

Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky

The **CzEch Leukemia Study Group for Life** (Česká leukemická skupina – pro život)
Z. Ráčil a J. Mayer (eds)

Autoři (abecedně): H. Bartáková, P. Cetkovský, Ľ. Drgoňa, J. Haber, P. Hamal,
I. Kocmanová, M. Kouba, D. Koukalová, M. Lengerová, N. Mallátová, J. Mayer,
K. Mencl, Z. Ráčil, M. Tesařová



Vychází za laskavé podpory společnosti



ve spolupráci s vydavatelstvím

MedicaHealthworld
An Ogilvy Healthworld Affiliate

Obsah

Úvod (J. Mayer, P. Cetkovský, Z. Ráčil)	S1
Rod <i>Aspergillus</i> (N. Mallátová, K. Mencl, M. Tesařová)	S2
Epidemiologie invazivní aspergilózy (L. Drgoňa)	S3
Rizikové faktory (L. Drgoňa)	S5
Mortalita invazivní aspergilózy (L. Drgoňa)	S5
Klinická manifestace invazivní aspergilózy (J. Haber)	S6
Zobrazovací metody v diagnostice invazivní aspergilózy (J. Haber)	S6
Možnosti (semi)invazivně získat materiál k průkazu invazivní aspergilózy (M. Kouba, P. Cetkovský, H. Bartáková)	S8
Histologické vyšetření (M. Kouba, P. Cetkovský, H. Bartáková)	S11
Mykologické vyšetřovací metody (N. Mallátová, K. Mencl, M. Tesařová)	S12
Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům (N. Mallátová, K. Mencl)	S14
Nekultivační diagnostické metody (Z. Ráčil, J. Mayer)	S16
Detekce galaktomananu (Z. Ráčil, I. Kocmanová, J. Mayer, M. Lengerová)	S16
Detekce 1,3 β -D-glukanu (I. Kocmanová, Z. Ráčil)	S20
Molekulárně genetické metody (P. Hamal, D. Koukalová)	S22
Závěr (Z. Ráčil, J. Mayer, P. Cetkovský)	S25

Webové adresy pracovišť autorů (*index odkazuje k autorovi v seznamu na následující straně*)

^{1,5,7} www.vfn.cz

² www.uhkt.cz

³ www.fnbrno.cz

⁴ www.nou.sk

⁶ www.upol.cz

⁸ www.nemcb.cz

⁹ www.nem.pce.cz

¹⁰ www.paru.cas.cz

Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky

CELL – The CzeCh Leukemia Study Group for Life (Česká leukemická skupina – pro život)

Editori: Z. Ráčil³, J. Mayer³

Autoři (abecedně): H. Bartáková¹, P. Cetkovský², L. Drgoňa⁴, J. Haber⁵, P. Hamal⁶, I. Kocmanová⁷, M. Kouba², D. Koukalová⁶, M. Lengerová³, N. Mallátová⁸, J. Mayer³, K. Mencl⁹, Z. Ráčil³, M. Tesařová¹⁰

¹ Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha, přednosta doc. MUDr. Martin Stříteský, CSc.

² Klinický úsek Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha, přednosta doc. MUDr. Petr Cetkovský, Ph.D.

³ Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

⁴ Oddelenie klinickej hematológie Internej kliniky, Národný onkologický ústav Bratislava, Slovenská republika, prednosta prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc.

⁵ I. interní klinika 1. Lékařské fakulty UK a VFN Praha, přednosta prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

⁶ Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc, přednostka doc. MUDr. Dagmar Koukalová, CSc.

⁷ Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, pracoviště Bohunice, přednostka prim. MUDr. Alena Ševčíková

⁸ Laboratoř lékařské parazitologie a mykologie Centrální laboratoře Nemocnice České Budějovice, ředitel MUDr. Miroslav Verner

⁹ Laboratoř lékařské mykologie, Oddělení klinické mikrobiologie Pardubické krajské nemocnice Pardubice, přednostka prim. MUDr. Ludmila Poustecká

¹⁰ Laboratoř elektronové mikroskopie Biologického centra AV ČR – Parazitologický ústav České Budějovice, vedoucí pracoviště Ing. Jana Nebesářová, CSc.

Souhrn: Invazivní aspergilóza je v současné době nejčastější invazivní mykotickou infekcí vyvolanou vláknitou houbou, respektive u nemocných s akutní leukemií a po transplantaci krevetvorné tkáně nejčastější invazivní mykózou vůbec. Klíčovým bodem úspěchu péče o pacienty s touto život ohrožující infekcí je správné ačasné stanovení diagnózy a následné časné podání účinné anti-mykotické léčby. Velmi významné pokroky v diagnostice invazivní aspergilové infekce (zejména zobrazovací a nekultivační metody) byly důvodem setkání odborníků z oblasti hematoonkologie a mikrobiologie s cílem vzájemně se o této složité problematice informovat. Níže předkládaná práce pak představuje soubor velmi podrobných informací o možnostech detekce invazivní aspergilové infekce, který vznikl na základě spolupráce předních odborníků na jednotlivé aspekty diagnostiky invazivní aspergilózy v České a Slovenské republice a vychází z výše uvedeného setkání. Práce by pak měla sloužit klinickým lékařům a mikrobiologům jako guidelines v jejich každodenní péči o pacienty s touto invazivní mykózou.

Klíčová slova: invazivní mykotické infekce – invazivní aspergilóza – diagnostika – kultivace – cytologie – histologie – HRCT – galaktomanan – 1,3-β-D-glukan – PCR

Invasive aspergillosis – current diagnostics options

Summary: Invasive aspergillosis is the most frequent invasive fungal infection caused by filamentous fungi, particularly in patients with acute leukemia and after hematopoietic stem cell transplantation. Early diagnosis and prompt initiation of antifungal therapy significantly improve outcomes of the treatment of this serious infectious complication. Therefore we organized inter/national interdisciplinary meeting of haematologists and microbiologists where recent advances (mainly in radiological and non-culture based diagnostic methods) and their contribution to clinical diagnosis were presented and discussed. Here we present an overview of various aspects of the diagnostics of invasive aspergillosis which resulted from close collaboration of the experts from the Czech and Slovak Republic participating on the meeting mentioned above. This text intends to be a useful diagnostic guideline for clinicians and microbiologists in their daily care about patients suffering from this life threatening disease.

Key words: invasive fungal infections – invasive aspergillosis – diagnosis – culture – cytology – histology – HRCT – galactomannan – 1,3-β-D-glukan – PCR

Úvod

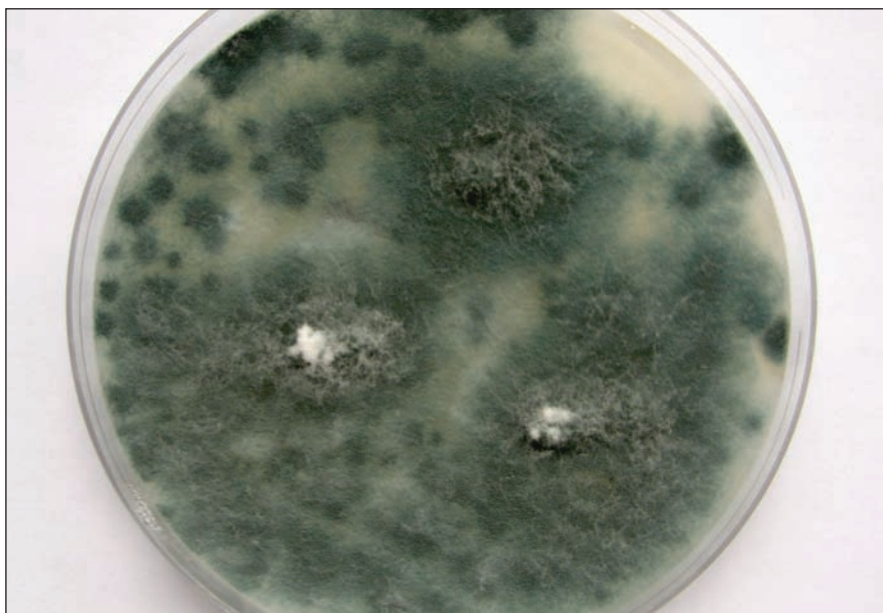
Invazivní mykotické infekce vyvolané vláknitými houbami, především pak invazivní aspergilóza (IA), zaujímají v současnosti čelní místo mezi příčinami morbidit a mortality nemocných s hematologickými malignitami,

ale i mnohými jinými základními chorobami, které oslabují imunitu.

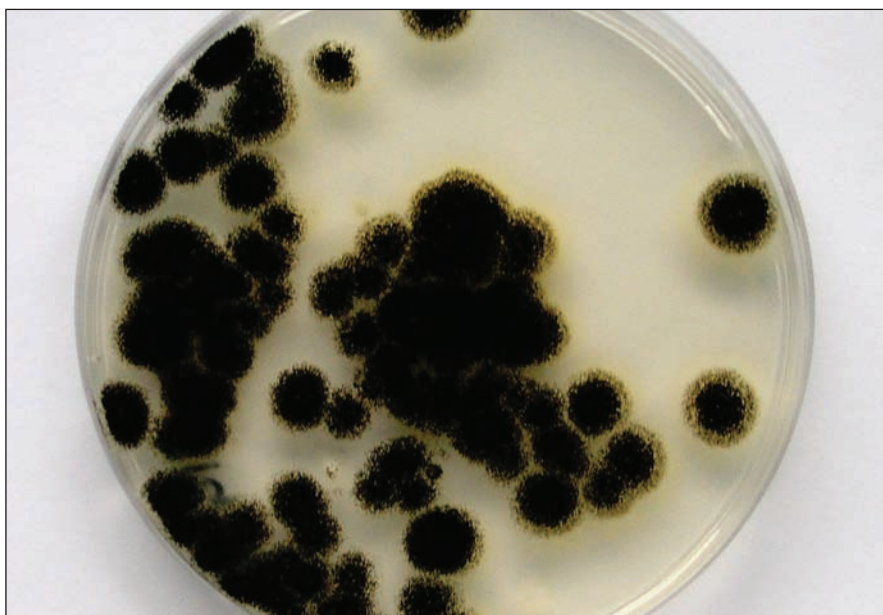
Diagnostika této život ohrožující infekce je v dnešní době založena na velmi precizně vypracovaných radio-diagnostických, sérologických a molekulárně biologických metodách a vy-

žaduje od lékařů pečujících o nemocné v riziku IA velmi úzkou spolupráci s odborníky z celé řady oborů.

Tento multioborový přístup s rutinním zavedením nejmodernějších diagnostických metod do běžné klinické praxe umožňuje včasné stanovení



Obr. 1. *Aspergillus fumigatus* (autor: MUDr. Naďa Mallátová, Oddělení lékařské mykologie a parazitologie, Nemocnice České Budějovice).



Obr. 2. *Aspergillus niger* (autor: MUDr. Naďa Mallátová, Oddělení lékařské mykologie a parazitologie, Nemocnice České Budějovice).

diagnózy, a tak i včasné podání účinné antimykotické léčby. Tím je umožněno zásadním způsobem příznivě ovlivnit prognózu pacientů s IA [1]. Naopak nedostatky v diagnostickém zázemí mohou vést k určitému „poddiagnostikování“ IA, respektive podchycení až velmi pokročilých případů. A u takových nemocných s pozdně stanovenou diagnózou může selhávat i velmi drahá antimykotická léčba.

Základním cílem **CELL – The CzeCh Leukemia Study Group for Life** – je snaha o zlepšení péče o nemocné s hematologickými malignitami, především s leukemiemi, katalyzováním intenzivní mezioborové spolupráce. Proto také **CELL** v rámci svého podprojektu „Oportunní infekce“ iniciovala setkání odborníků hematologů, mikrobiologů i molekulárních biologů – z České republiky a Slovenské republiky na téma

diagnostiky invazivní aspergilové infekce. Toto setkání umožnilo nejen vzájemnou výměnu zkušeností a znalostí, ale bylo především vynikající možností pro navázání vzájemné spolupráce mezi kliniky a laboratorními pracovníky.

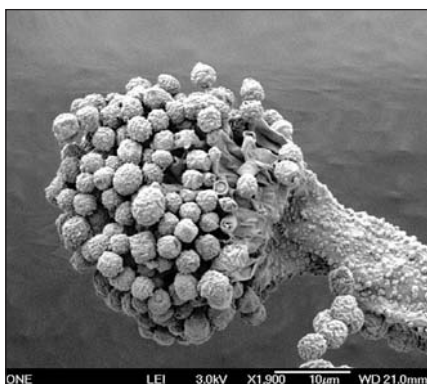
Výsledkem tohoto setkání je námi předkládaná publikace, která představuje „state-of-the-art“ v diagnostice invazivní aspergilózy. Domníváme se, že jde o mimořádně závažné téma atraktivní pro řadu klinických i neklinických oborů. Jak v laboratorní diagnostice, tak v terapii bylo v posledních letech dosaženo neuvěřitelného pokroku a tento pokrok je potřeba urychleně zavést do rutinní péče i v našich zemích. Tato publikace by tomu měla napomoci.

Rod *Aspergillus*

Aspergily jsou ubikvitární saprofyty vyskytující se celosvětově, jsou přítomny v půdě, v rostlinných i živočišných zbytcích. Mnohé mohou být patogenní i pro jiné živočichy. Rod má asi 200 známých druhů, z toho necelých 40 druhů bylo popsáno jako původci mykotických onemocnění člověka. Aspergily jsou řazeny mezi askomycety, do čeledi *Eurotiales*. Stále je respektováno dělení Rapera a Fennellové [2] do skupin, v nichž je jméno skupiny dáno typickým druhem, a to i přesto, že metody molekulární genetiky přinášejí v mykologii stejně jako v jiných oborech revoluci v taxonomii. Jako aktuální skupiny v humánní mykologii jsou uváděny skupina *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* [3]. Z nich některé mají významné postavení v environmentální či potravinářské mykologii. Jako původce onemocnění člověka je nejčastěji uváděn druh *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (obr. 1). Další častěji uváděné druhy jsou *Aspergillus niger* (obr. 2), *Aspergillus flavus* (obr. 3) a *Aspergillus terreus*, vzácně pak *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* [4].

Pro rod *Aspergillus* [5] je typické hlavcovité zakončení konidioforu. Mě-

chýřek je po celé nebo části obvodu porostlý fialidami, které mohou být v jedné nebo dvou řadách. Přes tyto fialidy prochází mikrokonidie, které mohou být kulovité i oválné, hladké i drsné. Měchýřek s fialidami a řetězci mikrokonidií tvoří tzv. konidiální hlavici a její uspořádání je typické pro jednotlivé druhy aspergilů a je základem jejich morfologické identifikace (obr. 4 a obr. 5). I výsledné zbarvení kolonií a jejich tvar na kultivačním mediu je dáno charakterem a zbarvením těchto hlavic. Mikrokonidie jsou velice malé, u *Aspergillus fumigatus* 2 až 3 µm, přenášejí se vzduchem, ulpívají na předmětech i potravinách a snadno mohou být vdechnuty či pozřeny náhodnými hostiteli. Spory pronikají až do alveolů, kde v závislosti na stavu hostitelského organismu terminují a postupně vyrůstají ve formě vláken neboli hyf, která tvoří tzv. mycelia. Růst mycelií rozdělujeme do 3 fází. V 1. fázi logaritmického růstu dochází k bohaté látkové výměně spojené s tvorbou organických substrátů nutných k výstavbě myceliální stěny. Je podmíněna dostatkem živin a hlavně glukózy v okolní tkáni. V této fázi může být uvolňován galaktomanan, který pak detekujeme v materiálu z dolních dýchacích cest nebo při dostatečné angioinvasivitě hyf v séru. S vyčerpáním zdrojů glukózy přechází růst do fáze stacionární a následně ve 3. fázi dochází k lýze a destrukci hyf [6].



Obr. 4. *Aspergillus flavus* – obraz v elektronové mikroskopii (autor: Bc. Martina Tesařová, PAUAV, České Budějovice).

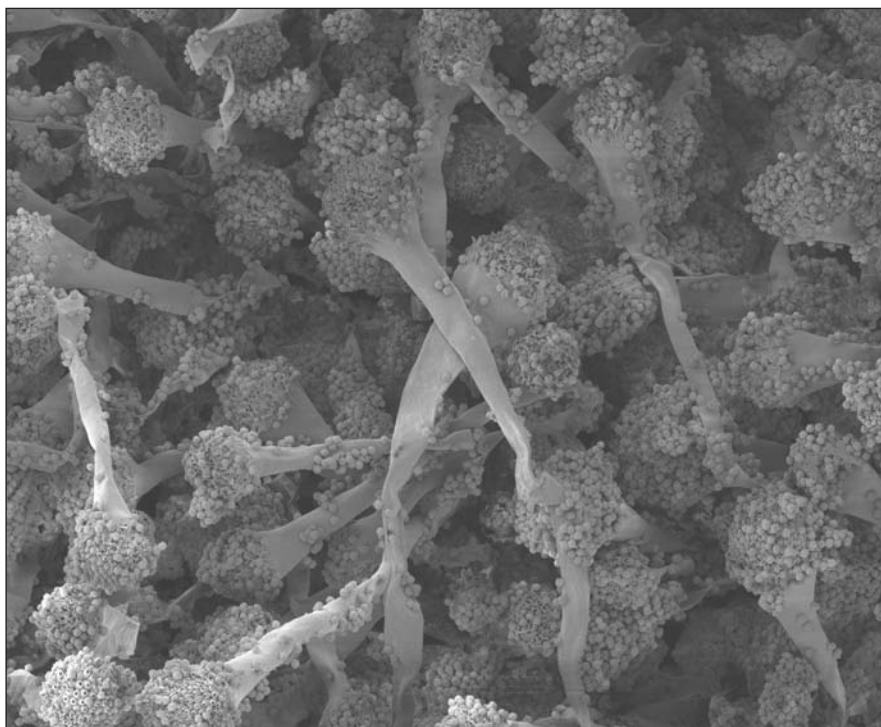


Obr. 3. *Aspergillus flavus* (autor: MUDr. Naďa Mallátová, Oddělení lékařské mykologie a parazitologie, Nemocnice České Budějovice).

Epidemiologie invazivní aspergilózy

V epidemiologii invazivních mykóz nastali v posledních letech výrazné změny. Používání flukonazolu v profylaxii vedlo k snížení incidence invazivních kandidových infekcí a ich mortality [7], na druhé straně je zjevný

nárůst invazivních mykóz vyvolaných vláknitými hubami, mezi kterými dominují infekce způsobené *Aspergillus spp.* [8]. U imunokompromitovaných jedinců je nejčastějším vyvolávatelem *Aspergillus fumigatus* (56–64 %) následovaný *Aspergillus flavus* (14–18 %), *Aspergillus niger* (5–8 %), *Aspergillus terreus*



Obr. 5. *Aspergillus fumigatus* – obraz v elektronové mikroskopii (autor: Bc. Martina Tesařová, PAUAV, České Budějovice).

(5–16 %); zastúpenie jednotlivých druhov môže mierne kolísať v jednotlivých centrách [9,10]. Bol zaznamenaný nárast infekcií vyvolaných *Aspergillus terreus* (ktorý je rezistentný na polyénové antimykotiká) v niektorých centrách v USA až o 100 % [11].

