

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**Laboratorní diagnostika invazivní
aspergilózy**
Diplomová práce

Hradec Králové 2009

Petra Martincová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

**LABORATORY DIAGNOSTICS OF INVASIVE
ASPERGILLOSIS**

HRADEC KRÁLOVÉ 2009

PETRA MARTINCOVÁ

Tato práce byla vypracována pod odborným vedením RNDr. Marcely Drahošové ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové na Oddělení klinické imunologie a alergologie, které si tímto dovoluji poděkovat za poskytnuté rady a pomoc. Mé poděkování patří rovněž Mgr. Radce Bolehovské z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové za pomoc při zpracování řady údajů a MUDr. Petru Hamalovi, Ph.D. z Ústavu mikrobiologie ve Fakultní nemocnici v Olomouci za poskytnutí cenné literatury. Na závěr bych ráda poděkovala také přednostovi Ústavu klinické mikrobiologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové doc. RNDr. Vladimírovi Buchtovi, CSc. za možnost provedení řady preparátů a fotografií a Mgr. Marcele Vejsové za pomoc při jejich zpracování.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne 7.5. 2009


Petra Martincová

Abstrakt

ÚVOD: Invazivní aspergilóza je v současné době nejčastější invazivní mykotickou infekcí u nemocných s akutní leukemií a po transplantaci krvetvorné tkáně, vyvolanou vláknitou houbou z rodu *Aspergillus*. Klíčovým bodem úspěšné léčby pacienta s touto život ohrožující infekcí je správné ačasné stanovení diagnózy a následné časné podání účinné antimykotické léčby. Mezi hlavní sérologický marker důležitý pro stanovení diagnózy invazivní aspergilózy patří především stanovení galaktomananového antigenu.

CÍL: Zhodnotit přínos dosavadních znalostí o využití stanovení galaktomananu v časné diagnostice invazivní aspergilózy a ověřit na souboru imunokompromitovaných pacientů ohrožených mykotickou infekcí přínos stanovení galaktomananového antigenu metodou ELISA, senzitivitu, specifitu, pozitivní prediktivní hodnotu a negativní prediktivní hodnotu tohoto testu.

METODIKA: Stanovení galaktomananového antigenu bylo provedeno pomocí metody ELISA, detekce aspergilových NK v klinických vzorcích pomocí metody PCR. Vzorky sér byly získány od 94 pacientů, z toho 57 mužů a 37 žen. Průměrný věk pacientů byl 55,81.

VÝSLEDKY: Senzitivita a specifita pravidelného monitorování GM metodou ELISA činila 75,93 % resp. 92,44 %. Pozitivní prediktivní hodnota byla 41,84 % a negativní prediktivní hodnota činila 98,17 %. Na základě ROC křivky je hodnota cut - off 0,5 pro metodu ELISA přijatelná.

ZÁVĚR: The Platelia *Aspergillus* EIA se využívá jako screeningový test pro stanovení IA. Pravidelnost a opakování odběrů krve pro detekci GM významně ovlivňuje senzitivitu metody a její schopnost časné detekce IA. Tento přístup může mít podstatný vliv na správnost preventivní a empirické antifungální terapie.

Abstract

BACKGROUND: Invasive aspergillosis is the most frequent invasive fungal infection caused by filamentous fungi from the genus *Aspergillus*, 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. For the diagnosis of invasive aspergillosis, the major serological marker in common use is galactomannan.

AIMS: To evaluate the significance of the diagnostic value of serial screening of circulating GM by using a recently developed sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for prolonged – neutropenic and/or steroid treated patients with hematological disorders and patients undergoing stem cell transplantation.

METHODS: Assessment of galactomannan antigen was performed using the standardized ELISA, detection of *Aspergillus* DNA was performed using the PCR. Serum samples were obtained from 94 patients (57 men and 37 women). The average age was 55,81.

RESULTS: The sensitivity and specificity of serial GM monitoring were 75,93 % and 92,44 % respectively. The positive predictive value was almost 41,84 %, the negative predictive value was 98,17 %. Based on the ROC curve, the cut - off 0,5 (optical density index) for the ELISA could be acceptable.

CONCLUSIONS: The Platelia *Aspergillus* EIA is a useful screening test for the detection of IA. Serial determination of serum GM by the sandwich ELISA technique is a sensitive tool for the diagnosis of IA in hematological patients at risk. This approach may substantially influence clinical management with regard to preemptive and empirical antifungal therapy.

Obsah

OBSAH	5
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 CHARAKTERISTIKA HOUBOVÉ BUŇKY	9
2.2 ROZMNOŽOVÁNÍ HUB.....	10
2.3 SYSTÉM HUB.....	11
2.4 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA ANTIFUNGÁLNÍ IMUNITY	11
2.5 ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ MYKÓZ.....	13
2.5.1 Sekundárně invazivní mykózy	14
2.6 ROD ASPERGILLUS.....	15
2.6.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
2.6.2 <i>Aspergillus flavus</i>	19
2.6.3 <i>Aspergillus niger</i>	22
2.6.4 <i>Aspergillus terreus</i>	25
2.7 ASPERGILÓZA	28
2.7.1 Epidemiologie	28
2.7.2 Rizikové faktory.....	28
2.7.3 Klinická manifestace.....	30
2.8 PLICNÍ ASPERGILÓZA	30
2.8.1 Invazivní aspergilóza.....	30
2.8.2 Plicní aspergilom.....	31
2.8.3 Alergická plicní aspergilóza.....	32
2.9 MIMOPLICNÍ ASPERGILÓZA	33
2.10 EORTC/MSG.....	36
2.11 MORTALITA IA	39
2.12 TERAPIE ASPERGILÓZY	39
2.13 DIAGNOSTICKÉ MOŽNOSTI SYSTÉMOVÝCH MYKÓZ	40
2.14 MOŽNOSTI INVAZIVNĚ ZÍSKAT MATERIÁL K PRŮKAZU IA	41
2.14.1 Plíce	41
2.14.2 Paranasální dutiny.....	42
2.14.3 Mozek.....	43
2.14.4 Další orgány: kůže, endoftalmitida, cévní náhrady, vertebální a jiné osteomyelitidy, infekční endokarditida a další	43
2.15 ZOBRAZOVACÍ METODY V DIAGNOSTICE IA.....	43
2.15.1 RTG.....	43
2.15.2 CT.....	44
2.16 HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ	44
2.17 MYKOLOGICKÉ VYŠETŘOVACÍ METODY	44
2.17.1 Mikroskopické vyšetření	45
2.17.2 Kultivační vyšetření	45
2.17.3 Stanovení citlivosti mikromycet k ATB	46
2.18 NEKULTIVAČNÍ DIAGNOSTICKÉ METODY	46
2.19 SÉROLOGICKÉ MARKERY IA	47
2.19.1 GM.....	47
2.19.2 Detekce galaktomananu.....	47

2.19.3	<i>Využití detekce GM pro diagnózu IA</i>	48
2.19.4	<i>Faktory ovlivňující senzitivitu testu</i>	49
2.19.5	<i>Faktory ovlivňující PPV testu</i>	51
2.19.6	<i>1,3-β-D-glukan</i>	54
2.19.7	<i>Detekce 1,3-β-D-glukanu</i>	54
2.20	MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY	55
2.20.1	<i>Vyšetřovaný materiál</i>	55
2.20.2	<i>Izolace DNA</i>	56
2.20.3	<i>Amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí</i>	56
2.20.4	<i>Amplifikace NASBA</i>	58
2.21	SHRNUTÍ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY INVAZIVNÍCH MYKÓZ	59
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	60
3.1	CHARAKTERISTIKA SOUBORU	60
3.2	POUŽITÉ METODY	60
3.2.1	<i>Průkaz galaktomannanového antigenu plísně rodu <i>Aspergillus</i></i>	60
3.2.2	<i>Detekce aspergilových NK metodou real – time PCR</i>	64
3.2.3	<i>SOP pro kultivaci a identifikaci vláknitých hub</i>	70
4	VÝSLEDKY	71
5	DISKUZE	77
6	ZÁVĚR	84
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	

1 Úvod

Výskyt mykotických onemocnění, komplikujících stavy snížené rezistence a imunity pacientů s různými závažnými základními chorobami vzrostl za posledních několik desetiletí natolik, že se stal jedním z významných problémů současné medicíny. Dlouhodobá terapie širokospektrými antibiotiky, imunosupresivy, kortikoidy, cytostatiky a jinými léky, které snižují imunitní odolnost organismu, vede u pacientů k častému výskytu oportunních mykóz a dalších oportunních infekcí. Tato terapie díky své mohutné biologické účinnosti přináší řadu nežádoucích vedlejších účinků a rizik, z nichž nejzávažnější je zásah do komplexu hemopoetického a imunitního systému.

Mnohé mykotické komplikace, které vedou k bezprostřednímu ohrožení života terminální fungemickou generalizací a orgánovou diseminací, jsou často vyvolány v prostředí vyskytujícími se houbami. Pro nemocné se stávají potenciálními či aktuálními oportunními patogeny s neomezenou proliferací v podmínkách imunodeficitního či areaktivního organismu, vyčerpaného jinou základní chorobou, anebo následně jako iatrogenní komplikace imunosupresivního či cytostatického režimu. Mnohé z organismů jsou také běžné v nozokomiálních podmínkách.

IFI vyvolané vláknitými houbami, především IA, zaujímají v současnosti čelní místo mezi příčinami morbidity 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 radiodiagnostických metodách, sérologických a molekulárně biologických metodách a vyžaduje 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 diagnózy, a tak i včasné podání účinné antimykotické léčby. Tím je umožněno zásadním způsobem příznivě ovlivnit prognózu pacientů (*Kod'ousek, 2003; Bartáková, Haber, Hamal, 2007*).

Cíl práce

Cílem naší práce bylo ověřit na souboru imunokompromitovaných pacientů ohrožených mykotickou infekcí přínos stanovení galaktomananového antigenu metodou ELISA, senzitivitu, specificitu, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu tohoto testu.

2 Teoretická část

2.1 Charakteristika houbové buňky

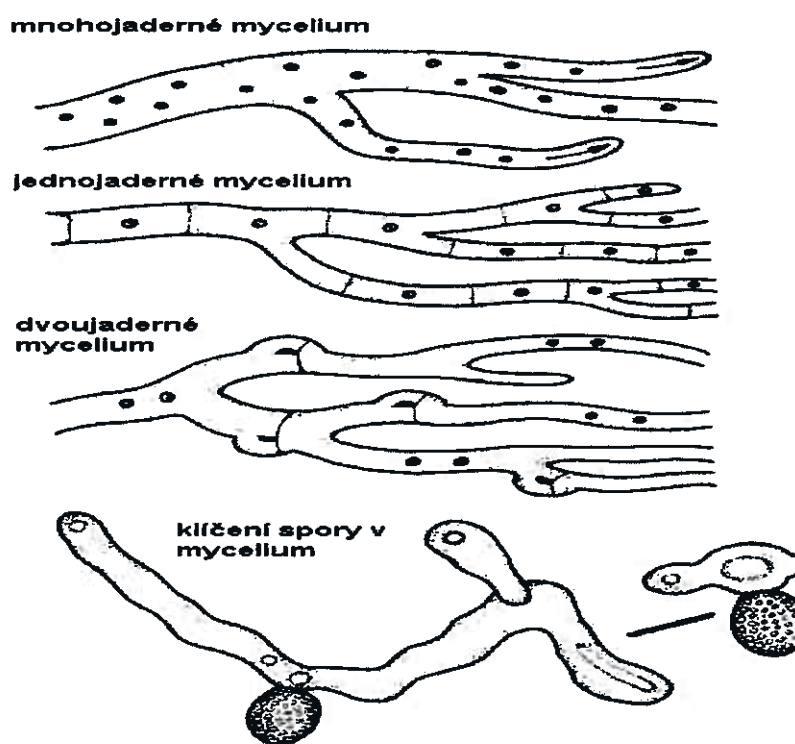
Houby (Fungi) představují velkou skupinu živých organismů dříve řazenou k rostlinám, ale nyní nově vyčleněnou jako samostatnou říši. Jedná se o jednobuněčné a vícebuněčné organismy.

Mikroskopické houby mají několikvrstevnou buněčnou stěnu. Nad cytoplazmatickou membránou se nachází vrstva manoproteinů, dále vrstva složená z glukanu a chitinu. Vně této vrstvy se nachází další vrstva glukanu a manoproteinů.

Houbové buňky mají **eukaryotickou stavbu**, čímž se více podobají savčím buňkám než bakteriím. Hlavní sterol plazmatické membrány hub se nazývá **ergosterol** a v současnosti většina antimykotik působí právě na této úrovni. Vedle hub s typickou vláknitou strukturou existuje také skupina houbových organismů označovaných jako – kvasinky.

Základní stavební jednotkou stélky vyšších hub je vlákno, nebo-li **hyfa**. Jedná se o jedno-,dvou-, či mnohojadernou trubkovitou strukturu, která je ve většině případů tvořena stěnovými **septy**. Tyto septa u nižších hub obvykle chybějí. Hyfy rostou vrcholovým vzrůstem, větví se a splétají do podhoubí **mycelia**. To, do jaké míry budou hyfy větvené či přehrádkované, je dáno genotypem mikroorganismu a také charakterem prostředí, v němž se mikroorganismus nachází (*Bailey and Scott's, 1994; Topley and Wilson's, 1998; Greenwood, Slack, Peutherer et al., 1999; Buchta, Jílek a kol., 2002; Votava a kol., 2003; http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=H011; <http://en.wikipedia.org/wiki/Fungi>*).

Obrázek č. 1 - Typy mycelií u mikromycet



(http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=M022)

2.2 Rozmnožování hub

Na specializovaných hyfách zvaných sporofory se tvoří pohlavní **spory** (výtrusy).

Nepohlavní spory **konidie** se vytváří na specializovaných hyfách konidioforech.

Zvláštností mikroskopických hub, mikromycet, je jejich schopnost střídat pohlavní a nepohlavní způsob rozmnožování. S tím souvisí i vytváření sexuálních (teleomorfy) a asexuálních (anamorfy) stádií, která si velmi často nejsou vůbec podobná a přispívají ke zvýšení zmatků v řadách taxonomů.

(Bailey and Scott's, 1994; Topley and Wilson's, 1998; Buchta, Jílek a kol., 2002; Votava a kol., 2003; <http://en.wikipedia.org/wiki/Fungi>).

2.3 Systém hub

Klasifikace hub vychází ze způsobu jejich rozmnožování, morfologie reprodukčních orgánů, spor a jiných buněčných struktur. Taxonomie je stále se vyvíjející obor, proto i systém hub se neustále mění v závislosti na aktuálním stavu našeho poznání, v současné době tedy především na výsledcích molekulárního studia hub (http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php).

2.4 Základní charakteristika antifungální imunity

Znalosti o imunopatogenetických mechanismech fungálních infekcí jsou v porovnání s množstvím informací, týkajících se virových a bakteriálních infekcí, značně omezené. Důvodem je především nižší zájem o fungální patogenní mikroorganismy v minulosti a strukturní a funkční komplikovanost těchto eukaryotních organismů.

Oportunně patogenní houby mají tendenci přetrvávat na vnějších i vnitřních tělních površích v latentní podobě. Intaktní imunitní systém není schopen jejich úplné eliminace, ale udržuje jejich aktivitu pod kontrolou. U osob s narušenou imunitou dochází velmi rychle k aktivaci latentních fungálních infekcí a rozvoji patologického procesu. Faktory patogenity a virulence fungálních mikroorganismů nejsou příliš výrazné. Například houby z rodu *Aspergillus* vytvářejí účinné hydrolytické enzymy, které poškozují tkáň. Předpokládá se, že většina imunomodulačních účinků hub je určována složením jejich buněčné stěny.

Vstupní branou infekce fungálními mikroorganismy jsou povrchy sliznic a kůže. Významnou část protekce hostitele vůči mikroskopickým oportunně patogenním houbám zajišťuje nenarušená lokální mikroflóra. Narušení mikrobiální rovnováhy nebo porušení slizniční imunity vede k patologické kolonizaci sliznic, případně průniku oportunně patogenních hub za slizniční bariéry.

Na slizniční a celkové imunitě vůči fungálním mikroorganismům se podílejí všechny složky přirozené i specifické imunity. V počátcích infekce je zdůrazňována úloha přirozené imunity, zvláště její buněčné složky.

Makrofágy identifikují nebezpečné vzory fungálních mikroorganismů, které označujeme jako PAMP membránovými receptory pro nebezpečné vzory PPR. Děje se tak prostřednictvím membránově vázaných i solubilních molekul, které mají charakter lektinů a reagují s cukernými složkami povrchů mikroskopických hub. Pokud to velikost dovolí, makrofágy fagocytují mikroskopické houby, usmrcují je a rozkládají. Makrofágy regulují zánětovou obrannou reakci, která je odpovědí na infekci oportunně patogenními houbami, prostřednictvím prozánětových cytokinů. Rozložené fungální antigenní fragmenty prezentují T lymfocytům a rozvíjejí buňkami zprostředkovanou imunitu.

Výraznou imunitní reakcí na fungální mikroorganismy je akumulace polymorfonukleárních leukocytů. Tyto leukocyty jsou rozhodující složkou v obraně vůči invazivním fungálním infekcím. Polymorfonukleární leukocyty adherují na hyfy, které jsou příliš velké na to, aby mohly být fagocytovány. Po vazbě uvolňují toxické produkty kyslíkového metabolismu a také peptidy s antimikrobiálními účinky, poškozující hyfy. Aktivací komplementu alternativní nebo lektinovou cestou jsou mikroskopické houby cytotoxicky ničeny. Složky komplementu opsonizují fungální mikroorganismy a zesilují tak jejich fagocytózu.

Až donedávna byla podceňována úloha specifických protilátek v imunitě vůči oportunně patogenním mikroskopickým houbám. Nyní je již prokázáno, že specifické protilátky brání adhezi mikroskopických hub na buňky hostitele a neutralizují solubilní toxické produkty. Jsou schopny zabránit vyklíčení konidií a tvorbě hyf (*Krejsek, Kopecký, 2004*).

2.5 Základní rozdělení mykóz

Mykózy se řadí mezi onemocnění, která jsou charakterizována kolonizací, následnou proliferací a případnou diferenciací a sporulací houby v tkáních nebo v tělních tekutinách hostitele a způsobující jeho poškození.

Tento infekční proces může být doprovázen projevy intoxikace a hypersenzitivní reakce na přítomnost patogenního agens. K přenosu houbové nákazy může dojít inhalací, kontaktem či traumatem.

1. Povrchové mykózy (mycoses superficiales)

a) Slizniční

Jedná se o mykózy postihující především dutinu ústní, jícen, nazální a paranazální oblast, oční rohovku a spojivku, genitál.

b) Kožní, dermatomykózy, „tineae“

Infekce postihuje keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly, nehtové lůžko a valy. Do této skupiny mykóz patří především dermatofyty, keratofilní houby způsobující dermatofytózy. Dermatofyty pomocí enzymů – keratináz využívají keratin, který je součástí různých kožních derivátů.

2. Hluboké (invazivní, viscerální a systémové) mykózy

Onemocnění postihující jeden nebo více orgánů, mohou diseminovat a přejít do septického stavu, zvláště u imunoalterovaných pacientů.

a) Primárně invazivní mykózy

Infekce vyvolané dimorfními houbami (blastomykóza, histoplazmóza, kokcidioidomykóza) nebo kvasinkou *Cryptococcus neoformans* (kryptokokóza).

b) Sekundárně invazivní (oportunní) mykózy

Infekce imunoalterovaných pacientů způsobené oportunními houbami, které pro zdravého, imunokompetentního jedince, nepředstavují reálné nebezpečí. V našich podmínkách jsou vyvolány zejména kandidami (kandidóza), aspergily (aspergilóza) a

zygomycetami (zygomykóza) (Buchta, Jílek a kol., 2002; Kad'ousek, 2003).

2.5.1 Sekundárně invazivní mykózy

Sekundární mykózy komplikují různá závažná primární onemocnění spojená s poklesem rezistence organismu a imunitních obranných mechanismů. Etiologicky se uplatňují potencionálně patogenní mykofyta relativně nízké virulence. Jejich výskyt v zevním prostředí je téměř ubikvitní, zčásti jde dokonce o endogenní saprofyty, které se příležitostně stávají aktuálními patogeny u imunitně oslabeného jedince. Endogenní mykotické infekce nejsou pro okolí kontagiózní. Obecně jde tedy o mykózy navazující na sníženou obranyschopnost a pokles účinnosti imunitního stavu organismu z různých příčin. Mezi onemocnění predisponující k sekundárním invazivním mykózám patří především:

1. Primární (vrozené) a sekundární (získané) imunodeficience: kongenitální imunodeficience, thymická dysplazie, AIDS aj.

2. Nádory krvetvorných a lymfatických tkání: leukémie, maligní lymfomy, případně generalizace karcinomu provázené defektem celulární nebo humorální imunity.

3. Různá krevní onemocnění včetně lézí kostní dřeně spojená s leukopenií a hypogamaglobulinemií. Také terminální fungémie u febrilních granulocytopenických pacientů.

4. Celková metabolická a endokrinní onemocnění: malabsorpční a malnutriční syndromy dětí při onemocnění GITu, chronická urémie, diabetes mellitus (Kad'ousek, 2003).

2.6 Rod *Aspergillus*

Aspergily jsou řazeny mezi ubikvitární saprofyty. Vyskytují 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. U imunokompromitovaných pacientů je nejčastějším původcem IA *A. fumigatus* (56-64%), poté *A. flavus* (14-18%), *A. niger* (5-8%) a *A. terreus* (5-16%)(cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php).

