

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tento takzvaný pre-emptivní přístup vyžaduje rychlé, neinvazivní, senzitivní a specifické diagnostické metody.

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

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

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

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

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

Galaktomannan – marker invazivní aspergilózy (IA)

Galaktomannan (GM) je polysacharid buněčné stěny aspergilů a některých

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

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

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

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

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

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

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

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

Tab. 2. Příčiny falešné positivity Platelia Aspergillus testu.

Falešná pozitivita	Mechanismus	Poznámky	Reference
1. Kontaminace vzorku při odběru nebo zpracování vzorku			
• kontaminace vzdušnými sporami <i>Aspergillus sp.</i> a <i>Penicillium sp.</i>	detekce GM z kontaminujících vláken aspergilů a penicilií	sporadické positivity; k odlišení slouží retest vzorku	[57]
• kontaminace vatou (např. při desinfekci místa odběru)	zkřížená reakce s glukopyranozovými zbytky	v laboratoři a vyšetření opakovaného odběru	[58]
2. Průnik antigenu z GIT při postižení nebo nezralosti GIT			
• předčasně narozené děti, novorozenci	průnik antigenů z <i>Bifidobacterium sp.</i> přes nezralou mukózu a zkřížená reaktivita polysacharidů buněčné stěny bifidobakterií s EB-A2		[59]
• mukozitida, střevní GvHD	průnik GM ze stravy přes poškozenou mukózu	GM obsažen v celé řadě potravin (těstoviny, rýže, kyselé zelí a další); většinou současně s postižením GIT nutný alespoň částečně zachovaný perorální příjem stravy	[60,61]
3. Reakce s antigeny v cirkulaci			
• infekce <i>Penicillium sp.</i>	zkřížená reakce s polysacharidem penicilií		[32]
• penicilinová ATB (piperacilin/tazobaktam, ampicilin, amoxicilin/klavulanát od některých výrobců)	reakce s GM kontaminujícím semisyntetická penicilinová ATB	klinicky nejčastější a nejvýznamnější příčina falešných pozitivit	[18,62,63]
4. Ostatní – zmiňované, ale neověřené příčiny			
• cyklofosamid			[32]
• bakteriemie			[32]
• paraproteinemie			[64]
• transfuzní přípravky a krevní deriváty			[65]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Indikace

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

Interpretace

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

Využití

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

Další materiály vhodné k testování

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

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

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

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

Mannan a antimannan – diagnostika invazivní kandidózy (IC)

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

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

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

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

PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

mannanu a protilátek proti němu, tzv. antimannanu.

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

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

Existují dvě hlavní příčiny.

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

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

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

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

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

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

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

PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

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

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

- a) falešnou negativitou mannanu i antimannanu při infekci vyvolané některými non-albicans kmeny kvasinek,
- b) falešnou pozitivitou antimannanu u kolonizovaných nemocných.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Závěr

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických

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

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

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

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

Literatura

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

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

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

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

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