Výskyt a prenos *Aspergillus spp.*

Aspergillus je ubikvitárnym mikroorganizmom. Nachádza sa v pôde, vo vode, v potravinách a v hnijúcej vegetácii. Boli popísané infekcie spôsobené kontaminovanou potravou (korenie, káva, čaj) – sú však raritné. Vstupnou bránou infekcie sú najmä dýchacie cesty, ktorými sa aspirujú spóry/konídiá; nosičom spór/konídií môže byť aj prach, prípadne aerosol z kontaminovanej vody. Zriedkavejšie môžu aspergilové konídiá infikovať poškodenú kožu (rany, cievne katetre, mokvajúca koža pod obväzmi). Kontaminované nemocničné ventilačné alebo vodovodné systémy sú rizikovým zdrojom epidemického výskytu nozokomiálnej invazívnej aspergilózy u imunokompromitovaných pacientov, najväčším rizikom sú však stavebné práce v nemocnici alebo jej blízkom okolí [12–14]. Aspergilóza sa objavuje aj ako endogénna reaktivácia po primárnej infekcii alebo kolonizácii, zvyčajne v čase prehlbenia imunodeficitu pacienta (chemoterapia, imunosupresia, relaps malignity a pod). Z tohto dôvodu nie je niekedy možné spoľahlivo rozlíšiť nozokomiálny a endogénny zdroj infekcie. Ochrana rizikového pacienta pred aspergilózou spočíva v zábrane vdýchnutia konídií použitím vysokoefektívnej filtrácie vzduchu (LAF/HEPA) a používaním masiek pri transporte pacienta. Tento prístup je však limitovaný len pre pacientov počas pobytu v nemocnici, preto je otázka systémovej antimykotickej/antiaspergillovej profylaxie pre rizikovú populáciu pacientov veľmi aktuálna [15–17].

Incidencia invazívnej aspergilózy

Incidencia IA závisí od typu pacientov, základnej diagnózy, vykonanej

liečby, typu transplantácie. Môže kolísať od centra k centru, dôležitá je aj metodika zberu údajov (nemocničné štúdie, národné prehľady, populačné štúdie). Väčšina prác potvrdzuje nárast incidence invazívnych mykotických infekcií vyvolaných vláknitými hubami a zvlášť *Aspergillus spp.*

Presvedčivé dôkazy o rozsahu invazívnych mykóz podávajú pitevné štúdie. 25 % pacientov s akútnou leukémiou a 12 % pacientov s lymfómom malo v čase smrti invazívnu mykotickú infekciu; 34 % z nich bolo vyvolaných *Aspergillus spp.* [18]. Novšia štúdia popisuje okrem poklesu pitvanosti nárast výskytu invazívnych mykóz v priebehu sledovaných rokov – 31 % pitvaných pacientov malo invazívnu mykotickú infekciu. Dominovala IA s nárastom zo 16 % na 19 % v priebehu sledovania a autori pozorovali aj nárast výskytu infekcií vyvolaných zriedkavými patogénmi. 75 % infekcií nebolo diagnostikovaných ante mortem [19]. Nemeckí autori sledovali v rokoch 1978–1992 v univerzitnom centre nárast výskytu aspergilózy v pitevnom materiáli z 0,5 % na 5,5 % [20]. Sledovanie prepúšťacích diagnóz v amerických nemocniciach v rokoch 1970–1996 potvrdilo nárast IA z 1,9 prípadov/milión obyvateľov na 38 prípadov/milión obyvateľov [21]. Skúsenosť so Seattlu hovorí taktiež o zvýšení výskytu IA u pacientov po autológnej a alogénnej transplantácii; u autológnej TKB sa incidencia zvýšila z 0,2 % v roku 1990 na 4 % v roku 1998; u alogénnej TKB zo 4 na 11 % [22,23]. Údaje z Európy potvrdzujú trendy výskytu IA [24]. Pacienti po autológnej TKB mali 1,6 % výskyt IA, pacienti po alogénnej transplantácii mali 11,3 % výskyt IA.

Príčiny nárastu IA u pacientov s hematologickými malignitami za posledných 20 rokov sú viaceré, najdôležitejšie sú však pokroky v transplantológii: vyšší počet vykonaných transplantácií, mohutná imunosupresívna liečba (nárast pacientov po nemyeloabla-

tívnych režimoch s GvHD), používanie chemoterapie alebo imunoterapie, napr. monoklonálnych protilátok, spôsobujúcich prehlbený a dlhodobý imunodeficit (napr. purínové analógy, alemtuzumab) [25]. Určitý podiel na náraste incidence má aj lepšia, senzitivnejšia diagnostika.

Invazívna aspergilóza po alogénnej HSCT

Výskyt IA v populácii pacientov po alogénnej transplantácii sa môže pohybovať medzi 12–15 %, niektoré centrá hlásia dokonca ešte vyššiu incidencia [26]. Celkový nárast invazívnej aspergilózy v transplantačných centrách dosahuje 3–4násobok za posledných 20 rokov [27].

Incidencia IA u detí po alogénnej transplantácii je 4,5 % a u detí s AML 4 % [28].

Výskyt IA u pacientov po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek závisí od viacerých faktorov. 5–10% incidencia IA sa popisuje u pacientov po príbuzenskej HLA-identickej transplantácii a stúpa k 25 % u pacientov po nepríbuzenskej transplantácii. Prítomnosť GvHD ovplyvňuje výskyt IA – pri neprítomnosti akútnej GvHD je výskyt do 6 %, pri akútnej GvHD stupňa I–II je 13 % a pri akútnej GvHD stupňa III–IV až 35 %. Pacienti s extenzívnou chronickou GvHD majú riziko IA až takmer 40 % [29]. Aspergilóza je teda najčastejšou príčinou „komunitnej pneumónie“ u pacientov s GvHD [30]. S nástupom nových terapeutických postupov v transplantológii (G-CSF, nemyeloablatívne režimy, periférne krvotvorné bunky) je obdobie neutropénie po transplantácii kratšie, a aj riziko vzniku IA v tomto období nižšie ako v predchádzajúcich rokoch. Preto sa klinické prejavy IA objavujú zvyčajne v 2 vlnách. Prvá vlna sa objaví v období neutropénie, v čase od transplantácie do prihojenia štep, čo je zvyčajne do 20–30 dní po transplantácii a predstavuje asi 20–30 % všetkých IA. V súčasnosti sa častejšie objaví IA v období po priho-

Tab. 1. Rizikové faktory invazívnej aspergilózy.

- GvHD
- steroidy
- dlhodobá neutropénia
- deplécia T-lymfocytov
- transplantácia krvotvorných buniek
- imunosupresívna terapia
- predchádzajúca invazívna mykotická infekcia
- akútna CMV infekcia
- nekontrolované základné ochorenie
- mukozitída
- konštrukčné práce v nemocnici alebo jej okolí
- masívna transfúzna terapia

Tab. 2. Rizikové faktory relapsu invazívnej aspergilózy [202].

- dokumentovaná (dokázaná/pravdepodobná) IA
- IA postihujúca prínosové dutiny
- neúplné vymiznutie infekcie podľa zobrazovacích metód pred ďalšou kúrou chemoterapie
- systémové kortikoidy
- nedosiahnutie KR základného ochorenia
- vysoké dávky cytozínarabinozidu
- > 3 antibiotiká
- trvanie neutropénie > 27 dní
- alogénna TKB
- nepríbuzenská alebo príbuzenská „mismatched“
- dĺžka primárnej antimykotickej liečby < 1 mesiac
- zdroj krvotvorných buniek (pupočnicková krv > kostná dreň > periférne kmeňové bunky)

jení štepu – po 30 dňoch od transplantácie; 60–70 % sa diagnostikuje až po 90. dni po transplantácii [22, 23,31,32]. Incidencia IA je porovnateľná u pacientov alogénne transplantovaných s použitím konvenčného režimu a s použitím nemyeloablatívneho režimu (minialogénna transplantácia) [33,34]. IA sa objavuje u pacientov po nemyeloablatívnom režime neskôr (medián 107 dní) ako u pacientov po myeloablatívnom režime [35].

Incidenca invazívnej aspergilózy u ostatných hematologických malignít

Pacienti s leukémiou, ktorí nepodstúpia transplantáciu, sú vystavení riziku invazívnej aspergilózy vo vysokej miere. Potvrdzujú to aj uvádzané autoptické štúdie spolu s klinickými analýzami. Incidencia invazívnej aspergilózy pacientov s akútnymi leukémiami je medzi 4,3–9,5 % [27]. Zo 595 pacientov s invazívnou aspergilózou malo hematologickú malignitu (prevažne akútnu leukémiu) bez transplantácie 28 % pacientov, čo predstavovalo najpočetnejšiu skupinu [9]. Príčinou je imunodeficit spôsobený samotnou chorobou ako aj chemoterapiou. Okrem myelosupresívneho účinku niektoré nové liečebné režimy spôsobujú protrahovanú ťažkú poruchu bunkovej imunity. Príkladom sú režimy s fludarabínom a alemtuzumabom, pričom

nemožno zabúdať na masívne používanie steroidov.

Pacienti s lymfoproliferatívnymi malignitami patria do skupiny s vyšším výskytom invazívnych mykóz v porovnaní s bežnou populáciou chorých, ale v porovnaní s pacientmi s AML, pacientmi po alogénnej transplantácii a s GvHD je incidencia v tejto skupine nižšia [36].

V porovnaní s pacientmi s akútnymi leukémiami je výskyt invazívnych mykóz všeobecne v post mortem analýzach asi polovičný [28].

Rizikové faktory

Samotná hematologická malignita a liečba predstavujú rizikový faktor pre vznik invazívnej aspergilózy. Najvýznamnejšie rizikové faktory asociované s rozvojom invazívnej aspergilózy sú uvedené v tab. 1.

Pacienti po alogénnej transplantácii sú vo včasnej fáze (do d +40) viac ohrození, ak nie sú chránení LAF [29,37]. Väčšina IA sa u pacientov po alogénnej transplantácii vyskytuje po prihojení štepu. Analýza rizikových faktorov v tejto skupine pacientov preukázala najväčšie riziko u pacientov s vysokými dávkami steroidov podávaných minimálne 2 týždne alebo strednými dávkami steroidov (< 1 mg/kg/deň) podávaných aspoň 4 týždne. Vysoké riziko pre vznik IA nieslo podávanie gancikloviru, 3. a 4. stupeň akútnej

nej GvHD a sekundárna neutropénia [32].

Riziko relapsu invazívnej aspergilózy hrozí najmä u najrizikovejších pacientov na dlhodobej imunosupresívnej liečbe a u tých, ktorí nedosiahnu remisiu. Relaps sa objaví veľmi často v pôvodnej lokalizácii infekcie; aspergilová sínusitída má tendenciu relapsovať a diseminovať častejšie. Rizikové faktory relapsu invazívnej aspergilózy sú v tab. 2.

Mortalita invazívnej aspergilózy

Mortalita IA je vysoká a závisí od stavu základného ochorenia pacienta, lokalizácie infekcie, včasnosti správnej diagnózy, použitej profylaxie a liečby. Kvôli chýbajúcim jednoznačným kritériám a rôznej metodike (napr. čas hodnotenia efektu liečby alebo prežívanie od stanovenia diagnózy) je niekedy ťažké porovnať jednotlivé štúdie. Trendy mortality kopírujú trendy výskytu invazívnej aspergilózy, v roku 1981 bola incidencia IA 0,1/100 000 obyvateľov, v roku 1996 0,4/100 000 obyvateľov [8]. Prehľad 50 klinických štúdií vykonaných do roku 1995 popisuje celkovú mortalitu IA 58 %. Vek samotný nehrá významnú úlohu, mortalita pacientov do 20 rokov je 68 % a nad 20 rokov 52–59 %. Pacienti po transplantácii krvotvorných buniek mali mortalitu 86,7 %, pacienti s leukémiou/lymfómom lie-

Tab. 3. Plicní postižení po transplantaci kostní dřeně – sekční nálezy (n = 50) – upraveno podle [203].

1. difuzní alveolární postižení	36 %
2. difuzní alveolární krvácení	24 %
3. invazivní plicní aspergilóza	12 %
4. plicní edém	12 %
5. bronchopneumonie	12 %
6. fokální alveolární krvácení	14 %
7. plicní hypertenze	10 %
8. plicní embolie	4 %
9. PTLD	4 %
10. bronchiolitis obliterans	1 %
11. plicní cytolytické tromby	1 %

Tab. 4. Klinické příznaky při sekčně potvrzené invazivní plicní aspergilóze ve srovnání s jinou etiologií plicního postižení – upraveno podle [204].

	IPA n = 47	kontroly n = 49	p
klinický nále z	(%)	(%)	
– horečka	77	65	0,2
– trvalá horečka	49	37	0,2
– kašel	64	45	0,06
– hemoptýza	26	18	0,4
– dušnost	79	84	0,5
– pleurální bolest	28	12	0,06
– paranazální sinusitida	13	8	0,5
– třecí šelest	11	2	0,11
– epistaxe	9	2	0,2

čení konvenčnou léčbou mali mortalitu 50 %. Typ přípravného režimu pri alogénnej transplantácii – myeloablatívny verzus nemyeloablatívny – neovplyvnil signifikantne mortalitu pacientov s IA (76–86 %) [33,35]. Miesto infekcie je významným prediktorom mortality – pacienti s plúcnou aspergilózou zomreli v 59–86 % prípadov, pacienti s aspergilózou CNS v 88–99 %, pacienti s aspergilózou prínosových dutín v 66 %; pacienti s kožnou formou aspergilózy mali len 25% mortalitu [9,38,39]. Neutropenickí pacienti nemajú automaticky vyššiu mortalitu než nonneutropenickí pacienti s IA. V monocentrickom 6-ročnom prehľade bola mortalita nonneutropenikov s IA 89 % a neutropenikov 60 % [31]. Známa Herbrechtova štúdia popisuje v 12. týždni od začiatku liečby mortalitu u 29–42 % pacientov [40]. Realitu približujú údaje hovoriace o celkovom prežívaní pacientov s pravdepodobnou alebo dokumentovanou invazívnou aspergilózou po roku od diagnózy invazívnej infekcie: prežíva asi 20 % pacientov [22,23]. Retrospektívna analýza pacientov z francúzskych transplantáčnych centier udáva 62% mortalitu pacientov s IA po 4 mesiacoch od stanovenia diagnózy. Navyše sa autori pokúsili analyzovať prognostické faktory mortality v čase diagnózy IA v tejto kohorte pacientov. Vek 12 až 35 rokov, diseminovaná forma IA, prítomnosť pleurálneho výpotku, po-

čet monocytov < 120/mm³, dlhodobé podávanie steroidov v predchádzajúcich 2 mesiacoch, dávka steroidov > 2 mg/kg v čase diagnózy IA a nekontrolovaná GvHD významným spôsobom korelovali s mortalitou [41].

Použitie modernej diagnostiky, účinnej profylaxie alebo preemptívnej terapie, poznanie a ovplyvňovanie rizikových faktorov viedlo v niektorých centrách k zníženiu mortality na IA [42].

Klinická manifestace invazivní aspergilózy

Nejčastější branou vstupu infekce je inhalační cesta, proto invazivní aspergilóza postihuje převážně plíce (80 až 90 %). Podle invaze do plicních struktur se rozlišují 3 typy plicní aspergilózy – **bronchoinvazivní aspergilóza**, **angioinvazivní aspergilóza** a **nekrotizující aspergilóza**. Aspergilóza paranazálních dutin (**invazivní sinoorbitální aspergilóza**) a CNS (**nitrolební aspergilóza**) jsou další 2 nejčastější lokalizace. Výskyt CNS postižení u nemocných po alogenní HSCT s prokázanou IA může dosahovat až 50 % [43]. Při generalizaci procesu může být však postižen jakýkoli orgán (ledviny, slezina atd.).

Kožní forma invazivní aspergilózy patří mezi méně časté. U diseminovaných forem IA se vzácně také myslí na možnost postižení GIT, srdce a ledvin [18].

Klinický obraz plicní formy invazivní aspergilózy (IPA), včetně CT nálezů, souvisí s angiotropizmem aspergilů, které postihují cévní systém s následným hemoragickým infarktem postižené tkáně a prokrvácením okolí.

Spektrum plicního postižení po transplantaci kostní dřeně je širší (tab. 3), v diferenciální diagnóze infekční etiologie však musí být IA na prvním místě klinické rozvahy.

Klinický stav vzbuzující podezření na invazivní aspergilózu není specifický (tab. 4). Podezření na IPA vzbudí neustupující horečka i přes léčbu ATB, kašel, bolest na hrudi, dušnost, ev. hemoptýza [44–46].

Při invazivní sinoorbitální aspergilóze dominují příznaky z postižení paranazálních dutin (horečka, kašel, epistaxe, bolest hlavy, výtok z nosu, lokální bolest, bolest v krku atd.), a při nitrolební aspergilóze nespecifické známky postižení CNS (alterace vědomí, křeče atd.). Projevy při diseminaci infekce do jiných než výše zmíněných tkání pak mohou mít specifické projevy dle lokalizace.

Zobrazovací metody v diagnostice invazivní aspergilózy

Prostý snímek hrudníku – nálezy u IPA

Nativní, zadopřední RTG snímek hrudníku z diagnostického hlediska IPA je relativně nepřínosný. Morfologie RTG nálezu je nespecifická a velmi

Tab. 5. Nález na RTG hrudníku při invazivní plicní aspergilóze.

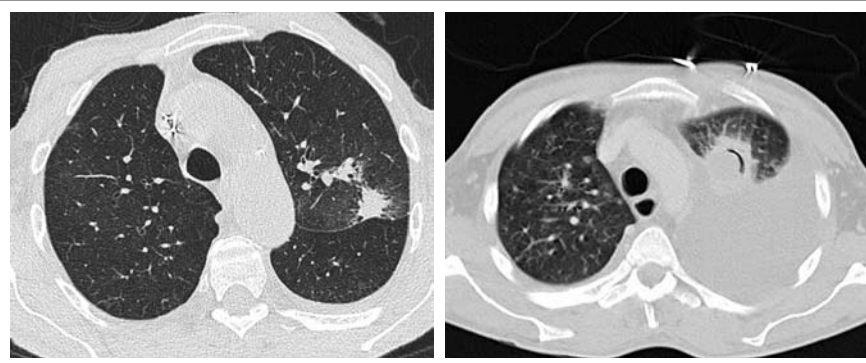
- mnohočetná ložiska
- ostře ohraničené uzly
- bronchopneumonie
- rozpadové dutiny (mikro- až makroabscesy)
- pleurální výpotek
- plicní infarkt
- oboustranné i jednostranné nálezy
- normální nález (pozitivní často až histologie ante mortem)

různorodá (tab. 5), patologický nález se často objevuje až pozdě. Proto při negativě RTG nález nelze plicní mykózu vyloučit, naopak je zásadně nutné indikovat CT vyšetření – helikální nebo spirální CT, HRCT, MSCT (multislice CT – multidetektorové CT), které odhalí již diskrétní změny, které nativní RTG nezobrazí.

CT plic – nálezy u invazivní plicní aspergilózy

Zásadní přínos CT oproti RTG vyšetření potvrdily i výsledky srovnání prostých RTG snímků s CT, bronchoalveolární laváží a klinickým průběhem. CT vyšetření proti prostému RTG má významně vyšší senzitivitu (89 % vs 58 %; $p < 0,0001$), vyšší negativní predikční hodnotu (78 % vs 47 %, $p < 0,0001$) a i významně vyšší přesnost nálezů (90 % vs 68 %, $p < 0,0001$). CT vyšetření je také přínosnější pro diagnózu mykotické i bakteriální infekce, potvrzené BAL ($p < 0,05$) [47].

Různé formy IPA mají odlišný CT nález. Typickým CT nálezem bronchoinvazivní aspergilózy je obraz „rašícího stromu“ (tree in bud), ale mohou se objevit i nálezy „mléčného skla“ (ground glass), nebo lobární kondenzace. Angioinvazivní aspergilóza má typický počáteční nález „halo sign“ (obr. 6), světlejší zónu charakteru mléčného skla (ground-glass attenuation), obkružující nodulární nebo masivní konsolidaci plicní tkáně [48]. Konsolidace tkáně je tvořena nekrotizací (v důsledku angioinvasze aspergilových hyf) a světlý



Obr. 6. Vývoj CT nálezů při plicní angioinvazivní aspergilóze u nemocných s neutropenií (autor: MUDr. Jana Červenková, Radiologická klinika VFN Praha).