Morfologické znaky jsou založeny především na stavbě konidioforu, tedy na nepohlavním stádiu houby, jehož funkcí je produkovat spory a šířit se jimi do okolí. U některých druhů je známo také pohlavní stádium charakteristické tvorbou plodnic. Pro rod *Aspergillus* je typické hlavicovité zakončení konidioforu. Měchýřek je po celém nebo části obvodu porostlý fialidami, které mohou být v jedné nebo dvou řadách. Přes tyto fialidy prochází mikrokonidie, které mohou být kulovité, oválné, hladké i drsné. Měchýřek s fialidami a řetězci mikrokonidií tvoří konidiální hlavicu a její uspořádání je charakteristické pro jednotlivé druhy aspergilů a je základem jejich morfologické identifikace. Také výsledné zbarvení kolonií a jejich tvar na kultivačním médiu je dán charakterem a zbarvením těchto hlavic. Mikrokonidie jsou velice malé, přenášejí se vzduchem, ulpívají na předmětech a potravinách, mohou být snadno vdechnuty či pozřeny náhodnými hostiteli. Spory mohou pronikat hluboko do alveolů, kde v závislosti na stavu hostitelského organismu terminují a postupně vyrůstají ve formě vláken neboli hyf, vytvářející mycelia. Hyfy jsou různě dlouhé, dichotomicky větvené, v tkáni mají často radiální uspořádání.

Růst mycelií může být rozdělen do 3 fází. V 1. fázi logaritmického růstu dochází k bohaté látkové výměně spojené s tvorbou organických substrátů nutných k výstavbě myceliální stěny, což je podmíněno dostatkem živin, především glukózy v okolní tkáni. V této fázi může být uvolněn GM, který poté detekujeme v materiálu z dolních dýchacích cest nebo při dostatečné angioin vazivitě hyf v séru. S vyčerpáním zdrojů glukózy přechází růst do fáze stacionární a následně ve 3. fázi dochází k lýze a destrukci.

Makroskopické znaky jsou založeny na hodnocení vzhledu kolonií. Kolonie se hodnotí na standardních živných médiích: CYA, MEA. Nejvýznamnější makroskopické znaky:

- zbarvení kolonií, zbarvení spodní stany kolonií
- povrchová struktura kolonií
- velikost kolonií po 7, 10, 14 dnech
- vzhled konidiální hlavice pod binokulární lupou

(Haber et al., 1995; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; <http://botany.natur.cuni.cz/pdf/kubatova/3.03%20Eurotiales-Aspergillus.pdf>).

2.6.1 *Aspergillus fumigatus*

Taxonomie:

Říše (kingdom) - Fungi

Oddělení (phylum) – Ascomycota

Třída (class) – Eurotiomycetes

Řád (order) – Eurotiales

Druh (species) – *A. fumigatus*

Hlavní diagnostické znaky: Modrozelené sametové kolonie rychle rostoucí jak při 25 °C tak i při 37 °C, kyjovité měchýřky, sloupcovité hlavice dobře pozorovatelné pod binokulární lupou.

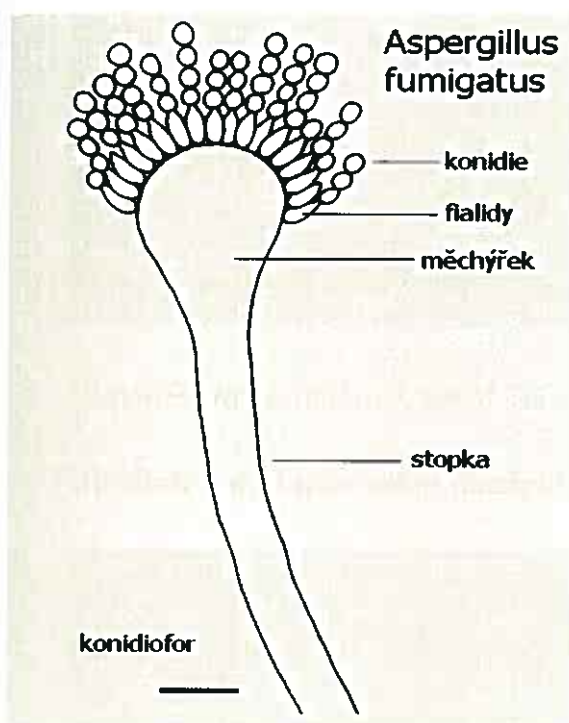
Patogenita: *A. fumigatus* je významný oportunní patogen, nejčastější původce invazivní diseminované aspergilózy. Dále může způsobovat alergické bronchopulmonální aspergilózy, myokarditidy, ledvinové infekce, kožní a nosní infekce a externí otomykózy.

Výskyt: *A. fumigatus* se vyskytuje celosvětově, hojněji však v teplejších oblastech, na rozmanitých plodinách. Produkuje mykotoxiny fumitremorginy, verruculogen a gliotoxin. U člověka může být nalazen na kůži, v uších, respiračním sekretu a žaludeční šťávě.

Doba potřebná k identifikaci kultivací: 2 - 6 dní

(Bailey and Scott's, 1994; Hoog, Guarro, Gené et al., 2000; Larone, 2002; Skořepová, 2008; www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fu.htm; http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php).

Obrázek č. 2 : *Aspergillus fumigatus*



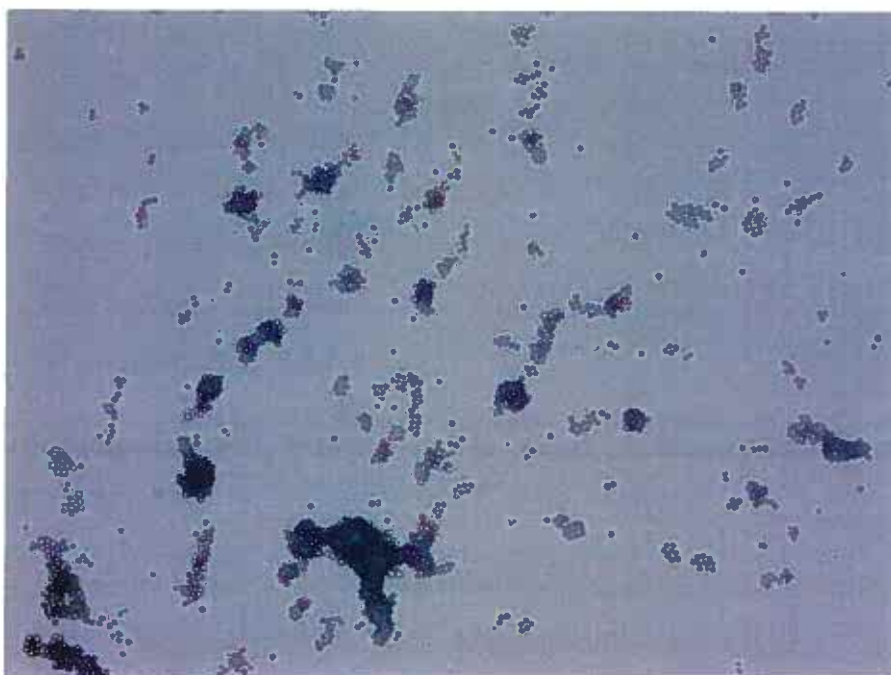
(<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fu.htm>)

Obrázek č. 3: *Aspergillus fumigatus*



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 400x

Obrázek č.4: *Aspergillus fumigatus* - konidie



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 200x

Obrázek č. 5: *Aspergillus fumigatus*



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové)

2.6.2 *Aspergillus flavus*

Taxonomické zařazení:

Říše (kingdom) – Fungi

Oddělení (phylum) – Ascomycota

Třída (class) – Eurotiomycetes

Řád (order) – Eurotiales

Druh (species) – *A. flavus*

Hlavní diagnostické znaky: Rychle rostoucí žlutozelené kolonie, konidie jemně bradavčité.

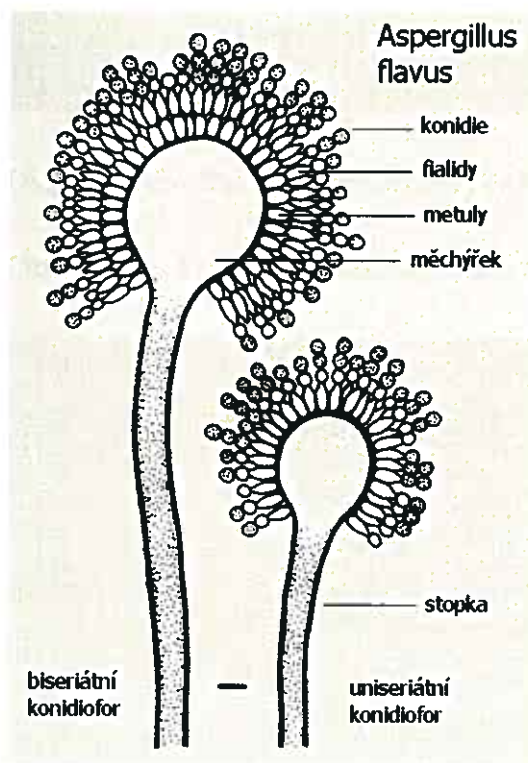
Patogenita: *A. flavus* patří mezi oportunní patogeny, způsobující například aspergilózu plic, alergickou bronchopulmonální aspergilózu, kožní infekce, myokarditidy, ledvinové infekce a diseminované infekce.

Výskyt: Vyskytuje se celosvětově, hojněji však v subtropických a tropických oblastech, na různých substrátech rostlinného původu a v půdě. Velmi často bývá izolován zvláště z burských oříšků a z cereálií. Může produkovat hepatotoxické a kancerogenní aflatoxiny B a kyselinu cyklopiazonovu. U člověka bývá izolován z kůže, respiračního sekretu a žaludeční šťávy.

Doba potřebná k identifikaci kultivací: 1 - 4 dny

(Bailey and Scott's, 1994; Hoog, Guarro, Gené et al., 2000; Larone, 2002; www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fl.htm; http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php).

Obrázek č. 6: *Aspergillus flavus*



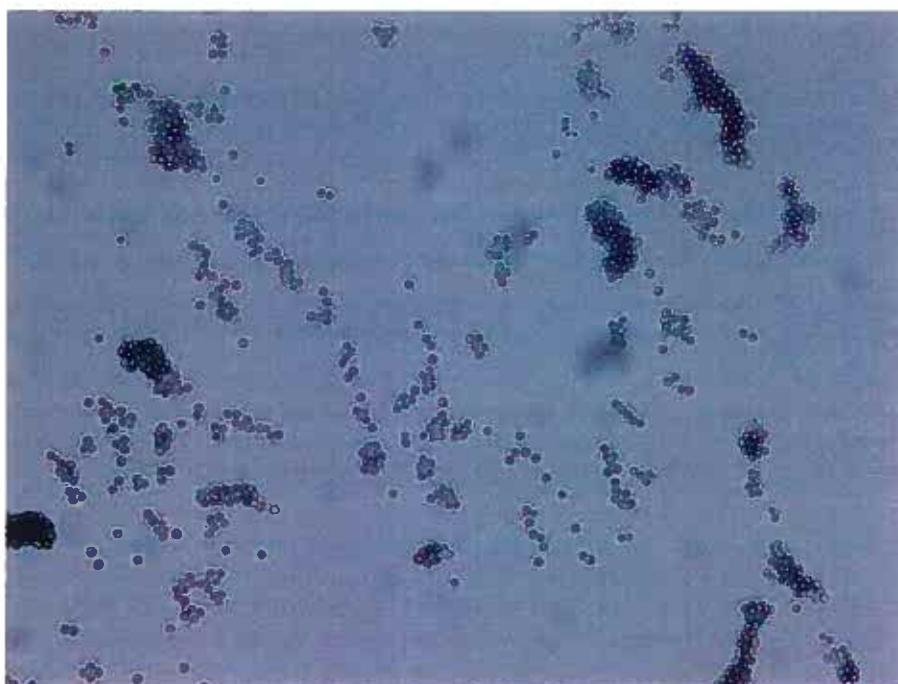
(<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fl.htm>).

Obrázek č. 7: *Aspergillus flavus*



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 400x

Obrázek č. 8: *Aspergillus flavus* – konidie



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 200x

Obrázek č. 9: *Aspergillus flavus*



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové)

2.6.3 *Aspergillus niger*

Taxonomické zařazení:

- Říše (kingdom) – Fungi
- Oddělení (phylum) – Ascomycota
- Třída (class) – Eurotiomycetes
- Řád (order) – Eurotiales
- Rod (genus) – *Aspergillus*
- Druh (species) – *A. niger*

Hlavní diagnostické znaky: Rychle rostoucí černé kolonie, černé kulovité konidie.

Patogenita: *A. niger* způsobuje především otomykózy, zřídka diseminuje..

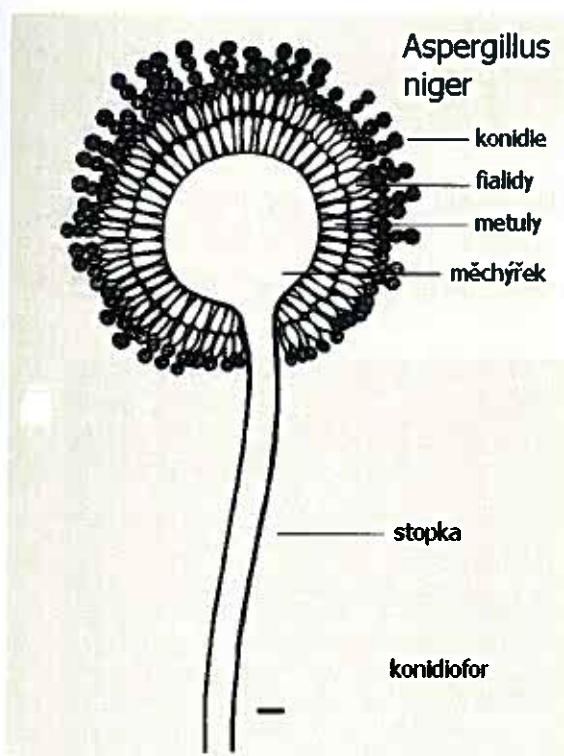
Výskyt: *A. niger* se vyskytuje celosvětově, především v teplejších oblastech, na rozmanitých potravinách, jak rostlinného tak i živočišného původu. Často se vyskytuje i v xerofilních podmínkách.

Dlouho byl považován za netoxinogenní, avšak v 90.letech byla u několika kmenů zjištěna produkce mykotoxinu ochratoxinu. U člověka může být nalezen v uších, respiračním sekretu, žaludeční šťávě a na kůži.

Doba potřebná k identifikaci kultivací: 1 - 4 dny

(Bailey and Scott's, 1994; Hoog, Guarro, Gené et al., 2000; Larone, 2002; Skořepová, 2008; <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-ni.htm>; http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php).

Obrázek č. 10: *Aspergillus niger*



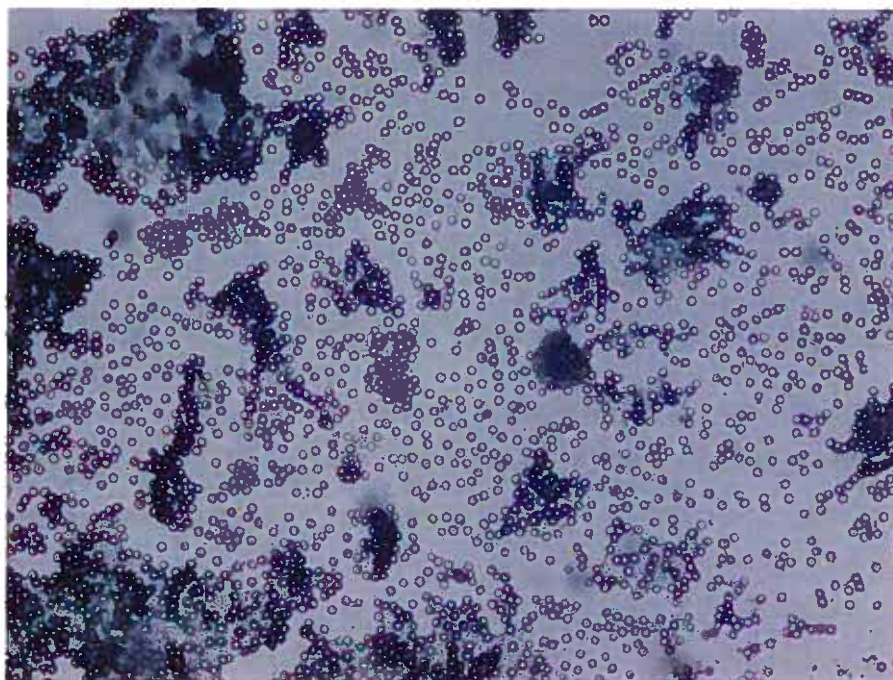
(<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-ni.htm>).

Obrázek č. 11: *Aspergillus niger*



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 400 x

Obrázek č. 12: *Aspergillus niger* – konidie



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 200x

Obrázek č. 13: *Aspergillus niger*



(Autor: Petra Martinová, ÚKM FN Hradec Králové)

2.6.4 *Aspergillus terreus*

Taxonomické zařazení :

- Říše (kingdom) – Fungi
- Oddělení (phylum) – Ascomycota
- Třída (class) – Eurotiomycetes
- Řád (order) – Eurotiales
- Rod (genus)– *Aspergillus*
- Druh (species) – *A.terreus*

Hlavní diagnostické znaky: Poměrně rychle rostoucí, okrové, sametové kolonie. Konidie kulovité až elipsoidní.

Patogenita: Jedná se o oportunní patogen, způsobující infekce plic, diseminované infekce, endokarditidy, onychomykózy, alergické bronchopulmonální infekce.

Výskyt: Vyskytuje se především na potravinách a v prostředí budov, bývá izolován z půdy a klinického materiálu. Může být nalezen na kůži, v nose, respiračním sekretu a žaludeční šťávě.

Doba potřebná k identifikaci kultivací: 2 - 6 dní

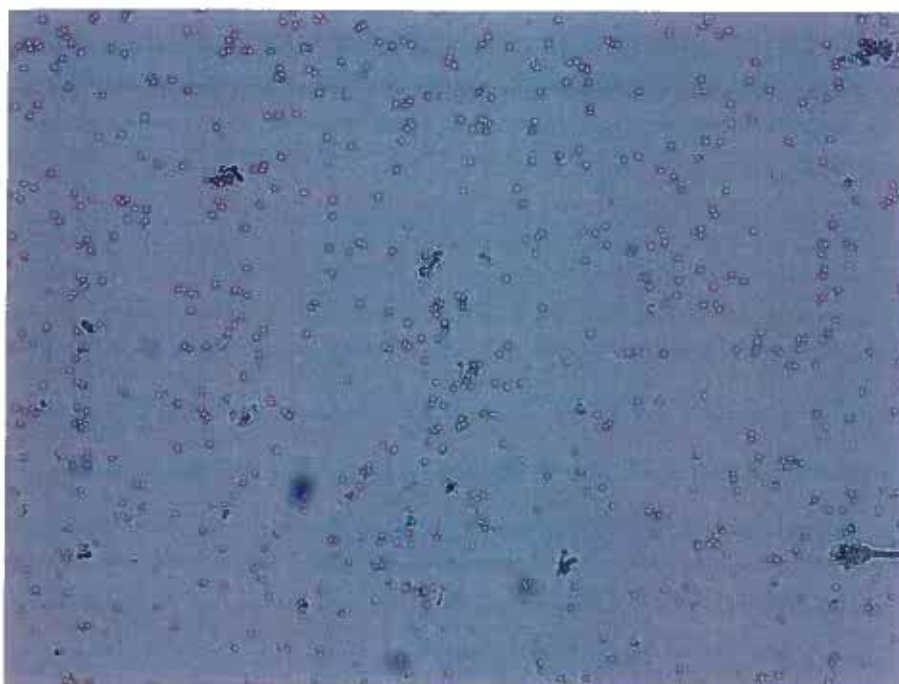
(Bailey and Scott's, 1994; Hoog, Guarro, Gené et al., 2000; Larone, 2002; <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-tr.htm>; http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php).

Obrázek č. 14: *Aspergillus terreus*



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 400x

Obrázek č. 15: *Aspergillus terreus* – konidie



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové), 200x

Obrázek č. 16: *Aspergillus terreus*



(Autor: Petra Martincová, ÚKM FN Hradec Králové)

2.7 Aspergilóza

Aspergilóza je charakterizována jako infekční onemocnění způsobené houbami z rodu *Aspergillus*. Tyto houby mohou působit na organismus jako alergen a nebo mohou vyvolávat různé formy IA.

Aktivně proliferující hyfy mají značnou schopnost penetrace různými tkáňovými komponentami a bariérami včetně cévní stěny. Tato angioinvasivita má za následek trombangitidu vedoucí k nekrotám a je také příčinou fungémie s následnou generalizací a mykotickým výsevem do vnitřních orgánů. Závažnost infekce je různá v závislosti na topice léze a na stupni imunitní odolnosti organismu pacienta (*Haber, 1995, Kodousek, 2003; Skořepová, 2008*).

2.7.1 Epidemiologie

Aspergily se nacházejí v půdě, ve vodě, v potravinách, v hnilící vegetaci, v kontaminované potravě (koření, káva, čaj). Vstupní branou infekce jsou především dýchací cesty (*viz.: kapitola 2.6*). Kontaminované nemocniční ventilační či vodovodní systémy jsou rizikovým zdrojem epidemického výskytu nozokomiální IA u imunokompromitovaných pacientů, největším rizikem jsou však stavební práce v nemocnici či v jejím blízkém okolí. Aspergilóza se také objevuje jako endogenní reakce po primární infekci a nebo kolonizaci, obvykle v době hlubokého imunodeficitu pacienta. Z tohoto důvodu není někdy možné spolehlivě rozlišit nozokomiální a endogenní zdroj infekce (*Haber, 1995; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007*).

