fungal infection - laboratory diagnosis and antifungal treatment*. J Microbiol Immunol Infect, 2006, 39, p. 178-188
17. CHANDRASEKAR, P. *Invasive mold infections: recent advances in management approaches*. Leuk Lymphoma, 2009, 50, p. 703-715

18. MAERTENS, J., THEUNISSEN, K., LODEWYCK, T., et al. *Advances in the serological diagnosis of invasive Aspergillus infections in patients with haematological disorders*. *Mycoses*, 2007, 50 Suppl 1, p. 2-17
19. MAERTENS, J., DEEREN, D., DIERICKX, D., et al. *Preemptive antifungal therapy: still a way to go*. *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 19, p. 551-556
20. WHITE, P. L., BARNES, R. A. *Aspergillus PCR - Platforms, strengths and weaknesses*. *Medical Mycology*, 2006, 44, p. 191 - 198
21. AQUINO, V. R., GOLDANI, L. Z., PASQUALOTTO, A. C. *Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis*. *Mycopathologia*, 2007, 163, p. 191-202
22. UPTON, A., LEISENRING, W., MARR, K. A. *(1-->3) beta -D-glucan assay in the diagnosis of invasive fungal infections*. *Clin Infect Dis*, 2006, 42, p. 1054-1056; author reply 1056
23. PFEIFFER, C. D., FINE, J. P., SAFDAR, N. *Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis*. *Clin Infect Dis*, 2006, 42, p. 1417-1427
24. MUNOZ, P., GUINEA, J., BOUZA, E. *Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006, 12, p. 24-39
25. WHEAT, L. *Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, Part II*. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2005, 27, p. 59-63
26. WHEAT, L. J. *Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, part I*. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2005, 27, p. 51-57
27. OSTROSKY-ZEICHNER, L., MARR, K. A., REX, J. H., et al. *Amphotericin B: time for a new "gold standard"*. *Clin Infect Dis*, 2003, 37, p. 415-425

28. MAERTENS, J., VERHAEGEN, J., DEMUYNCK, H., et al. *Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis*. J Clin Microbiol, 1999, 37, p. 3223-3228
29. MAERTENS, J., VERHAEGEN, J., LAGROU, K., et al. *Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation*. Blood, 2001, 97, p. 1604-1610
30. MAERTENS, J., VAN ELDERE, J., VERHAEGEN, J., et al. *Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients*. J Infect Dis, 2002, 186, p. 1297-1306
31. SULAHIAN, A., BOUTBOUL, F., RIBAUD, P., et al. *Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study*. Cancer, 2001, 91, p. 311-318
32. HERBRECHT, R., LETSCHER-BRU, V., OPREA, C., et al. *Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients*. J Clin Oncol, 2002, 20, p. 1898-1906
33. PINEL, C., FRICKER-HIDALGO, H., LEBEAU, B., et al. *Detection of circulating Aspergillus fumigatus galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2003, 41, p. 2184-2186
34. ROVIRA, M., JIMENEZ, M., DE LA BELLACASA, J. P., et al. *Detection of Aspergillus galactomannan by enzyme immunoabsorbent assay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study*. Transplantation, 2004, 77, p. 1260-1264

35. QUINDOS, G. *New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi*. Clin Microbiol Infect, 2006, 12 Suppl 7, p. 40-52
36. MCLINTOCK, L. A., JONES, B. L. *Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients*. Br J Haematol, 2004, 126, p. 289-297
37. MENNINK-KERSTEN, M. A., DONNELLY, J. P., VERWEIJ, P. E. *Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis*. Lancet Infect Dis, 2004, 4, p. 349-357
38. VERDAGUER, V., WALSH, T. J., HOPE, W., et al. *Galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis*. Expert Rev Mol Diagn, 2007, 7, p. 21-32
39. VISCOLI, C., MACHETTI, M., CAPPELLANO, P., et al. *False-positive galactomannan platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam*. Clin Infect Dis, 2004, 38, p. 913-916
40. ADAM, O., AUPERIN, A., WILQUIN, F., et al. *Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive Aspergillus galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies*. Clin Infect Dis, 2004, 38, p. 917-920
41. MATTEI, D., RAPEZZI, D., MORDINI, N., et al. *False-positive Aspergillus galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment*. J Clin Microbiol, 2004, 42, p. 5362-5363
42. BART-DELABESSE, E., BASILE, M., AL JIJAKLI, A., et al. *Detection of Aspergillus galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments*. J Clin Microbiol, 2005, 43, p. 5214-5220
43. MACHETTI, M., FURFARO, E., VISCOLI, C. *Galactomannan in piperacillin-tazobactam: how much and to what extent?* Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49, p. 3984-3985