Obr. 6A. Relativně specifický nález na CT v počátečním období rozvoje invazivní plicní aspergilózy. Bývá v období neutropenie nejčastěji po léčbě akutní leukémie. Je patrné typické „halo sign“ (= prokrvácení) na periferii centrální kondenzace (nekróza).

Obr. 6B. Nález z období reparace granulocytů (den 10–20), dochází k rozpadu infikované nekrotické tkáně. Na okraji kondenzace plicní tkáně se objevuje rozpadová dutina (= air crescent sign) tvaru měsíčku.

lem na periferii krvácením do alveolů v okolí. Tento nález byl u invazivní plicní aspergilózy popisován již dávno dříve [49], avšak až znalost patologickoanatomického korelátu k CT nálezů a ke klinickým projevům u neutropenických nemocných [44,50,51] zařadila tento nález mezi relativně specifické u IPA. Postupným vývojem dochází k retrakci infarktového centrálního ložiska, s absorpcí nekrotických hmot na periferii a vzniklý prostor je následně vyplněn vzduchem. Radioopákní okraj hemoragické tkáně proti vzdušné dutině vytváří na CT obraz air-crescent sign. Nález air-crescent sign lze považovat za typický pro pozdější stadium IPA, diagnostický význam má však jen u odpovídajícího klinického stavu imunoalterovaných nemocných [52].

Morfologie CT nálezů u rizikových nemocných s angioinvazivní aspergilózou plic je natolik charakteristická, že na jejím základě lze vyslovit velmi silné podezření na plicní aspergilózu [51] (obr. 6) a podle současných kritérií diagnostické jistoty je tento nález podkladem „pravděpodobné diagnózy“ [46].

Pro formu bronchopneumonickou jsou charakteristické centrilobulární

noduly, typické pro šíření infekce bronchopneumonickou cestou. Často jsou však nálezy smíšené, výskyt „čistě“ bronchopneumonie nepřesahuje 10 % [53]. S výjimkou vyššího přežití (73 % vs 25 %) nemocných s angioinvazivní IPA po alogenní transplantaci kostní dřeně není mezi oběma formami IPA zásadní rozdíl z hlediska klinických projevů, rizikových faktorů, volby léčebného režimu, hloubky a délky neutropenie, ani formy a závažnosti GVHD [33].

Ve snaze časově posunout CT diagnózu IPA, ještě před objevením halo signs a kavitací (obr. 6), byl hodnocen diagnostický význam časnějšího nálezů centrální hypodenzity („hypodense sign“) v oblasti nodulárního nálezů nebo v oblasti konsolidace [54, 55]. Při podezření na IPA u imunoalterovaných nemocných mohou být centrální hypodenzity považovány jako pomocný morfologický nález. Tento CT nález má sice nízkou senzitivitu, ale vysokou specifitou u rizikových nemocných má u IPA prediktivní význam.

Z hlediska pravidelných kontrol CT a hodnocení vývoje plicního postižení je významná informace o dynamice CT nálezů u IPA [56]. Dlouhodobé sle-

dování nemocných po transplantaci kostní dřeně s neutropenií a GVHD ukázalo, že velikost nodulárních lézí při prvním záchytu je asi 3 cm² (medián) a v 90 % dochází až do 9. dne (= medián i průměr) ke zvýšení počtu lézí i jejich rozměru. V následujících 3,5 dnech (= medián, průměr = 7 dní) je fáze plateau, kdy počet lézí klesá o 17 % (= medián). U 42,5 % nemocných pak dojde v mediánu 80 dní k úplné normalizaci CT nálezu. Při hodnocení prediktivních faktorů má negativní hodnotu počáteční nález kavítace, při němž trvá úprava CT nálezu 2,5krát déle oproti ostatním nálezům. Nález rozpadových dutin je však paradoxně příznivým prognostickým faktorem vyléčení, při tom ani vlastní velikost ani počet rozpadových lézí nemá vliv ani na dobu do normalizace CT nálezu, ani na celkový výsledek léčby. Vzhledem k tomu, že rozpad tkáně je nálezem již pokročilé infekce, pak je prodloužená doba do úpravy CT, u tohoto počátečního CT nálezu zcela pochopitelná.

Horger [54,55] stejně jako Brodoffel [56] u podobného souboru také neprokázal prognostický význam počtu a velikostí nodulárních lézí (s halo sign u 82 %) v počátku IPA, v práci však neuvádí přítomnost rozpadových dutin jako počáteční nález na CT. Vyšetření CT má význam i pro posouzení diagnostického přínosu bronchoalveolární laváže při podezření na IPA [57]. U angioinvasivní aspergilózy (na CT nodulace) je výtěžnost menší než u aspergilové bronchopneumonie s CT nálezem segmentální konsolidace plicní tkáně. Optimální výtěžnost bronchoskopie a BAL je při bilaterálním postižení nebo výskytu mnohočetných ložisek [45].

Diferenciální diagnostika CT nálezů imitujících invazivní plicní aspergilózu

Nodulární nálezy na CT s halo sign či bez něj nejsou pro IPA zcela specifické. Podobné nálezy má i angioinvasivní mukormykóza, plicní tuberkulóza, me-

tastázy choriokarcinomu, bronchogenní karcinom, maligní lymfom, metastázy angiosarkomu, eozinofilie plic (Loefflerův syndrom), aktinomykóza plic a další [58,59]. Proto je zřejmé, že hodnocení CT nálezu je nutné vždy provádět v kontextu s klinickým stavem a s dalšími diagnostickými postupy.

Při diferenciálně diagnostických pochybách, zejména v počátku febrilní neutropenie je možné provést vyšetření angio-CT [60]. Přímá invaze aspergilových hyf do cév je příčinou defektů perfuze. Výpadek kontrastu v zobrazení cévního systému svědčí pro okluzi, a tak podpoří diagnózu angioinvasivní aspergilózy již v časném stadiu onemocnění. Rozsáhlejší zkušenosti s touto metodou při diferenciální diagnostice IPA však nejsou dosud k dispozici.

Možnosti (semi)invazivně získat materiál k průkazu invazivní aspergilózy

Cesta k potvrzení diagnózy invazivní aspergilózy histologickým (ev. cytologickým) a kultivačním vyšetřením bývá riskantní a vyžaduje použití invazivních metod. Vhodný bioptický materiál tak není ve většině případů k dispozici, a to nejčastěji v důsledku rozhodnutí klinického lékaře upustit od invazivní procedury, neboť její rizika převažují nad možným přínosem. Invazivní aspergilózou často trpí těžce imunosuprimovaní pacienti, mnohdy s trombocytopenií a koagulopatiemi, při plicním postižení navíc často v respirační insuficienci – jakýkoliv diagnostický výkon může být velmi riskantní. Četnost diagnostických invazivních procedur se velmi liší mezi centry, ve kterých jsou riziková pacienta léčeni. Rozhodnutí musí být individuální, zobecnit lze jedině: u každého pacienta s fokální infekcí suspektní z IA by měla být některá z vyšetřovacích metod k získání reprezentativního vzorku alespoň zvážena [61].

V následujícím výčtu uvádíme používané invazivní přístupy. Soustředíme

se převážně na metody k vyšetření plicní formy IA, která je nejčastější.

Plíce

Bronchoalveolární laváž (BAL)

Získaný materiál je vhodný k vyšetření sérologickému (GM), PCR, kultivačnímu, cytologickému.

BAL je standardním vyšetřením v diagnostice nozokomiální pneumonie (hospital acquired pneumonia – HAP) a s umělou plicní ventilací asociované pneumonie (ventilator-associated pneumonia – VAP) [62]. Flexibilní bronchoskop je po přehlédnutí bronchiálního stromu zaveden do postižené oblasti a po zaklínění do segmentárního či subsegmentárního bronchu je aplikováno několik porcí sterilního fyziologického roztoku (standardně 4krát 50 ml), který je zpět částečně aspirován a odeslán k vyšetření. V průběhu bronchoskopie je možno získat materiál také pouhou aspirací nebo bronchiálním výplachem několika ml fyziologického roztoku. Takto získaný materiál odráží složení bronchiálního sekretu v místě odběru.

Výkon lze provést při plném vědomí s lokální anestezií oblasti hrtanu, ev. za pomoci mírné sedace. BAL je často prováděna také cestou endotracheální kanyly u intubovaných pacientů.

Kromě klasické BAL lze provést „chráněnou BAL“ (protected BAL) či „chráněný kartáčkový stěr“ (protected specimen brush sampling). Tyto modernější a nákladnější metody byly v poslední době porovnány v diagnostice neutropenických pacientů s hematologickými malignitami a oproti klasické BAL nepřinesly větší výtěžnost [63], navíc jsou technicky a časově náročnější [64], teoretickou výhodou je použití vnitřního chráněného pracovního kanálu, což snižuje možnost kontaminace v orofaryngeální oblasti.

U imunokompromitovaných a velmi často onkologicky nemocných pacientů (kteří tvoří většinu pacientů s IA) nelze obecná doporučení k diagnostice VAP a HAP aplikovat bez modifikace.

Podle obecných doporučení má být BAL provedena před zahájením či změnou antibiotické terapie. To však u nejrizikovějších pacientů (hematologické malignity, transplantace kostní dřeně) není vždy možné vzhledem k nutnosti zahájit empirickou antimikrobiální terapii ihned po stanovení diagnózy pneumonie. Také průkaz lepšího přežití imunosuprimovaných pacientů, kterým byla provedena BAL do 5 dnů od diagnózy pneumonie, ztratil statistickou významnost v podskupině pacientů s hematologickou malignitou či po transplantaci kostní dřeně [65]. Naopak byla tato mortalitní výhoda zřejmá pro podskupinu pacientů po transplantaci solidních orgánů.

Literární údaje o výtěžnosti BAL se různí a pohybují se mezi 30 a 70 % (procento, ve kterém BAL vede k stanovení specifické diagnózy). Jen u části těchto úspěšných BAL však nález vede ke změně terapie. Nižší procenta úspěšnosti, menší vliv na změnu léčby a absence vlivu na mortalitu jsou popisovány u pacientů po transplantaci kostní dřeně či u neutropenických pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče [66–70]. Konkrétně pro diagnózu IA je za použití cytologie a kultivace z BAL (bez modernějších sérologických a PCR metod) uváděna senzitivita okolo 50 % [71,72].

Komplikace se vyskytují zhruba v 10 % a nejčastějšími jsou hyposaturace kyslíku přechodně nebo i s nutností umělé plicní ventilace či krvácení do plic.

Dopad uvedeného na praktické postupy je ten, že se jednotlivá pracoviště řídí vlastní zkušeností a počet prováděných BAL vykazuje velké regionální rozdíly i v rámci ČR. Používá-li se BAL rutinně a spolupráce s intenzivisty, pneumology, rentgenology a mikrobiology je pravidelná a dobrá, je časná BAL jistě přínosem. Naopak na pracovištích, která dávají přednost konzervativnějším přístupům a BAL je prováděn zřídka a později po stanovení diagnózy nejsou výsledky pro diagnózu přínosné.

Bronchoskopická transbronchiální punkce s aspirací jehlou nebo s použitím biopsických kleští

Získaný materiál je vhodný k vyšetření kultivačnímu, cytologickému, ev. histologickému.

Jde o metodu, kterou lze doplnit prováděné bronchoskopické vyšetření. Provádí se obvykle pod skiaskopickou kontrolou. Zvýšení diagnostické výtěžnosti u imunokompromitovaných pacientů však nebývá významné [68] a přináší další riziko komplikací. Metoda umožňuje biopsii přímo ze suspektního ložiska. Je tedy teoreticky vhodná např. pro diagnózu aspergillové tracheobronchitidy.

Transparietální punkční biopsie a aspirace tenkou jehlou

Získaný materiál je vhodný k vyšetření kultivačnímu, cytologickému, histologickému ev. sérologickému a molekulárně biologickému.

Jde o diagnostickou metodu, která je populárnější v USA než v Evropě. V České republice, pokud je autorům známo, se v diagnostice invazivní aspergilózy u imunosuprimovaných pacientů uplatňuje zřídka.

Technicky jde o transparietální punkci prováděnou většinou jehlou 18–22 G, která je za pomoci CT (ev. i sonografie a skiaskopie) vedena k plicnímu ložisku. Lze použít jak jehly aspirační, tak „samořezné“. Výkon lze provést v lokální anestezii.

Vhodnou indikací je přístupné a dobře ohraničené periferně ležící ložisko nesousedící s velkými cévami. Někteří autoři zvažují biopsii jak z centra ložiska, tak z jeho periferie – vyvstává zde však obava z nárůstu komplikací při náročnějším výkonu [73]. Metoda není vhodná k objasnění difúzních zastření.

Výtěžnost metody kromě rizikového profilu pacienta závisí také na pořadí, které punkční biopsie v diagnostickém procesu zaujme – většinou jde o situaci, kdy je negativní BAL a zároveň CT potvrzený infiltrát přístupný k punkci.

Nosari et al hodnotila retrospektivně 17 biopsií tenkou jehlou u pacientů s hematologickou malignitou po negativní BAL se suspekci na invazivní mykózu na základě CT vyšetření – byla 8krát potvrzena IA, 4krát invazivní zygomykóza, pozitivní prediktivní hodnota byla 100 %, ve 2 případech, které byly v dalším průběhu diagnostikovány jako invazivní mykóza, byla punkční biopsie falešně negativní [72]. V retrospektivní analýze finských autorů [74] (provedeno 30 biopsií tenkou jehlou u 21 pacientů po transplantaci kostní dřeně) byla senzitivita pro IA 50% – k tomuto výsledku však bylo ve 2 případech potřeba opakované punkce. Biopsie tenkou jehlou má jako ostatní biopsické vyšetření vysokou pozitivní a nízkou negativní prediktivní hodnotu.

Komplikace jsou poměrně časté, zvláště pneumotorax se rozvine až v 50 % případů. Ve velké většině je však jen drobný, plášťový, jen v asi 4 % vyžaduje drenáž (<http://www.aspergillus.org.uk>).

Diagnostická otevřená plicní biopsie

Získaný materiál je vhodný k vyšetření kultivačnímu a histologickému, eventuálně molekulárně biologickému a sérologickému.

Nejinvazivnější z dosud uvedených vyšetření umožňuje získat operativní cestou dostatečně velký biopsický vzorek za cenu operačního rizika. Tato metoda je v éře sérologické a PCR diagnostiky IA, moderních zobrazovacích metod a účinných antimykotik vnímána jako příliš riziková [75]. Specifická diagnóza, tj. nález etiologicky definovaný, je zjištěna přibližně v 70 % případů. Zbývající nálezy odhalí většinou nespecifickou reakci plicní tkáně.

Někteří autoři však referují o dobrých zkušenostech. K dispozici je studie [76], ve které autoři provedli 32 otevřených biopsií u pacientů s hematologickými malignitami, kteří měli v CT obraze typické známky invazivní mykózy. Invazivní mykózu diagnosti-

kovali pouze v 17 případech (z toho 13 IA), a ukázali tak neobvykle nízkou pozitivní prediktivní hodnotu samotného HRCT vyšetření. Podařilo se jim také provést tyto výkony bez mortality a s relativně nízkou morbiditou. Výhodou podobného přístupu byla i možnost kompletní resekce solitárního ložiska.

Ve větší studii [9] bylo provedeno 67 otevřených biopsií pacientům s hematologickými malignitami a specifickou diagnózu se podařilo stanovit v 62 %. V 57 % byla na základě výsledku biopsie změněna terapie. V den 30 a 90 po biopsii přežívalo více pacientů, u nichž byla specifická diagnóza biopsií stanovena. Komplikace se vyskytly v 13 % včetně 5 pacientů vyžadujících umělou plicní ventilaci, 1 pacient zemřel v souvislosti s biopsií. Ve starší práci byla převážně v pediatrické populaci po transplantaci kostní dřeně (87 otevřených biopsií) četnost komplikací 21 % [77].

Diagnostická biopsie cestou videoasistované torakoskopie (VATS)

Získaný materiál je vhodný k vyšetření kultivačnímu a histologickému, eventuálně molekulárně biologickému a sérologickému.

Jde o potenciálně méně zatěžující alternativu k torakotomii, v již zmíněné studii však byla tíže komplikací obdobná u obou výkonů [9]. Nevýhodou může být chybějící možnost stavět velké krvácení.

Materiál získaný při plicním resekčním výkonu

Získaný materiál je vhodný k vyšetření kultivačnímu a histologickému, eventuálně molekulárně biologickému a sérologickému.

Není vzácností, že je definitivní diagnóza IA stanovena až při plicní resekci. Předchozí snahy o potvrzení diagnózy některou invazivní metodou buď nebyly úspěšné anebo nebyly prováděny a pacient byl léčen antimykotiky na základě diagnózy pravděpodobné

IA (typicky pozitivita galaktomananu + typický CT nález) nebo jen na základě diagnózy možné IA, ev. neléčen. S uvedením méně toxických a účinných antiaspergilových preparátů do praxe jsou resekční výkony prováděny méně často. I nadále jsou za indikace k resekčnímu výkonu považovány: ložiska IA v těsné blízkosti velkých cév nebo hemoptýza ze solitárního ložiska či život ohrožující hemoptýza. Volba operačního výkonu může být také ovlivněna intolerancí nebo toxicitou dlouhodobé antimykotické terapie nebo nutností časně pokračovat v onkologické terapii.

Rozsah výkonu (segmentektomie, lobektomie, pulmonektomie) a provedení závisí na velikosti a lokalizaci ložiska, funkčním stavu plic a celkovém stavu pacienta a je předmětem společné rozvahy s operátorem.

Paranazální dutiny

Punkce paranazálních sinů

Získaný materiál je vhodný k vyšetření sérologickému, PCR, kultivačnímu, cytologickému.

Přímá detekce hyf či pozitivní kultivace z tohoto materiálu přispívá jako mikrobiologické kritérium k diagnóze pravděpodobné IA.

Otevřená a endoskopická biopsie

Získaný materiál je vhodný k vyšetření kultivačnímu a histologickému, cytologickému ev. molekulárně biologickému a sérologickému.

Indikace k těmto invazivním procedurám vzniká ve spolupráci s ORL specialistou. V posledních letech se prosazují endoskopické metody [78]. Byla publikována práce, podle níž bylo při agresivním diagnostickém přístupu – nazální endoskopie s biopsií všech podezřelých ložisek při každé klinické suspekci na IA paranazálních dutin – zachyceno mezi pacienty po transplantaci kostní dřeně 14 invazivních aspergilóz, které byly za použití kombinace antimykotické terapie a endoskopické chirurgie ve 100 % eradikovány [79]. Vzorek k histologickému

vyšetření má být odebrán šetrně před zahájením agresivního sání či použitím nástrojů k odstranění nekrotických hmot.

Mozek

Punkce mozkomíšního moku

Získaný materiál je vhodný k vyšetření sérologickému, PCR, kultivačnímu, cytologickému.

Přímý záchyt aspergilových hyf je sice velmi nepravděpodobný, nicméně vyšetření je významné diferenciálně diagnosticky (nález maligních elementů, jiných infekčních agens). Pro diagnostiku invazivní aspergilózy CNS nabývá na významu vyšetření galaktomananu a PCR v mozkomíšním moku.

Stereotaktická biopsie a otevřený neurochirurgický výkon

Získaný materiál je vhodný k vyšetření kultivačnímu a histologickému, eventuálně molekulárně biologickému a sérologickému.

Rozhodnutí provést tato invazivní vyšetření vzniká ve spolupráci s neurochirurgem po pečlivém prostudování snímků počítačové tomografie, ev. nukleární magnetické rezonance a zvážení poměru rizika a možného přínosu. U velmi rizikových pacientů jsou tato vyšetření často nahrazována modernějšími sérologickými a PCR metodami. Při centrálních neurologických symptomech a odpovídajícím ložisku v CT či MRI obraze je nutné vyšetřit také ostatní orgány (především provést HRCT plic). V retrospektivní studii mělo 100 % pacientů s CNS invazivní aspergilózou postižen alespoň jeden další orgán [80].