2.7.2 Rizikové faktory

IFI představují závažné infekční komplikace u imunokompromitovaných nemocných s nádorovým onemocněním. Základní nádorová choroba a především poté protinádorová léčba (chemoterapie, radioterapie, protinádorové protilátky) vedou k poklesu neutrofilních granulocytů k tzv. neutropenii, která je jedním ze závažných rizikových faktorů infekčních komplikací. Riziko infekce výrazně stoupá s hloubkou tohoto poklesu. Vedle hloubky neutropenie je velmi důležitá také délka jejího trvání. S prodlužující se dobou neutropenie výrazně stoupá riziko vzniku mykotických infekcí. Přestože invazivní mykózy mohou

postihnout celou skupinu nemocných s nádorovým onemocněním, jejich výskyt u pacientů se solidními nádory je spíše vzácný.

Naopak časté jsou u nemocných s hematologickými malignitami a to především je-li součástí léčebného režimu transplantace krve tvorné tkáně. Již samotná hematologická malignita a léčba představují rizikový faktor pro vznik IA.

Mezi nejvýznamnější rizikové faktory IA tedy patří léčba vysokými dávkami kortikosteroidů, která eliminuje první fagocytární obrannou linii plicních alveolárních makrofágů, dlouhodobá granulocytopenie a imunosupresivní léčba.

Riziko relapsu IA hrozí především nejrizikovějších pacientům na dlouhodobé imunosupresivní léčbě a u těch, kteří nedosáhnou remise. Relaps se velice často objevuje v původní lokalizaci infekce (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

Rizikové faktory IA:

- GvHD
- steroidy
- dlouhodobá neutropenie
- dalece T lymfocytů
- transplantace krve tvorných buněk
- imunosupresivní terapie
- předcházející IFI
- akutní CMV infekce

Rizikové faktory relapsu IA

- dokumentovaná IA
- systémové kortikoidy
- neúplné vymizení infekce před další kúrou chemoterapie
- > 3 antibiotika
- trvání neutropenie > 27 dní
- délka primární antimykotické léčby < 1 měsíc
- zdroj krve tvorných buněk

(*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*)

2.7.3 Klinická manifestace

Predilekční lokalizací aspergilózy jsou především plíce, které mohou být postiženy až v 90 %, mimoplicní lokalizace je vzácnější. Rozeznáváme 3 základní formy postižení respiračního traktu, a to: **invazivní aspergilózu, alergickou plicní aspergilózu a plicní aspergilom (mycetom).**

Jen ve 20 - 30 % jsou postiženy i jiné systémy – GIT, játra, mozek, srdce, ledviny. Může se jednat o izolovanou infekci či infekci spojenou s infekcí v plicích (Haber, 1995; Poljak, Krč, Ehrmann, 1997; Larone, 2002; Kod'ousek, 2003; Malcolm, Warnock, 2003; <http://www.aspergillus.org.uk/>).

2.8 Plicní aspergilóza

Jako první popsal aspergilovou infekci plic roku 1847 Sluyter a nazval ji – pneumomycosis (cit.: Haber, 1995). Označení aspergilóza pochází od Presenia, a to až z roku 1850 (cit.: Haber, 1995).

2.8.1 Invazivní aspergilóza

Nejčastějším klinickým projevem u imunoalterovaných nemocných je IA. Základním onemocněním bývá v naprosté převaze akutní hemoblastóza s neutropenií nebo maligní lymfom. Infekce obvykle začíná endobronchiální proliferací hyfální formy plísně, poté dochází k tkáňové invazi s postižením plicních cév, s krvácením nebo ischemickou nekrózou parenchymu (plicními infarkty) a rozpadem tkáně. Tato forma invazivní aspergilové infekce se nazývá **akutní nekrotizující pneumonitida.**

Klinicky je stav provázen septickými horečkami, neproduktivním kašlem, tachypnoí, hemoptýzou, pleurálním syndromem s třecím šelestem a projevy hypoxie různého stupně.

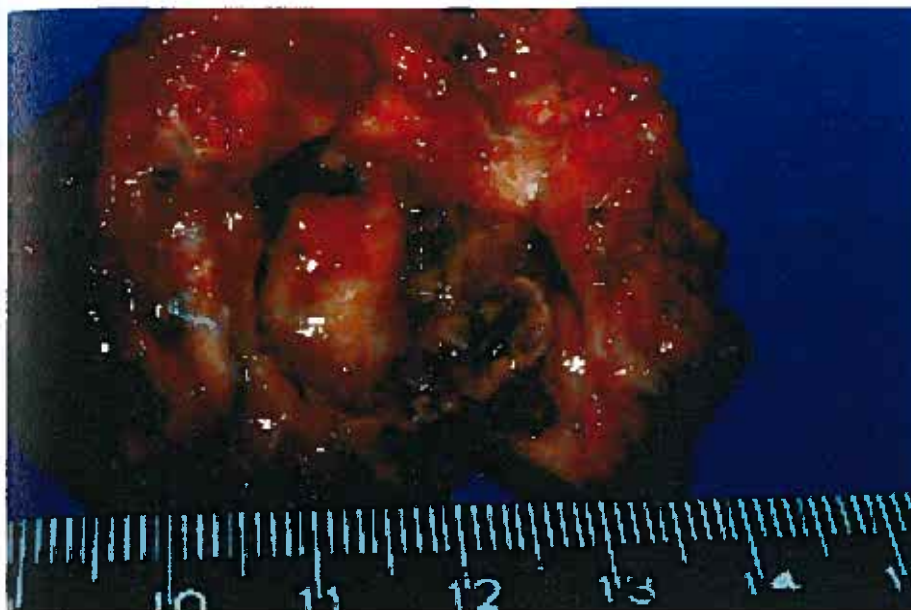
Chronická nekrotizující pneumonitida je pomalu progredující forma akutní nekrotizující pneumonitidy, dříve nazývaná pseudotuberkulóza nebo chronická granulomatózní aspergilóza. Chronická forma aspergilózy je chápána jako jeden pól širokého spektra klinické manifestace plicní aspergilózy a akutní forma jako pól opačný, mezi nimiž je mnoho klinicky přechodných tvarů.

V souvislosti s transplantací plic byla definována další, relativně specifická jednotka akutní formy invazivní plicní aspergilózy, **ulcerativní tracheobronchitida**. Klinický nález je velmi chudý, onemocnění může velmi dlouho probíhat asymptomaticky (*Haber, 1995; Topley and Wilson's, 1998; Hoog, Guarro, Gené et al., 2000; Malcolm, Warnock, 2003; Kodousek, 2003; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; <http://www.aspergillus.org.uk/aspergillosisframeset.html>;**<http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/aspergillus/aspergillosis.htm>*).

2.8.2 Plicní aspergilom

Plicní aspergilom, **mycetom**, je projevem saprofytické kolonizace již vytvořených, preformovaných plicních dutin, které komunikují s bronchiálním stromem a které vznikly většinou po prodělané tuberkulóze, sarkoidóze, invazivní plicní aspergilóze, rozpadem nádoru, nebo v bronchiektaziích. Proliferace mycelia v uvedeném prostředí se děje apozičním způsobem v závislosti na různé růstové aktivitě v časovém sledu. Tímto způsobem vznikají charakteristicky koncentricky zonálně vrstvené struktury mycelia a útvary kulovitého tvaru a různé velikosti – **aspergilomy**. Aspergilomy jsou ve většině případů solitární a zůstávají topicky ohraničené (*Bailey and Scott's, 1994; Haber, 1995; Topley and Wilson's, 1998; Malcolm, Warnock, 2003; Kodousek, 2003; <http://www.aspergillus.org.uk/aspergillosisframeset.html>;**<http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/aspergillus/aspergillosis.htm>*).

Obrázek č. 17: Houbová infekce *A.niger* uvnitř staré tuberkulózní kaverny.



(<http://www.aspergillus.org.uk/aspergillosisframeset.html>).

2.8.3 Alergická plicní aspergilóza

Hypersenzitivní reakce na aspergilové antigeny je podkladem několika klinických jednotek – **alergické bronchopulmonální aspergilózy, alergické alveolitidy a astmatu**. Tyto jednotky se manifestují u nemocných s neporušeným imunitním systémem. Jedná se o hypersenzitivní reakce I. a III. typu. Aspergily v tomto případě kolonizují bronchiální strom bez tendence k tkáňové invazi. Nemocný trpí epizodickými záchvaty dušnosti bronchospastického charakteru se sípavým dýcháním, kašlem a expektorací menšího množství nahnědlého sputa. Záchvat je u některých pacientů provázen hemoptýzou, pleurální bolestí či horečkou.

Diagnostika je komplexní, v krevním obraze je nacházena eozinofilie, pozitivní kožní testy na aspergilový antigen, pozitivní precipitace protilátek s aspergilovým antigenem, zvýšené sérové hladiny IgE, zvýšená hladina specifického IgE proti aspergilovému antigenu, pozitivní kulturačnický nález sputa (Haber, 1995; Topley and Wilson's, 1998; Greenwood, Slack, Peutherer et al., 1999; Malcolm, Warnock, 2003; Kod'ousek, 2003; <http://www.aspergillus.org.uk/aspergillosisframeset.html>; <http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/aspergillus/aspergillosis.htm>).

2.9 Mimoplicní aspergilóza

Z extrapulmonálních projevů IA je významná • **aspergilóza paranazálních dutin**. Intenzita a forma klinických příznaků je bezprostředně ovlivněna základním imunitním stavem nemocného. V případě zachovalé imunitní reakce jde v podstatě o aspergilom, bez tendence k invazi a bez významných klinických projevů. U imunodeficitních pacientů je v popředí obtíží bolest hlavy a lícni oblasti s otokem orbity, obrna okohybných nervů a později porucha zraku. Někdy může dojít až k lokální destrukci skeletu, k infiltraci kůže. Klinický průběh je dramatický, velmi podobný rhinoorbitální mukormykóze, včetně nepříznivé prognózy. Stav vyžaduje vedle antimykotické léčby často chirurgické řešení. K diagnostice se využívá především CT sken a RTG.

- **Cerebrální aspergilóza** je projevem hematogenní diseminace infekce z plic, přestup z paranazálních dutin je výjimečný. Rozsah postižení je různý, nejčastější lokalizace je v kůře mozkové, kde se vytváří solitární nebo mnohočetné abscesy nebo granulomy, mohou však být postiženy i mozkové pleny. Klinické projevy odpovídají formě a lokalizaci infekce, od projevů nitrolebeční hypertenze k příznakům meningeálního dráždění s parézami nervů a poruchou vědomí. Pacienti s mírnou poruchou imunodeficiencie trpí pouze mírnými bolestmi hlavy a fokálním neurologickým deficitem. U pacientů s výraznou imunodeficiencí se cerebrální aspergilóza projevuje nespecifickými nálezy, například změnami mentálního charakteru a opakovanými záchvaty. Mozková infarktová ložiska způsobená cerebrální arteriální trombózou mohou mít za následek neurologické příznaky, křeče a zvýšení mozkomíšního tlaku. K diagnostice se využívá především CT sken a MRI. Dále biopsie a vyšetření CSF. Klinické vyšetření, tak i pomocné nálezy jsou však diagnosticky nepřiznačné, kultivační průkaz aspergila z moku většinou selhává. Prognóza je nepříznivá.

- Při diseminaci infekce může být také postižen **GIT**, s převažujícími projevy aspergilové ezofagitidy a nebezpečím vzniku abscesů. Ulcerace střevní sliznice predilekčně postihují oblast céka, ale mohou být lokalizovány kdekoli, v orofaryngu, žaludku nebo tenkém střevě. Častým průvodním jevem je krvácení, výjimečně může dojít k perforaci střevní stěny.

- **Apergilóza jater** se projevuje nejčastěji ve formě abscesu, buď solitárního nebo mohou být celá játra prostoupena miliárním rozsevem drobných dutinek. Postižení je většinou asymptomatické, s vyššími hodnotami jaterních enzymů, zejména bilirubinu a alkalické fosfatázy.

- **Ledviny** bývají postiženy u 10 % nemocných, s tvorbou izolovaných nebo mnohočetných mikroabscesů v kůře i ve dřeni. Symptomatologie je velmi chudá.

- **Aspergilová endokarditida** je spojena s rizikem perforace chlopní při rozpadu abscesu, septické emboly z velkých a křehkých adenoidních vegetací na chlopních jsou podkladem mnohdy dramatických klinických projevů, které se však neliší od symptomatologie bakteriální endokarditidy. Mezi nespecifické symptomy patří ztráta váhy, únava a ztráta chuti k jídlu. U 80 % pacientů dochází ke vzniku embolu, který ucpává hlavní artérie, zvláště mozkové.

- **Postižení myokardu** prakticky vždy provází systémovou aspergilózu, nejčastěji plicní. V srdečním svalu jsou okrsky nekrózy a infarktová ložiska, jako projev trombózy koronárních tepen. Tromby obsahují vlákna plísně. Až ve 40% je postižen murální endokard.

- **Oftalmomycosis.** Většinou se jedná o mykotickou komplikaci v rámci ulcerosní keratokonjunktivitidy. Vzácně je pozorováno masivní postižení oka ve formě panoftalmie v průběhu generalizované aspergilové infekce provázené cévní trombózou.

Obrázek č. 18: Aspergillus keratitis



(<http://www.aspergillus.org.uk/aspergillosisframeset.html>).

- **Otomykóza.** Jedná se o onemocnění postihující zvukovod případně dutinu tympální při chronické perforativní mezotitidě. Pacienti trpí zhoršeným sluchem a bolestí.

- **Kožní aspergilóza.** U imunodeficientních pacientů jsou popisovány 2 typy kožní aspergilózy. U prvního typu léze vznikají blízko místa vsunutého intravenózního katetru, zejména u pacientů, kteří měli na pokožku přiložený kontaminovaný obvaz či dlahu. Léze se projevují fialovým erytémem, zatvrdlými strupy, nekrotizujícími vředy s černými strupy.

U druhého typu kožní aspergilózy léze vznikají v důsledku hematogenního šíření infekce z plic nebo z infikovaných tkání. Tato forma aspergilózy se rozvíjí u 5% pacientů s IA. Léze mohou mít charakter makulární nebo nodulární, mohou být izolované nebo mnohočetné, zarudlé nebo nekrotické, mohou vznikat i rozsáhlé ulcerace, většinou na končetinách, kryté černou krustou. Diagnóza vyžaduje biotické a kulturační vyšetření.

- **Osteomyelitida** představuje méně běžnou formu aspergilózy, avšak přináší velké riziko pro děti s CGD. K šíření infekce dochází z plicních lézí a nejvíce postiženou oblast tvoří žebra a páteř. Aspergilová osteomyelitida může být také následkem iatrogenního poškození během chirurgického zákroku.

Pacienti si často ztěžují na horečku, bolest a velkou citlivost postižených míst.

(Bailey and Scot's, 1994; Haber, 1995; Topley and Wilson's, 1998; Hoog, Guarro, Gené et al., 2000; Malcolm, Warnock, 2003; Kod'ousek, 2003; <http://www.aspergillus.org.uk/aspergillosisframeset.html>).

2.10 EORTC/MSG

V roce 2002 společnost EORTC a MSG publikovali standardní definice pro IFI (cit.: Ben, Peter, Thomas, Walsh, 2008). IFI byly pomocí těchto definic rozděleny do tří kategorií – **prokázané, pravděpodobné a možné** IFI. Prokázaná IFI pouze vyžadovala, aby byl patogen detekován histologicky nebo aby byla pozitivní kultivace vzorku tkáně získané z místa infekce. Pravděpodobné a možné IFI byly založeny na 3 elementech – faktor hostitele, který identifikuje pacienta v riziku, klinických symptomech a mykologickém důkazu, který zahrnuje nejen kultivace a mikroskopii, ale také nepřímé testy.

Rozdělení umožnilo lépe definovat IFI s různou jistotou diagnózy. Tyto definice se ovšem neobešly bez svých nedostatků, například kategorie možných IFI zahrnovala mnoho nejistých případů. Proto se společnosti EORTC/MSG opět sešli v roce 2003 v Chicagu a všichni členové se shodli na tom, že je třeba definice revidovat (cit.: Ben, Peter, Thomas, Walsh, 2008). Byl přijat název IFD. Kritéria pro prokázané a pravděpodobné IFD byly modifikovány, aby lépe odrážely postupy nepřímých testů, zatímco kategorie možných IFD byla revidována, aby zahrnovala pouze případy, jejichž příčinou je houbová etiologie, i když mykologická evidence chybí. Z tohoto důvodu definice pravděpodobných a možných IFD byly založeny na stejných 3 elementech jako originální definice – faktor hostitele, klinická manifestace a mykologický důkaz.

Při použití EORTC/MSG kritérií pro stanovení jistoty diagnózy (viz.: tabulka č.1 a č.2) bylo zjištěno, že v současné době je absolutní většina nemocných léčena pro pravděpodobnou IA. Časně zahájení léčby při splnění kritérií pravděpodobné IA umožní výrazně zlepšit prognózu nemocných s touto velmi závažnou infekcí (Bartáková, Drgoňa, Haber, Hamal, Tetkovský a kol., 2007; Ben, Peter, Thomas, Walsh, 2008).

Tabulka č.1: Definice IA

<p>Prokázaná IA</p> <p>histo/cytopatologický průkaz vláken (hyf) získané aspirací tenkou jehlou nebo z biotického 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.</p>
<p>Pravděpodobná IA</p> <p>přítomnost alespoň jednoho z rizikových faktorů hostitele a jednoho mikrobiologického kritéria a jednoho velkého (nebo dvou malých) klinických kritérií s klinickými projevy místa (orgánu) odpovídající infekci</p>
<p>Možná IA</p> <p>přítomnost alespoň jednoho z rizikových faktorů hostitele a buď jeden mikrobiologický faktor nebo jeden velký klinický faktor (nebo dva malé) odpovídající infekci</p> <p>(Bartáková, Drgoňa, Haber , Hamal, Tetkovský a kol., 2007)</p>

Tabulka č. 2: Faktory používané v kritériích pro diagnózu IA

<p>Rizikové faktory hostitele/pacienta</p> <ul style="list-style-type: none">• leukocyty $< 0,5 \times 10^9 / l \geq 10$ dní• perzistující horečka > 96 hodin refrakterní na adekvátní ATB léčbu• tělesná teplota > 38 °C nebo < 36 °C + jeden další faktor:<ul style="list-style-type: none">- 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
<p>Mikrobiologické faktory</p> <ul style="list-style-type: none">• pozitivní kultivace nebo mikroskopický průkaz <i>Aspergillus spp.</i> ze sputa nebo BAL

- pozitivní kultivace nebo mikroskopický průkaz *Aspergillus spp.* Z aspirátu ze sinusů

- pozitivní antigen – GM – v BAL, likvoru, krvi

Klinické faktory

- musí být relevantní místo 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* – příznak postižení dolních dýchacích cest (kašel, bolest na hrudi, hemoptýza, dušnost), fyzikální nález pleurálního šelestu, atypické plicní infiltráty nesplňující „velká“ kritéria, pluerální 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* – příznak 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

(Bartáková, Drgoňa, Haber, Hamal, Tetkovský a kol., 2007).

2.11 Mortalita IA

Mortalita IA je vysoká a závisí od stavu základního onemocnění pacienta, lokalizace infekce, včasnosti správné diagnózy, použité profylaxi a léčbě. Kvůli chybějícím jednoznačným kritériím a různé metodice je někdy těžké porovnat jednotlivé studie. Trendy mortality kopírují trendy výskytu IA. V roce 1981 byla incidence IA 0,1/100 000 obyvatel, v roce 1996 0,4/1000 000 obyvatel. Přehled 50 klinických studií vykonaných do roku 1995 popisuje celkovou mortalitu IA 58%. Věk samotný nehraje významnou úlohu, mortalita pacientů do 20 roků je 68 % a nad 20 roků 52-59 %. Pacienti po transplantaci krevetvorných buněk měli mortalitu 86,7 %, pacienti s leukémií měli mortalitu 50 % (*cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*). Typ přípravného režimu při alogenní transplantaci – myeloablativní či nemyeloablativní – neovlivnil signifikantně mortalitu pacientů s IA.

Místo infekce je významným prediktorem mortality – pacienti s plicní aspergilózou umřeli v 59 - 86 % případů, pacienti s aspergilózou CNS v 88 - 99 %, pacienti s kožní formou aspergilózy měli jen 25 % úmrtnost. Neutropenický pacienti nemají automaticky vyšší mortalitu než nonneutropenický pacienti s IA. Mortalita nonneutropenických pacientů s IA byla 89 % a u neutropenických pacientů s IA 60 % (*cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

Použití moderní diagnostiky, účinné profylaxe, poznání a ovlivňování rizikových faktorů vede v některých případech ke snížení mortality na IA (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.12 Terapie aspergilózy

Terapie aspergilových infekcí je svízelná. Jedním z problémů je relativně pozdní stanovení diagnózy, další je ten, že v některých případech se terapie neobejde bez chirurgického zákroku, který může být provázen těžkým krvácením v důsledku fibrinolytické aktivity aspergilových exoenzymů.

Na základě reprezentativních klinických studií byly stanoveny léčebné postupy IA. Lékem první volby u prokázané IA je VORI. V randomizované srovnávací nezaslepené studii, VORI (N = 144) versus c-AmB (N = 133), hodnocené nezávislým panelem odborníků VORI poprvé dosáhl lepších

výsledků než dosud užívaný c-AmB. Ve skupině VORI byla celková odpověď 52,8 %, v rameni s c-AmB pak 31,6 %. VORI dosáhl statisticky významně lepších výsledků i z hlediska přežití: 70,8 % proti 57,9 %. Jako lék druhé volby se nejčastěji používá: ABLC, ABCD, CASPO, c-AmB, ITRA, POSA (Haber, 1995; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007).

2.13 Diagnostické možnosti systémových mykóz

Přístup klinika při podezření na mykotickou infekci spočívá zejména ve zhodnocení rizikových faktorů. Zásadní roli v hodnocení hraje samozřejmě základní onemocnění a léčebný postup, který různou měrou ovlivní imunitní stav hostitele.