44. WALSH, T. J., SHOHAM, S., PETRAITIENE, R., et al. *Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction.* J Clin Microbiol, 2004, 42, p. 4744-4748
45. AUBRY, A., PORCHER, R., BOTTERO, J., et al. *Occurrence and kinetics of false-positive Aspergillus galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders.* J Clin Microbiol, 2006, 44, p. 389-394
46. SINGH, N., OBMAN, A., HUSAIN, S., et al. *Reactivity of platelia Aspergillus galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum.* Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48, p. 1989-1992
47. HAGE, C. A., REYNOLDS, J. M., DURKIN, M., et al. *Plasmalyte as a cause of false-positive results for Aspergillus galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid.* J Clin Microbiol, 2007, 45, p. 676-677
48. ANSORG, R., VAN DEN BOOM, R., RATH, P. M. *Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics.* Mycoses, 1997, 40, p. 353-357
49. MENNINK-KERSTEN, M. A., RUEGEBRINK, D., KLONT, R. R., et al. *Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay reactivity.* J Clin Microbiol, 2005, 43, p. 3925-3931
50. BLIJLEVENS, N. M., DONNELLY, J. P., MEIS, J. F., et al. *Aspergillus galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition.* Transpl Infect Dis, 2002, 4, p. 64-65
51. KAPPE, R., SCHULZE-BERGE, A. *New cause for false-positive results with the Pastorex Aspergillus antigen latex agglutination test.* J Clin Microbiol, 1993, 31, p. 2489-2490

52. DALLE, F., CHARLES, P. E., BLANC, K., et al. *Cryptococcus neoformans Galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with Aspergillus Galactomannan*. J Clin Microbiol, 2005, 43, p. 2929-2931
53. KNIGHT, F., MACKENZIE, D. W. *Aspergillus antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis*. Lancet, 1992, 339, p. 188
54. DALLE, F., LOPEZ, J., CAILLOT, D., et al. *False-positive results caused by cotton swabs in commercial Aspergillus antigen latex agglutination test*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21, p. 130-132
55. KWAK, E. J., HUSAIN, S., OBMAN, A., et al. *Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients*. J Clin Microbiol, 2004, 42, p. 435-438
56. HASHIGUCHI, K., NIKI, Y., SOEJIMA, R. *Cyclophosphamide induces false-positive results in detection of aspergillus antigen in urine*. Chest, 1994, 105, p. 975-976
57. LEHMANN, P. F., REISS, E. *Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits*. Infect Immun, 1978, 20, p. 570-572
58. REISS, E., LEHMANN, P. F. *Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis*. Infect Immun, 1979, 25, p. 357-365
59. ODABASI, Z., MATTIUZZI, G., ESTEY, E., et al. *Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome*. Clin Infect Dis, 2004, 39, p. 199-205
60. OBAYASHI, T., YOSHIDA, M., MORI, T., et al. *Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes*. Lancet, 1995, 345, p. 17-20

61. SENN, L., ROBINSON, J. O., SCHMIDT, S., et al. *1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia*. Clin Infect Dis, 2008, 46, p. 878-885
62. OSTROSKY-ZEICHNER, L., ALEXANDER, B. D., KETT, D. H., et al. *Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans*. Clin Infect Dis, 2005, 41, p. 654-659
63. PERSAT, F., RANQUE, S., DEROUIN, F., et al. *Contribution of the (1-> 3)-{beta}-D-Glucan Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections*. J Clin Microbiol, 2007, p.
64. HERBRECHT, R., BERCEANU, A. *Beta-D-glucan detection test: a step toward preemptive therapy for fungal infections in leukemic patients?* Clin Infect Dis, 2008, 46, p. 886-889
65. SPELLBERG, B., EDWARDS, J., JR., IBRAHIM, A. *Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management*. Clin. Microbiol. Rev., 2005, 18, p. 556-569
66. NUCCI, M., MARR, K. A. *Emerging fungal diseases*. Clin Infect Dis, 2005, 41, p. 521-526
67. RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, C. L., BAKER, D. J. *Zygomycetes in human disease*. Clin Microbiol Rev, 2000, 13, p. 236-301
68. T. J. WALSH, A. G., J. HIEMENZ, R. FLEMING, E. ROILIDES, E. ANAISSIE,. *Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens*. Clinical Microbiology & Infection, 2004, 10, p. 48-66
69. HRNCIROVA, K., LENGEROVA, M., KOCCMANOVA, I., et al. *Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples Using High Resolution Melt Analysis 10.1128/JCM.01109-10*. J. Clin. Microbiol., 2010, p. JCM.01109-01110