Další orgány: kůže, vertebrální a jiné osteomyelitidy, cévní náhrady, endoftalmitida, pacemakerová infekce, infekční endokarditida a další

Bioptické metody se pochopitelně liší podle lokalizace. U těchto vzácnějších lokalizací IA saháme k bioptickým vyšetřením častěji – zvláště z diferenciálně diagnostických důvodů.

Minimální požadavky k bezpečnému zajištění nejčastějších invazivních výkonů Koagulační parametry

Pro většinu elektivních invazivních výkonů jsou požadovány standardní koagulační testy (minimálně aPTT a Quickův test) v normálních mezích. Pro substituci trombocytů je uváděna jako bezpečná hodnota $50 \times 10^9/l$ pro většinu punkčních výkonů i např. pro laparotomii. Při operačních výkonech ve zvláště kritických místech, jako je centrální nervový systém či oko, jsou požadavky na substituci trombocytů vyšší ($100 \times 10^9/l$). Nutná je kontrola hodnoty trombocytů těsně před výkonem, po podání substitute [81].

Ostatní

Všechny invazivní diagnostické výkony při suspekci na IA vyžadují dostupnost intenzivní péče včetně možnosti umělé plicní ventilace v případě komplikací. Mnohé jsou elektivně prováděny v analgosedaci či celkové anestezii.

Rozhodnout, kdy celkový stav a míra dušnosti a respirační insuficience umožňuje provést např. BAL bez nutnosti umělé plicní ventilace, bývá velmi obtížné.

Histologické vyšetření

Průkaz aspergilových hyf v tkáních spolu s odpovídající invazí a poškozením okolních struktur zůstává zlatým standardem v diagnostice IA.

Odběr materiálu

Rozhodnutí provést u často velmi rizikového pacienta biopsii z hlubokých vnitřních orgánů je natolik závažné, že musí být vyvinuta maximální snaha, aby byl získaný materiál správně vyšetřen. Již samotné provedení odběru ovlivňuje výtěžnost.

V ideálním případě mají být zároveň vyšetřeny vzorky normální tkáně a tkáně z centra a periferie ložiska (<http://www.mycology.adelaide.edu.au>).

To samozřejmě nejde zajistit vždy, např. u biopsie tenkou jehlou.

Průvodka k histologickému materiálu musí obsahovat informaci o tom, že jde o vzorek získaný od imunosuprimovaného pacienta s podezřením na invazivní mykózu.

Cesta od odběru k histopatologickému vyšetření

V podmínkách ČR musí již odebírající klinik rozdělit materiál na část odeslanou ke kultivačnímu vyšetření (do sterilní nádoby) na oddělení mikrobiologická a na část k vyšetření cytologickému (nativně), ev. histopatologickému (ve formolu), které jsou odesílány na patologická ev. specializovaná cytologická oddělení.

Je zkušeností nejen autorů, že odesláním celého preparátu na patologické oddělení je tento pro kultivační vyšetření často ztracen.

Problémem může být i nedostatečné zajištění logistiky a informovanosti všech, kdo se o cenný materiál starají, v českých podmínkách vše koordinuje sekundární klinický lékař, jehož snaha je stejně důležitá jako zkušenost a zručnost biotupujícího lékaře či histopatologa.

Zpracování vzorku histopatologem a barvení

U většiny pacientů bude invazivní aspergilóza jen jedním z diferenciatně diagnosticky možných nálezů, při zpracování je třeba myslet i na možnost nálezu maligních buněk, neinfekčního zánětu atd.

Kromě standardního barvení hematoxylinem-eozinem (HE, zde mohou být hyfy zcela pominuty) jsou tkáně imunokompromitovaných pacientů se suspektní mykózou barveny podle Grama (spíše na mikrobiologických odděleních) a také dvěma základními „fungálními barvivy“: Gomori-Grocott za použití stříbrných solí a PAS (periodic acid Schiff). Praxe, kdy se až dle HE preparátu rozhoduje, zda speciálně barvit, není podle britských do-

poručení správná a způsobuje zpoždění diagnostiky mykóz.

Dvě základní metody pro průkaz hub – PAS a Grocott-Gomori – je vhodné provést paralelně. Zatímco Grocott-Gomori stříbření je velmi kontrastní a velmi zřetelně odliší fungální vlákna oproti pozadí, PAS umožní barvení i popis zachovalých okolních struktur, detaily vláken či popis vztahu hyf k okolní tkáni – invaze apod.

Imunohistochemické metody (pomocí antiaspergilových protilátek WF-AF-1 nebo EB-A1) [82,83] a PCR metody [84] k druhovému určení hyf v histologickém vzorku nejsou dosud v ČR běžně užívány.

Další možností je užít fluorescenčních metod (v ČR nejčastěji Rylux BSU, dále Calcofluor white, Uvitex 2B, Blankophor), které sice nejsou specifické pro rod *Aspergillus*, ale mají slušnou senzitivitu v zachycení fungálních patogenů a jsou rychlé [85].

Minimum pro klinika k orientovanému rozhovoru s histopatologem

Aspergilové hyfy jsou užší (2–5 μm) než zygomycetové, bývají septované. Na rozdíl od pravoúhlého větvení u zygomycet je větvení aspergilových hyf typicky ve 45°. Po léčbě mohou být hyfy modifikovány. U rychle progresujících infekcí IA jsou vlákna stejnoměrně šířky, u chronických případů mají hyfy bulózní rozšíření. Spóry (diagnostické pro druhové určení) nebývají přítomny, pouze výjimečně v plicích tam, kde je kontakt se vzduchem [86]. Přesto je dobré pro případ negativní kultivace vědět, že v histologickém preparátu jsou hyfy některých plísňů od hyf aspergilových neodlišitelné – jsou to *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Geotrichum candidum*, *Acremonium spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Penicillium spp.*, *Schizophyllum commune* a jiné.

Předání výsledku klinikovi

Pozitivní výsledky by měly být telefonovány nebo jiným způsobem okamžitě

Tab. 6. Interpretační kritéria dle CLSI (MIC v µg/ml).

	citlivý (S)	citlivost závislá na dávce (SDD)	intermediární	rezistentní (R)
flukonazol	≤ 8	16–32		≥ 64
itrakonazol	≤ 0,125	0,25–0,5		≥ 1
vorikonazol	≤ 1	2		≥ 4
flucytosin	≤ 4		8–16	≥ 32

sděleny klinikům. Podle britských doporučení [87] by měla zpráva obsahovat informaci o: přítomnosti kvasinek, přítomnosti hyf, přítomnosti septování hyf – pokud lze určit, přítomnosti melaninu, rozměrech hyf či kvasinek, lokalizaci vzhledem k buňce, zvláštních strukturách či formách.

Interpretace výsledků

a význam pro klinický postup

Každý záchyt hyf či jiných fungálních součástí v histologickém vzorku z oblasti, kde bylo přítomno tkáňové poškození, má velký význam. Je potvrzením invazivní mykotické infekce. Vzhledem k používání empirické antimykotické terapie nebo terapie preemptivní (řízené např. monitorací galaktomanganu a včasným HRCT snímkem) bude v době histologického průkazu již většina imunokompromitovaných pacientů léčena antimykotiky. Zvláště v případě, kdy tomu tak není nebo je použité antimykotikum na prokázané agens neúčinné, může být rychlé informování klinika a následná změna léčby život zachraňující.

Snaha je vždy za pomoci mikroskopických známek, imunohistochemie, PCR, ale především kultivace určit agens na úroveň druhu. Vlákňité plísňe jsou dnes převažujícím typem oportunních fungálních infekcí a některé z nich jsou rezistentní na mnohá antimykotika. I v rámci rodu *Aspergillus* se citlivost k antimykotikům liší (např. rezistence *Aspergillus terreus* k amfotericinu B). Určení kauzálního druhu má tedy zásadní význam pro pokračování léčby a následné (v hematatoonko-

logii často dlouhodobé) sekundární profylaxe.

Pozitivní histologický nálezn po dlouhodobé antimykotické terapii může znamenat také průkaz selhání terapie a vést k její změně.

Diagnostická jistota, kterou histologie přináší, vede v ideálním případě k rychlé, agresivní léčbě diagnostikované invazivní mykózy, a tak mohou být ukončeny aplikace některých empiricky podávaných antimikrobiálních preparátů. Takto vedená léčba může vést rychleji k léčebné odpovědi a umožnit tak mimo jiné dříve pokračovat v léčbě základního (často onkologického) onemocnění, a zvýšit tak naději pacienta na vyléčení.

Mykologické vyšetřovací metody

Odběr a zasílání materiálu

Základem úspěšného mykologického vyšetření je kvalifikovaný odběr vhodného biologického materiálu. Nelze opomenout ani včasný transport materiálu do laboratoře a jeho uchování za vhodných podmínek, aby nedošlo k úhynu nebo nežádoucímu pomnožení organismů. Odběr materiálu na průkaz vláknitých mikromycet je poměrně problematickou záležitostí. Za ideální se považují vzorky odebrané přímo z podezřelého ložiska invazivními technikami (biopticky, endoskopicky, peroperačně nebo incizí z postižené tkáně) [76,88]. V případě, že nemáme tuto možnost, snažíme se odebrat materiál z postižené lokality, např. BAL při postižení plic, výplach z dutin, mok při ložiskovém postižení CNS a podobně. Musíme počítat s tím, že se snižující se validitou mate-

riálu klesá i výtěžnost mykologického vyšetření. Technika odběru by měla maximálně omezit možnost kontaminace vzorku. Při malém množství získaného materiálu nebo hrozí-li vyschnutí, je vhodnější odebrat přímo do tekutého kultivačního media nebo sterilního fyziologického roztoku. Vzorky dodáme do laboratoře co nejrychleji, v případě nutnosti uchováme při 4 °C, materiál odebraný do kultivačních medií při pokojové teplotě.

Pro mykologa je velice důležité, aby odesílající lékař, kromě nezbytných náležitostí, uvedl na průvodce také lokalitu, odkud je materiál odebrán, a správnou diagnózu pacienta. Jsou to rozhodující kritéria, podle kterých mykolog posuzuje závažnost nálezu. Většina mikromycet je běžnou součástí životního prostředí, některé dokonce součástí naší mikroflóry, a tím bohužel také častou kontaminantou jak při odběrech biologického materiálu, tak při zpracování v laboratoři.

Mikroskopické vyšetření – cytologie

Mikroskopické vyšetření má v laboratorní diagnostice mykóz nezastupitelnou úlohu. Mikroskopické preparáty jsou většinou snadno proveditelné a mohou být prohlíženy ve velice krátké době. V řadě případů lze s použitím běžných barvení (Gram, Giemsa) potvrdit mykotickou etiologii nebo i stanovit skupinovou diagnózu. Pro aspergilózu je typický nálezn širokých septovaných hyf s větvením do tvaru písmene V (dichotomické), obr. 7. Vlákna mukormycet jsou neseptovaná a odstupují pod úhlem větším než 45° [89]. Z přítomnosti dalších elementů, charakteristické bakteriální flóry, epitelí a leukocytů, můžeme usuzovat na kvalitu odběru, přítomnost zánětu a význam mykotického nálezu ve vyšetřovaném vzorku.

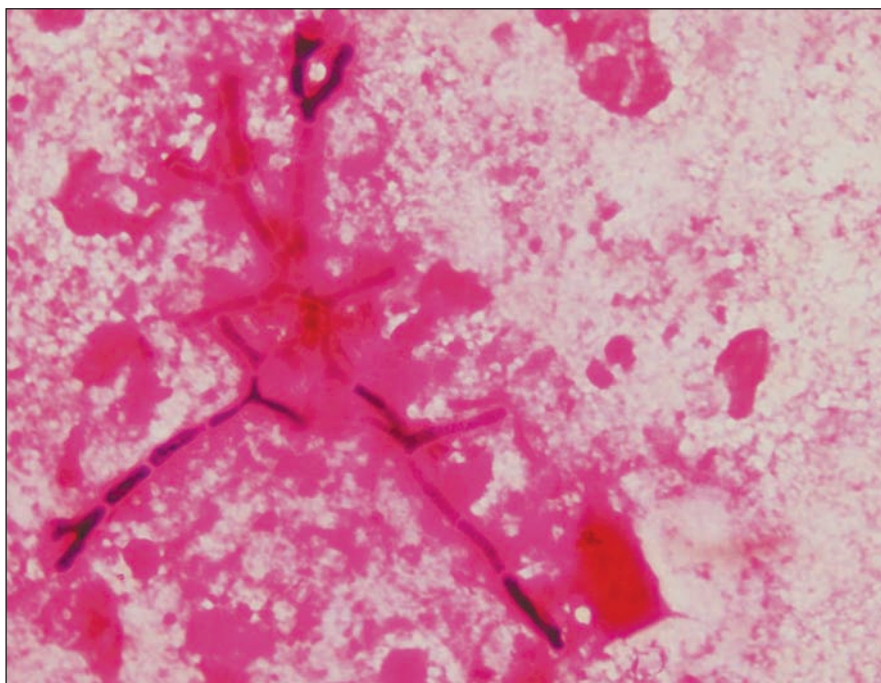
Někteří mykologové upřednostňují tzv. fluorescenční mikroskopické metody, kdy stěny houbových elementů obarvené fluorescenčním barvivem (např. rylux) září v dopadajícím světle fluorescenčního mikroskopu [90].

Kultivační vyšetření

Kultivace odebraného materiálu na vhodném izolačním médiu je základem mykologické diagnostiky. Pouze kultivační průkaz vede k jednoznačné identifikaci vyvolávajícího agens. Kultivační vyšetření má vysokou specifitu (92 %) v případě pozitivního nálezu, ale nízkou senzitivitu (50 % a méně) ve srovnání s dalšími metodami [91, 92]. K izolaci mikromycet se nejčastěji používá tzv. Sabouraudovo médium, selektivní a diagnostická média (Czapek-Dox) jsou pak využívána spíše při identifikaci narostlých kultur [5]. Materiál můžeme očkovat i do tzv. tekutých médií. Tato duplicita zvyšuje zachytnost a zároveň eliminuje možnost kontaminace vzorku při zpracování v laboratoři. Nejdříve můžeme očekávat narostlé kolonie aspergilů (obr. 1–3) za 24–48 hod u druhu *Aspergillus fumigatus* nebo *Aspergillus flavus*. Některé druhy rostou pomaleji a také u léčených pacientů očekáváme pozdější nárůst. Kultivaci ukončujeme obvykle po 10 až 14 dnech, ale předběžné výsledky jsou odesílány dříve. Identifikace do druhu se provádí na základě charakteristických mikroskopických znaků a může být poměrně náročná odborně i časově.

Interpretace nálezu

Součástí laboratorního vyšetření je i interpretace nálezu. U primárních patogenů je jejich průkazem fakticky stanovena diagnóza. Složitější situace nastává při izolaci oportunních patogenů jako *Aspergillus*. Signifikantní je



Obr. 7. *Aspergillus spp.* v BAL – barveno dle Grama (autor: MUDr. Naďa Mallátová, Oddělení lékařské mykologie a parazitologie, Nemocnice České Budějovice).

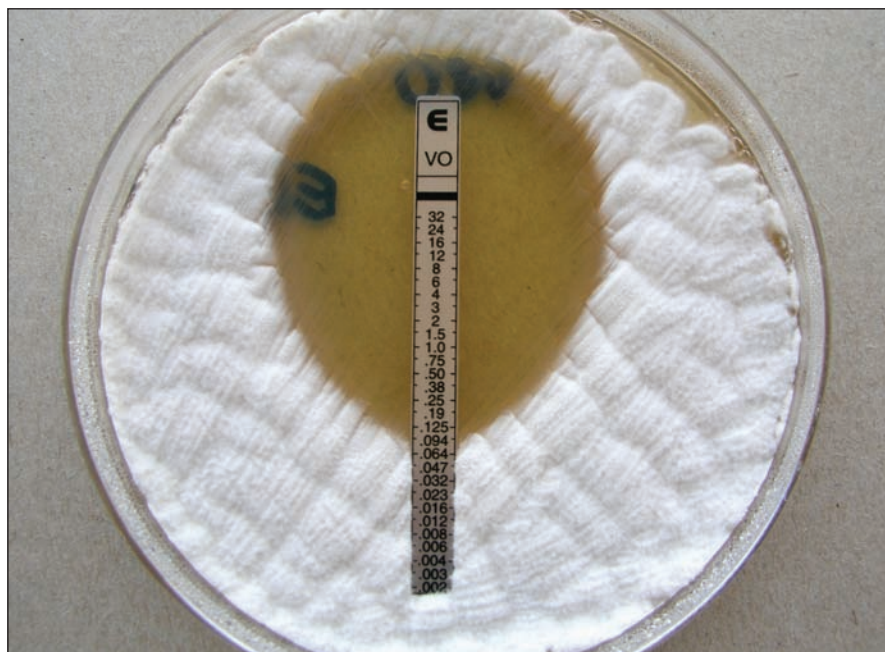
nález oportunních patogenů z primárně sterilních lokalit (krev, mozkomíšní mok). Při izolaci z takových materiálů, jako je sputum nebo i sekret z dolních dýchacích cest (DDC), musí být nález interpretován s velkou opatrností. Je třeba znát klinický stav pacienta, vyšetření ev. opakovat, doplnit nebo ověřit dalšími vyšetřovacími postupy (průkaz galaktomananu, PCR, CT). Velkým pomocníkem v těchto případech může být právě mikroskopický nález. Dále je třeba si uvědomit všudypřítomnost aspergiových mikrokonidií, a tedy velice snadnou možnost kontaminace vzorku jak

při odběru, tak při práci v laboratoři, a to zvláště mykologické.

Soubani uvádí, že 90 % nálezů *Aspergillus spp.* z DDC u pacientů z oddělení plicního a ARO, sledovaných v období 5 let, bylo vyhodnoceno jako kolonizace [93]. Jinak je třeba hodnotit nálezy u pacientů hematologických, po transplantaci kostní dřeně nebo s déletrvající neutropenií. Tady je pozitivní kultivační nález z materiálů DDC signifikantní pro invazivní infekci [94]. Stanovení rychlé a správné diagnózy usnadní dobrá komunikace mezi klinikem a laboratorním pracovníkem.

Tab. 7. Nejvýznamnější studie sledující význam detekce galaktomananu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematoonkologických nemocných.

práce	celkový počet pacientů/ počet pacientů s IA	GM cut-off index	senzitivita (%)	specifita (%)	PPV (%)	NPV (%)
Maertens (1999) [112]	243/33	1,0	92,6	95,4	93,0	95,0
Maertens (2001) [113]	362/95	1,0	89,7	98,1	87,5	98,4
Maertens (2002) [114]	100/27	1,0	97,4	98,8	94,4	98,8
Sulahians (2001) [115]	797/53	1,5	90,5	94,0	52,0	98,7
Herbrecht (2002) [116]	797/153	1,5	29,4	94,8	57,7	84,9
Maertens (2004) [126]	104/29	2 × 0,5	96,5	98,6	98,6	98,4
Pinel (2003) [117]	807/48	1,0	50,0	99,6	85,0	96,8



Obr. 8. Kultura *Aspergillus spp.* s Etestem vorikonazolu (autor: MUDr. Naďa Mallátová, Oddělení lékařské mykologie a parazitologie, Nemocnice České Budějovice).

Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům

Celosvětově respektovaná CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, USA) schválila v roce 1998 dokument M 38A, který standardizuje způsob provádění testů citlivosti pro vláknité mikromycety (NCCLS, 1998). Jedná se o metodu kvantitativní, diluční, poskytující možnost stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) a umožňující dle hodnoty MIC zařadit testovaný izolát do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD – Susceptible-Dose Dependent), rezistentní (R).

Interpretační kritéria jsou uvedena v tab. 6. Pro nově přicházející antimykotika zatím interpretační kritéria stanovena nejsou. Pro běžné rutinní použití a poměrně malý počet testovaných kmenů je tato metoda pracná a i finančně náročná.