Jelikož není žádný specifický klinický projev, který by svědčil pro infekci mikroskopickými houbami, je důležité na tyto infekce myslet a provést řadu rutinních, ale i speciálních vyšetření (Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007).

Tabulka č. 3: Diagnostické možnosti IFI

Metody	Techniky	Poznámka
Zobrazovací	<ul style="list-style-type: none"> ●rtg nativní ●hr- CT (spirální CT) 	<ul style="list-style-type: none"> ●nativní rtg plic: vysoká falešná negativita + nespecifické obrazy
Odběry vzorků	<ul style="list-style-type: none"> ●BAL ●stěry, výplachy, odběry z tkání a tělesných tekutin ●bioptické – tenkou punkční peroperačně jehlou, 	<ul style="list-style-type: none"> ●mikroskopické, kultivační, cytologické, sérologické vyšetření... ●sputum, moč, stěry kožní, peritoneální tekutina, operační rány, drény ●plíce, játra, sval, kosti...
Kultivační	<ul style="list-style-type: none"> ●hemokultura 	<ul style="list-style-type: none"> ●opakované odběry

Sérologické	●antigeny (ELISA)	●aspergily:galaktomanan, ●panfungální – glukan ●kandidy: mannan
	●protilátky	●pouze u kandid
Molekulárně biologické	●PCR ●FISH	●krev, likvor, sputum, BAL

(Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007).

2.14 Možnosti invazivně získat materiál k průkazu IA

Cesta k potvrzení diagnózy IA histologickým a kultivačním vyšetřením bývá riskantní a vyžaduje použití invazivních metod. Vhodný bioptický materiál tak není ve většině případů k dispozici. Rizika invazivních procedur často převažují nad možným přínosem. Jakýkoliv diagnostický výkon u těžce imunosuprimovaných pacientů může být riskantní. Četnost diagnostických invazivních procedur se liší mezi centry, ve kterých jsou riziková pacienta léčení. 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 zvažena (Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007).

2.14.1 Plíce

● BAL

Získaný materiál je vhodný k vyšetření sérologickému (pozitivita GM se objeví dříve než v séru), PCR, kultivačnímu a cytologickému.

BAL je standardním vyšetřením v diagnostice nozokomiální pneumonie a s umělou plicní ventilací asociované pneumonie. Takto získaný materiál odráží složení bronchiálního sekretu v místě odběru. Podle obecných doporučení má být BAL provedena před zahájením či změnou ATB terapie. To však u nejrizikovějších pacientů není vždy možné vzhledem k nutnosti zahájit empirickou antimikrobiální terapii ihned po stanovení diagnózy pneumonie.

- Bronchoskopická transbronchiální punkce s aspirací jehlou nebo s použitím bioptických kleští

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

Metoda umožňuje biopsii přímo ze suspektního ložiska. Je tedy teoreticky vhodná pro diagnózu aspergilové tracheobronchitidy.

- **Transparietální punkční biopsie a aspirace tenkou jehlou**

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

- **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 biotický vzorek za cenu operačního rizika.

- **Diagnostická biopsie cestou videoasistované torakoskopie**

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

- **Materiál získaný při plicním resekčním výkonu**

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

Rozsah výkonu a provedení závisí na velikosti a lokalizaci ložiska, funkčním stavu plic a celkovém stavu pacienta (*Hofmeister, Czerlanis, Forsythe et al., 2006; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007*).

2.14.2 Paranasální dutiny

- **Punkce paranasálních dutin**

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, histologickému, cytologickému, molekulárně biologickému a sérologickému (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.14.3 Mozek

- **Punkce mozkomíšního moku**

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

Přímý záchyt aspergilových hyf je sice velmi nepravděpodobný, avšak vyšetření je významné diferenciálně diagnosticky. Pro diagnostiku IA CNS nabývá na významu vyšetření GM 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 (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

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

Bioptické metody se liší podle lokalizace. U těchto vzácnějších lokalizací IA saháme k bioptickým vyšetřením častěji – zvláště z diferenciálně diagnostických důvodů (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.15 Zobrazovací metody v diagnostice IA

2.15.1 RTG

Mezi hlavní nálezy na RTG hrudníku při invazivní plicní aspergilóze patří – mnohočetná ložiska, ostře ohraničené uzly, bronchopneumonie, rozpadové dutiny, pleurální výpotek, plicní infarkt, oboustranné i jednostranné nálezy, normální nález (pozitivní často až histologie ante mortem).

RTG snímek hrudníku je sice rutinním vstupním vyšetřením, avšak jeho diagnostický přínos při podezření na plicní mykózu je relativně malý.

Morfologie RTG nálezu je nescifická a velmi různorodá, patologický nálezu se často objevuje až pozdě (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007*).

2.15.2 CT

Zásadní přínos CT oproti RTG vyšetření potvrdily i výsledky srovnávání prostých RTG snímků s CT, bronchoalveolární laváží a klinickým průběhem. CT vyšetření proti prostému RTG má významně vyšší senzitivitu, vyšší negativní predikční hodnotu a i významně vyšší přesnost nálezu. CT vyšetření je také přínosnější pro diagnózu mykotické infekce, potvrzené BAL.

Morfologie CT nálezu u rizikových nemocných s angioinvasivní aspergilózou plic je natolik charakteristická, že na jejím základě lze vyslovit velmi silné podezření na plicní aspergilózu a podle současných kritérií diagnostické jistoty je tento nálezu podkladem „pravděpodobné“ diagnózy (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007*).

2.16 Histologické vyšetření

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

Rozhodnutí provést u velmi často rizikových pacientů biopsii z hlubokých vnitřních orgánů je natolik závažné, že vzorek musí být maximálně správně vyšetřen (*Munoz, Guinea, Bouza, 2006; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007*).

2.17 Mykologické vyšetřovací metody

Základem úspěšného mykologického vyšetření je kvalifikovaný odběr vhodného biologického materiálu, včasný transport materiálu do laboratoře a jeho uchování za vhodných podmínek. Odběr materiálu na průkaz vláknitých mikromycet je poměrně problematický. Ideální jsou vzorky odebrané přímo z podezřelého ložiska invazivními technikami. V případě, že není tato možnost, materiál může být odebrán z postižené oblasti například pomocí BAL při postižení plic, výplachem z dutin a podobně. Při malém množství získaného materiálu nebo hrozí-li vyschnutí, je vhodnější odebrat materiál přímo do tekutého kultivačního média nebo sterilního fyziologického roztoku. Je důležité,

aby byly vzorky dodány do laboratoře co nejrychleji a v případě nutnosti byly uchovávány při 4 °C a nebo při pokojové teplotě, pokud byl materiál odebrán do kultivačního média (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007*).

2.17.1 Mikroskopické vyšetření

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 potvrdit mykotickou etiologii, avšak nelze obvykle patogen zařadit do rodu a druhu, lze pouze stanovit skupinovou diagnózu.

Mikroskopické vyšetření je zásadně přínosné v diferenciální diagnostice aspergilózy. Typickým nálezem pro aspergilózu je nález širokých septovaných hyf s větvením do tvaru V.

Někteří mykologové upřednostňují fluorescenčně mikroskopické metody, kdy stěny houbových elementů obarvené fluorescenčním barvivem září v dopadajícím světle fluorescenčního mikroskopu (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007*).

2.17.2 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 (cit.: *Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

K izolaci mikromicet se nejčastěji používá Sabouraudovo médium, selektivní a diagnostická média (Czapek-Dox) jsou pak využívána spíše při identifikaci narostlých kultur. Materiál může být očkovan také do tekutých médií.

Nárůst kolonie aspergilů může být očekáván za 24 - 48 hodin u druhu *Aspergillus fumigatus* nebo *Aspergillus flavus*. Některé druhy rostou pomaleji a také u léčených pacientů je očekáván pozdější nárůst. Kultivace bývá ukončena obvykle po 10 - 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 (Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007).

2.17.3 Stanovení citlivosti mikromycet k ATB

Celosvětově respektovaná CLSI schválila v roce 1998 dokument M 38A, který standardizuje způsob provádění testů citlivosti pro vláknité mikromicety (cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007). Jedná se o metodu kvantitativní, diluční, poskytující možnost stanovit MIC a umožňující dle hodnoty MIC zařadit testovaný izolát do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD), rezistentní (R).

Pro běžné rutinní použití a poměrně malý počet testovaných kmenů je tato metoda pracná i finančně náročná.

V současné době jsou na trhu diagnostické proužky s flukonazolem, ketokonazolem, itrakonazolem, vorikonazolem, amfotericinem, flucytozinem.

Metodika Etestu umožňuje stanovit MIC antimykotik podávaných v kombinaci. Účinek této kombinační terapie je hodnocen pomocí FICI. FICI je stanoven jako součet poměrů MIC antimykotik testovaných v kombinaci a samostatně (Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007).

2.18 Nekultivační diagnostické metody

Časně zahájena cílená antimykotická léčba, která však vyžaduje časně stanovení co možná nejpřesnější diagnózy, je jedním z klíčových faktorů zlepšujících prognózu nemocných s IA. Konvenční diagnostické přístupy bohužel velmi často selhávají a to jak ve své senzitivitě, tak časnosti stanovení definitivní prognózy.

Tyto obtížnosti v diagnostice IA proto v průběhu posledních několika let vedly k rozvoji nekultivačních diagnostických metod.

Tyto postupy můžeme rozdělit na dvě skupiny: **1. metody sérologické** – vyžadující detekci antigenů, protilátek nebo metabolitů aspergilových kmenů a **2. metody molekulárně genetické** – detekující NK aspergilů.

Ze všech nekultivačních metod má v současné době jednoznačně definované a zásadní místo v diagnostice IA sérologický test využívající detekci GM. 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 diagnostice IA zatím použít v běžné rutinní praxi (Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007).

2.19 Sérologické markery IA

2.19.1 GM

Kmeny aspergilů uvolňují při svém růstu do okolí exoantigeny, které jsou poté detekovatelné v malém množství v tělesných tekutinách. V roce 1978 Lehmann a Weiss našli v séru imunokopromitovaných laboratorních zvířat infikovaných kmeny aspergilů a následně také v séru a moči pacientů s IA antigen, který byl poté identifikován jako GM (*cit.: Weiss, Lehman, 1979*).

GM je termostabilní heteropolysacharid buněčné stěny aspergilů. Molekula GM o velikosti 25 - 75 kDa se skládá z neimunní mananové korové části a imunoreaktivních bočních řetězců zakončených galaktofuranozylovými jednotkami. In vitro studie ukazují, že různé kmeny aspergilů uvolňují různá množství GM, klinická závažnost této souvislosti však není významná. Na druhou stranu vedle aspergilových kmenů uvolňují GM také kmeny penicilií a při invazivní infekci tímto patogenem může být GM v séru také detekován. Kromě toho je to fáze růstu hyf, mikroprostředí, ve kterém probíhají infekce, imunitní stav jedince, stav renálních funkcí a antimykotická léčba, které ve svém konečném bodě mohou ovlivnit definitivní množství GM v cirkulaci (Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Haber, Mallátová, Kocmanová, 2007; <http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/aspergillus/aspergillosis.htm>).

2.19.2 Detekce galaktomananu

Pro detekci GM je možno použít několik imunochemických metod – latexovou aglutinaci, radioimunoanalýzu a sendvičovou ELISA., které se liší detekčním limitem i senzitivitou. Komerčního využití dosáhly pouze dvě – latexová aglutinace (Pastorex Aspergillus, BioRad, France) a sendvičová ELISA (Platelia Aspergillus, BioRad, France). Oba komerční sety využívají pro detekci králičí monoklonální protilátku EB-A2, která rozpoznává β -(1-5) vázané

zbytky na molekule GM. Pro pozitivitu testu je nezbytná přítomnost minimálně 4 těchto epitopů.

Latexová aglutinace se ještě místy používá, zvláště tam, kde je vyšetření prováděno spíše příležitostně. V rutinní diagnostice je v současné době nahrazena sendvičovou ELISA metodou. Tato metoda detekuje větší počet nemocných s IA a také pozitivita při použití této metody bývá častější. Reakce je semikvantitativní a její výsledek je udáván jako index positivity (IP) – poměr mezi naměřenou optickou denzitou a optickou denzitou kontrolního séra obsahujícího přibližně 1ng GM/ml. Jako pozitivní se označuje vzorek s $IP > 0,5$ a jako pozitivní pacient pak nemocný s více než 2 po sobě jdoucími pozitivními odběry.

Pravidelný a rutinní monitoring GM tedy umožňuje zkrátit časový interval do stanovení diagnózy IA. Je však zřejmé, že pravděpodobnost časně positivity GM bude ovlivněna frekvencí prováděných odběrů a hodnotou zvoleného cut - off IP.

GM je také důležitý marker léčebné odpovědi IA. V prvních dvou týdnech klinický obraz ani nález na HRCT nemůže sloužit k časnému zhodnocení IA na léčbu ATM. Při úspěšné léčbě IA dochází k poklesu hladin GM. Pokud ovšem léčba selhává, dochází k nárůstu hladin GM. Za určitých okolností se můžeme setkat s paradoxním vzestupem GM IP i přes dobrou léčebnou odpověď infekce. K tomuto vzestupu může dojít při současném závažném renálním selhání a v prvních několika dnech léčby echinokandiny (*Weiss, Lehman, 1979; Wheat, 2005; Maertens, Theunissen, Lodewyck et al., 2007; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; <http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/aspergillus/aspergillosis.htm>*).

2.19.3 Využití detekce GM pro diagnózu IA

Studie, sledující detekci GM jako markeru IA u nemocných s rizikem vzniku této infekce ukázaly, že Platelia Aspergillus test má vysokou specificitu pohybující se od 81 - 100 %. Extrémně vysoká je také NPV testu, která je v absolutní většině studií nad 95 % (cit.: *Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*). Negativní výsledek testu tedy s velmi vysokou pravděpodobností vylučuje IA a FN jsou vzácné.

Na druhou stranu senzitivita a PPV jsou slabými místy tohoto testu. Senzitivita testu v různých pracích značně kolísá a to od 30 - 100 % a velmi podobně je tomu i u PPV, která se pohybuje od 50 do 100 % (cit.: *Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*). Přímé porovnávání výsledků jednotlivých studií je však velmi obtížné, protože oba dva zmiňované parametry mohou být ovlivněny celou řadou faktorů (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.19.4 Faktory ovlivňující senzitivitu testu

- **Typ a závažnost imunoprese**

Před pár lety publikovaná metaanalýza studií sledujících tento problém poukázala na značné rozdíly v senzitivě metody v závislosti na studované populaci nemocných. Zatímco senzitivita testu pro nemocné s hematologickou malignitou byla 70 %, pro nemocné po transplantaci orgánu byla jen 22 %. Tyto výsledky potvrdily fakt, že test je více přínosný pro nemocné s nádorovým onemocněním než pro jiné skupiny pacientů. Ale také mezi onkologickými pacienty lze najít významné rozdíly. Ve studiích, do kterých bylo zařazeno velké procento pacientů s „low-risk“ neutropenií (solidní tumory, lymfomy, autologní transplantace krvetvorné tkáně), je senzitivita nižší než ve studiích s vysoce rizikovými pacienty (alogení transplantace krvetvorné tkáně, akutní leukémie) (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

- **Manifestace aspergilové infekce**

Manifestace IA 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 imunoprimovaných až po ABPA u hypersenzitivních nemocných. Je zřejmé, že přechod antigenů (včetně GM) do cirkulace se bude u různých stupňů angioinvasivní formy lišit. Zatímco lokální nekrotizace plicního parenchymu u angioinvasivní formy bude průchod GM usnadňovat, u lokalizovaných nebo ohraničených forem aspergilové infekce (tracheobronchitida u pacientů po transplantaci plic nebo ohraničený aspergilom) bude průnik GM menší nebo dokonce žádný a výsledek detekce Platelia Aspergillus testu poté bude negativní.

• Předchozí podání ATM

Podávání ATM s efektem na kmeny aspergilů léčebně nebo profylakticky omezuje velikost a rychlost nárůstu mykotické nálože, stejně tak jako intenzita její angioinvaze. Tento mechanismus je pak pravděpodobně příčinou snížení 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 ATM s efektem na vláknité houby pouze 20 % ve srovnání se senzitivitou 80 % ve skupině pacientů bez profylaxe (*cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

• Cut-off

Velice důležitým faktorem ovlivňující senzitivitu testu je hodnota cut-off IP, tedy hodnota IP, od kterého je vzorek označen jako pozitivní. Maertens et al a i další autoři prokázali, že snížení cut-off na hodnotu 0,5 výrazně zvýšilo senzitivitu testu při současném jen mírném zhoršení jeho specifity (*cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*). Toto snížení cut-off IP je důležité především u nemocných, kteří dostávají profylakticky ATM s efektem na vláknité houby a u nemocných po transplantaci krvetvorné tkáně s GvHD léčenou imunosupresivou. U obou těchto skupin pacientů je mykotická nálož nízká a proto při užití vyšších hodnot cut - off IP by tito nemocní byli falešně označeni za negativní.

• Frekvence prováděných odběrů

Frekvence a pravidelnost odběrů krve pro detekci GM významně ovlivňují senzitivitu metody a její schopnost časně detekce IA. Zatímco v práci Maertense et al byl průměrný počet odběrů na epizodu 11,2, ve studii Herbrechta et al pouze 4,1 (*cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*). Senzitivita metody pak byla v první práci 89,7 %, ve druhé pak pouhých 31,6 %. Progrese IA 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 poté může vést ke zmeškání okamžiku, kdy hodnota IP těsně přesáhne 0,5 a vzorek se stane časně pozitivním. Obecně se doporučuje provádět pravidelný rutinní screening rizikových nemocných (nemocní s akutní leukemií nebo po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně) 2 - 3 krát týdně. V rizikových obdobích (febrilní neutropenie nereagující na antibiotickou léčbu, nález infiltrátů na HRTC plic) i

častěji. Více než jeden odběr za den (při použité cut - off 0,5) již senzitivitu testu dále nezvýší (Maertens, Eldere, Verhaegen et al., 2002; Herbrecht, Letscher-Bru, Oprea et al., 2002; Marr, Balajee, McLaughlin et al., 2004; Maertens, Theunissen, Verbeken et al., 2004; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007).

2.19.5 Faktory ovlivňující PPV testu

Druhým slabým místem testu je PPV testu (pozitivní výsledek správně označí nemocného s IA). Opět existuje celá řada 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 IA a těmi jsou především nemocní s akutní leukemií a pacienti po alogenní transplantaci krvinek. U ostatních skupin pacientů, u nichž je incidence IA nízká (nemocní s ostatními hematologickými malignitami a nebo po autologní transplantaci krvinek, pacienti po transplantaci solidních orgánů), je významně nižší i PPV testu.

Druhým faktorem ovlivňujícím PPV a specifitu Platelia Aspergillus testu je **kritérium, které označí pacienta jako pozitivního**. Maertens et al využili testu k prospektivnímu sledování nemocných s vysokým rizikem IA a prokázali, že jak při použití cut-off 1,0, tak 0,5 specifita testu významně narůstá, pokud je nemocný označen za skutečně pozitivního až při pozitivitě 2 vzorků jdoucích po sobě (cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007).

Možnost falešných pozitivit je nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím PPV testu. Izolované falešné positivity mohou být způsobeny kontaminací vzorku při odběru nebo při zpracování vzdušnými sporama aspergilů nebo penicilií. Tyto izolované falešné positivity 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 - 48 hodin).

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 nutnost v maximální míře tyto faktory u pravidelně nemocných eliminovat.

Příčiny falešných pozitivit:

- **Intravenózní podání penicilinových ATB**

Aplikace penicilinových ATB – piperacillinu, piperacilinu/tazobaktamu, některých amoxicilin/klavulanátů a ampicilinu – je jedním z nejčastějších příčin falešné positivity při detekci GM. Důvodem je pravděpodobně kontaminace antibiotik GM při jejich semisyntetické výrobě. Tento proces využívá kmenů penicilií a GM z jejich buněčných stěn se pak pravděpodobně dostává do finálního výrobku. Množství kontaminujícího GM kolísá jednak mezi jednotlivými ATB, ale také mezi jednotlivými šaržemi jednoho výrobku a proto intenzita falešné positivity při podávání těchto preparátů kolísá. Vzhledem k odlišné kinetice kontaminujícího GM od kinetiky vlastního ATB dochází při podávání léku ke kumulaci GM a tak i nárůstu měřeného IP v séru nemocných. Navíc po ukončení podávání ATB falešná pozitivita testu vzhledem k pomalejší eliminaci kontaminujícího GM přetrvává téměř ještě 6 dnů.

Eliminace FP při podávání výše zmíněných preparátů je složitá. Ideální je vyloučení používání těchto ATB 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 ATB, kdy by měla být koncentrace kontaminujícího GM nejnižší. Avšak vzhledem ke zmíněné kontaminaci GM lze tohoto mechanismu využít pouze v prvních 2 dnech podávání léku, neboť následně je i ustálená koncentrace kontaminujícího GM vysoká. Falešné positivity lze minimalizovat při podávání piperacilinu/tazobaktamu testováním jednotlivých šarží a používáním šarží GM negativních.

Přítomnost GM nebyla potvrzena v celé řadě dalších ATB (cefalosporiny, chinolony, vankomycin, karbapenemy) a podávání těchto léků nemocným nevedlo k rozvoji falešných pozitivit.

• Aplikace roztoku Plasma – Lyte

Hage et al publikovali FP při detekci GM z tekutiny získané BAL při současném použití infuzního roztoku Plasma-Lyte (Baxter) jako lavážní tekutiny (cit.: Bartáková, Drgoňa, Haber, Hamal, Tetkovský a kol., 2007). Vysoký IP byl zjištěn také při testování jednotlivých šarží roztoku. Příčinou FP 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 však jeho hlavní použití) po distribuci v cirkulaci mohlo množství kontaminujícího GM způsobit FP. Avšak intravenózní podání roztoku Plasma - Lyte je vedle penicilinových ATB jednou z hlavních příčin FP. Řešením této příčiny je používání jiných infuzních roztoků pro hydrataci nemocných, u kterých probíhá rutinní screening.