Disková difuzní metoda

Disková difuzní metoda se používá pro orientační vyšetření citlivosti mikromycet k antimykotikům. Jako metoda kvalitativní umožňuje stanovit citlivost nebo rezistenci podle toho, zda vyšetřovaná mikromyceta ve sta-

novené koncentraci buněk na agarové půdě vytvoří nebo nevytvoří přípustnou zónu inhibice růstu kolem disku s určitou koncentrací antimykotika po předepsané době inkubace.

Pro stanovení citlivosti vláknitých mikromycet k antimykotikům není tato metoda standardizována.

Etest

Etest (AB Biodisk, Švédsko) je metoda pro kvantitativní vyšetření citlivosti, která kombinuje principy diskové difuzní a diluční metody. Pro vysoký stupeň shody s výsledky MIC získanými mikrodiluční standardní metodou je Etest vhodný k vyšetření MIC antimykotik u kvasinkovitých organismů i vláknitých mikromycet [95–97].

Etest je inertní plastický proužek, který na své jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimikrobní látky v suchém stavu, na druhé straně proužku je vyznačen kód antimikrobní látky a kontinuální stupnice, obvykle odpovídající rozmezí 15 ředění antimikrobní látky dvojnásobně geometrickou řadou. Stupnice slouží k odečítání MIC. Na povrch agarů naočkováných inoku-

Tab. 8. Faktory ovlivňující senzitivitu Platelia *Aspergillus* testu.

Faktory snižující senzitivitu

- pacienti bez hematologické malignity/bez neutropenie [206]
- lokalizovaná forma aspergilové infekce [207]
- vysoká hodnota cut-off indexu pozitivity [126]
- nízká frekvence odběrů [121]
- předchozí podávání antimykotik [125]
- přítomnost protilátek proti galaktomananu [116]
- dlouhodobé uchovávání vzorků v zamraženém stavu [111]

lem testované mikromycety se přiloží proužek stranou, která obsahuje antimikrobní látku. Prostředí, teplota a doba inkubace závisí na vyšetřovaném mikroorganismu. Po inkubaci se vytváří kolem proužku Etestu elipsa inhibovaného růstu. MIC se odečítá v místě, kde elipsa přetíná okraj proužku (obr. 8).

Kmen se podle MIC zařadí do kategorie citlivý, citlivý v závislosti na dávce (azoly), ev. intermediární (amfotericin B, 5-flucytozin), rezistentní, dle interpretačních kritérií CLSI standardu (tab. 6). V současné době jsou na trhu diagnostické proužky s flukonazolem, ketokonazolem, itraconazolem, vorikonazolem, amfotericinem, flucytozinem. Kaspofungin a posakonazol jsou určeny pro experimentální použití, neboť nejsou stanovena interpretační kritéria.

Metodika Etestu umožňuje stanovit MIC antimykotik podávaných v kombinaci. Účinek tzv. kombinační terapie je hodnocen pomocí FIC indexu (fractional inhibitory concentration index). FIC index (FICI) stanovíme jako součet poměrů MIC antimykotik testovaných v kombinaci a samostatně. Synergie je definována $FICI \leq 0,50$, antagonismus $FICI > 4$ [98,99].

Komerční soupravy pro stanovení citlivosti

Některé laboratoře používají ke stanovení citlivosti komerčně dostupné

Tab. 9. Příčiny falešné positivity Platelia Aspergillus testu.

Falešná pozitivita	Mechanismus	Poznámky	Ref.
1. Kontaminace vzorku při odběru nebo zpracování vzorku			
– kontaminace vzdušnými spórami <i>Aspergillus spp.</i> a <i>Penicillium spp.</i>	detekce GM z kontaminujících vláken aspergilů a penicilií	sporadické positivity; k odlišení slouží retest vzorku v laboratoři	[144]
– kontaminace vatou (např. při dezinfekci místa odběru)	zkřížená reakce s glukopyranozovými zbytky	a vyšetření opakovaného odběru	[147]
2. Průnik antigenu z GIT při postižení nebo nezralosti GIT			
– předčasně narozené děti, novorozenci	průnik antigenů z <i>Bifidobacterium spp.</i> přes nezralou mukózu a zkřížená reaktivita polysacharidů buněčné stěny bifidobakterií s EB-A2		[143]
– 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	[141,142]
3. Reakce s antigeny v cirkulaci			
– infekce <i>Penicillium spp.</i>	zkřížená reakce s polysacharidem penicilií		[91]
– 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	[139]
– penicilinová ATB (piperacilin/tazobaktam, ampicilin, amoxicilin/klavulanát od některých výrobců)	reakce s GM kontaminujícím semisyntetická penicilinová ATB	klinicky jedna z nejčastějších a nejvýznamnějších příčin falešných pozitivit	[129,132]
4. Ostatní – zmiňované, ale neověřené příčiny			
– cyklofosamid; bakteremie; paraproteinemie; transfúzní přípravky a krevní deriváty			[91,109, 146]

firemní sety Fungitest (Biorad, Francie) nebo ATB Fungus (Biomérieux, Francie). První z nich umožňuje zařadit testovaný izolát do již zmiňovaných kategorií (S, SDD, R), druhý umožňuje i stanovení omezeného spektra MIC. Tyto soupravy nejsou určeny pro stanovení citlivosti vláknitých mikromycet k ATM. Souprava Sensititre Yeast One, která by byla k tomuto stanovení vhodná, není na našem trhu k dispozici [100].

Interpretace

Při interpretaci respektujeme kritéria CLSI (tab. 6). Je třeba brát zřetel zvláště na izoláty, které se nacházejí

v kategorii citlivý v závislosti na dávce. Zde doporučujeme jako první krok při terapeutickém neúspěchu zvýšení dávky podávaného antimykotika. Ve většině studií zabývajících se in vitro citlivostí aspergilů k antimykotikům, pro něž nejsou dána interpretační kritéria, se hodnoty MIC 50 (minimální koncentrace antimykotika, která inhibuje růst 50 % populace) pro posakonazol, pohybují do 0,5 µl/ml [101, 102]. Z toho můžeme odvozovat, že dosáhneme-li při našem testování výsledné MIC pod uvedené hodnoty, bude náš izolát pravděpodobně citlivý. Pro kaspofungin také nepřesahuje MIC 50 0,5 µl/ml [96,101,103], avšak Kart-

sonis dokládá, že kaspofungin byl klinicky úspěšný i při léčbě kandid s MIC 2,0 µl/ml.

Korelace laboratorních výsledků citlivostí vláknitých mikromycet k ATM a klinické odpovědi na léčbu je stále problematickou záležitostí.

Stanovení účinku kombinační terapie je v současné době na úrovni teoretické. Výsledky in vitro studií jsou značně rozdílné. Singh shrnuje, že pro amfotericin a azoly jsou in vitro výsledky zřídka synergní, v klinické praxi není výhoda nad monoterapií demonstrována, in vitro je amfotericin a echinokandiny často synergní, v klinice je úspěšného výsledku dosaženo ve

Tab. 10. Využití detekce galaktomananu – *Platelia Aspergillus* – souhrnné informace.

Indikace

Pravidelný monitoring GM v séru indikován minimálně 23krát za týden 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 febrilních 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:

- možnost falešných pozitivit
- falešné negativity jsou spíše vzácné
- 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 positivity ve srovnání s detekcí GM v séru

mozkomíšni mok – diagnostika postižení CNS invazivní aspergilózou

35–60 %, echinokandiny s azoly jsou in vitro převážně synergní, klinické studie nejsou, ojedinělé dokumentované případy prezentují úspěch [104]. Podobné hodnocení najdeme i v práci Johnsonové [99].

Veškeré získané výsledky je třeba vždy hodnotit v korelaci s klinickým stavem pacienta.

Nekultivační diagnostické metody

Časně zahájená cílená antimykotická léčba, která však vyžaduje časně stanovení co možná nej přesnější diagnózy, je jedním z klíčových faktorů zlepšujících prognózu nemocných s invazivní aspergilózou [1]. Konvenční diagnostické přístupy bohužel velmi často selhávají a to jak ve své senzitivitě, tak časnosti stanovení definitivní diagnózy.

Výše zmíněné obtížnosti v diagnostice invazivní aspergilózy proto v prů-

běhu posledních několika let vedly k rozvoji tzv. nekultivačních diagnostických metod.

Tyto postupy můžeme dělit na dvě skupiny: a) **metody sérologické** – využívající detekci antigenů, protilátek nebo metabolitů aspergilových kmenů [105] a b) **metody molekulárně genetické** – detekující nukleové kyseliny aspergilů.

Ze všech nekultivačních metod má v současné době jednoznačné definované a zásadní místo v diagnostice invazivní aspergilózy sérologický test využívající detekci galaktomananu. „Panfungální“ sérologický test využívající záchyt fungálního antigenu 1,3-β-D-glukanu je pak metodou novou, která podobně jako molekulárně genetické postupy ve formě různých variant PCR mají doposud postavení pouze výzkumné a nelze je k diagnos-

tice invazivní aspergilózy zatím použít v běžné rutinní praxi.

Detekce galaktomananu

Galaktomanan: 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 imuno-kompromitovaných laboratorních zvířat infikovaných kmeny aspergilů a následně také v séru a moči pacientů s invazivní aspergilózou antigen, který byl poté identifikován jako galaktomanan (GM), což je termostabilní heteropolysacharid buněčné stěny aspergilů [106,107]. Molekula GM o velikosti 25–75 kDa se skládá z neimunní mananové korové části a imunoreaktivních bočních řetězců zakončených galaktofuranozylovými jednotkami [107,108]. 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 penicilií a při invazivní infekci tímto patogenem (která je však velmi vzácná) může být tedy galaktomanan v séru také detekován [109]. Na zvířecích modelech byla prokázána korelace mezi mykotickou náloží ve tkáních a množstvím uvolněného, respektive detekovatelného GM v séru [110]. 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 [6].

Pro detekci GM je možno použít několik imunochemických metod – latexovou aglutinaci, radioimunoanalýzu a sendvičovou ELISA, které se liší detekčním limitem i senzitivitou. Komerčního užití dosáhly pouze dvě – latexová aglutinace (Pastorex Aspergillus, Bio-Rad, France) a sendvičová ELISA

(Platelia Aspergillus, BioRad, France). Oba komerční sety využívají pro detekci králičí monoklonální protilátku EB-A2, která rozpoznává β -(1-5) vázané galaktofuranosylové zbytky na molekule GM. Pro pozitivitu testu je nezbytná přítomnost minimálně 4 těchto epitopů [6].

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 metodou, která je 10–15krát (při použití cut-off 1,5) a nebo až 30krát (při použití cut-off 0,5) senzitivnější. Je tedy schopna detekovat větší počet nemocných s invazivní aspergilózou a rovněž pozitivita je při použití této metody časnější [111]. Reakce je semikvantitativní a její výsledek je udáván jako index positivity (IP) – poměr mezi naměřenou optickou densitou a optickou densitou kontrolního séra obsahujícího přibližně 1 ng GM/ml. Jako pozitivní se označuje vzorek s $IP > 0,5$ a jako pozitivní pacient pak nemocný s více než 2 po sobě jdoucími pozitivními odběry.

Využití detekce galaktomananu pro diagnózu invazivní aspergilózy

Studie, sledující detekci galaktomananu jako markeru invazivní aspergilózy u nemocných s rizikem vzniku této infekce ukázaly, že Platelia Aspergillus test má vysokou specifitu pohybuji 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 [112–120].

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 % [112–120]. Přímé porovnání výsledků jednotlivých studií je však velmi obtížné, ne-li nemožné, neboť oba dva zmiňované parametry mohou být ovlivněny celou řadou faktorů [121].

Faktory ovlivňující senzitivitu testu

Typ a závažnost imunosuprese

Nedávno publikovaná metaanalýza studií sledujících tento problém ukázala na značné rozdíly v senzitivě 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 leukemie) [114,116].

Výše zmíněné nálezy odpovídají nedávno rozpoznaným rozdílům v patogenезi invazivní aspergilózy u jedinců s a bez neutropenie [122]. 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 zánetlivá infiltrace plicního 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 [123]. Je zřejmé, že přechod antigenů (včetně GM) do cirkulace se bude u různých stupňů angioinvasze lišit. Zatímco lokální nekrotizace plicního parenchymu u angioinvasivní formy bude průchod GM usnadňovat, u lokalizovaných nebo ohraničených forem aspergilové infekce (např. tracheo-bronchitida u pacientů po transplantaci plic nebo ohraničený aspergilom) bude průnik GM menší nebo dokonce žádný, a výsledek detekce Platelia Aspergillus testu pak bude negativní [124].

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 angioinvasze. 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 [125].

Cut-off

Velice důležitým faktorem ovlivňujícím senzitivitu testu je hodnota tzv. cut-off indexu positivity (cut-off IP), tedy hodnota indexu positivity, 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 % vs 96,5 %) [126]. Toto snížení cut-off indexu positivity 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 imunosupresivy. U obou těchto skupin pacientů je, jak výše zmíněno, mykotická nálož nízká, a proto při užití vyšších hodnot cut-off IP by tito nemocní byli falešně označeni za negativní, a naopak při cut-off IP = 0,5 je test dokáže správně označit za pozitivní [125,127].

Frekvence prováděných odběrů

Frekvence a pravidelnost odběrů krve pro detekci galaktomananu významně ovlivňují senzitivitu metody a její schopnost časné 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 % [40,113]. 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 positivity (IP) těsně přesáhne 0,5 a vzorek se stane časné pozitivním. Obecně se doporučuje provádět pravidelný rutinní screening rizikových nemocných (nemocní s akutní leukemií nebo po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně) 2–3krát týdně, v rizikových obdobích (febrilní neutropenie nereagující na antibiotickou léčbu, nález infiltrátů na HRCT plic) ev. i častěji [111]. Podle našich zkušeností však více než 1 odběr za den (při použití cut-off IP 0,5) již senzitivitu testu dále nezvyšší [128].

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 leukemií a pacienti po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně (incidence IA je zde 10 %, resp. 20 %). U ostatních skupin pacientů, u nichž 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 [129].

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 využili testu k prospektivnímu sledování nemocných s vysokým rizikem invazivní aspergilózy a prokázali, že jak při použití cut-off indexu positivity 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 %) [114,126].

Konečně nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím PPV testu je možnost falešných pozitivit. I přes používání konsekutivní positivity je až 20 % pozitivních výsledků falešně pozitivních [129]. Izolované falešné positivity mohou být způsobeny kontaminací vzorku při odběru nebo při zpracování vzorku při odběru nebo při zpracování vzorku. Tyto izolované falešné positivity 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 měly být provedeny co možná nejdříve (do 24 až 48 hod), aby nedošlo k prodloužení v časném stanovení diagnózy invazivní aspergilózy.

Klinicky závažnějším problémem jsou však falešné positivity testu přetrvávající i v opakovaných odběrech, které pak imitují obraz nalézáný při skutečné 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 pro jeho správnou interpretaci, 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 [6,111,121,129,130].

Intravenózní podání

penicilinových antibiotik

Aplikace penicilinových antibiotik – piperacilinu, piperacilinu/tazobaktamu, některých amoxicilin/klavulanátů a ampicilinu – je jedním z nejčastějších příčin falešné positivity při detekci GM [131–134]. Důvodem je pravděpodobně kontaminace antibiotik GM při jejich semisyntetické výrobě. Tento proces využívá kmenů penicilíí a GM z jejich buněčných stěn se pak pravděpodobně dostává do finálního výrobku [121]. Množství kontaminujícího GM kolísá jednak mezi jednotlivými antibiotiky, ale také mezi jednotlivými šaržemi jednoho výrobku, a proto intenzita falešné positivity (tj. IP séra nemocných) při podávání těchto preparátů kolísá [135]. 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 [136]. Navíc po ukončení podávání antibiotika falešná pozitivita testu vzhledem k pomalejší eliminaci kontaminujícího GM přetrvává ještě téměř 6 dnů [137].

Eliminace falešných pozitivit při podávání výše zmíněných preparátů je složitá. Ideální je vyloučení používání těchto antibiotik u nemocných, u kterých probíhá monitoring GM. To je možné u ampicilinu a amoxicilinu/klavulanátu, ale velmi obtížné u piperacilinu/tazobaktamu. 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 nejnížší [138]. Nicméně vzhledem ke zmíněné kumulaci kontaminujícího GM lze tohoto mechanismu využít pouze v prvních 2 dnech podávání léku, neboť následně je i ustálená koncentrace kontaminujícího GM vysoká [136]. Podle našich zkušeností lze minimalizovat falešné positivity při podávání piperacilinu/tazobaktamu testováním jednotlivých šarží a používáním pouze šarží GM negativních. K velmi podobným názorům pak dochází také Bart-Delabesse et al [134].

Přítomnost GM nebyla potvrzena v celé řadě dalších antibiotik (cefalosporiny, chinolony, vankomycin, aminoglykosidy, karbapenemy) a podávání těchto léků nemocným nevedlo k rozvoji falešných pozitivit Platelia Aspergillus testu [136,138].

Aplikace roztoku Plasma-Lyte

Hage et al publikovali falešnou pozitivitu při detekci GM z tekutiny získané bronchoalveolární laváží (BAL) při současném použití infuzního roztoku Plasma-Lyte (Baxter) jako lavážní tekutiny [139]. Vysoký index positivity byl zjištěn také při testování jednotlivých šarží roztoku. Příčinou falešné positivity 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 positivity Platelia Aspergillus testu (nepublikovaná data). Řešením této příčiny falešných pozitivit testu je pak používání jiných infuzních roztoků pro hydrataci nemocných, u kterých probíhá rutinní screening GM [140].

Průnik antigenu

z gastrointestinálního traktu

GM ze stěny aspergilů a penicilů byl prokázán v celé řadě potravin a nápojů a je běžně nalézán ve stolici [141]. 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 positivity Platelia Aspergillus testu u nemocných s mukozitidou a současně alespoň částečně zachovaným perorálním příjmem stravy [142]. 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 spp.* (zkříženě reagující s protilátkou EB-A2 použitou v Platelia Aspergillus testu) ze zažívacího traktu přes nezralou mukózu je jednou z hlavních příčin falešné positivity Platelia Aspergillus kitu u předčasně narozených dětí [143].

Infekce jinými patogeny

Vzácnou příčinou falešné positivity při detekci GM může být infekce mykotickými patogeny, které nesou zkříženě reagující epitopy s kmeny aspergilů, jako jsou infekce vyvolané *Penicillium spp.* a *Cryptococcus neoformans* [144,145]. Tyto infekce jsou však našťastí velmi raritní. Někteří autoři spekulují také o falešné pozitivě testu při infekci některými z běžných bakterií (*Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*), nicméně Swanink et al neprokázal reaktivitu kmenů s testem in-vitro a falešné positivity Platelia Aspergillus testu u ne-

mocných s bakteriemi nebyly v žádné korelaci s výsledky kultivace [109].

Ostatní příčiny falešné positivity

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 positivity testu při autoimunitních stavech a přítomnosti paraproteinu, při dialýze, při použití cyklofosfamidů a při kontaminaci vzorku vatou [146–149].

Detekce galaktomananu umožňuje časnější diagnózu IA

Pravidelný a rutinní monitoring GM umožňuje zkrátit časový interval do stanovení diagnózy invazivní aspergilózy. Ve studii Maertense et al předcházela antigenemie diagnózu IA stanovenou na základě radiologických abnormalit o 8 dní v 80 % případů a diagnózu stanovenou na základě pozitivního kultivačního vyšetření pak o 9 dní u 89 % nemocných [114]. Podobně i několik dalších prací prokázalo předcházení positivity GM přibližně o 7 dní pozitivitu zobrazovacích metod [115,150]. Navíc v prospektivní studii Maertense et al byla antigenemie primárním impulzem pro provedení HRCT plic u 84 % hematologických nemocných s febrilní neutropenií a tento „impulz“ předcházela klasické důvody k provedení HRCT [151]. Je však zřejmé, že pravděpodobnost časné positivity GM bude ovlivněna frekvencí prováděných odběrů a hodnotou zvoleného cut-off indexu positivity (IP). Při použití dnes doporučeného cut-off IP 0,5 předcházela pozitivita testu v práci Marrové et al rozvoj klinických příznaků a definitivní stanovení diagnózy o 6, resp. 10 dní. Naopak při použití cut-off IP 1,0 nebo 1,5, pozitivita testu výše zmíněné parametry nepředcházela vůbec [125].