• Průnik antigenu z GIT

GM ze stěny aspergilů a penicilií byl prokázán v celé řadě potravin a nápojů a je běžně nalézán ve stolici. 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 FP u nemocných s mukozitidou a současně alespoň částečně zachovaným příjmem stravy. V klinické praxi však tato situace u onkologických nemocných není příliš častá. Na druhou stranu však právě průchod polysacharidů ze stěny bakterií *Bifidobacterium spp.* (zkříženě reagují s protilátkou EB - A2 použitou v Platelia Aspergillus testu) ze zažívacího traktu přes nezralou mukózu je jednou z hlavních příčin FP Platelia Aspergillus kitu u předčasně narozených dětí.

• Infekce jinými patogeny

Vzácnou příčinou FP 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*. Tyto infekce jsou naštěstí jen velmi raritní.

• Ostatní příčiny FP

V literatuře lze najít celou řadu možných příčin FP Platelia Aspergillus testu. Tyto případy však nejsou potvrzeny více autory a jejich mechanismus není většinou jednoznačně vysvětlen. Jsou popsány FP testu při autoimunitních stavech a přítomnosti paraproteinu, při dialýze, při použití cyklofosfamidu a při

kontaminaci vzorku vatou (*Ansorg, Boom, Rath, 1997; Adam, Auperin, Wilquin et al., 2004; Hage, Reynolds, Durkin et al., 2007; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.19.6 1,3- β -D-glukan

1,3- β -D-glukan je dalším markerem v nekultivační diagnostice invazivních mykotických infekcí. 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. Glukan se ovšem vylučuje o něco později než GM a jeho koncentrace je nižší. 1,3- β -D-glukan není součástí lidských, bakteriálních ani virových buněk, ale je vylučován do séra pacientů s IFI (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.19.7 Detekce 1,3- β -D-glukanu

Pro laboratorní diagnostiku se využívá schopnosti 1,3- β -D-glukanu reagovat s lyzátem améboctů kraba *Limulus polyphemus* nebo *Tachypleus tridentatus*.

V současné době ovšem nejsou dostatečné zkušenosti s využitím glukanu jako jednoznačného markeru IFI v běžné klinické praxi. Stanovení 1,3- β -D-glukanu by však mělo mít své místo v panelu pro diagnostiku mykóz – ať už při verifikaci infekcí vzácnými mykotickými agens nebo třeba jako konfirmace FP, zejména GM (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.20 Molekulárně genetické metody

Genetické metody jsou v diagnostice IA zaměřené na detekci aspergilových NK v klinických vzorcích. Tyto metody přispívají ke zkvalitnění diagnostiky, z pohledu klinických lékařů zejména k rychlejšímu objasnění etiologie infekce, zahájení i monitorování cílené ATM léčby. 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, což komplikuje vzájemné porovnávání (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Hamal, 2007*).

2.20.1 Vyšetřovaný materiál

Jedním z vyšetřovaných klinických materiálů 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. Bylo však dokumentováno, že se stoupajícím objemem odebrané krve se zvyšuje i pravděpodobnost záchytu DNA. 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. Při odběru plné krve je nutné vyloučit inhibiční vliv heparinu a citrátu na průběh amplifikace, EDTA tento účinek nemá. Pravděpodobnost farmaky podmíněných negativních výsledků lze snížit zařazením interní kontroly amplifikace, například podáním 10 pg myší DNA ke zkoumanému vzorku.

Buchheidt a Hummel uvádějí, že průkaz DNA z BAL je citlivější než z krve, především pro primární lokalizaci IA v plicní tkáni (*cit.: Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*). Aspergily lze také detekovat a identifikovat i v bioptických vzorcích, avšak s biopsií plic je spojené vysoké riziko vzniku pneumotoraxu. Klasická kultivace zde bývá obvykle neúspěšná, proto je použití molekulárně

genetických technik v tomto případě zvláště výhodné (*Hope, Walsh, Denning, 2005; Halliday, Wu, James, 2005; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.20.2 Izolace DNA

Lýza buněčné stěny hub se provádí různými způsoby, nejčastěji mechanicky skleněnými perličkami nebo enzymaticky rekombinantní lytikázou. Pro získání čisté DNA se využívá kromě klasické, ale pracné, fenol-chloroformové extrakce, i řada komerčních souprav, například QIAmp Tissue Kit, DNA Lego Kit nebo FastDNA Kit. Při porovnání různých způsobů však byly zjištěny rozdíly v množství a v kvalitě DNA, které mohou ovlivňovat výsledky detekce. Důležitá je také skutečnost, že v průběhu každé extrakce dochází ke ztrátám DNA. Účinnost může být zvýšena používáním souprav pro automatizované izolace vysoce čisté DNA, snižujících i riziko kontaminace (*Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*).

2.20.3 Amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí

- **PCR** je amplifikační metoda, která slouží pro detekci houbového agens. Tato metoda se vyznačuje vysokou citlivostí (> 92 %) a NPV (> 99 %) PCR a také poměrně dobrou specificitou (cit.: *Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007*). V principu jde o cyklické množení úseku dvojlátkové DNA, vymezeného dvojicí oligonukleotidů (primerů), pomocí tepelně odolného enzymu DNA-polymerázy. Výhodou je především rychlost, možnost zpracování řady materiálů, které jsou často obtížně kultivovatelné. PCR je vysoce citlivá, vyžaduje jen nepatrné množství vstupní DNA, proto je i náchylná ke kontaminaci. Je důležité mít na paměti, že pouhá přítomnost ATM v krvi snižuje záchytnost DNA PCR, což spolu se ztrátami při extrakci může vést k FN výsledkům.

- **Nested PCR.** V praxi jsou často využívány citlivější modifikace PCR. Jednou z nich je uhnížděná (nested) PCR, jejímž principem je použití dvou PCR za sebou. V prvním kole je amplifikován vybraný úsek DNA. Vzniklý produkt je poté podroben druhé PCR s novými primery, které vymezují kratší úsek DNA uvnitř úseku namnoženého v první reakci.

- **Real - time PCR** je v poslední době široce používaná metoda. Jedná se o PCR v reálném čase, kterou lze využít nejen ke kvalitativnímu, ale také ke

kvantitativnímu stanovení. Kvantitativní stanovení neznámých vzorků je umožněno za přispění kvantitativních standardů.

Metoda je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované NK. Výsledkem měření je křivka, z níž lze odvodit původní množství DNA ve vzorku.

Po technologické stránce se nejvíce v rámci real - time PCR využívají specifické sondy – hydrolytické a hybridizační. Z přístrojů se často používají - TaqMan a LightCycler. Jejich hlavní výhodou, oproti nested PCR, je průběh v uzavřeném systému, který minimalizuje riziko vzdušné kontaminace.

• **Identifikace aspergilů v klinických vzorcích.**

Postamplifikační detekční techniky umožňují identifikaci agens na úroveň druhu, dále mohou zvyšovat citlivost a specificitu 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 také analýzy teploty tání amplikonů.

PCR-ELISA - reakce se účastní dvě oligonukleotidové sondy. První, značená digoxigeninem, se naváže na specifické komplementární sekvence DNA, druhá je vychytávací značená biotinem. Vytvořený komplex DNA s oběma sondami se přenesse do jamek mikrotitrační destičky potažených streptavidinem, na který se naváže. Specifická hybridizace je detekována změnou barvy v jamce po přidání protilátky proti digoxigeninu značené křenovou peroxidázou a substrátu, podobně jako v klasické ELISA.

Princip **teploty tání** amplikonů spočívá v uvolňování fluorescenčního barviva při denaturaci fluorochromem obarveného dvouřetězcového amplikonu. Výsledkem měření je křivka teploty tání produktů, jejíž průběh závisí jednak na délce amplikonu, jednak na jeho sekvenci, protože úseky DNA bohaté na adenin a thymin tají při nižších teplotách než úseky, obsahující převážně guanin a cytosin. To umožňuje bližší identifikaci např. druhů aspergilů.

Z ostatních je z hlediska validity výsledku nejlepší volbou přímé sekvenování, dále se využívá APLP nebo RFLP, možné je i hodnocení SSCP

(Einsele, Hebart, Roller et al., 1997; Ascioğlu, Rex, Pauw et al., 2002; Loeffler, Hebart, Sepe et al., 1998; Adam, Merad, Antoun et al., 2005; Bolehovska, Plisková, Buchta et al., 2006; Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Hamal, 2007).

2.20.4 Amplifikace NASBA

Na principu cyklického množení produktu je založena také další specifická a vysoce citlivá metoda. NASBA, kterou lze amplifikovat RNA. V rutinní praxi se však velmi málo používá. 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 degradovaná.

Metoda se běžně používá ve virologii, recentně byl tímto způsobem monitorován i průběh IA u hematologických pacientů (Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007; Hamal, 2007).

Tabulka č. 4: Přehled amplifikačních metod

Typ amplifikace	Detekovaná NK	Typ reakce	Způsob identifikace
•PCR	•DNA	•Jednokolonová	•Sekvenování •Hybridizace se sondou
		•Nested PCR	•Southern blot •PCR-EIA
		•Real time PCR	•Restrikce endonukleázami •Délkový polymorfismus •Konfirmační polymorfismus
•NASBA	•RNA		

(Bartáková, Haber, Hamal a kol., 2007).

2.21 Shrnutí laboratorní diagnostiky invazivních mykóz

1. Laboratorní diagnostika invazivních mykóz – přínos vyšetření podle **rostoucí senzitivity**.

- mikroskopie
- kultivace
- stanovení antigenů galaktomannan, manan, glukuronoxylomannan
- 1,3- β -D-glukan
- PCR

2. Laboratorní diagnostika invazivních mykóz – přínos vyšetření podle **rostoucí specifity**

- kultivace z primárně nesterilních materiálů
- 1,3- β -D-glukan
- stanovení antigenů galaktomannan, manan, glukuronoxylomannan
- kultivace a mikroskopie z primárně sterilních materiálů (krev, likvor)

3. Laboratorní diagnostika invazivních mykóz – přínos vyšetření **podle časové náročnosti do získání výsledků**

- mikroskopie (minuty)
- 1,3- β -D-glukan (hodiny)
- galaktomannan, manan, glukuronoxylomannan (hodiny)
- PCR (kolem 24 hodin)
- kultivace (dny až týdny)

(Haber, Kocmanová, Mallátová, 2007).

3 Experimentální část

3.1 Charakteristika souboru

Vyšetřovaný soubor byl tvořen 94 pacienty (57 mužů, 37 žen, průměrný věk pacientů byl 55,81). Opakovanými odběry v čase bylo od těchto pacientů získáno 1 115 vzorků. Nejčastěji se jednalo o pacienty s diagnózou C 833, C 920, C 911, C 900 a C 811.

3.2 Použité metody

3.2.1 Průkaz galaktomannanového antigenu plísně rodu *Aspergillus*

Princip:

Na dně jamek je navázaná králičí monoklonální protilátka (EBA – 2 anti galactomannan m Ab). Na tu se z upraveného patientského séra váže galaktomannan. Komplex monoklonální protilátky a galaktomannanu reaguje s další protilátkou označenou enzymem (anti – galaktomannanová monoklonální protilátka). Obě reagenty se pipetují současně. Po inkubaci a promytí se pro zviditelnění reakce váže na tento komplex (Ab I – Ag – AbII) chromogen a barevná reakce se měří na fotometru.

Pracovní postup:

Příprava reagentů:

Promývací roztok:

ředíme 10x v destilované vodě (např. 100 ml konc. roztoku + 900 ml dest.vody)

Lyofilizované kontroly a kalibrátory:

rekonstituujeme v 1 ml apyrogenní vody, řádně promícháme a po 5 minutách inkubace rozdělíme do šroubovacích lahviček po 300 ul

TMB: roztok chromogenu a substrátového pufru mícháme v poměru 1:50 (např. na 16 jamek mícháme 80 ul chromogenu + 3 920 ul substrátového pufru TMB)

Příprava kalibrátoru, kontrol a patientských vzorků před vlastním stanovením:

Do malých šroubovacích lahviček nepipetujeme po 300 ul patientských sér (kalibrátor, negativní a pozitivní kontrola jsou již rozpipetovány a zpracovávají se stejně jako patientská séra). Do každé přidáme po 100 ul roztoku R7 a promícháme na Vortexu. Lahvičky vložíme do kádinky vystlané buničinou, na vařiči přivedeme k varu a vaříme při 100°C asi 3 minuty. Dojde k vysrážení bílkovin.

Následuje centrifugace za použití ultracentrifugy:

parametry: teplota 4°C

otáčky 10 000 g

čas 10 minut

Odklopíme víko centrifugy, víčko rotoru a vložíme lahvičky. Nasadíme víčko rotoru (zatlačit silou), zavřeme víko centrifugy a zmáčkneme tlačítko START. Po 10 minutách se centrifuga sama zastaví. Dojde k oddělení vyprecipitovaných bílkovin od supernatantu. Ten se dále zpracovává a proto je nejlépe ho ihned odebrat.

Postup stanovení:

1. Připravíme si potřebný počet jamek (pouze po osmi, protože nejdou dělit).
2. Zamícháme konjugát.
3. Do každé jamky ihned přidáme po 50 ul konjugátu.
4. Pipetujeme po 50 ul supernatantu negativní kontroly (R3) do 1. jamky, do 2. a 3. jamky supernatant kalibrátoru (R4), do 4. jamky supernatant pozitivní kontroly (R5) a od 5. jamky supernatanty patientských sér v duplikátech.
5. Jamky zakryjeme fólií a inkubujeme 90 minut v termostatu při 37°C.
6. Vyklepneme obsah jamek a promyjeme 5x 350 ul promývacího roztoku. Přebytečnou kapalinu vytřeme do buničiny.

7. Pipetujeme do každé jamky po 200 ul připraveného substrátu TMB s chromogenem.
8. Inkubujeme 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
9. Reakci zastavíme přidáním 100 ul ukončovacího roztoku do každé jamky.
10. Měříme intenzitu žlutého zabarvení na fotometru při vlnové délce 450 nm (program Genesis: absorbance 450 nm.prt).

Dokumentace, zpracování a hodnocení dat

Ze dvou absorbancí kalibrátorů vypočteme průměr Cut-Off.

Hodnocení se provádí formou indexu: $I = \text{absorbance pacientského vzorku} / \text{průměr Cut-off}$.

Negativní index je menší než 0,5

Pozitivní index je větší než 0,5

Diagnóza musí být potvrzena klinickým obrazem pacienta a jeho dalším vyšetřením.

Znaky analytické metody:

Senzitivita: 31,6 – 100 %

Specifita: 89,9 – 98,6 %

Manipulace s materiálem

Viz. Směrnice pro příjem, zpracování a expedici

Přístroje a pomůcky

- nastavitelná mikropipeta na objem 100, 300 ul
- míchačka Vortex
- kádinka
- vaříč
- ultracentrifuga
- promývací zařízení
- termostat
- fotometr

Reagencie:

R1: mikrotitrační destička s nedělitelnými stripy

R2: promývací roztok (10x koncentrovaný)

R3: negativní kontrola (lyof.)

R4: kalibrátor (lyof.)

R5: pozitivní kontrola (lyof.)

R6: konjugát

R7: ředící roztok na zpracování sér, kalibrátoru, kontrol

R8: TMB substrátový pufr

R9: chromogen

R10: ukončovací roztok

Spotřební materiál:

- žluté a modré pipetovací špičky na jedno použití
- šroubovací lahvičky o objemu 2 ml
- buničitá voda
- destilovaná voda

Poznámky:

- je nezbytně nutné dodržovat všechny instrukce uvedené v návodu
 - před použitím je třeba nechat všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu
 - před vlastním stanovením je nutné reagencie i naředěná patientská séra zamíchat
 - působení vlhkosti na jamky nebo kontaminace prachem nebo jinými částicemi má za následek degradaci antigenu, proto se nespotřebované jamky ihned vrací do fóliového sáčku se dvěma balíčky vysoušecího prostředku a sáček se znovu pevně uzavře.
 - přebytečný konjugát a substrát se nikdy nevrací do lahvičky s čistou reagentií
 - nedoporučuje se míchat substance ze souprav různých šarží
 - ke každé řadě stanovení je třeba použít novou kalibrační závislost
- (SOP, Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové).*

3.2.2 Detekce aspergilových NK metodou real – time PCR

Real – time PCR

Metoda je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu (u klasického PCR se detekuje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované NK. Data jsou tedy sbírána během celého PCR procesu na speciálních "termocyklerech" s optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce (http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf).

Detekce

Na přístroji LightCycler real – time PCR je cyklické změny teploty dosaženo pomocí vzduchu. Tento vzduch je zahříván vyhřívací spirálou, jejíž teplota je kontrolována pomocí termočlánků v tepelné komoře.

PCR reakce probíhá ve speciálních borokřemičitých kapilárách, které mohou obsahovat až 20 μ l reakční PCR směsi. Tyto kapiláry mají velký povrch vůči objemu, což zaručuje rychlé dosažení požadované teploty i uvnitř kapiláry.

Kombinace použití vzduchu a velký povrch kapiláry vůči objemu dovoluje jednotlivé PCR cykly dokončit za méně než 30 s. Kompletní PCR reakce, která je tvořena 30 - 40 cykly může být provedena za 20 - 30 minut.

Optická jednotka LightCycleru 1.5 detekuje fluorescenci ze špičky kapiláry. Fluorescence je měřena během PCR, vždy jednou během každého cyklu. Optická jednotka je tvořena 3 detekčními kanály, které měří emitující světlo ve 3 různých vlnových délkách a LED diodou, která slouží jako světelný zdroj. Modré světlo z LED (470nm) je soustředěno na příslušnou špičku kapiláry a je zde prováděna detekce vznikající fluorescence. Emitující fluorescenční záření je vedeno zpátky do optické jednotky, kde se nachází sada filtrů a zrcadel separující záření na základě její rozdílné vlnové délky. K detekci poté dochází na jednom ze tří kanálů. Data jsou ihned přenesena na obrazovku

počítače, což umožňuje sledování v čase. Až 32 kapilár může být umístěno v karuselu. Aktuální měřicí čas pro každou kapiláru je přibližně 20 ms (http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf).

Monitorování real – time PCR pomocí hybridizačních sond

Hybridizační sondy jsou jednou z možností, které se využívají k detekci a kvantifikaci DNA. Jedná se o dvě specifické oligonukleotidové sondy komplementární k určitému úseku cílové DNA. Základem je dvojice specifických hybridizačních sond označených rozdílnými fluorescenčními barvami: první sonda je označena na 3'konci a plní funkci donorové barvy; druhá sonda je označena na 5'konci, a slouží jako akceptorová barva.

Donor (fluorescein) je excitován modrým zářením ze zdroje a emituje zelené fluorescenční záření s mírně delší vlnovou délkou. Po přiblížení sond do těsné blízkosti emitovaná energie excituje akceptor (např. LCRed 640), který se nachází na druhé hybridizační sondě. Dochází k emisi fluorescenčního záření o jiné vlnové délce.

Tento přenos energie se nazývá - fluorescenčně rezonanční přenos energie (FRET). Jedná se o přenos závislý na vzdálenosti mezi excitovaným donorovým fluoroforem a jiným akceptorovým fluoroforem.

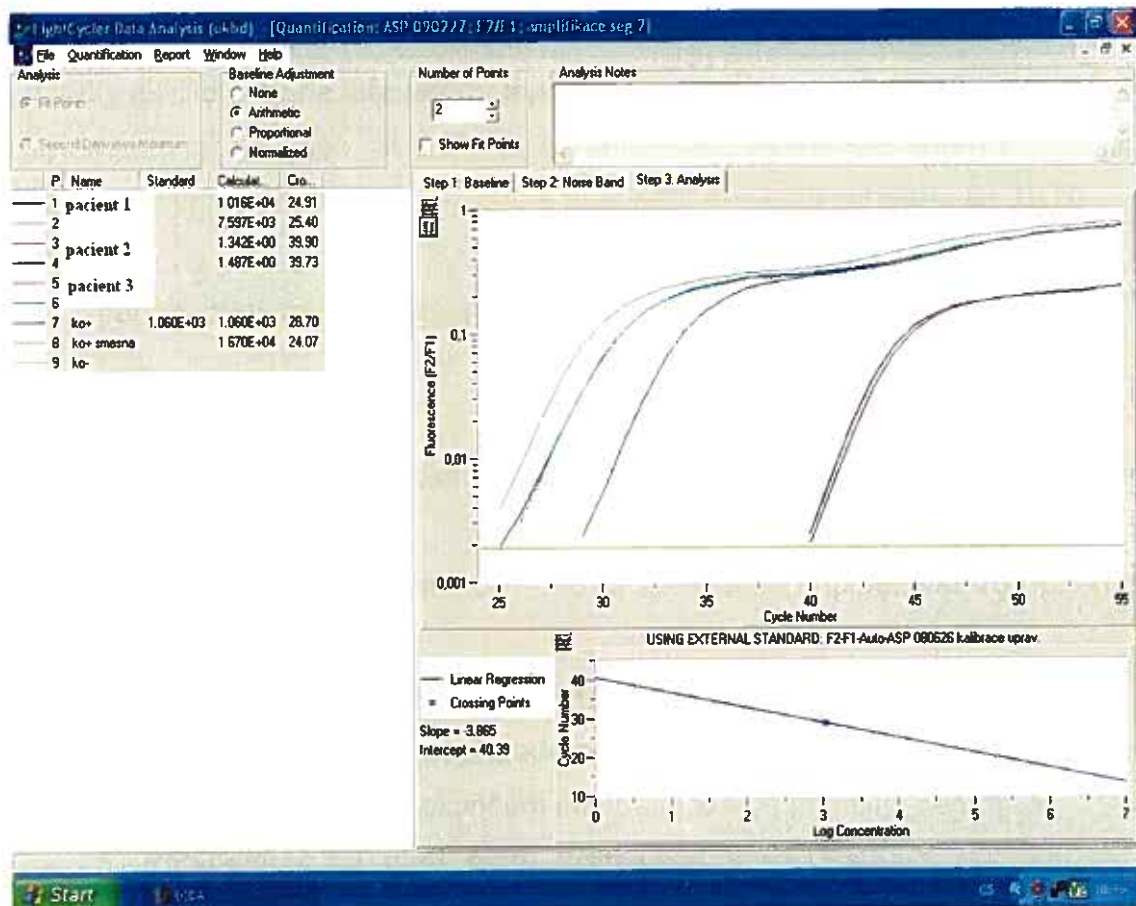
Intenzita emitovaného záření LC Red 640 je měřená na kanále 2 (640 nm) LightCycleru na konci každého annealingu. Čím více produktu, tím v dřívějším cyklu začne vzrůstat fluorescence nad určitou prahovou hodnotu → kvantita je odečítána za základě tzv. treshold cyklu.

Množství DNA je uváděno např. v kopiích/ml.

Přepočet: $(\text{kopie}/\mu\text{l}) \cdot \text{eluční objem } (\mu\text{l}) / \text{vstupní objem (ml)} = \text{kopie/ml}$

(http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf; SOP – Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králově).

Obrázek č. 19- Ukázka výsledku real-time PCR. 1. pacient je silně pozitivní, 2. pacient pozitivní a 3. je negativní. Vyšetření se provádí v dubletu a kvantitativní údaj je v kopiích/μl.



(Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové).

Izolace bakteriální DNA komerčním kitem QIAamp DNA Mini Kit (250) firmy QIAGEN – tkáňový protokol

Poznámky:

- Předehřát termoblok na 56 a 70 °C.
- Vzorky ekvilibrovat na laboratorní teplotu.
- Vytemperovat AE nebo sterilní vodu na laboratorní teplotu pro krok 11.
- Pokud je vyprecipitovaný AL, je nutné precipitát rozpustit zahřátím na 70 °C.

Materiál:

BAL, sputum, punktát, moč, stěry, likvor, hutné materiály atd.

Pracovní postup:

1. 1 až 1,5 ml biologického materiálu centrifugovat 10 minut při 13 000 otáčkách.
2. Supernatant odsát a k 30 – 50 µl sedimentu připipetovat 180 µl ATL pufru.
3. Připipetovat 20 µl QIAGEN proteinázy K, důkladný vortex.
4. Inkubace 3 hodiny, popřípadě přes noc při 56 °C, v průběhu inkubace občasný vortex, po skončení inkubace krátce přitočit v centrifuze.
5. Připipetovat 200 µl AL pufru. Vortexovat pulsy 15 s.
6. Inkubovat 10 minut při 70 °C, po skončení inkubace krátce přitočit v centrifuze.
7. Připipetovat 200 µl 96% etanolu, vortexovat v pulsech 15 s a krátce přitočit v centrifuze.
8. Přelit mix z kroku 6 na kolonku se sběrnou tubou.
9. Centrifugovat 1 minutu při 8 000 otáčkách. Kolonu umístit na novou sběrnou tubu – použitou sběrnou tubu odstranit.
10. Připipetovat na kolonu 500 µl AW1 pufru, centrifugovat 1 minutu při 8 000 otáčkách, kolonu umístit na novou sběrnou tubu – použitou sběrnou tubu odstranit.
11. Připipetovat na kolonu 500 µl AW2 pufru, centrifugovat 3 minuty při 13 000 otáčkách, sběrnou tubu odstranit.
12. Kolonu nasadit na 1,5 ml zkumavku. Připipetovat 200 µl AE pufru.

13. Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 otáčkách.

Pro dlouhodobé skladování vzorků uchovávat DNA při – 20 °C.

Příprava a skladování roztoků:

ATL – Přimo k použití. Skladovat při pokojové teplotě.

QIAGEN proteináza K – Přimo k použití. Skladovat při pokojové teplotě. Lze použít i proteinázu K (10mg/ml): 0,1 g proteinázy K rozpustit v 10 ml destilované vody. Jeden pracovní roztok skladovat v chladu při teplotě 2-8 °C. Ostatní pracovní roztoky skladovat při – 20 °C.

AL – Přimo k použití. Skladovat při pokojové teplotě.

96% etanol – Přimo k použití. Skladovat při teplotě – 20 °C.

AW1 – Přidat 125 ml 96% etanolu, promíchat. Skladovat při pokojové teplotě.

AW2 – Přidat 160 ml 96% etanolu, promíchat. Skladovat při pokojové teplotě.

AE – Přimo k použití. Skladovat při pokojové teplotě.

Průkaz a kvantifikace Aspergillus species DNA pomocí in-house real-time PCR na přístroji LightCycler 1,5 (Roche).

Primery z oblasti mitochondriálního genu, hybridizační sonda (značení fluorescein-LCRed 640), produkt 91 bp.

5 µl směsi + 5 µl tem plátové DNA (standardu nebo vody)		1 vzorek
Voda		0,6 µl
LC FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche)	1x	1,0 µl
(1a+1b) (10x)		
Mg²⁺ (25 mmol/l)	3 mmol/l	1,2 µl
primer P (Generi-Biotech) (10 pmol/µl)	0,8 umol/l	0,8 µl
primer/sonda P+LC (10 pmol/µl) (TIB-MOLBIOL)	0,8 umol/l	0,8 µl
sonda FI (10 pmol/µl) (TIB-MOLBIOL)	0,4 umol/l	0,4 µl
UNG (1U/µl)	0,2 U	0,2 µl

• Příprava mixu 1a+1b: přidat **60 µl LC FastStart Reaction Mix HybProbe 1b** (bezbarvé víčko) k **LC FastStart Enzyme 1a** (červené víčko).

• **Hybridizační sondy** – zásobní sondy – primer/sonda **P+LC** a sonda **FI** – jsou připraveny v pracovní koncentraci 10 pmol/ µl a uloženy v krabičce ASP při 20°C (**NEŘEDIT**). Používané sondy jsou uloženy v kovové tubě v chladu.

Program: ASPI.

Teplotní profil:

50 °C 5 minut

95 °C 10 minut

55x (95 °C 5 s; 60 °C 10 s; 72 °C 15 s)

72 °C 40 s

40 °C 15 s

Detekce:

Záznam fluorescence (LC Red 640 na kanálu F2) na konci každého annealingu (na konci 10 s při 60 °C).

Odečet: kanál F2/F1

(SOP, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové).

3.2.3 SOP pro kultivaci a identifikaci vláknitých hub

Pracovní postup:

Materiál zpracováváný v mykologické laboratoři

1. Primokultivace materiálů na kultivaci vláknitých hub (vyjma dermatofytů) odeslaných přímo do mykologické laboratoře na S2 (37 °C a nebo 28 °C, v případě negativy zůstává v termostatu 1 týden).
2. Příprava barvených preparátů z tekutých materiálů (likvor, sputum, BAL..) – barví se orientačně krystalovou violetí nebo Gramem
3. Izolace a identifikace vláknitých hub narostlých na S2 v ostatních laboratořích (v případě čisté primokultury lze vynechat). Kultivace ve 37°C nebo 28 °C.

IDENTIFIKACE VLÁKNITÝCH HUB

A. Vláknité houby typu *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*. apod. se identifikují

1. podle morfologie růstu a zbarvení kolonií na půdách
2. mikroskopickým preparátem v Lugolově roztoku, kde pátráme po charakteristickém uspořádání hyf a konidii

(SOP, Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové).

4 Výsledky

Výsledky jsou uspořádány v tabulkách a grafech. Vzhledem k rozsahu získaných dat (1115 vzorků získaných opakovanými odběry od 94 pacientů) jsou kompletní data uložena na přiloženém CD (zadní strana desek diplomové práce).

V následující základní tabulce (viz. tabulka č. 5) jsou uvedeny údaje s ohledem na datum provedení PCR. Vyšetření metodou PCR se z důvodů vysokých finančních nákladů provádí mnohem méně často než vyšetření metodou ELISA, které je finančně výhodnější.

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí software MedCalc.

K závěrečnému zhodnocení senzitivity a specificity jednotlivých parametrů jsme použili ROC analýzu (program MedCalc).

ROC – analýza: (Receiver operating characteristic plot).

Grafické vyhodnocení diskriminačních schopností funkcí nebo veličin (např. používaných diagnostických testů). Sestrojuje se vynesáním hodnot klinické citlivosti (osa y) proti hodnotám klinické nespecifičnosti (osa x) pro všechny rozhodovací úrovně. ROC křivky poskytují hodnoty klinické senzitivity a specifičnosti, pozitivních a negativních prediktivních hodnot a klinické věrohodnosti (Likelihood ratio-LR). Hodnota plochy pod křivkou (AUC) kvantifikuje diagnostickou správnost zkoušky. ROC analýza dovoluje optimalizovat hodnoty rozhodujících úrovní pro zvolený účel (dosažení vyšší citlivosti nebo specifičnosti nebo optimální kombinace obou) (*Metrologická terminologie v analytické laboratoři*).

Tabulka č.5: Základní tabulka

Datum	Pohlaví a číslo pacienta	Materiál-PCR	výsledek real-time PCR	galaktomanan	GM (jiny den)	klinický závěr	léčba ASP (ano/ne)	přežití (ano/ne)
29 12 2008	Ž 1	BAL	hraniční hodnota	0,26	N	HH	ne	ano
28 5 2008	M 1	BAL	70 kopií aspergilové DNA/ml	0,2	N	SP	ano	ano
30 4 2008	M 1	BAL	negativní	0,49	N	N	ne	ano
27 3 2007	M 2	BAL	negativní	ELISA neprovedena	P	N	ne	ne
2 11 2007	M 3	BAL	2000 kopií aspergilové DNA/ml	1,06	P	P	ano	ano
25 8 2008	Ž 2	CSF	hraniční hodnota(šedá zona)	0,24	N	HH	ne	ne
28 8 2008	Ž 2	BAL	negativní	0,31	N	N	ano	ano
6 8 2008	Ž 3	BAL	2840000 kopií aspergilové DNA/ml	0,35	N	P	ano	ano
16 10 2008	Ž 3	BAL	negativní	0,17	N	N	sporné	ne
8 9 2008	Ž 4	BAL	negativní	0,23	N	N	ano	ne
11 9 2008	Ž 4	BAL	150 kopií aspergilové DNA/ml	0,56	P	P	ne	ne
12 11 2007	Ž 5	BAL	negativní	ELISA neprovedena	N	N	ano	ne
21 5 2007	M 4	BAL	negativní	0,29	N	N	sporné	ne
8 6 2007	M 4	BAL	negativní	0,08	N	N	ano	ano
17 6 2007	M 4	BAL	negativní	0,38	N	N	ne	ano
26 10 2007	M 5	BAL	negativní	0,17	N	N	ano	ne
4 12 2007	M 6	BAL	negativní	N	N	ne	ano
20 11 2008	M 6	BAL	400 kopií aspergilové DNA/ml	0,94	P	P	ne	ano
1 12 2008	M 6	BAL	2000 kopií aspergilové DNA/ml	0,66	P	P	ano	ne
7 7 2008	M 7	BAL	nejasný výsledek	0,32	N	?	ne	ano
2 1 2007	Ž 6	punktát	negativní	0,29	N	N	ne	ano
29 10 2008	M 8	CSF	negativní	P	N	ne	ano
14 8 2008	M 8	CSF	negativní	0,2	N	N	ne	ano
21 6 2007	M 9	BAL	negativní	0,16	N	N	ne	ano
13 7 2007	M 9	BAL	negativní	0,23	N	N	ne	ano
21 4 2008	Ž 7	BAL	negativní	0,25	N	N	nehodnoceno	ne
12 1 2007	Ž 8	BAL	negativní	0,04	N	N	sporné	ano
1 12 2008	M 10	hrudní punktát	negativní	0,24	P	P	ne	ne
5 12 2008	M 10	BAL	hraniční hodnota	0,37	N	HH	ne	ne

15	1	2007	M 11	sputum	9 500 kopií aspergillové DNA/ml	P	0,73	P	...	ano	ano	ano
22	3	2007	M 12	BAL	negativní	N	0,08	N	N	sporně	ano	ne
11	4	2007	M 12	sputum	negativní	N	0,13	N	N	ne	ne	ano
2	6	2008	Ž 9	BAL	hraniční hodnota	HH	0,21	N	N	ne	ne	ano
11	3	2008	Ž 10	CSF	negativní	N	N	N	ne	ne	ano
30	9	2008	M 13	BAL	300 kopií aspergillové DNA/ml	P	0,62	P	P	ano	ano	ano
17	10	2008	M 13	hrudní punktát	negativní	N	2,89	P	P	ano	ano	ano
1	8	2008	Ž 11	BAL	negativní	N	0,57	P	P	sporně	ano	ano
6	8	2008	Ž 11	BAL	120 kopií aspergillové DNA/ml	P	0,24	N	N	ne	ne	ano
22	9	2008	Ž 12	TAS	260 kopií aspergillové DNA/ml	P	0,36	N	N	ne	ne	ano
10	6	2008	Ž 13	BAL	šedá zóna	?	ELISA neprovedena	N	N	ne	ne	ano
15	2	2007	Ž 14	BAL	negativní	N	0,08	N	N	ne	ne	ano
18	3	2008	M 14	BAL	negativní	N	0,23	N	P	ne	ne	ano
4	8	2008	M 15	BAL	negativní	N	0,38	N	H	ne	ne	ano
8	11	2007	Ž 15	BAL	negativní	N	0,18	N	ne	ne	ano
23	4	2007	M 16	BAL	negativní	N	2,12	P	N	sporně	ano	ano
29	8	2008	M 17	BAL	negativní	N	0,79	P	P	ano	ano	ano
17	10	2008	Ž 16	BAL	negativní	N	ELISA neprovedena	N	N	nehodnoceno	ne	ne
7	1	2008	M 18	BAL	negativní	N	0,22	N	ne	ne	ano
5	12	2008	M 19	BAL	negativní	N	0,24	N	P	ne	ne	ano
12	8	2008	M 20	BAL	253000 kopií aspergillové DNA/ml	P	0,19	N	P	ano	ano	ne
31	7	2007	M 21	BAL	250 kopií aspergillové DNA/ml	P	N	N	sporně	ano	ne
30	4	2008	Ž 17	BAL	negativní	N	N	P	sporná	ano	ano
14	7	2008	Ž 18	BAL	šedá zóna	?	N	N	ne	ne	ano
14	7	2008	Ž 18	CSF	negativní	N	0,43	N	N	ne	ne	ano
14	7	2008	Ž 19	BAL	negativní	N	0,12	N	N	ne	ne	ano
16	7	2008	Ž 19	CSF	330 kopií aspergillové DNA/ml	P	N	N	ne	ne	ano
18	7	2008	Ž 19	plazma	negativní	N	0,39	N	N	ano	ano	ano
15	11	2007	Ž 20	BAL	negativní	N	0,16	N	P	ne	ne	ano
19	7	2007	M 22	CSF	negativní	N	0,17	N	N	ne	ne	ano
10	8	2007	M 23	BAL	negativní	N	N	N	ne	ne	ano
13	5	2008	M 23	BAL	negativní	N	N	N	ne	ne	ano
29	6	2007	M 24	BAL	65700 kopií aspergillové DNA/ml	P	N	N	ano	ne	ne
21	11	2008	M 25	BAL	negativní	N	0,38	N	P	ne	ne	ne
15	5	2007	Ž 21	BAL	negativní	N	0,08	N	ne	ne	ne

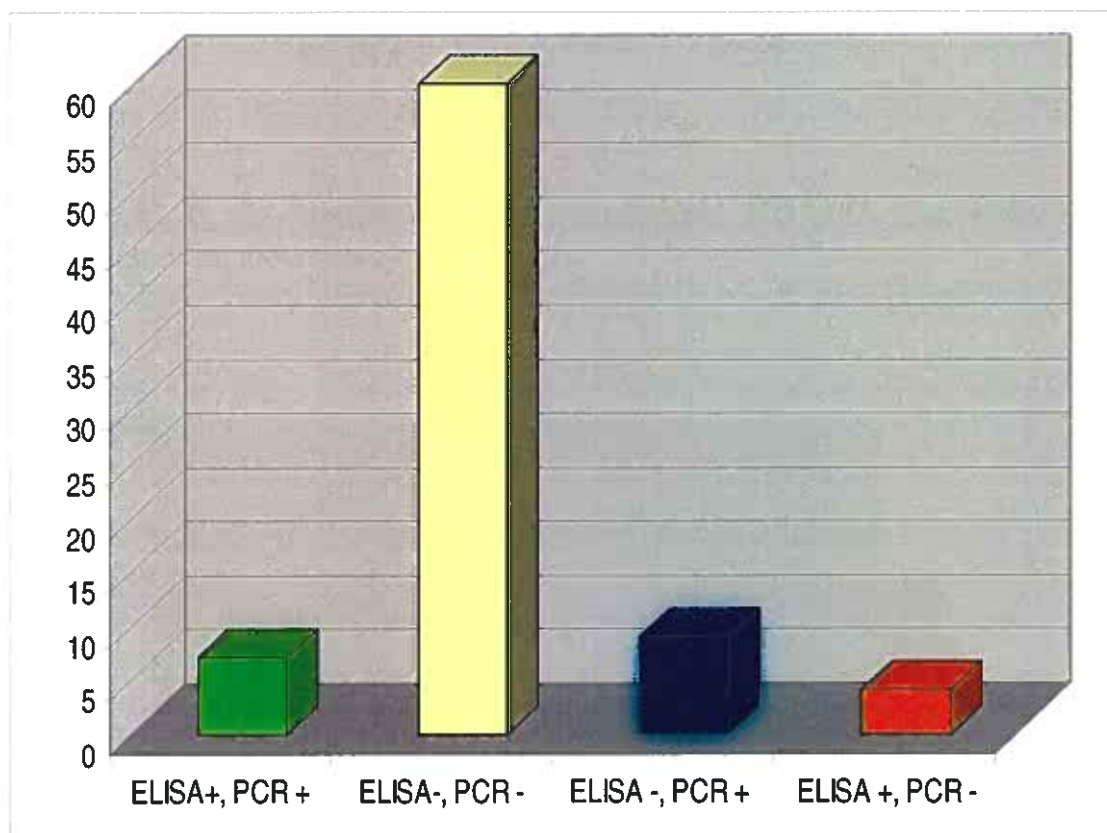
20	7	2008	M 26	CSF	negativní	N	0,5	H	N	ne	ne	ano
25	5	2007	M 27	BAL	200 kopií aspergilové DNA/ml	P	0,42	N	ano	ne	ano
23	3	2007	M 28	BAL	negativní	N	0,24	N	N	ne	ne	ne
22	7	2008	M 29	BAL	negativní	N	0,21	N	P	ne	ne	ano
14	11	2008	M 30	BAL	negativní	N	N	N	ne	ne	ano
4	10	2007	M 31	BAL	negativní	N	0,32	N	P	ne	ne	ano
11	4	2007	M 31	sputum	negativní	N	0,35	N	P	ne	ne	ano
18	4	2007	M 31	CSF	negativní	N	0,41	N	P	ne	ne	ano
4	3	2008	Ž 22	BAL	negativní	N	0,18	N	N	ne	ano	ano
21	2	2008	M 32	BAL	negativní	N	ELISA neprovedena			ne	ne	ne
23	4	2008	Ž 23	BAL	794000 kopií aspergilové DNA/ml	P	3,03	P	P	ano	ano	ne
25	7	2007	M 33	BAL	negativní	N	0,23	N	P	ne	ne	ne
10	10	2008	Ž 24	CSF	negativní	N	N	P	ne	ne	ne
23	8	2007	M 34	BAL	negativní	N	N	P	ne	ne	ano
6	2	2008	M 34	BAL	negativní	N	0,22	N	P	ne	ne	ano
25	2	2008	M 34	BAL	negativní	N	N		ne	ne	ne
6	8	2007	Ž 25	krev	negativní	N	0,1	N	P	ne	ne	ano
9	5	2008	Ž 25	BAL	440 kopií aspergilové DNA/ml	P	0,29	N	P	ano	ano	ano
5	1	2007	Ž 26	BAL	negativní	N	0,24	N	P	ne	ne	ano
20	3	2008	Ž 26	BAL	negativní	N	0,26	N	P	ano	ano	ne
22	1	2007	M 35	CSF	negativní	N	ELISA neprovedena			ne	ne	ano
10	8	2007	M 36	BAL	negativní	N	N	N	ne	ne	ano
3	6	2008	M 37	BAL	negativní	N	0,17	N	N	ne	ne	ano
14	4	2008	M 38	CSF	negativní	N	N	N	ne	ne	ano
6	3	2008	M 39	BAL	negativní	N	N	P	ano	ano	ano
10	10	2008	M 40	BAL	negativní	N	0,2	N	P	ne	ne	ano
8	3	2007	M 41	BAL	negativní	N	0,08	N	N	ne	ne	ano
14	11	2008	Ž 27	BAL	negativní	N	0,14	N	P	ne	ne	ano
19	5	2008	Ž 28	BAL	negativní	N	0,16	N	ne	ne	ano
7	10	2008	Ž 29	BAL	negativní	N	0,32	N	P	ne	ne	ano
31	5	2007	M 42	CSF	negativní	N	0,19	N	N	ne	ne	ano
7	8	2008	Ž 30	BAL	negativní	N	0,17	N	N	nehodnoceno	ne	ne
4	4	2008	M 43	BAL	negativní	N	ELISA neprovedena			ano	ano	ne
3	4	2008	M 44	BAL	negativní	N	H		ne	ne	ano
11	4	2008	M 44	CSF	negativní	N			ne	ne	ano