Galaktomanan 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 prvních 2 týdnech léčby k tomuto hodnocení sloužit [56,121]. Jak bylo zmíněno výše, při studiích na zvířecích modelech byla prokázána korelace mezi fungální náloží v plicích a množstvím GM v plicním parenchymu, resp. hladinou GM v séru [110].

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 tedy 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 [113,115,150]. Vzestup GM IP o více než 1,0 po 7 dnech léčby je s více než 90% pozitivní prediktivní hodnotou spojen se selháním terapie a měla by být zvážena její změna [152]. 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 ev. i s nutností hemodialýzy (porucha clearance vysokomolekulárního GM, který není eliminován ani hemodialýzou) a v prvních několika málo dnech léčby echinokandiny (poškození a rozpad buněčné stěny obsahující GM) [153–155].

Detekce galaktomananu z ostatních materiálů

Přestože je Platelia Aspergillus test určen primárně k vyšetřování séra, lze pomocí něj detekovat GM i v jiných tělesných tekutinách ev. v tkáních [156].

Protože invazivní aspergilóza je ve většině případů inhalační infekcí a primárně jsou postiženy plíce, není překvapením, že nejčastěji vyšetřovaným materiálem jiným než sérum je tekuti-

na získaná bronchoalveolární laváž (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 %) [157]. 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, v níž většinou provádíme BAL v případě nálezů plicních infiltrátů na zobrazovacích metodách, je časový rozdíl mezi pozitivním zachytem 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 nízké rizikových nemocných je možná falešná pozitivita při kolonizaci dýchacích cest kmeny aspergilů. Nicméně podobně, jako je tomu při interpretaci pozitivního kultivačního zachytu 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 [158].

Dalším materiálem, ve kterém může být GM detekován, je mozkomíšni 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 % [159,160].

Pozitivita GM z mozkomíšního moku (samotná nebo spolu s pozitivitou GM v séru) je tak vedle klinického a ev. i radiologického nálezů jediným mikrobiologickým markerem, který může vést k diagnóze postižení CNS invazivní aspergilózou [159]. 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 positivity GM v mozkomíšním moku však v těchto případech bývají výrazně nižší [159,161].

Detekce GM z jiných tělesných tekutin ev. z tkání byla sice testována, nicméně interpretace výsledků není v současné době jednotná [161].

Detekce 1,3-β-D-glukanu 1,3-β-D-glukan: struktura, uvolňování a možnosti detekce

Dalším markerem v nekultivační diagnostice invazivních mykotických infekcí je 1,3-β-D-glukan. Obecně jsou glukany polymery složené z různě vázaných glukóz, které se dále liší dle druhu této glykozidické vazby – v buněčné stěně většiny medicínsky významných patogenních hub včetně aspergilů se nachází 1,3-β-D-glukan.

Mennink-Kersten zkoumala dynamiku jeho uvolňování na in vitro modelu s kmenem *Aspergillus 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. 1,3-β-D-glukan není součástí lidských, bakteriálních ani virových buněk, ale je vylučován do séra pacientů s invazivní mykotickou infekcí.

Pro laboratorní diagnostiku se využívá schopnosti 1,3-β-D-glukanu reagovat s lyzátem amébocytů kraba *Limulus polyphemus* nebo *Tachypleus tridentatus*. V amébocyttech je obsažen tzv.

Tab. 11. Možnosti stanovení 1,3-β-D-glukanu – komerční kity.

název	Fungitell™ (dříve Glucatell™)	Fungitec G™	Wako WB003
výrobce	Associates of Cape Cod (USA)	Seikagaku Kogyo Corp. (Japonsko)	Wako Pure Chem. Ind. (Japonsko)
cutt-off	80 pg/ml	20 pg/ml	11 pg/ml
krab	<i>L. polyphemus</i>	<i>T. tridentatus</i>	<i>T. tridentatus</i>
reakce	kolorimetrická	kolorimetrická	turbidimetrická

Tab. 12. 1,3-β-D glukan jako marker pro diagnostiku invazivních mykotických infekcí – publikované studie.

autor	set	cutt-off	počet pac.	senzitivita	specifita	PPV	NPV
Miyazaki (1995) [208]	Fungitec G	20	60	ne	ne	ne	ne
Obayashi (1995) [209]	Fungitec G	20	202*	90	100	59	97
Kawazu (2004) [210]	Wako	11	149	55	98	67	96
Odabasi (2004) [211]	Glucatell	60	283	70	96	79	93
Pazos (2005) [150]	Glucatell	120	40	88	90	70	96
Ostrosky-Zeichner (2005) [212]	Fungitell	80	333	64	92	89	73
Pickering (2005) [213]	Fungitell	80	76	93	77	52	98

* počet febrilních epizod

faktor G (serinová proteáza), který se v přítomnosti 1,3-β-D-glukanu aktivuje (reakce je specifická pro tuto glykozidickou vazbu) a krátká následná kaskáda je vizualizovaná buď odštěpením barevného produktu z přidaného chromogenního substrátu, anebo změnou turbidity média (dle použitého setu).

V současné době jsou dostupné 3 komerčně vyráběné sety založené na tomto principu – 2 japonské a 1 americký – liší se použitím amébocytů z různých krabů, cutt-off a typem reakce (tab. 11). Zkušenosti s dvěma japonskými sety jsou omezeny takřka výhradně na Japonsko – v Americe či Evropě je používán americký set Fungitell™, který byl také v roce 2004 uznán FDA jako vhodný pro diagnostiku invazivní mykózy u rizikových pacientů.

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 s alespoň 2 po sobě jdoucími pozitivními vzorky. Doporučovaná frekvence odběrů je alespoň 2krát týdně.

Při interpretaci výsledků je ovšem nutné vzít v úvahu, že na rozdíl od galaktomananu 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 testu negativní – tyto oportunní patogeny neobsahují glukan v buněčné stěně v dostatečném množství a není tedy detekovatelný.

Klinické využití – výhody a nevýhody testu

Vzhledem k již zmiňovaným problémům se správnou a hlavně časnou diagnostikou invazivních mykotických infekcí (malá senzitivita mikroskopie a kultivace, mnohdy nemožnost odebrat validní materiál pro tato vyšetření apod), je každá standardní metodika (jako je tato) přínosem.

Velkou výhodou testu je tedy jeho pozitivita v časných stádiích invaze houby a z toho plynoucí možnost včas zareagovat na infekci antimykotickou léčbou a zlepšit prognózu pacienta. Další výhodou – ale při interpretaci

výsledků současně nevýhodou – je široké spektrum patogenů, které lze detekovat pomocí 1,3-β-D-glukanu (*Candida spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* atd). Proto se jako nejvýhodnější jeví využívat tento set zejména v kombinaci s dalšími nekultivačními testy, které identifikují specifické houbové antigeny ev. protilátky proti nim (galaktomanan, mannan, glukuronoxylomanan atp). Dále lze pomocí glukanu monitorovat status infekce (uvolňuje se v logaritmické fázi růstu houby, což svědčí pro aktivní infekci) a léčebnou odpověď (úspěšná léčba vs její selhání).

Naopak nevýhodami jsou kromě vysoké ceny vyšetření a relativní laboratorní náročnosti (Fungitell™ vyžaduje reader, umožňující číst vyhřívanou kinetickou reakci) hlavně falešné positivity a negativity.

Falešné positivity

Nejčastěji jsou falešné positivity způsobeny léčbou antibiotiky – amoxicilin/klavulanát, ev. imipenem, gentamycin, dále pak dialýzou s celulóзовou membránou, kontaminací gázou,

Tab. 13. Přehled amplifikačních metod.

typ amplifikace	detekovaná NK	typ reakce	způsob identifikace
PCR	DNA	jednokolová	sekvenování
		uhnížděná (nested)	hybridizace se sondou (Southern blot, PCR-EIA, INNO-LiPA)
		kvantitativní v reálném čase	restrikce endonukleázami délkový polymorfismus konformační polymorfismus
NASBA	RNA		

bakteriální sepsi. V neposlední řadě je tu laboratorní kontaminace – souprava je schopná detekovat pikogramová množství ubikvitního glukanu, a je tedy náročná na kvalitu laboratorních pomůcek a přesnost práce.

Falešné negativitu

Jak prokazuje Pickering et al, vysoké koncentrace bilirubinu a triglyceridu mohou inhibovat reakci. Rovněž malé množství materiálu vstupujícího do reakce (5 µl) může při nepřesné laboratorní práci způsobit falešnou negativitu.

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

V současné době nejsou dostatečné zkušenosti s využitím glukanu jako jednoznačného markeru invazivní mykotické infekce v běžné klinické praxi.

Publikované studie uvádějí senzitivitu testu v rozmezí 55–93 %, specifitu mezi 77–100 % (tab. 12), dlužno ovšem podotknout, že tyto výsledky nejsou mezi sebou objektivně srovnatelné – testovaní pacienti jsou v různém riziku invazivní mykózy, rovněž se liší kritéria pro pozitivitu, použité sety, počet vzorků na pacienta apod.

V každém případě by mělo mít stanovení 1,3-β-D-glukanu své místo v panelu pro diagnostiku mykóz – ať už při verifikaci infekcí vzácnými mykotickými agens nebo třeba jako konfirmace falešných pozitivit, zejména galaktomananu [105].

Molekulárně genetické metody Význam a současné postavení v diagnostice

Genetické metody jsou v diagnostice invazivní aspergilózy zaměřené na detekci aspergilových nukleových kyselin v klinických vzorcích. Od počátku 90. let 20. století až dodnes prodělávají intenzivní vývoj, proto nejsou dosud k dispozici obecně akceptované a standardizované postupy. Podstata metod také nemusí být klinickým lékařům dostatečně známa, jejich přínos může být podceňován, nebo naopak spojován s nereálným očekáváním. Je nepochybné, že mohou přispět ke zkvalitnění diagnostiky, z pohledu klinických lékařů zejména k rychlejšímu objasnění etiologie infekce, zahájení i monitorování cílené antimykotické léčby. Vždy však bude nutné, aby úzkou spoluprací klinických a laboratorních pracovníků byly získané výsledky správně interpretovány.

V současné genetické diagnostice existuje řada různých metodických přístupů. Jejich průběh a výsledek může být ovlivněn prakticky na každé úrovni, od způsobu odběru a volby typu vzorku až po finální interpretaci a komplikuje tak vzájemné porovnávání.

Vyšetřovaný materiál

Nejčastěji vyšetřovaným klinickým materiálem je krev, kterou lze použít plnou nebo jen sérum. Zatím mezi nimi nebyl zjištěn zásadní rozdíl, optimální frakce pro průkaz aspergilové DNA tak zůstává nejasná [85]. Bylo však

dokumentováno, že se stoupajícím objemem odebrané krve se zvyšuje i pravděpodobnost zachytu DNA [162]. K výhodám vyšetření séra patří možnost současné detekce antigenů, určitým úskalím je průkaz jen volně cirkulující DNA, neboť hyfy, stejně jako fagocytované houbové elementy živé či usmrcené, jsou odstraněny spolu s krevní sraženinou. Nevýhodou izolace z plné krve je časová a technická náročnost, dále riziko enzymatické degradace DNA. Životaschopné elementy by navíc měly být prokazatelné hemokultivací, i když aspergily jsou z krve izolovány jen zřídka, pravděpodobně v důsledku rychlé fagocytózy a usmrcování mikrofágy [163]. Při odběru plné krve je nutné vyloučit inhibiční vliv heparinu a citrátu na průběh amplifikace, EDTA tento účinek nemá [164]. Podobně inhibičně působí řada dalších léků a infuzních roztoků [85]. Pravděpodobnost farmaky podmíněných negativních výsledků lze snížit zařazením interní kontroly amplifikace, např. přidáním 10 pg myší DNA ke zkoumanému vzorku [165].

Buchheidt a Hummel uvádějí, že průkaz DNA z BAL je citlivější než z krve, především pro primární lokalizaci invazivní aspergilózy v plicní tkáni. Vzhledem k častému omezení infekce na určitou oblast plicního parenchymu je však zachyt značně závislý na kvalitě provedeného endoskopického vyšetření [166]. Limitujícím faktorem je i vyšší riziko falešně pozitivních výsledků v důsledku inhalace aspergilových spór z ovzduší. Bart-Delabesse et al ve své studii uvádějí, že až 25 % vzorků BAL od zdravých dobrovolníků bylo z uvedeného důvodu falešně pozitivních [167]. Dalším problémem je obtížnost provedení u kriticky nemocných, zejména z hlediska verifikace výsledků opakováním odběrů.

Aspergily i další vláknité houby lze detekovat a identifikovat i v bioptických vzorcích, jsou však u kriticky nemocných pacientů často nedostupné. Klasická kultivace zde bývá obvykle

neúspěšná, proto je použití molekulárně genetických technik v tomto případě zvlášť výhodné.

Izolace DNA

Lýza buněčné stěny hub se provádí různými způsoby, nejčastěji mechanicky skleněnými perličkami nebo enzymaticky rekombinantní lytázou [168, 169]. Pro získání čisté DNA se využívá kromě klasické, ale pracné, fenol-chloroformové extrakce, i řada komerčních souprav, např. QIAmp Tissue Kit (Qiagen), DNA Lego Kit (TopBio) nebo FastDNA Kit (Qbiogene). Při porovnání různých způsobů však byly zjištěny rozdíly v množství a kvalitě DNA, které mohou ovlivňovat výsledky detekce [170]. Stejně důležitá je skutečnost, že v průběhu každé extrakce dochází ke ztrátám DNA [171]. Účinnost může být zvýšena používáním souprav pro automatizované izolace vysoce čisté DNA, snižujících i riziko kontaminace. V porovnání s manuálními postupy vyžadují nákladnější zařízení, např. MagNA Pure LC (Roche Diagnostics) [172].

Amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí

Pro detekci houbového agens je využívána především amplifikace DNA formou různých modifikací polymerázové řetězové reakce (PCR). V principu jde o cyklické množení úseku dvojvláknové DNA, vymezeného většinou dvojicí oligonukleotidů (primerů), pomocí tepelně odolného enzymu DNA-polymerázy. Výhodou je jednoduchost provedení, neboť je automatizováno v termocykleru, dále rychlost získání výsledku. PCR je vysoce citlivá, vyžaduje jen nepatrné množství vstupní DNA, proto je i náchylná ke kontaminaci [173].

Volba cílových sekvencí

Cílové sekvence DNA pro přímou detekci aspergilů bývají nejčastěji univerzální (panfungální), kdy jsou nejprve amplifikovány úseky společné širokému spektru původců systémových mykóz,

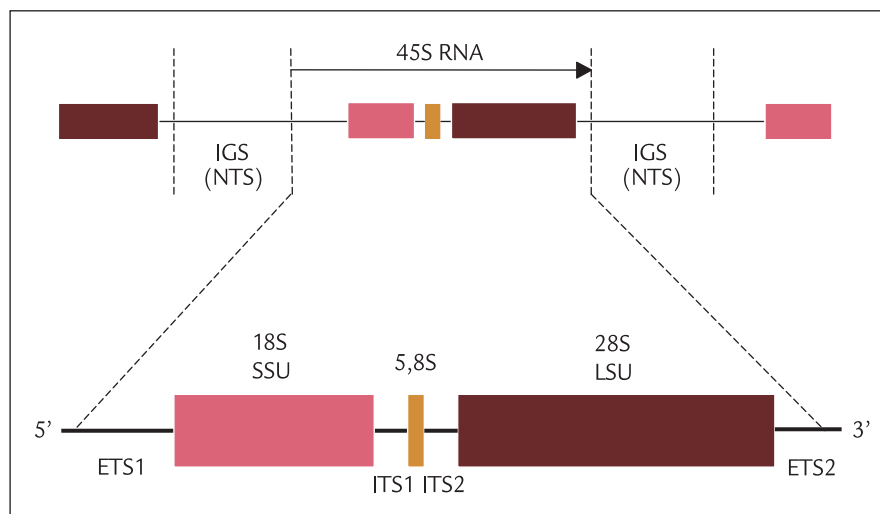


Schéma 1. Schéma rRNA genu.

SSU – malá podjednotka; LSU – velká podjednotka; IGS – mezigenový NTS – non-transcribed spacer; ETS – external transcribed spacer; ITS – internal transcribed spacer.

v dalším kroku je pak agens přesně určeno [174–176]. Alternativně lze již zpočátku použít specifické primery zaměřené na 3–4 nejčastější druhy, včetně dominujícího *Aspergillus fumigatus* [162,177,178]. První přístup je vhodný při nejasné etiologii infekce s nutností rychlého potvrzení nebo vyloučení houbového agens, např. u neutropenických pacientů po transplantaci kostní dřeně, druhý se uplatňuje při verifikaci invazivní aspergilózy. Cílovými oblastmi DNA jsou obvykle vysoce konzervované úseky přítomné v genomu ve velkém počtu kopií. Většinou se jedná o sekvence odvozené z 18S podjednotky genu pro rRNA, dále z mitochondriálních genů kódujících některé z tRNA genů a cytochrom B nebo z ITS oblastí rRNA [179–183] (schéma 1).

Uhnížděná PCR a kvantitativní PCR v reálném čase

Snížení hodnoty cut-off indexu pozitivity na $> 0,5$ při stanovení galaktomananu ELISA se odrazilo ve výrazném zlepšení senzitivity zmíněného testu při porovnávání s klasickou jednobou PCR [171]. Proto jsou v praxi stále více využívány její citlivější modifikace. Jednou z nich je uhnížděná (nested) PCR, jejímž principem je použití dvou amplifikačních kol. V prv-

ním je amplifikován vybraný úsek DNA, poté je vzniklý produkt podroben druhé PCR s novými primery vymezujícími kratší úsek uvnitř prvního [184].

Další perspektivní a v poslední době široce používanou modifikací je kvantitativní PCR v reálném čase (real time qPCR) [171,185]. Od tradiční se liší tím, že na vlákno DNA nasedá kromě primerů také sonda značená fluorochromem. K nárůstu intenzity fluorescence pak dochází v závislosti na počtu vzniklých amplikonů, což je monitorovatelné přímo v průběhu reakce, tedy v reálném čase. Výsledkem je křivka, z níž lze odvodit původní množství DNA ve vzorku. Z klinického hlediska je kvantifikace výhodná pro porovnávání množství DNA v postupně odebíraných vzorcích, tedy pro sledování vývoje infekce, případně i účinnosti léčby, navíc výsledek může být k dispozici již během několika hodin po odběru. Kvantitativní PCR spolu s detekcí galaktomananu tak zásadním způsobem rozšiřují možnosti monitorování rizikových pacientů [157,186]. Po technologické stránce jsou nejznámější dvě varianty real time qPCR, TaqMan a Light Cycler™. Jejich hlavní výhodou, proti nested PCR, je průběh v uzavřeném systému, který minimalizuje riziko vnější kontaminace. Detekční limit obou modifikací bývá

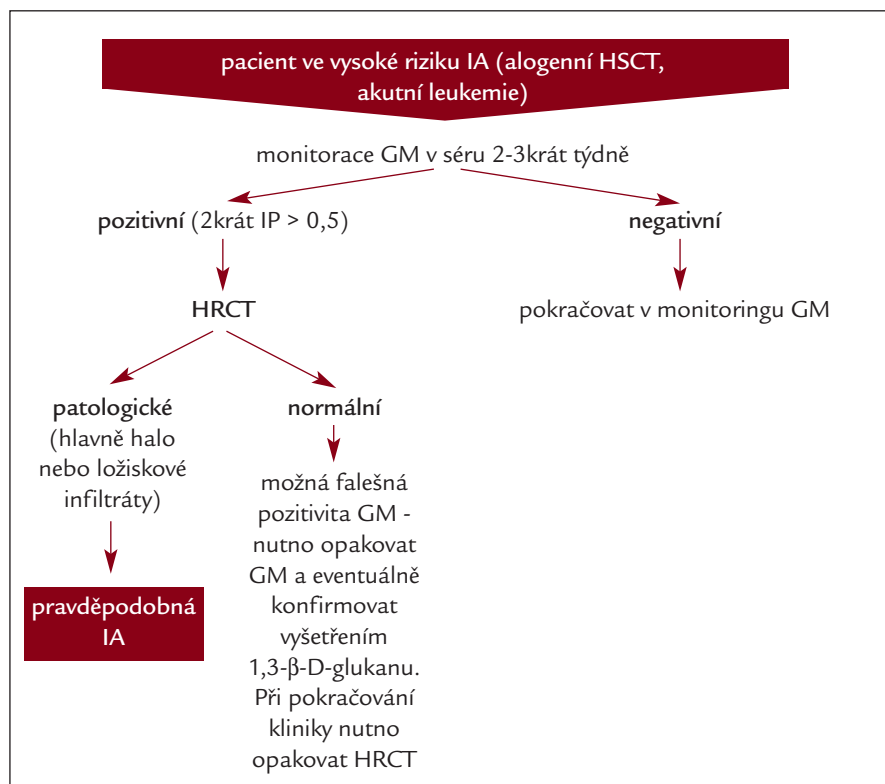


Schéma 2. Postup vyšetření u nemocných ve velmi vysokém riziku plicní IA.

Tab. 14. Definice invazivní aspergilózy – podle [46].

Prokázaná invazivní aspergilóza

histo/cytopatologický průkaz vláken (hyf) získané aspirací tenkou jehlou nebo z bioptického vzorku tkáně s průkazným vztahem (mikroskopicky nebo nesporně zobrazovací technikou) k poškozené tkáni *nebo*

pozitivní kultivace ze vzorku získaného sterilním odběrem z normálně sterilního místa (s výjimkou vzorků moči a sliznic), které klinicky nebo radiologicky odpovídá místu infekce.

Pravděpodobná invazivní aspergilóza

přítomnost alespoň jednoho z rizikových faktorů hostitele *a*
jednoho mikrobiologického kritéria *a*
jednoho velkého (nebo dvou malých) klinických kritérií s klinickými projevy místa (orgánu) odpovídajícími infekci

Možná invazivní aspergilóza

přítomnost alespoň jednoho z rizikových faktorů hostitele *a buď*
jeden mikrobiologický faktor *nebo*
jeden velký klinický faktor (nebo dva malé) odpovídající infekci

uváděn 10–100 fg/ml⁻¹ (10 fg houbové DNA odpovídá 1 kopii genomu nebo 1 cfu) [185].

Identifikace aspergilů v klinických vzorcích
Postamplifikační detekční techniky umožňují identifikaci agens na úrovni rodu až druhu, dále mohou zvyšovat

citlivost a specifitu PCR. Nejčastější je hybridizace produktu se značenou sondou po přebílení na membránu podle Southerna nebo postup založený na principu enzymoimunoanalýzy (PCR-ELISA), s výhodou lze využít i rozdílné teploty tání amplikonů, případně reverzní hybridizace pomocí

technologie INNO-LiPA nebo DNA čipů [180,187–190]. Nejvyšší potenciál pro komerční využití má PCR-ELISA, zejména pro průběh v jamkách mikrotitračních destičky. Vysoká citlivost a specifita byla dokumentována ve studii zaměřené na diagnostiku invazivní aspergilózy u pacientů s hematologickými malignitami a v této studii významně přispěla ke zvýšenému počtu časné diagnostikovaných případů. U většiny z nich pozitivita testu předcházela nebo byla zachycena současně s průkazem biotickým nebo počítačovou tomografií či galaktomananu [191]. Z ostatních je z hlediska validity výsledku nejlepší volbou přímé sekvencování, dále se využívá analýza délky amplifikovaných produktů (AFLP) nebo jejich restrikce endonukleázami (RFLP), možné je i hodnocení konformačního polymorfismu jednovláknové DNA (SSCP) [192–195].

Specifita a senzitivita

Četné studie uvádějí vysokou citlivost (> 92 %) a negativní prediktivní hodnotu (> 99 %) PCR, většinou dokumentují i dobrou specifitu. Případná nižší pozitivní prediktivní hodnota je ovlivněna malým počtem případů prokázané nebo pravděpodobné invazivní aspergilózy a může být proto způsobena i jediným falešně pozitivním výsledkem. K verifikaci skutečného stavu tak bude třeba vyhodnotit ještě řadu rozsáhlých studií [171]. Objektivní interpretace laboratorních výsledků dále vyžaduje dostupnost veškerých klinických informací. Již pouhá přítomnost antimykotik v krvi snižuje záchytnost DNA PCR, což spolu se ztrátami při extrakci může vést k falešně negativním výsledkům [196]. Obecně se udává, že k potvrzení positivity je třeba prokázat aspergilovou DNA nejméně ve 2 po sobě odebraných vzorcích. V klinických podmínkách však ztrátu positivity umožňují různé faktory, proto by za signifikantní měla být považována také intermitentní detekce DNA získaná během 2týdenního monitoringu [197]. Vzhledem k nedo-

statečným znalostem o kinetice fungemie mohou být tyto sporné výsledky důsledkem počátečního stadia infekce, jejího subklinického průběhu, dále antimykotické profylaxe nebo terapie, ale rovněž kontaminace, v případě BAL i kolonizace dýchacích cest. Uvedené skutečnosti akcentují nutnost hodnocení výsledků PCR v kontextu radiologických, sérologických a klinických informací [171].

Amplifikace NASBA

Na principu cyklického množení produktu je založena také další specifická a vysoce citlivá metoda, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), kterou lze amplifikovat RNA. Její předností proti PCR je, že využívá kopie genů již namnožené samotnými buňkami při transkripci a postup množení je tak výrazně rychlejší. Další výhodou je její izotermický charakter, není tedy potřebný termocykler. Detekuje však RNA hlavně v živých buňkách, neboť extracelulárně je rychle degradována. K minimalizaci uvedeného jevu je třeba ochranný pufr RNA a/nebo inhibitor RNAázy [171]. Další limitací je vysoká cena reakční směsi enzymů. Metoda se běžně používá ve virologii, recentně byl tímto způsobem monitorován i průběh invazivní aspergilózy u hematologických pacientů [198].

Standardní metodika

a perspektivy genetické diagnostiky

Význam genetických metod byl prokázán v řadě nezávislých studií. Problémem zůstává malý počet údajů o mezilaboratorní reprodukovatelnosti výsledků, jehož odstranění by mělo vést k vývoji všeobecně uznávané standardní metodiky. V roce 2006 byl publikován konsenzus Britské společnosti lékařské mykologie pro diagnostiku aspergilózy a kandidózy pomocí PCR [199]. Na jeho základě byla vytvořena pracovní skupina směřující k vytvoření standardu pro diagnostiku aspergilózy PCR akceptovaného celosvětově. Ochotu podílet se na vývoji

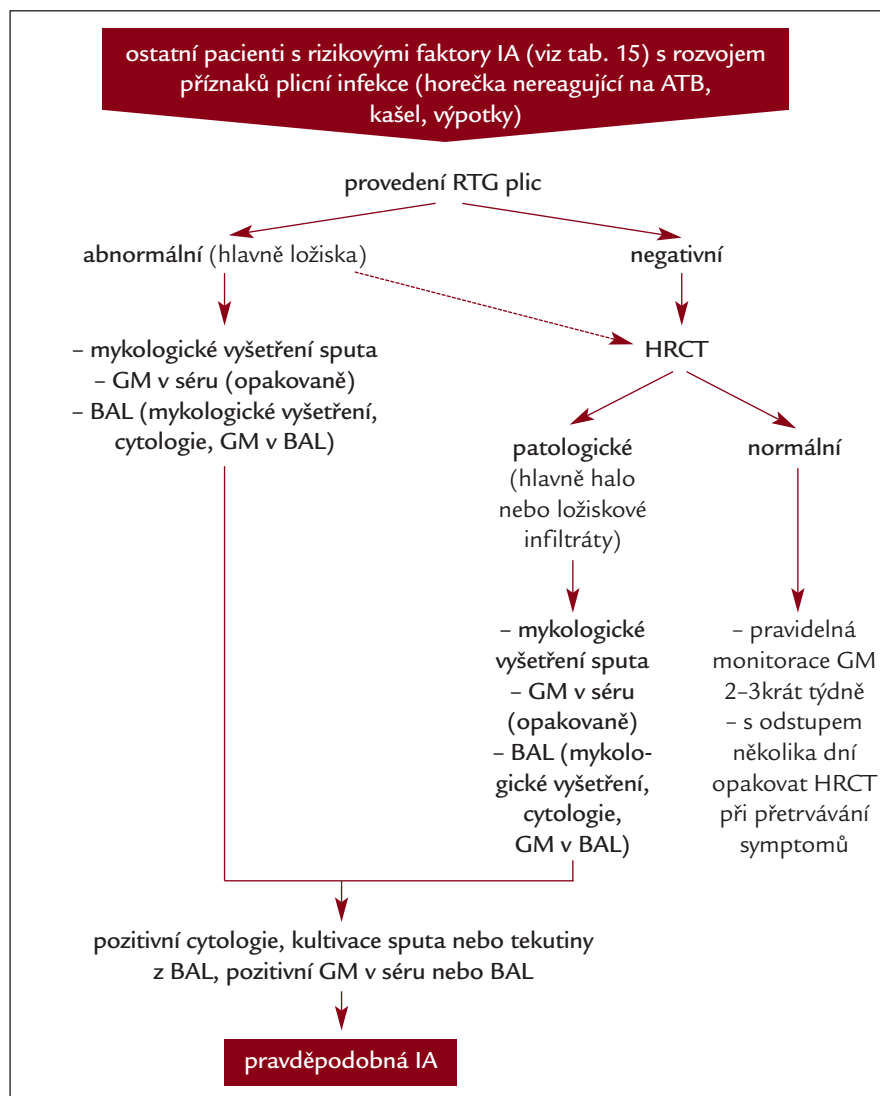


Schéma 3. Postup vyšetření u ostatních pacientů s rizikovými faktory pro rozvoj plicní IA.

vyjádřila řada center převážně z Evropy, ale i Austrálie, Japonska, Kanady a dalších zemí, záštitu převzala Mezinárodní společnost pro lékařskou a veterinární mykologii – ISHAM (<http://www.isham.org>). Cílem projektu je rychlé zařazení standardní metodiky PCR mezi EORTC/MSG kritéria pro diagnostiku invazivních mykóz [46]. K dispozici je již také první komerční souprava pro průkaz aspergilové DNA pomocí PCR [200]. Genetická diagnostika aspergilózy by se tak zanedlouho mohla stát součástí běžné praxe i v českých laboratořích, zejména velkých nemocnic s hematologickými pacienty. Záchyt aspergilové DNA přitom vhodně doplňuje

sérologickou detekci jejich antigenů. Současné využívání real time qPCR a průkazu galaktomananu, s důsledným dodržováním frekvence odběrů, umožňuje kvalitní monitorování rizikových pacientů, stejně jako rychlou diagnostiku invazivní aspergilózy. Představuje však i možnost významné prognostické informace, neboť klesající index galaktomananu a/nebo konverze PCR z positivity do negativity obvykle potvrzují účinnost antifungální léčby [85].

Závěr

Diagnostika invazivní aspergilózy znamenala v posledních letech obrovský pokrok. Jednoznačně je vidět

Tab. 15. Faktory používané v kritériích pro diagnózu invazivní aspergilózy – upraveno podle [46].

rizikové faktory hostitele/pacienta

- leukocyty $< 0,5 \times 10^9/l$ ≥ 10 dní
- perzistující horečka > 96 hod refrakterní na adekvátní ATB léčbu
- tělesná teplota $> 38^\circ\text{C}$ nebo $< 36^\circ\text{C}$ + jeden další faktor:
 - neutropenie ≥ 10 dní v předchozích dnech
 - vysoké dávky imunosupresiv v předchozích 30 dnech
 - invazivní mykóza při předchozí imunosupresivní léčbě
 - AIDS
- známky a projevy suspektní z GvHD ≥ 2 . stupně
- dlouhodobá (> 3 týdny) kortikoterapie v předchozích 60 dnech

mikrobiologické faktory

- pozitivní kultivace nebo mikroskopický průkaz *Aspergillus spp.* ze sputa nebo BAL
- pozitivní kultivace nebo mikroskopický průkaz *Aspergillus spp.* z aspirátu ze sinusů
- pozitivní antigen – galaktomanan – v BAL, likvoru, krvi (v krvi minimálně ze dvou konsektivních odběrů)

klinické faktory

- musí být relevantní místu odběru infekčního agens a času projevů

postižení plic

velké kritérium	nález na HRCT – nové infiltráty typu: halo sign, air-crescent sign, kavítace v místě konsolidace plicní tkáně
malé kritérium	příznaky postižení dolních dýchacích cest (kašel, bolest na hrudi, hemoptýza, dušnost) fyzikální nález pleurálního šelestu atypické plicní infiltráty nesplňující „velká“ kritéria pleurální výpotek

postižení paranazálních dutin

velké kritérium	RTG známky invaze do dutin (eroze stěn sinusů nebo expanze infekce do okolních struktur, destrukce báze lebni)
malé kritérium	příznaky infekce horních dýchacích cest (sekrece z nosu, nebo ucpaný nos) ulcerace nosu nebo krusty na sliznici, epistaxe, periorbitální otok, bolest maxilární oblasti, černé nekrotické léze nebo perforace patra

postižení CNS

velké kritérium	RTG průkaz infekce CNS (mastoiditida, parameningeální ložiska, extradurální empyém, ložiska v mozku nebo v míše)
malé kritérium	fokální neurologický nález (křeče, hemiparéza, paréza kraniálních nervů), mentální změny, iritace mening, abnormální biochemický i cytologický nález v likvoru (při negativní kultivaci jiných patogenů či nálezu maligních buněk)

diseminovaná infekce

příznaky postižení více orgánů/tkání

trend nečekat na definitivní potvrzení diagnózy, ale vysoce rizikové pacienty monitorovat a při prvních příznacích infekce včasné zahájit antimykotickou léčbu.

Hlavním „tahounem“ těchto velkých změn jsou nekultivační diagnostické metody – především pak detekce galaktomananu většinou v kombinaci s HRCT.

Jejich optimální začlenění do screeningu nemocných ve vysokém riziku IA, respektive do diagnostického postupu při podezření na plicní patologii u pacientů s rizikovými faktory pro IA, je zobrazeno na schématech 2 a 3.

I přes tento nesporný pokrok v diagnostických postupech je ještě nutno do diagnostického panelu vložit další nekultivační metody – PCR a 1,3- β -D-glukan (s využitím 1,3- β -D-glukanu nejsou zatím rozsáhlejší zkušenosti a molekulárně biologické metody nejsou standardizovány) a rovněž vytvořit optimální návod na jejich kombinaci a postavení i ve vztahu k HRCT.

„Konvenční“ diagnostické metody (histologie, cytologie, kultivace) však i dnes, nezávisle na výše zmíněných moderních metodách, zůstávají stále „konfirmačním“ standardem v diagnostice IA.

Při použití EORTC/MSG kritérií pro stanovení jistoty diagnózy IA (tab. 14 a tab. 15) [46] zjistíme, že v současné době je absolutní většina nemocných léčena pro tzv. pravděpodobnou IA. Časně zahájení léčby při splnění kritérií pravděpodobné IA (bez čekání na definitivní potvrzení diagnózy) umožní výrazně zlepšit prognózu nemocných s touto velmi závažnou infekcí [201].

Poděkování

Práce vznikla z iniciativy a za velké podpory **CELL** – The **CzEch** Leukemia Study Group for Life. Dále byla práce podpořena IGA NR 8452-3/2005 a VZ MŠMT č. MSM 6198959223.

Zkratky			
SFC	flucytosin (nebo 5-fluorocytosin)	GIT	gastrointestinální trakt
APLP	analýza délky amplifikovaných produktů (amplified product length polymorphism)	GM	galaktomanan
ARO	anesteziologickou resuscitační oddělení	GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus Host Disease)
ATB	antibiotika	HAP	nozokomiální pneumonie (hospital acquired pneumonia)
ATM	antimykotika	HRCT	vysoce rozlišovací CT (high resolution CT)
BAL	bronchoalveolární laváž	HSCT	transplantace krvetvorných buněk (hematopoietic stem cell transplantation)
cfu	jednotky tvořící kolonie (colony forming units)	IA	invasivní aspergilóza
CLSI	institut pro vytváření standardů v klinických laboratořích (Clinical Laboratory Standard Institute, USA)	INNO-LiPA	INNO-line probe assay
CNS	centrální nervový systém	IP	index pozitivita
CT	počítačová tomografie (computed tomography)	IPA	plicní forma invazivní aspergilózy (invasive pulmonary aspergillosis)
DDC	dolní dýchací cesty	ISHAM	Mezinárodní společnost pro lékařskou a veterinární mykologii (International Society for Human and Animal Mycology)
DNA	deoxyribonukleová kyselina	kDa	kilodalton
EDTA	etylendiamin tetraoctová kyselina (ethylenediamine tetraacetic acid)	LAF	laminární proudění vzduchu (laminary air flow)
EIA	enzymoimunoanalýza (enzyme immunoassay)	HEPA	vysoce účinná filtrace vzduchu (high efficiency particulate arresting)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	MIC	minimální inhibiční koncentrace
fg	femtogramy	MSCT	multidetektorové CT (multislice CT)
FIC	interakční koeficient pro kombinaci antimikrobních látek (fractional inhibitory concentration)	NASBA	metoda amplifikace RNA pomocí 3 enzymů (nucleic acid sequence-based amplification)
FICI	FIC index	NCCLS	národní komise pro vytváření standardů v klinických laboratořích, USA (Natio-
G	jednotka průměru katétrů		
G-CSF	granulocytární kolonie stimulující faktor – granulocytární růstový faktor (granulocyte-colony stimulating factor)		
			nal Committee on Clinical Laboratory Standards, USA)
			NK nukleová kyselina
			NPV negativní prediktivní hodnota (negative predictive value)
			PAS periodic acid Schiff
			PCR polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
			PPV pozitivní prediktivní hodnota (positive predictive value)
			PTLD potransplantační lymfoproliferativní choroba (posttransplant lymphoproliferative disease)
			qPCR kvantitativní polymerázová řetězová reakce
			R rezistentní (resistant)
			RFLP délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
			RNA ribonukleová kyselina
			RNAáza enzym hydrolyzující fosfodiesterové vazby RNA
			S citlivý (susceptible)
			SDD citlivý v závislosti na dávce (susceptible dose dependent)
			SSCP hodnocení konformačního polymorfismu jednovláknové DNA (single-stranded conformational polymorphism)
			TKB transplantace krvetvorných buněk
			USA Spojené státy americké
			VAP s umělou plicní ventilací asociované pneumonie (ventilator-associated pneumonia)
			VATS diagnostická biopsie cestou videoasistované toraskopie

Práce vznikla jako výsledek jednání odborníků na setkání pořádaného **CELL – The Czech Leukemia Study Group for Life** dne 11. 1. 2007 v Brně.

Seznam účastníků jednání (abecedně):

Martin Brejcha (Nový Jičín), Melanie Cermanová (Hradec Králové), Petr Cetkovský (Praha), Daniel Codl (Praha), Radim Dobiáš (Ostrava), Jana Doležalová (Liberec), Luboš Drgoňa (Bratislava, Slovenská republika), Jan Haber (Praha), Petr Hamal (Olomouc), Jana Hanzlíčková (Plzeň), Kristýna Hrnčířová (Brno), Petr Hubáček (Praha), Božena Jandová (Brno), Helena Janoušková (Plzeň), Iva Kocmanová (Brno), Michal Kouba (Praha), Dagmar Koukalová (Olomouc), Vladimír Krácík (Liberec), Táňa Lázníčková (Praha), Naďa Mallátová (České Budějovice), Dagmar Matušková (Ružomberok, Slovenská republika), Jiří Mayer (Brno), Karel Mencl (Pardubice), Jakub Mrázek (Ostrava), Peter Múdry (Brno), Adam Paulík (Hradec Králové), Dagmar Pospíšilová (Olomouc), Vladislav Raclavský (Olomouc), Zdeněk Ráčil (Brno), Filip Růžička (Brno), Pavel Sauer (Olomouc), Gabriela Smělá (Praha), Jan Trupl (Bratislava), Barbora Voxová (Hradec Králové), Barbora Wagnerová (Brno), Pavel Žák (Hradec Králové)

Literatura

1. von Eiff M, Roos N, Schulten R et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995; 62: 341–347.
2. Raper K, Fennell D. The genus *Aspergillus*. 1. ed. Baltimore USA: Williams & Wilkins 1965.
3. Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Medical Mycology* 2006; 44: 127–131.
4. Samson RA, Hong SB, Frisvad JC. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 2006; 44: 133–148.
5. Larone DH. Medically important fungi: a guide to identification. 3th ed. Washington DC: ASM Press 1995.
6. 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.
7. Marr KA, Seidel K, Slavin MA et al. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood* 2000; 96: 2055–2061.
8. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 641–647.
9. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M et al. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 *Aspergillus* Study Group. *Medicine* (Baltimore) 2000; 79: 250–260.
10. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Medical Mycology* 2005; 43: 49–58.
11. Steinbach WJ, Benjamin DK Jr, Kontoyannis DP et al. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 192–198.
12. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 2006; 63: 246–254.
13. Anaissie EJ, Penzak SR, Dignani MC. The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1483–1492.
14. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC et al. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 2542–2546.
15. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 659–713; 715; 717–627; 729–733.
16. Mantadakis E, Samonis G. Novel preventative strategies against invasive aspergillosis. *Medical Mycology* 2006; 44: 327–332.
17. Hajjeh RA, Warnock DW. Counterpoint: invasive aspergillosis and the environment-rethinking our approach to prevention. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1549–1552.
18. Bodey G, Buelmann B, Duguid W et al. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 99–109.
19. 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.
20. 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.
21. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1524–1528.
22. 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.
23. 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.
24. 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 2006: Abstract M-990.
25. Nath DS, Kandaswamy R, Gruessner R et al. Fungal infections in transplant recipients receiving alemtuzumab. *Transplant Proc* 2005; 37: 934–936.
26. Wingard JR, Leather H. A new era of antifungal therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 73–90.
27. Wiederhold NP, Lewis RE, Kontoyannis DP. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 1592–1610.
28. Zaoutis TE, Heydon K, Chu JH et al. Epidemiology, outcomes, and costs of invasive aspergillosis in immunocompromised children in the United States, 2000. *Pediatrics* 2006; 117: e711–e716.
29. Jantunen E, Ruutu P, Niskanen L et al. Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 801–808.
30. Alangaden GJ, Wahiduzzaman M, Chandrasekar PH. Aspergillosis: The most common community-acquired pneumonia with gram-negative Bacilli as copathogens in stem cell transplant recipients with graft-versus-host disease. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 659–664.
31. 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.
32. Thursky K, Byrnes G, Grigg A et al. Risk factors for post-engraftment invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 115–121.
33. Kojima R, Kami M, Nannya Y et al. Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 645–652.
34. Junghanss C, Marr KA, Carter RA et al. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 512–520.
35. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2003; 102: 827–833.
36. Lortholary O, Ascioglu S, Moreau P et al. Invasive aspergillosis as an opportunistic infection in nonallografted patients with multiple myeloma: a European

- Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the Intergruope Francais du Myelome. Clin Infect Dis 2000; 30: 41–46.
37. Wald A, Leisenring W, van Burik JA et al. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. J Infect Dis 1997; 175: 1459–1466.
38. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis 2001; 32: 358–366.
39. Denning DW, Marinus A, Cohen J et al. An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. J Infect 1998; 37: 173–180.
40. 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.
41. Cordonnier C, Ribaud P, Herbrecht R et al. Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. Clin Infect Dis 2006; 42: 955–963.
42. 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.
43. Saugier-Verber P, Devergie A, Sulahian A et al. Epidemiology and diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bone marrow transplant patients: results of a 5 year retrospective study. Bone Marrow Transplant 1993; 12: 121–124.
44. 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.
45. Perea S, Patterson TF. Invasive Aspergillus infections in hematologic malignancy patients. Semin Respir Infect 2002; 17: 99–105.
46. 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.
47. Schueller G, Matzek W, Kalhs P et al. Pulmonary infections in the late period after allogeneic bone marrow transplantation: chest radiography versus computed tomography. Eur J Radiol 2005; 53: 489–494.
48. Pinto PS. The CT Halo Sign. Radiology 2004; 230: 109–110.
49. Kuhlman JE, Fishman EK, Siegelman SS. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. Radiology 1985; 157: 611–614.
50. Orr DP, Myerowitz RL, Dubois PJ. Patho-radiologic correlation of invasive pulmonary aspergillosis in the compromised host. Cancer 1978; 41: 2028–2039.
51. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. J Clin Oncol 2001; 19: 253–259.
52. Abramson S. The air crescent sign. Radiology 2001; 218: 230–232.
53. Franquet T, Muller NL, Gimenez A et al. Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. Radiographics 2001; 21: 825–837.
54. Horger M, Einsele H, Schumacher U et al. Invasive pulmonary aspergillosis: frequency and meaning of the „hypodense sign“ on unenhanced CT. Br J Radiol 2005; 78: 697–703.
55. Horger M, Hebart H, Einsele H et al. Initial CT manifestations of invasive pulmonary aspergillosis in 45 non-HIV immunocompromised patients: association with patient outcome? Eur J Radiol 2005; 55: 437–444.
56. 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: 404–413.
57. Brown MJ, Worthy SA, Flint JD et al. Invasive aspergillosis in the immunocompromised host: utility of computed tomography and bronchoalveolar lavage. Clin Radiol 1998; 53: 255–257.
58. Kim Y, Lee KS, Jung KJ et al. Halo sign on high resolution CT: findings in spectrum of pulmonary diseases with pathologic correlation. J Comput Assist Tomogr 1999; 23: 622–626.
59. Bandoh S, Fujita J, Fukunaga Y et al. Cavitary lung cancer with an aspergilloma-like shadow. Lung Cancer 1999; 26: 195–198.
60. Sonnet S, Buitrago-Tellez CH, Tamm M et al. Direct detection of angioinvasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed patients: preliminary results with high-resolution 16-MDCT angiography. AJR Am J Roentgenol 2005; 184: 746–751.
61. Kibbler C. Defining invasive fungal infections in neutropenic or stem cell transplant patients. J Antimicrob Chemother 2005; 56(Suppl 1): i12–i16.
62. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 388–416.
63. Boersma WG, Erjavec Z, van der Werf TS et al. Bronchoscopic diagnosis of pulmonary infiltrates in granulocytopenic patients with hematologic malignancies: BAL versus PSB and PBAL. Respir Med 2007; 101: 317–325.
64. Jolis R, Castella J, Puzo C et al. Diagnostic value of protected BAL in diagnosing pulmonary infections in immunocompromised patients. Chest 1996; 109: 601–607.
65. Rano A, Agusti C, Benito N et al. Prognostic factors of non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. Chest 2002; 122: 253–261.
66. Gruson D, Hilbert G, Valentino R et al. Utility of fiberoptic bronchoscopy in neutropenic patients admitted to the intensive care unit with pulmonary infiltrates. Crit Care Med 2000; 28: 2224–2230.
67. Hofmeister CC, Czerlanis C, Forsythe S et al. Retrospective utility of bronchoscopy after hematopoietic stem cell transplant. Bone Marrow Transplant 2006; 38: 693–698.
68. Patel NR, Lee PS, Kim JH et al. The influence of diagnostic bronchoscopy on clinical outcomes comparing adult autologous and allogeneic bone marrow transplant patients. Chest 2005; 127: 1388–1396.
69. Murray PV, O'Brien ME, Padhani AR et al. Use of first line bronchoalveolar lavage in the immunosuppressed oncology patient. Bone Marrow Transplant 2001; 27: 967–971.
70. Eikenberry M, Bartakova H, Defor T et al. Natural history of pulmonary com-

plications in children after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 56–64.

71. Albelda SM, Talbot GH, Gerson SL et al. Role of fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Am J Med* 1984; 76: 1027–1034.

72. Nosari A, Anghileri M, Carrafiello G et al. Utility of percutaneous lung biopsy for diagnosing filamentous fungal infections in hematologic malignancies. *Hematologica* 2003; 88: 1405–1409.

73. Schalk E, Mohren M, Jentsch-Ullrich K et al. Zygomycoses in patients with acute leukaemia. *Ann Hematol* 2006; 85: 327–332.

74. Jantunen E, Piilonen A, Volin L et al. Radiologically guided fine needle lung biopsies in the evaluation of focal pulmonary lesions in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 353–356.

75. Shorr AF, Susla GM, O'Grady NP. Pulmonary infiltrates in the non-HIV-infected immunocompromised patient: etiologies, diagnostic strategies, and outcomes. *Chest* 2004; 125: 260–271.

76. Kim K, Lee MH, Kim J et al. Importance of open lung biopsy in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Am J Hematol* 2002; 71: 75–79.

77. Snyder CL, Ramsay NK, McGlave PB et al. Diagnostic open-lung biopsy after bone marrow transplantation. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 871–876; discussion 876–877.

78. Klossek JM, Serrano E, Peloquin L et al. Functional endoscopic sinus surgery and 109 mycetomas of paranasal sinuses. *Laryngoscope* 1997; 107: 112–117.

79. Eliashar R, Resnick IB, Goldfarb A et al. Endoscopic surgery for sinonasal invasive aspergillosis in bone marrow transplantation patients. *Laryngoscope* 2007; 117: 78–81.

80. Jantunen E, Volin L, Salonen O et al. Central nervous system aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 191–196.

81. Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol* 2003; 122: 10–23.

82. Verweij PE, Smedts F, Poot T et al. Immunoperoxidase staining for identification of *Aspergillus* species in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1996; 49: 798–801.

83. Fenelon LE, Hamilton AJ, Figueroa JI et al. Production of specific monoclonal antibodies to *Aspergillus* species and their use in immunohistochemical identification of aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1221–1223.

84. Paterson PJ, Seaton S, McLaughlin J et al. Development of molecular methods for the identification of *Aspergillus* and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections. *Mol Pathol* 2003; 56: 368–370.

85. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609–622.

86. Munoz P, Guinea J, Bouza E. Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 24–39.

87. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 230–240.

88. Zihlif M, Khanchandani G, Ahmed HP et al. Surgical lung biopsy in patients with hematological malignancy or hematopoietic stem cell transplantation and unexplained pulmonary infiltrates: improved outcome with specific diagnosis. *Am J Hematol* 2005; 78: 94–99.

89. Richardson M, Warnock D. *Fungal Infection. Diagnosis and management*. 1. edition. Oxford, London: Osney Mead 1997.

90. Otčenášek M, Hejtmánek M, Manych J. *Výšetrovací metody při mykotických onemocněních*. 1. vydání. Praha: Avicenum 1990.

91. Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transpl Infect Dis* 2003; 5: 158–166.

92. Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E et al. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1078–1083.

93. Soubani AO, Khanchandani G, Ahmed HP. Clinical significance of lower respiratory tract *Aspergillus* culture in elderly hospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 491–494.

94. Perfect JR, Cox GM, Lee JY et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1824–1833.

95. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1360–1367.

96. Espinel-Ingroff A, Rezusta A. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2101–2107.

97. Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ et al. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1126–1129.

98. Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 970–978.

99. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L et al. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 693–715.

100. Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Ruesga M et al. In vitro antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One. *Mycoses* 2006; 49: 293–297.

101. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ et al. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3623–3626.

102. 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: 2009–2015.

103. Kartsonis N, Killar J, Mixson L et al. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3616–3623.

104. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 44–69.

105. 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.

106. Lehmann PF, Reiss E. Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits. *Infect Immun* 1978; 20: 570–572.

107. Reiss E, Lehmann PF. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1979; 25: 357–365.

108. Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62: 5424–5433.

109. 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.

110. Petraitis 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: 1510–1517.

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

112. 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: 3223–3228.

113. 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.

114. 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.

115. 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 du-

ring a 4-year prospective study. *Cancer* 2001; 91: 311–318.

116. 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.

117. 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.

118. Rovira M, Jimenez M, De La Bel-lacasa 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.

119. Quindos G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: Suppl 7: 40–52.

120. 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.

121. 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): 2–17.

122. 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: 494–503.

123. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Med Mycol* 2005; 43(Suppl 1): S207–S238.

124. 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: 796–802.

125. 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.

126. Maertens J, Theunissen K, Verbeken 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.

127. 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.

128. Racil Z, Kocmanova I, Kubicova E et al. Variation of galactomannan level during 24-hour period in haematological patients with/without invasive aspergillosis (Paper 729). Abstract of the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID), Nice, France, March 2006, P 729.

129. Wheat LJ. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, part I. *Clinical Microbiology Newsletter* 2005; 27: 51–57.

130. Verdaguer V, Walsh TJ, Hope W et al. Galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 21–32.

131. 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.

132. 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.

133. 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: 5362–5363.

134. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A et al. Detection of *Aspergillus galactomannan* antigenemia to determine biological and clinical implications of β -lactam treatments. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5214–5220.

135. Machetti M, Furfaro E, Viscoli C. Galactomannan in piperacillin-tazobactam: how much and to what extent? *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3984–3985.

136. Walsh TJ, 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: 4744–4748.

137. Aubry A, Porcher R, Bottero J et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with β -lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 389–394.
138. 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: 1989–1992.
139. 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.
140. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M et al. Intravenous Plasma-Lyte as a Major Cause of False-Positive Results of Platelia *Aspergillus* Test for Galactomannan Detection in Serum. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3141–3142.
141. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 1997; 40: 353–357.
142. 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.
143. 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.
144. 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.
145. Dalle F, Charles PE, Blanc K et al. *Cryptococcus neoformans* Galactoxylo-mannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* Galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2929–2931.
146. Knight F, Mackenzie DW. *Aspergillus* antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 1992; 339: 188.
147. 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.
148. 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: 435–438.
149. Hashiguchi K, Niki Y, Soejima R Cyclophosphamide induces false-positive results in detection of *aspergillus* antigen in urine. *Chest* 1994; 105: 975–976.
150. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1 \rightarrow 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* 2005; 43: 299–305.
151. 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.
152. 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.
153. 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: e23–e25.
154. 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: e9–e14.
155. El Saleeby CM, Allison KJ, Knapp KM et al. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving Aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3560–3563.
156. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1467–1474.
157. 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.
158. 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: 448–457.
159. 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.
160. 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.
161. Wheat L. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, Part II. *Clin Microbiol News* 2005; 27: 59–63.
162. Halliday C, Wu QX, James G et al. Development of a nested qualitative real-time PCR assay to detect *Aspergillus* species DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5366–5368.
163. 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: 376–384.
164. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J et al. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1567–1568.
165. Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45: 361–368.
166. Buchheidt D, Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. *Med Mycol* 2005; 43(Suppl 1): S139–S145.
167. Bart-Delabesse E, Marmorat-Khuong A, Costa JM et al. Detection of *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of AIDS patients by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 24–25.
168. Kabir S, Rajendran N, Amemiya T et al. Quantitative measurement of fungal

- DNA extracted by three different methods using real-time polymerase chain reaction. *J Biosci Bioeng* 2003; 96: 337–343.
- 169.** Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR et al. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1187–1191.
- 170.** 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: 5122–5128.
- 171.** White PL, Barnes RA *Aspergillus* PCR – Platforms, strengths and weaknesses. *Medical Mycology* 2006; 44: 191–198.
- 172.** Loeffler J, Schmidt K, Hebart H et al. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2240–2243.
- 173.** Loeffler J, Hebart H, Bialek R et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1200–1202.
- 174.** Adam O, Merad M, Antoun S et al. Usefulness of panfungal PCR for the diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52: 544–549.
- 175.** 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: 246–254.
- 176.** Kappe R, Fauser C, Okeke CN et al. Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18S rDNA. *Mycoses* 1996; 39: 25–30.
- 177.** Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I et al. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2464–2468.
- 178.** 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: 2224–2227.
- 179.** 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: 1504–1512.
- 180.** Einsele H, Hebart H, Roller G et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1353–1360.
- 181.** Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW et al. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 319–325.
- 182.** 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: 263–269.
- 183.** 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: 1811–1818.
- 184.** Hummel M, Spiess B, Kentouche K et al. Detection of *Aspergillus* DNA in cerebrospinal fluid from patients with cerebral aspergillosis by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3989–3993.
- 185.** Ferns RB. Evaluation of the role of real-time PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 15–20.
- 186.** Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V et al. Detection of *Aspergillus* spp. in biological samples by real-time PCR. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006; 150: 245–248.
- 187.** Loeffler J, Hebart H, Sepe S et al. Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Medical Mycology* 1998; 36: 275–279.
- 188.** Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML et al. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 906–914.
- 189.** Martin C, Roberts D, van Der Weide M et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3735–3742.
- 190.** Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB et al. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4943–4953.
- 191.** Florent M, Katsahian S, Vekhoff A et al. Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis* 2006; 193: 741–747.
- 192.** Hall L, Wohlfel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 622–626.
- 193.** Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ et al. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1846–1851.
- 194.** Dendis M, Horvath R, Michalek J et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1191–1202.
- 195.** Kumar M, Shukla PK. Single-stranded conformation polymorphism of large subunit of ribosomal RNA is best suited to diagnosing fungal infections and differentiating fungi at species level. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 45–51.
- 196.** Lass-Flörl C, Aigner J, Günsilius E et al. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with hematological malignancies. *Br J Haematol* 2001; 113: 180–184.
- 197.** Halliday C, Hoile R, Sorrell T et al. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 132: 478–486.
- 198.** Yoo JH, Choi JH, Choi S M et al. Application of nucleic acid sequence-based amplification for diagnosis of and monitoring the clinical course of invasive aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 392–398.
- 199.** White PL, Linton CJ, Perry MD et al. 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: 479–486.

- 200.** Finstrom N, Eriksson T, Pisa E et al. Development of a novel and standardized real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus* spp. in immunocompromised patients. 2nd Advances Against Aspergillosis 2006: Abstract 172.
- 201.** 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.
- 202.** Sipsas NV, Kontoyiannis DP. Clinical issues regarding relapsing aspergillosis and the efficacy of secondary antifungal prophylaxis in patients with hematological malignancies. Clin Infect Dis 2006; 42: 1584-1591.
- 203.** Roychowdhury M, Pambuccian SE, Aslan DL et al. Pulmonary complications after bone marrow transplantation: an autopsy study from a large transplantation center. Arch Pathol Lab Med 2005; 129: 366-371.
- 204.** Hachem R, Sumoza D, Hanna H et al. Clinical and radiologic predictors of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients. Cancer 2006; 106: 1581-1586.
- 205.** Kojima R, Tateishi U, Kami M et al. Chest computed tomography of late invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2005; 11: 506-511.
- 206.** Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2006; 42: 1417-1427.
- 207.** Maertens J, Theunissen K, Deeren D et al. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. Med Mycol 2006; 44(Suppl): 173-178.
- 208.** 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.
- 209.** 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: 17-20.
- 210.** 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: 2733-2741.
- 211.** 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.
- 212.** 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.
- 213.** 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.

MUDr. Zdeněk Ráčil

www.fnbrno.cz

e-mail: zracil@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 23. 10. 2007