22	1	2007	M 45	BAL	nejasný výsledek (šedá zóna)	?	0,28	N	N	N	ne	ne	ano
19	10	2007	Ž 31	sputum	negativní	N	ELISA neprovedena	N			ne	ne	ano
16	1	2008	Ž 32	BAL	negativní	N	P			ne	ne	ano
7	11	2007	M 46	BAL	40 000 kopií aspergillové DNA/ml	P	P			ne	ne	ano
16	7	2007	M 46	sérum	negativní	N	0,16	N	N		sporné	ano	ano
27	1	2008	M 47	BAL	30000 kopií aspergillové DNA/ml	P	0,47	N	N		ne	ne	ano
18	5	2007	M 48	BAL	130 kopií aspergillové DNA/ml	P	P			ne	ne	ano
21	2	2007	Ž 33	BAL	negativní	N	0,29	N	N		ne	ne	ano
14	12	2007	Ž 34	BAL	negativní	N	0,13	P	N		ne	ne	ano
14	3	2008	Ž 35	BAL	negativní	N	P			ne	ne	ano
29	10	2008	M 49	BAL	hraniční hodnota	HH	0,27	N	N		nedořešeno	ne	ne
3	11	2008	M 49	BAL	negativní	N	0,5	H	H				
23	1	2008	Ž 36	BAL	2700 kopií aspergillové DNA/ml	P	0,07	N	N		ne	ne	ano
12	12	2007	Ž 36	BAL	negativní	N	0,13	N	N		ne	ano	ne
15	8	2008	M 50	BAL	negativní	N	0,33	N	N		ne	ne	ne
29	8	2008	M 50	CSF	negativní	N	N					
16	11	2007	M 51	BAL	negativní	N	0,15	N	N		ne	ne	ano
30	6	2008	M 51	BAL	negativní	N	N			ne	ne	ano
30	1	2008	Ž 37	BAL	negativní	N	0,27	N	N		ne	ne	ne
3	12	2008	M 52	BAL	negativní	N	0,27	P	P		sporné	ano	ano
19	3	2008	M 53	punktát	negativní	N	0,25	N	N		ne	ne	ano
5	9	2007	M 54	BAL	negativní	N	0,16	P	N		ano	ano	ano
29	6	2007	M 55	BAL	negativní	N	0,06	N	N		ne	ne	ano
4	2	2008	M 56	CSF	negativní	N	0,23	P	N		ne	ne	ano
13	6	2008	M 56	BAL	negativní	N	0,22	P	P		ne	ne	ano
27	3	2008	M 57		negativní	N	...	P	P		ne	ne	ne

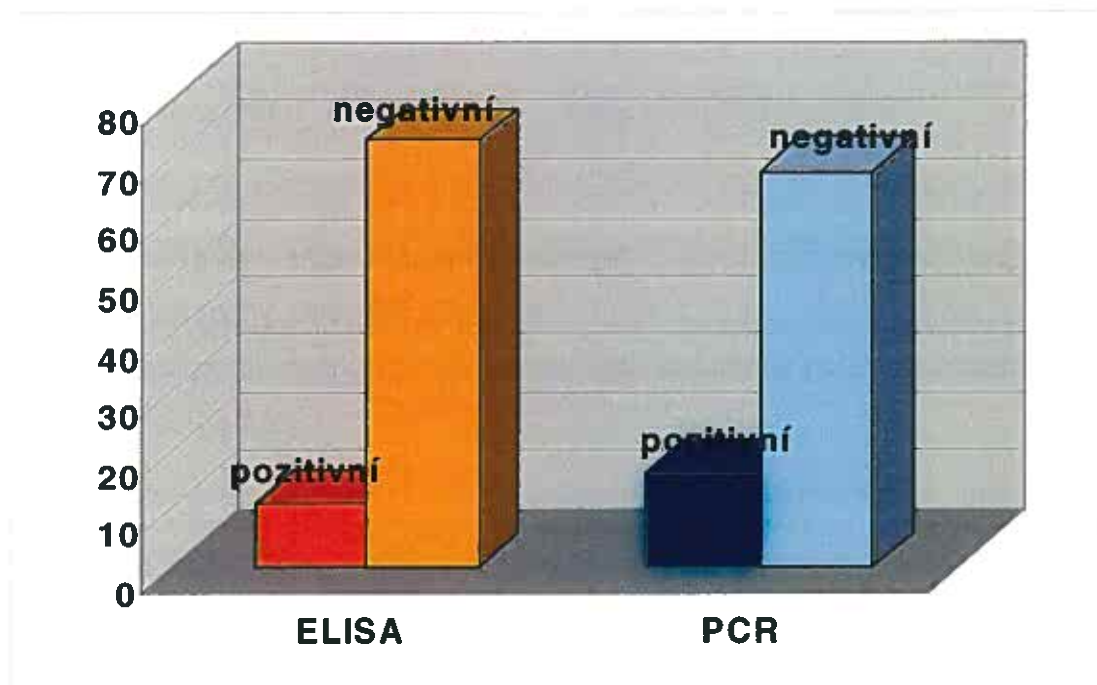
Tabulka č.6: Uvádí srovnání výsledků stanovení GM metodou ELISA s detekcí aspergilových NK metodou PCR. Uvedeny jsou pouze výsledky, ve kterých se datum odběru pro PCR shodovalo s datem odběru pro ELISA test.

91 vzorků		ELISA (GM)		
		pozitivní	negativní	hraniční
PCR	pozitivní	7	8	--
	negativní	4	64	2
	hraniční	--	5	--

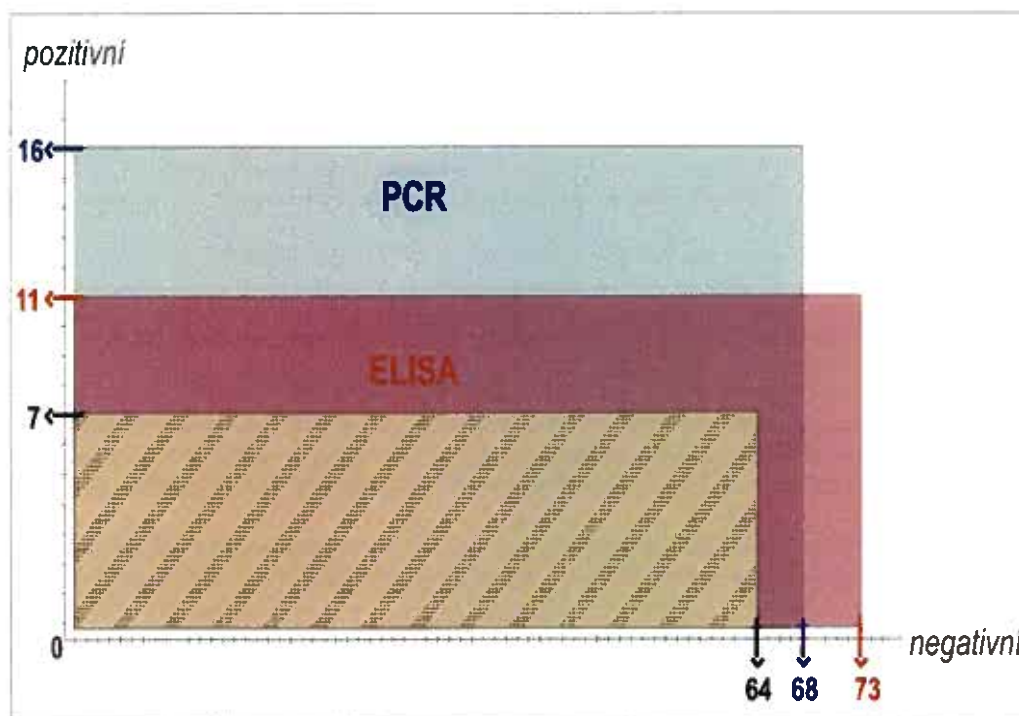
Graf č.1: Zobrazuje grafické znázornění dosažených kombinací výsledků.



Graf č. 2 Zobrazuje porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků metodou ELISA a PCR.

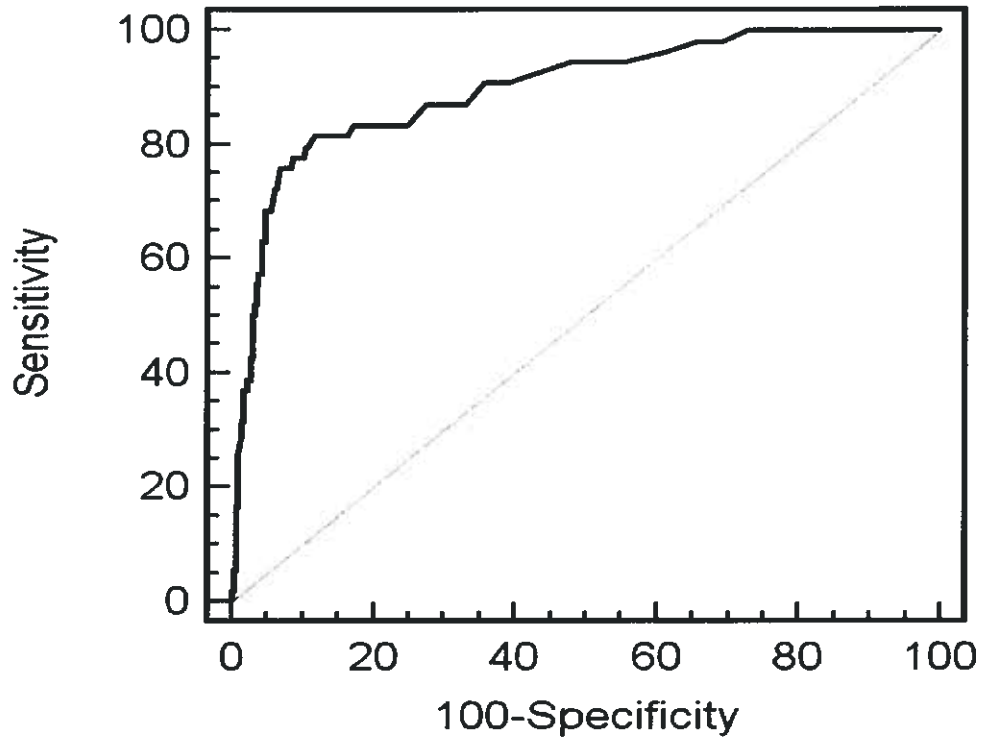


Graf č. 3: Zobrazuje shodu ve smyslu positivity a negativity ve výsledcích obou srovnávaných metod.



ROC analýza

galaktomanan



Criterion values and coordinates of the ROC curve

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI
$\geq 0,02$	100,00	93,3 - 100,0	0,00	0,0 - 0,5
$> 0,16$	100,00	93,3 - 100,0	27,19	24,0 - 30,5
$> 0,17$	98,15	90,1 - 99,7	30,90	27,6 - 34,3
$> 0,18$	98,15	90,1 - 99,7	34,48	31,1 - 38,0
$> 0,19$	96,30	87,2 - 99,4	38,86	35,4 - 42,4
$> 0,2$	94,44	84,6 - 98,8	44,69	41,1 - 48,3
$> 0,22$	94,44	84,6 - 98,8	52,25	48,6 - 55,9
$> 0,23$	92,59	82,1 - 97,9	56,63	53,0 - 60,2
$> 0,24$	90,74	79,7 - 96,9	61,01	57,4 - 64,5
$> 0,25$	90,74	79,7 - 96,9	64,19	60,7 - 67,6
$> 0,26$	87,04	75,1 - 94,6	66,98	63,5 - 70,3
$> 0,28$	87,04	75,1 - 94,6	72,68	69,3 - 75,8
$> 0,29$	83,33	70,7 - 92,1	75,07	71,8 - 78,1
$> 0,34$	83,33	70,7 - 92,1	82,89	80,0 - 85,5
$> 0,35$	81,48	68,6 - 90,7	83,69	80,9 - 86,3
$> 0,39$ *	81,48	68,6 - 90,7	86,33	85,8 - 90,5
$> 0,4$	79,63	66,5 - 89,4	89,26	86,8 - 91,4
$> 0,41$	79,63	66,5 - 89,4	89,66	87,3 - 91,7
$> 0,42$	77,78	64,4 - 87,9	89,79	87,4 - 91,9
$> 0,45$	77,78	64,4 - 87,9	91,38	89,1 - 93,3
$> 0,46$	75,93	62,4 - 86,5	91,51	89,3 - 93,4
$> 0,5$	75,93	62,4 - 86,5	93,24	91,2 - 94,9
$> 0,51$	74,07	60,3 - 85,0	93,37	91,4 - 95,0
$> 0,52$	72,22	58,4 - 83,5	93,77	91,8 - 95,4
$> 0,55$	72,22	58,4 - 83,5	94,03	92,1 - 95,6
$> 0,56$	70,37	56,4 - 82,0	94,16	92,2 - 95,7
$> 0,57$	70,37	56,4 - 82,0	94,30	92,4 - 95,8
$> 0,59$	68,52	54,4 - 80,5	94,56	92,7 - 96,1
$> 0,61$	68,52	54,4 - 80,5	95,23	93,5 - 96,6

>0,62	66,67	52,5 - 78,9	95,36	93,6 - 96,7
>0,63	62,96	48,7 - 75,7	95,36	93,6 - 96,7
>0,65	62,96	48,7 - 75,7	95,76	94,1 - 97,1
>0,67	57,41	43,2 - 70,8	95,76	94,1 - 97,1
>0,7	57,41	43,2 - 70,8	96,15	94,5 - 97,4
>0,71	55,56	41,4 - 69,1	96,29	94,7 - 97,5
>0,72	55,56	41,4 - 69,1	96,42	94,8 - 97,6
>0,73	53,70	39,6 - 67,4	96,42	94,8 - 97,6
>0,74	53,70	39,6 - 67,4	96,55	95,0 - 97,7
>0,75	51,85	37,8 - 65,7	96,55	95,0 - 97,7
>0,78	51,85	37,8 - 65,7	96,82	95,3 - 97,9
>0,79	50,00	36,1 - 63,9	96,82	95,3 - 97,9
>0,8	50,00	36,1 - 63,9	96,95	95,5 - 98,1
>0,84	42,59	29,2 - 56,8	96,95	95,5 - 98,1
>0,88	42,59	29,2 - 56,8	97,21	95,8 - 98,3
>0,89	40,74	27,6 - 55,0	97,21	95,8 - 98,3
>0,9	40,74	27,6 - 55,0	97,35	95,9 - 98,4
>0,94	38,89	25,9 - 53,1	97,35	95,9 - 98,4
>0,97	38,89	25,9 - 53,1	97,75	96,4 - 98,7
>0,98	37,04	24,3 - 51,3	97,88	96,6 - 98,8
>1,04	37,04	24,3 - 51,3	98,28	97,1 - 99,1
>1,06	35,19	22,7 - 49,4	98,41	97,2 - 99,2
>1,2	31,48	19,5 - 45,6	98,41	97,2 - 99,2
>1,33	31,48	19,5 - 45,6	98,67	97,6 - 99,4
>1,36	29,63	18,0 - 43,6	98,67	97,6 - 99,4
>1,39	27,78	16,5 - 41,6	98,81	97,7 - 99,5
>1,41	27,78	16,5 - 41,6	98,94	97,9 - 99,5
>1,42	25,93	15,0 - 39,7	99,07	98,1 - 99,6
>1,54	22,22	12,1 - 35,6	99,07	98,1 - 99,6
>1,6	22,22	12,1 - 35,6	99,20	98,3 - 99,7
>1,66	16,67	7,9 - 29,3	99,20	98,3 - 99,7
>1,74	16,67	7,9 - 29,3	99,34	98,5 - 99,8
>2,02	14,81	6,6 - 27,1	99,34	98,5 - 99,8
>2,18	14,81	6,6 - 27,1	99,47	98,6 - 99,9
>2,82	5,56	1,2 - 15,4	99,47	98,6 - 99,9
>2,85	5,56	1,2 - 15,4	99,60	98,8 - 99,9
>3,03	1,85	0,3 - 9,9	99,60	98,8 - 99,9

• PPV a NPV testu ELISA

Pozitivní předpovědní hodnota: vyjadřuje pravděpodobnost, že onemocnění je přítomno, pokud je výsledek testu pozitivní (%).

Negativní předpovědní hodnota: vyjadřuje pravděpodobnost, že onemocnění není přítomno, pokud je test negativní (%).

PPV testu ELISA pro diagnózu IA je 41,84 %

NPV testu ELISA pro diagnózu IA je 98,17 %

5 Diskuze

Cílem naší práce bylo získat přehled dosavadních znalostí o využití GM v časně diagnostice IA a ověřit na souboru imunokompromitovaných pacientů ohrožených mykotickou infekcí přínos stanovení GM metodou ELISA, senzitivitu, specifitu, PPV a NPV tohoto testu.

IA představuje závažné a často letální mykotické onemocnění u imunokompromitovaných pacientů. Vysoká mortalita u pacientů se závažnou mykotickou infekcí je podmíněna především těžkou imunosupresí nemocných a zároveň, na straně druhé, obtížností časného stanovení této diagnózy.

Podle kritérií EORTC/MCG je za prokázanou považována mykotická infekce potvrzená histologickým nebo mikroskopickým průkazem ve vzorku pacienta získaném invazivními technikami nebo kultivačně. Záchytnost je udávána dlouhodobě okolo 50 % (<http://knil.trios.cz/UstiAbstr/usti059.htm>). Kultivační techniky mají vysokou specifitu, ale bohužel nízkou senzitivitu.

V posledních letech dosáhly velkého rozvoje metody umožňující stanovení některých složek buněčné stěny v tělních tekutinách a metody molekulární diagnostiky. Aspergily uvolňují při svém růstu GM, který můžeme prokázat metodou ELISA. Tento test pomůže často stanovit diagnózu ještě před jasnou klinickou manifestací infekce. Rizikem je však výskyt FP výsledků, jejichž příčinou může být například podání některých ATB, či alterace střevní stěny. Obsah GM v séru s velkou pravděpodobností souvisí s invazivitou růstu aspergilových hyf. Detekce jeho hladiny je proto přínosem především u pacientů s vysokým rizikem rozvoje aspergilózy. Na zvířecích modelech byla prokázána korelace mezi množstvím GM v plicní tkáni, a hladinou GM v séru (*Petratis V., Petraitiene R., Solomon J. et al., 2006*).

Detekce GM v séru lze použít jako marker léčebné odpovědi. Při úspěšné léčbě IA by mělo docházet k poklesu hladin GM. Pokud hladina GM narůstá nebo dojde opakovaně k nárůstu po předchozím poklesu je pravděpodobné, že léčba selhává (*Maertens J. Verhaegen J. Lagrou K. Van Eldere J. Boogaerts M, 2001; Sulahian A. Boutboul F. Ribaud P. Leblanc T. Lacroix C. Derouin F, 2001*).

Je však na místě upozornit, že za určitých okolností může stoupat hladina GM i přesto, že léčba byla úspěšná. K tomuto jevu dochází za situace, probíhá-li současně závažné renální selhání a v případě užití některých léčiv (*El Salleeby CM, Ellison KJ, Knapp KM et al., 2005; Klont RR, Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D et al., 2006*).

Vedle aspergilových kmenů uvolňují GM také kmeny penicilií a při infekci může být GM v séru rovněž detekován (IF tímto patogenem je však velmi vzácná) (*Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ et al., 1997*).

Kromě výše uvedeného, hladinu GM ovlivňuje také mikroprostředí, ve kterém probíhá infekce, imunitní stav jedince, stav renálních funkcí a antimykotická léčba (*Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE, 2004*).

Metodu ELISA jsme srovnávali s metodou PCR a zároveň s klinickým závěrem klinika. Metodou ELISA bylo vyšetřeno 94 pacientů, od nichž bylo získáno opakovanými odběry 1115 vzorků.

K srovnání výsledků stanovení GM metodou ELISA s detekcí aspergilových NK metodou PCR jsme vyšetřili 91 vzorků. Shody v obou testech (ve smyslu pozitivní-pozitivní, negativní-negativní, hraniční-hraniční) bylo dosaženo u 71 vzorků (78,02 %). Ke shodě ve smyslu positivity došlo u 7 vzorků (7,69 %). Ke shodě ve smyslu negativity došlo u 64 vzorků (70,33 %). Shody v kategorii „hraniční“ v obou testech nebylo dosaženo. Hraniční nález metodou ELISA byl nalezen u 2 vzorků (2,2 %) s klinickým závěrem 1x NE a 1x NEDOŘEŠENO. Hraniční nález metodou PCR byl nalezen u 5 vzorků (5,49 %) s klinickým závěrem 4x NE a 1x nedořešeno.

Studie, které se zabývaly detekcí GM u nemocných s rizikem vzniku IA prokázaly vysokou specificitu v rozsahu od 81-100 %. Velmi vysoká byla také NPV, která činila ve většině studií více než 95 %. Z uvedeného vyplývá, že negativní výsledek s vysokou pravděpodobností vylučuje IA. (*Maertens J. Verhaegen J. Demuynck H. Brock P. Verhoef G. Vandenberghe P. Van Eldere J. Verbist L. Boogaerts M, 1999; Maertens J. Verhaegen J. Lagrou K. Van Eldere J. Boogaerts M, 2001; Maertens J., Van Eldere J., Verhaegen J. et al, 2002; Herbrecht R., Letscher-Bru V., Oprea C. et al, 2002; Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B et al., 2003*).

Námi stanovená specifická činila 92,44 %, což odpovídá literárním údajům.

Námi stanovená NPV byla 98,17 %, což odpovídá většině studií, ve kterých byla uváděna > 95 %.

FN se vyskytly, podobně jako v pracích řady autorů, pouze u zanedbatelného počtu případů (1,6 %), (FN je vzácná).

Mírně problematickými místy našeho testu se ukázala být senzitivita a PPV. Senzitivita testů v pracích různých autorů kolísá mezi 30 - 100 %, stejně jako PPV, která je uváděna mezi 50 - 100 % (*Maertens J. Verhaegen J. Demuynck H. Brock P. Verhoef G. Vandenberghe P. Van Eldere J. Verbist L. Boogaerts M, 1999; Maertens J. Verhaegen J. Lagrou K. Van Eldere J. Boogaerts M, 2001; Maertens J., Van Eldere J., Verhaegen J. et al, 2002; Herbrecht R., Letscher-Bru V., Oprea C. et al, 2002; Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B et al., 2003*).

Námi stanovená senzitivita byla vzhledem k literárním údajům poměrně vysoká 75,93 %. Bylo tedy dosaženo minimálně stejné, spíše však lepší hodnoty.

Námi stanovená PPV činila 41,84 %, ale i přes svou poměrně nízkou hodnotu odpovídala hodnotám v jiných, podobně zaměřených studiích.

Počet FP byl mírně vyšší (7,05 %) než FN, což odpovídá i nižší hodnotě PPV.

Srovnávat výsledky z různých studií je velmi obtížné v důsledku ovlivnění daných parametrů řadou faktorů (*Maertens J., Theunissen K., Lodewyck T. et al, 2007*).

Sulahian et al udává specificku testu 94 % (*Sulahian A. Boutboul F. Ribaud P. Leblanc T. Lacroix C. Derouin F, 2001*).

Pazos et al udává specificku testu 96 % a senzitivu testu 73 %, PPV 73 %, NPV 98 % (*Pazos C. del Palacio A, 2003*).

Suarez et al udává specificku 95,8 % a senzitivu 88,2 %, PPV 75 %, NPV 98,3 % (*Suarez F. Lortholary O. Buland S. Rubio MT. Ghez D. Mahe V. Quesne G. Poiree S. Buzyn A. Varet B. Berche P. Bougnoux ME, 2008*).

Závažným činitelem, který ovlivňuje senzitivitu metody je hodnota cut-off IP. Je prokázáno, že snížení původní hodnoty doporučené výrobcem na hodnotu $IP = 0,5$ vede k výraznému zvýšení senzitivity při mírném zhoršení specificity (Maertens J., Theunissen K., Verbeken E. et al, 2004).

Pokud je hladina GM u pacientů nízká, při hodnocení výsledku testu pomocí vyšší hodnoty IP cut-off mohou být tyto pacienti označeni za negativní, naopak při cut - off 0,5 je test dokáže správně označit za pozitivní (Maertens J., Theunissen K., Verbeken E. et al, 2004; Marr Ka, Balajee SA, McLaughlin L. et al, 2004). Užití cut - off 0,5 je několikanásobně senzitivnější než cut - off např. 1,5 (Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC, 2007).

Námi, pomocí ROC analýzy stanovená optimální cut - off hodnoty $IP = 0.5$, odpovídá literárním údajům a je v souladu se současnými údaji výrobce. Při této hodnotě je dosaženo optimální senzitivity a specificity 75,93 % resp. 93,24%.

Interpretace výsledků blíží se hodnotě $IP = 0,5$ je mnohdy problematická. Při mírném snížení cut - off na hodnotu $IP = 0,39$ (viz. ROC analýza) stoupne senzitivita testu na 81,48 % a specificita klesne jen mírně, na 88,33 %.

Na základě tohoto našeho zjištění se nabízí otázka, zda by u pacientů s hodnotami $IP = 0,39-0,5$ nebylo vhodné označit tyto případy za pacienty v riziku, u nichž je IA „možná“? U kvalitativních testů je obvyklé, že se uvažuje tzv. „šedá zóna“. V našem případě by to znamenalo, že by vznikl interval šedé zóny např. 0,4 – 0,5.

Významným faktorem ovlivňující senzitivitu testu a schopnost včasné detekce IA je frekvence odběrů. Maertans et al uvádí průměrný počet odběrů na pacienta 11,2 při senzitivě metody 89,7 %. Herbrecht et al uvádí pouze 4,1 odběrů při senzitivě metody pouhých 31,6 % (Maertens J. Verhaegen J. Lagrou K. Van Eldere J. Boogaerts M, 2001; Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF et al., 2002).

V našem souboru se počet odběrů u pacientů pohyboval mezi 1-40, v extrémním případě až 60 odběry.

Rozvoj IA u těžce imunosuprimovaných jedinců je velmi rychlý a k výskytu GM v oběhu a tím ke změně hodnot IP z negativity do pozitivity může dojít během několika dnů.

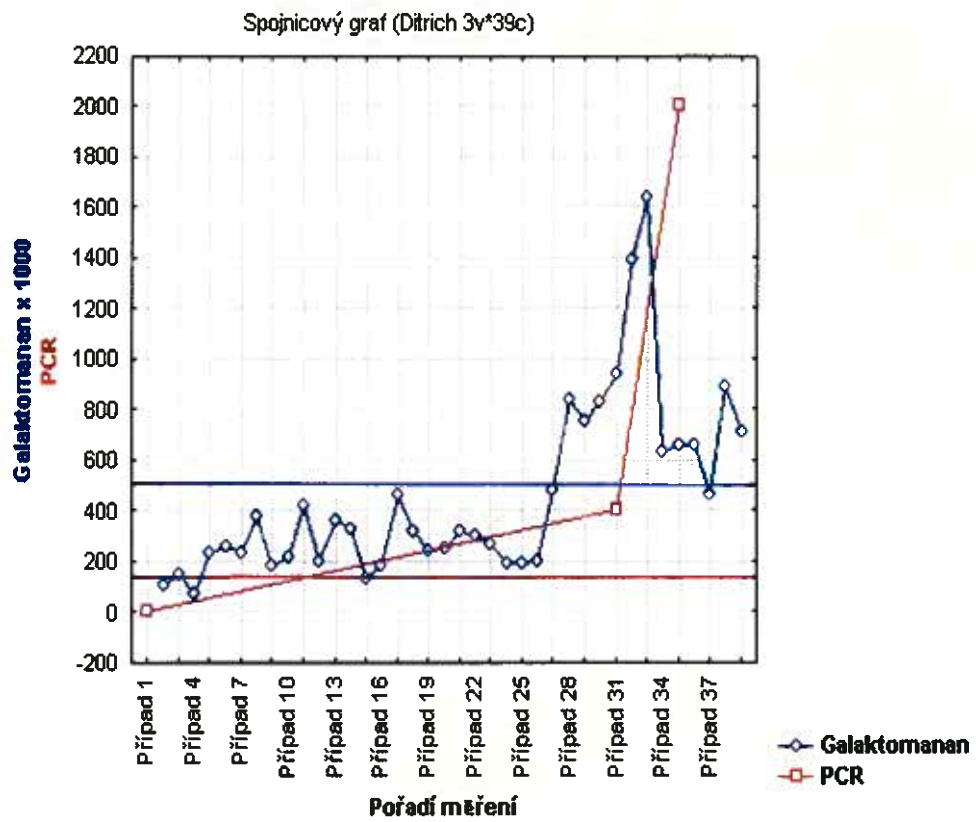
Frekvence zpracování odběrů na pracovišti ÚKIA je 2x týdně, v případě naléhavé potřeby v režimu statim i mimo tyto termíny.

Pravidelný screening se doporučuje provádět 2 - 3x týdně, v rizikových obdobích i častěji (*Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC, 2007*). Více než 1 odběr za jeden den při cut off IP = 0,5 již senzitivitu testu dále nezvýší (*Racil Z, Kocamnova I, Kubicova E et al., 2006*).

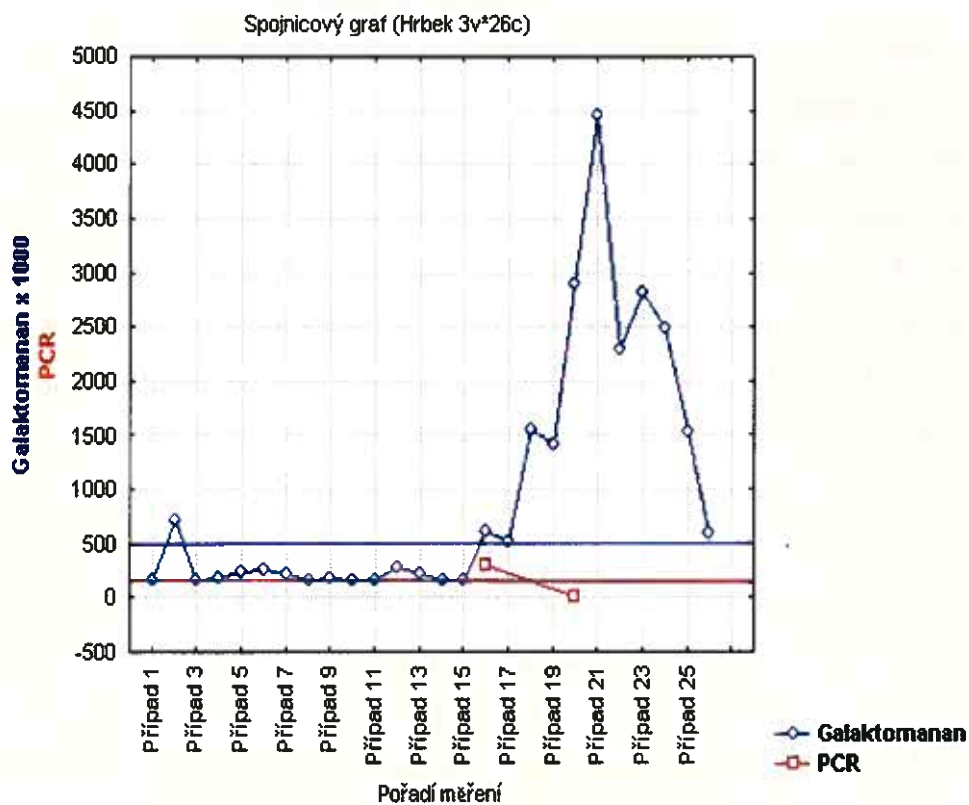
Pravidelné monitorování hladiny GM umožňuje zkrátit časový interval do stanovení diagnózy a včasné zahájení léčby. Pravděpodobnost časného záchytu pozitivita GM bude jistě ovlivněna četností odběrů a hodnotou cut - off indexu IP. Při použití doporučeného cut - off IP = 0,5 předcházela pozitivita testu definitivní stanovení diagnózy o 10 dní. Při použití cut - off IP = 1 už pozitivita testu tyto parametry nepředcházela vůbec (*Marr Ka, Balajee SA, McLaughlin L. et al, 2004*).

Z našeho pozorování vyplývá, že průkaz GM antigenu metodou ELISA je v první řadě vhodná ke screeningu a monitorování pacientů. Metoda PCR slouží k detekci aspergilových NK a je tedy především vhodná k potvrzení diagnózy.

Pacient č.1: Příklad monitoringu v čase. Modrá křivka značí hladiny GM. Červená křivka počet kopií ASP DNA/ml. Křivka udávající počet kopií ASP DNA/ml v čase odpovídá průběhu křivky zachycující GM stanovené metodou ELISA.



Pacient č.2: Příklad monitoringu v čase. Modrá křivka značí hladiny GM. Červená křivka počet kopií ASP DNA/ml. Uvedený graf dokládá význam opakovaní stanovení v rámci screeningu a monitorování léčby metodou ELISA.



6 Závěr

Výskyt mykotických onemocnění, komplikujících stavy snížené rezistence a imunity pacientů s různými závažnými základními chorobami a ohrožujících jejich život terminální fungemií, vzrostl za posledních několik desetiletí natolik, že se stal jedním z významných problémů současné medicíny.

V naší studii jsme se snažili získat přehled dosavadních znalostí o využití stanovení GM v časně diagnostice IA a ověřit na souboru imunokompromitovaných pacientů ohrožených mykotickou infekcí přínos stanovení GM metodou ELISA, senzitivitu, specificitu, PPV a NPV tohoto testu.

Z našeho pozorování vyplývá, že průkaz GM antigenu metodou ELISA je v první řadě vhodný ke screeningu a monitorování pacientů. Metoda PCR slouží k detekci aspergilových NK a je tedy především vhodná k potvrzení diagnózy.

Pravděpodobnost časného záchytu pozitivitu GM bude jistě ovlivněna četností odběrů a hodnotou cut - off indexu IP.

Očekávaný přínos je dosažen při hodnotě cut - off IP = 0,5. Při pohledu na výsledky námi provedené analýzy se nabízí možnost zavedení kategorie hodnocení výsledků „hraniční“, spadajícího do námi navrženého rozmezí šedé zóny 0,4 – 0,5. Senzitivita testu a tím i pravděpodobnost záchytu by poté stoupla na 81,48 %.

Pravidelný screening hladin GM se doporučuje provádět 2 - 3x týdně, v rizikových obdobích i častěji.

Diagnostika IA zaznamenává v posledních letech obrovský pokrok. Stále více se rozšiřuje trend nečekat na definitivní potvrzení diagnózy, ale vysoce rizikové pacienty monitorovat a při prvních příznacích infekce včas zahájit antimykotickou léčbu.

Velkého rozvoje dosáhly především nekultivační diagnostické metody a to nejen sérologické (z nichž nejvýznamnější je detekce GM metodou ELISA), ale také molekulárně genetické.

Seznam použitých zkratk

ABCD - Abelcet

ABLC – Amphocil

ABPA – Allergic bronchopulmonary aspergillosis

AIDS – Aquired immunodeficiency syndrome

AE – eluční roztok

AL – lyzační roztok

APLP – Amplified product length polymorphism

ATB – antibiotika

ATL – tkáňový pufr

ATM - antimykotika

BAL – bronchoalveolární laváž

c-AmB – konvenční amfotericin B

CASPO – kaspofungin

CGD – chronická granulomatóza

CLSI – Clinical laboratory standard institute

CMV – cytomegalovirus

CNS – centrální nervový systém

CSF – colony stimulating factor

CT - computer tomography

CYA – Czapkův agar s kvasničným extraktem

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EBA – 2 anti galactomanna Ab

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid

EIA - enzyimoimunoanalýza

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EORTC – European organization for research and treatment of cancer

FICI – fractional inhibitory concentration index

FISH – fluorescenční in situ hybridizace

FN – falešně negativní (falešná negativita)

FP – falešně pozitivní (falešná pozitivita)

FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer

GIT – gastrointestinální trakt

GM - galaktomanan
GvHD – graft-versus-host disease
hr-CT – high resolution Computed Tomography
IA - invazivní aspergilóza
IFD – invasive fungal disease
IFI – invasive fungal infection
IPA – plicní forma invazivní aspergilózy
IP – index positivity
ITRA – itrakonazol
LED- light-emitting-diode
MEA – agar se sladovým extraktem
MIC – minimální inhibiční koncentrace
MRI – magnetic resonance imaging
MSCT – multislice CT
MSG – Mycoses study group
NASBA – Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NK – nukleová kyselina
NPV – negativní prediktivní hodnota
PAMP – Pathogen Associated Molecular Patterns
PAS – periodic acid schiff
PCR – polymerázová řetězová reakce
POSA - posakonazol
PPR – Pathogen Pattern Receptors
PPV – pozitivní prediktivní hodnota
RFLP – restriction fragment length polymorphism
RTG – rentgen
SDD – susceptible-dose dependent
SN – správně negativní
SP – správně pozitivní
SSCP – single-stranded conformational polymorphism
S2 - Sabouraudův agar s chloramfenikolem
TMB - tetramethylbenzidin
UNG - Uracil-N-Glycosylase
VORI – vorikonazol

Seznam literatury

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

ADAM O., MERAD M., ANTOUN S. ET AL: Usefulness of panfungal PCR for the diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *Pathol Biol* 2004; 52: 544-549

ANSORG R., VAN DEN BOOM R., RATH PM.: Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 1997; 40: 353-357

AQUINO VR, GOLDANI LZ, PASQUALOTTO AC: Update in the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 2007; 163: 191-202

ASCIOGLU S., REX J. H., PAUW B. ET AL.: Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *CID* 2002;34 (1 January): 7-13

BAILEY AND SCOTT'S: Diagnostic microbiology, ninth edition, 1994, s. 694, 698-701, 730, 741, 744, 762

BARTÁKOVÁ H., HABER. J., HAMAL P. A KOL.: Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky, *Vnitř Lék* 2007; 53 (Suppl), s. 1-26

BEN DE PAUW, THOMAS J. WALSH, J. PETER DONNELLY ET AL.: Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *CID* 2008;46 (15 June): 1813-1820

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

- BUCHTA VLADIMÍR, JÍLEK PETR A KOL.:** Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2002, s. 79, 143 – 145
- 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
- EL SALLEEBY CM, ELLISON KJ, KNAPP KM ET AL:** Discordant rise in galaktomannan antigenemia in a patients with resolving Aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. J Clin Microbiol, 2005; 43: 3560-3563
- GREENWOOD DAVID, SLACK RICHARD, PEUTHERER JOHN ET AL.:** Lékařská mikrobiologie, Grada, 1999, s. 52, 563, 579
- HABER JAN ET AL.:** Systémové mykózy a jejich léčba, Galén, 1995, s. 53-60, 82-94
- HABER JAN, MALLÁTOVÁ NAĎA, KOČMANOVÁ IVA:** Invazivní mykózy, Epidemiologie, diagnostika a léčba, 2007, s. 9, 10, 12, 14, 15, 29, 30
- 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
- HALLIDAY C., WU Q.X., 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
- HAMAL P.:** Molekulárně genetické metody v lékařské mykologii: Současný stav a perspektivy. Klin mikrobiol inf lék 2007; 13(4): 136-144
- HERBRECHT R, DENNING DW, PATTERSON TF ET AL:** Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med 2002; 342: 408-415
- 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

HOFMEISTER C.C, CZERLANIS C., FORSYTHE S. ET AL.: Retrospective utility of bronchoscopy after hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 693-698

HOOG S.G., GUARRO J., GENÉ J. ET AL.: Atlas of clinical fungi, 2000, s. 21-28, 471, 473, 489, 509

HOPE W.W., WALSH T.J., DENNING D.W.: Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609-622

KANSENSHOGAKU ZASSHI: The performance of (1,3)-beta-D-glucan and Aspergillus galactomannan measurement for early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases, 2004 Jul; 78(7): 566-73

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: e23-25

KOĐOUSEK ROSTISLAV: Mykózy, 2003, s. 9-11, 13-18, 37-42

KREJSEK JAN, KOPECKÝ OTAKAR: Klinická imunologie, Nukleus HK, 2004, s. 10, 527 – 534

LARONE H. DAVISE: Medically important fungi, ASM PRESS, 2002, s. 36, 266, 267

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

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), s. 2-17

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

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

MAERTENS J. VERHAEGEN J. DEMUYNCK H. BROCK P. VERHOEF G. VANDENBERGHE P. VAN ELDERE J. VERBIST L. BOOGAERTS M.: 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.* 37(10): 1999 Oct, 3223-8

MAERTENS J. VERHAEGEN J. LAGROU K. VAN ELDERE J. BOOGAERTS M: 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.* 97(6): 2001 Mar 15, 1604-10

MALCOM D. RICHARDSON , DAVID W. WARNOCK: *Fungal Infection (Diagnosis and Management)*, third edition, 2003, s. 156-183

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

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

MUNOZ P., GUINEA J., BOUZA E.: Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 24-39

PAZOS C. DEL PALACIO A.: Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating galactomannan by Platelia Aspergillus. *Rev Iberoam Micol.* 20(3): 2003 Sep, 99-102

Petratis V., Petraitiene R., Solomon J. et al.: Multidimensional volumetric imaging of pulmonary infiltrates for measuring therapeutic response to antifungal therapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1510-1517

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

POLJAK VLADKO, KRČ IVO, EHRMANN JIŘÍ: Přehled infekčních onemocnění, 1997, s. 107, 108

RACIL Z, KOČMANOVA I, KUBICOVA E ET AL.: Variation of galactomannan level during 24-hour period in haematooncological patients with/without invasive aspergillosis. Abstract of the 16 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Nice, France, March 2006, P 729.

RACIL Z. KOČMANOVA I. WAGNEROVA B. WINTEROVA J. LENGEROVA M. MOULIS M. MAYER J.: Využití detekce galaktomananu pro diagnostiku invazivní aspergillozy u hematologických nemocných. *Vnitr Lek.* 54(1):45-52, 2008 Jan.

SKOŘEPOVÁ MAGDALÉNA: Dermatomykologie v obrazech, Galén, 2008, s. 35-36

SUAREZ F. LORTHOLARY O. BULAND S. RUBIO MT. GHEZ D. MAHE V. QUESNE G. POIREE S. BUZYN A. VARET B. BERCHE P. BOUGNOUX ME.: Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol.* 46(11): 2008 Nov, 3772-7

SULAHIAN A. BOUTBOUL F. RIBAUD P. LEBLANC T. LACROIX C. DEROUIN F.: 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.* 91(2): 2001 Jan 15, 311-8

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

TOPLEY AND WILSON'S: *Mikrobiology and Microbial Infections*, ninth edition, Volume 4: Medical Mycology, 1998, s. 57-59, 62, 96, 97, 286-294

VOTAVA MIROSLAV A KOL.: *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun, 2003, s. 211 – 229

VOTAVA MIROSLAV, ONDROVČÍK PETR: *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*, 1998, s. 81-89

WEISS E., LEHMAN PF.: Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis, *Infect Immun* 1979; 25: 357-365

WHEAT LJ.: Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis part I. *Clinical Microbiology Newsletter* 2005; 27: 51-57

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=H011

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=M022

<http://www.aspergillus.org.uk/>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Fungi>

http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php

<http://botany.natur.cuni.cz/pdf/kubatova/3.03%20Eurotiales-Aspergillus.pdf>

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fu.htm>

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fl.htm>

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-ni.htm>

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-tr.htm>

<http://www.aspergillus.org.uk/aspergillosisframeset.html>

<http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/aspergillus/aspergillosis.htm>

http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf

<http://www.kmil.trios.cz/kmil08033a.htm>

<http://kmil.trios.cz/UstiAbstr/usti059.htm>

SOP, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové

SOP, Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

SOP, Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové