



**Masaryk University
Faculty of Medicine**

**INVASIVE FUNGAL DISEASES AND COVID-19 IN
HEMATOLOGICAL PATIENTS
– EARLY DIAGNOSTIC AND THERAPY**

HABILITATION THESIS

MUDr. Barbora Weinbergerová, Ph.D.

**Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology
University Hospital Brno**

Brno, 2022

Acknowledgement

I would like to express my sincere thanks and respect to Prof. Jiří Mayer, M.D., the head of the Department of Internal Medicine-Hematology and Oncology (Interní Hematologická a Onkologická Klinika, IHOK), Faculty of Medicine, Masaryk University, for his excellent professional guidance, support, inspiration, and valuable advice during my clinical and scientific work.

Thanks also go to the founding head of the clinic, Prof. Jiří Vorlíček, M.D., senior consultant, Zdeněk Král, M.D., head of the Leukemia group at the clinic, Prof. Michael Doubek, M.D., and other clinic colleagues and collaborators for their support and cooperation. Special recognition applies to current and former members of the Working Group for Opportunistic Infections at IHOK – assoc. prof. Martina Lengerová, Mgr. Iva Kocmanová, Tomáš Kabut, M.D., Bc. Jiřina Procházková and Prof. Zdeněk Ráčil, M.D.

Greatest appreciation is accorded to loved ones--my husband, sons, parents, sister and the entire family--for their enormous understanding, patience, inspiration, and support.

Commentary

Throughout her professional career, the aspirant has been dealing with myeloid malignancies (acute and chronic myeloid leukemia, Ph-negative myeloproliferative neoplasias). Infectious complications including opportunistic infections and severe COVID-19, dominated by high-risk patients with acute myeloid leukemia and patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (ALO-HSCT), are among the major life-threatening complications, and their management is an essential part of care for these patients. The overall aspirants' H-index 10 according to WOS corresponds to the professional focus of the candidate on this complex issue. As part of her habilitation thesis, the author focused specifically on opportunistic infections, especially invasive fungal diseases, and COVID-19.

Background. Infectious diseases are principal causes of morbidity and mortality among high-risk immunocompromised patients with hematological malignancies. Among neutropenic patients, fever, termed febrile neutropenia, is often the singular manifestation of infection, requiring prompt initiation of broad-spectrum potent empirical antibiotic treatment. Moreover, high-risk patients with prolonged and profound neutropenia and those following ALO-HSCT are at risk of developing invasive fungal diseases (IFD). Although several potent antifungals are currently available, successful IFD treatment is often hampered by limited diagnostic options. Subsequent delay of antifungal therapy initiation is a significant factor contributing to the impaired survival of immunocompromised patients. Clinical symptoms and imaging findings are non-specific, and IFD diagnosis is based on probability degree determination meeting host, microbiological and clinical criteria. Conventional cytological, culture and histological procedures denote low sensitivity during early IFD stages, unlike non-culture-based procedures, which render both serological identification of fungal cell wall antigens, especially galactomannan (GM) and 1,3-beta-D-glucan (BDG), and, conversely, fungal nucleic acid detection by molecular biological mechanisms. These procedures have the potential to accelerate and refine IFD diagnosis and, consequently, targeted antifungal treatment. Furthermore, antifungal therapy optimization via monitoring azole plasma levels is equally essential.

During the recent pandemic, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrom-CoronaVirus-2) infection was a primary cause of communicable complications while significantly increasing hematological patient mortality.

Aims. Our habilitation premise centers around 2 key objectives reflecting current challenges regarding immunocompromised patient comprehensive care. The first goal was to optimize IFD diagnosis using non-culture-based methods--galactomannan and 1,3-beta-D-glucan--followed by early initiation of antifungal therapy, while optimizing azole antifungals treatment via plasma level monitoring. Our second objective was to detail COVID-19 symptomatology monitoring among the general Czech population in connection with viral load. With hematological patients, data were attained relating to the epidemiology, course, and prognosis of COVID-19 along with treatment optimization.

Methods. The submitted habilitation dissertation embodies an annotated set of 29 applicants' publications.

Results. Regarding our first objective, we affirmed the crucial role of GM determination from serum and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) and evaluated a number of factors affecting test quality in IPA prediction (current antifungal therapy, gastrointestinal mucositis, lavage sample volume obtained by BAL, neutropenia depth). Considering IFD prediction using BDG in serum and BAL fluid, we identified acceptable sensitivity and specificity, albeit with a low positive predictive test value, both in IFD screening and IPA diagnosis. Neither the combination of both materials nor the new BDG optimal cut-off led to a significant improvement in IPA diagnosis test quality. Both the higher absolute neutrophil count at the time of BAL and the higher aspirated BAL fluid volume significantly exacerbated BDG assay performance. Concerning probable and proven IPA prediction, the BDG test did not surpass the GM test. Consequently, we've introduced into routine clinical practice the rapid detection and identification of a fungal pathogen in BAL fluid using a panfungal polymerase chain reaction (PCR) together with high resolution melting (HRM) analysis.

In terms of our second objective, COVID-19 symptomatology relevant to SARS-CoV-2 viral load in the general Czech population during the first pandemic wave was evaluated in detail via telemedicine. Among hematological patients, higher COVID 19 mortality was confirmed when compared with the general population and worldwide data. Still, during the pandemic, mortality was significantly reduced when specific treatment against SARS-CoV-2 was part of routine clinical practice. Combined treatment of remdesivir and convalescent plasma with a high titer of virus-neutralizing antibodies resulted in reduced mortality among hematologic patients irrespective of baseline pneumonia. Similarly, a prospective study analyzing the use of anti-

SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies recorded mortality reduction among patients with hematological malignancies compared to a cohort of hematological patients without therapy at Czech hematological centers.

Summary. Our timely habilitation results substantially and definitively contribute towards optimization of IFD and COVID-19 management among immunocompromised patients with hematological malignancy.

Key Words:

Invasive fungal diseases – non-culture-based diagnostics – galactomannan – 1,3-beta-D-glucan – PCR – immunocompromised patient – hematological malignancy – SARS-CoV-2 – COVID-19

Contents

Commentary	3
Contents	6
1. Introduction	10
1.1. Infections in Immunocompromised Patients	10
1.2. Invasive Fungal Diseases in Immunocompromised Patients	15
1.3. Infections Caused by SARS-CoV-2 in Immunocompromised Patients	21
1.4. Annexes to Introduction	23
1.4.1. Annex 1	23
1.4.2. Annex 2	28
1.4.3. Annex 3	28
1.4.4. Annex 4	28
1.4.5. Annex 5	29
1.4.6. Annex 6	38
1.4.7. Annex 7	40
1.4.8. Annex 8	47
1.4.9. Annex 9	59
1.4.10. Annex 10	61
1.4.11. Annex 11	63
2. Habilitation Thesis Goals	78
3. Invasive Fungal Diseases in Immunocompromised Patients	80
3.1. Invasive Fungal Infections – Optimization of Diagnostics and Treatment	80
3.1.1. Annexes to Chapter 3.1.	85
3.1.1.1. Annex 12	85

3.1.1.2. Annex 13	87
3.1.1.3. Annex 14	97
3.2. Glucan in Invasive Fungal Disease Diagnostics	99
3.2.1. Annexes to Chapter 3.2.	101
3.2.1.1. Annex 15	101
3.2.1.2. Annex 16	111
3.3. Galactomannan in Invasive Fungal Disease Diagnostics	119
3.3.1. Annexes to Chapter 3.3.	121
3.3.1.1. Annex 17	121
3.3.1.2. Annex 18	130
3.4. PCR in Invasive Fungal Disease Diagnostics	136
3.4.1. Annexes to Chapter 3.4.	139
3.4.1.1. Annex 19	139
3.4.1.2. Annex 20	141
3.4.1.3. Annex 21	143
3.4.1.4. Annex 22	145
3.4.1.5. Annex 23	147
4. COVID-19 Among Immunocompromised Patients	149
4.1. Annexes to Chapter 4	154
4.1.1. Annex 24	154
4.1.2. Annex 25	171
4.1.3. Annex 26	178
4.1.4. Annex 27	186
4.1.5. Annex 28	188

4.1.6. Annex 29	190
5. Conclusions and Perspectives	192
5.1. Habilitation Thesis Conclusions at Key Points	193
6. References	195
7. List of Abbreviations	205
8. List of Figures, Tables and Annexes	208
8.1. List of Figures	208
8.2. List of Tables	208
8.3. List of Annexes	208

In this work, certain candidate articles are provided for an overview "in extenso", and some only in the form of a first page and an abstract, while "in extenso" are listed in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*.

1. Introduction

The author developed the habilitation thesis as an annotated set of publications corresponding to her more than 20 years of experience at the Department of Internal Medicine-Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, including coordination of a number of national projects with international cooperation. During this period, the applicant published more than 60 articles as an author or co-author, of which 30 are included in the Web of Science (WOS) Core Collection with a total of 412 citations (excluding self-citations). In 13 publications, applicant is the primary or contributing author. As an author and co-author, the candidate participated in 12 chapters of peer-reviewed books or textbooks. Her academic activities also include educational videos. As a national coordinator, the aspirant participates in countrywide projects of the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL) - FIND (Fungal INfection Database), DATOOL-AML (Database of Acute Leukemia Tool – Acute Myeloid Leukemia), MIND (Myeloproliferative Neoplasia Database) and international projects - FUNGISCOPE, HARMONY-AML, PETHEMA-APL. Locally, author coordinates COVID-19 projects among hematological patients including the academic clinical study COVIGI evaluating vaccination efficacy and safety against COVID-19 in hematooncological patients. Internationally, applicant contributes to the EPICOVIDEHA project with hematological patients.

The habilitation thesis is focused on 2 thematic areas related to both the optimization of diagnostics and invasive fungal diseases (IFD) and COVID-19 treatment among hematological patients.

1.1. Infections in Immunocompromised Patients

Infections, along with uncontrollable underlying disease, are the leading causes of death in immunocompromised patients. The causative agents of infections in hematooncological patients are mainly bacteria, less often yeasts or filamentous fungi, viruses or, very rarely, parasites. About 15% of all infections are polymicrobial infections. Infection source is most often endogenous-especially the patient's microflora (dominantly the digestive tract), less often it is an exogenous infection (inhaled air, transmission by staff ...). The causes of hematooncological patient increased susceptibility to infections are many: Hematooncological diseases, anticancer treatment (chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy), deep and prolonged neutropenia, physiological barrier disruption, malnutrition, immobilization,

comorbidities. Among neutropenic patients, clinically or radiologically documented infections cover about 60% of all infectious complications with pneumonia the most common in a third of them. In the case of deep neutropenia, classic clinical or radiological signs of infection may not develop, and the only manifestation is fever. Such a condition, when a singular sign of infection in a neutropenic patient is febrile, available examination procedures can't determine infection source and no pathogen has been confirmed by culture, we term febrile neutropenia, which is definitively the most common form of infection in these patients. Infection in a neutropenic patient, both with and without clinical and microbiological evidence of the infection source (ie febrile neutropenia) can lead very quickly (within a few hours) to infection generalization, ie. development of sepsis and septic shock. Advanced septic shock mortality is very high among neutropenic patients without adequate antimicrobial treatment. Furthermore, with high-risk patients, antimicrobial prophylaxis is indicated [1].

Bacterial Infections

Bacterial infections are the most common infections in cancer patients. Individual bacterial strain representation is influenced by prophylactic and empirical antimicrobial treatment along with local epidemiological factors. In the group of gram-positive infections, streptococci, enterococci, and staphylococci seizures have an absolute predominance (however, a large part of staphylococcal strain seizures only represent contamination). Regarding gram-negative infections, the most common causes are *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., and *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Bacterial infection diagnosis is based on clinical, laboratory, imaging, and microbiological examinations. In recent years, an increase in infections caused by multidrug-resistant bacteria has been observed [3, 4]. The development of antibacterial resistance subsequently complicates the treatment of infections. The prevalence of resistance is influenced by local antibiotic use policies in prophylaxis and treatment, infection control measures, and local patterns of resistance in a particular hospital and throughout the country.

Viral Infections

Viral infections are a common complication of immunocompromised patients. T-cell-mediated immunity plays a major role in viral infection defense. Viral infections are most common in hematological patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), especially from an allogeneic donor, when the viral infections are often lethal. Customary characteristics of the most common herpesviruses are the high prevalence in the population, the emergence of latent infection after primary infection, and the risk of endogenous virus reactivation during

immunodeficiency [5-8]. Nonetheless, infections caused by other (non-herpes) adenoviruses and respiratory viruses (RS-virus, influenza virus, etc.) which are less common can certainly complicate patient treatment [9-12].

Infection Caused by *Pneumocystis Jiroveci*

Pneumocystis jiroveci pneumonia (PCP) is a typical opportunistic infection. Main risk factors are corticotherapy, low CD4+ cell counts, medications causing T cell dysfunction, and solid organ transplantation. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis introduction reduced PCP incidence among patients with HSCT from approximately 10% to 0.5% [13]. However, mortality remains at around 30%. Two thirds of patients have a fulminant disease onset with high fever and rapid dyspnea development, tachypnea, and severe hypoxemia; the others have a subacute onset with low temperatures, dry cough, and slower dyspnea development for several days. The most common clinical symptoms are dyspnea (90%) and fever (85%). Diagnosis is based on a combination of the above-described clinical characterization, atypical pneumonia detection within the clinical examination, and, most frequently, bilateral "ground-glass" opacities on the imaging examination. However, definitive etiology confirmation recognizes only the demonstration of 1,3-beta-D-glucan positivity in the serum or the presence of *Pneumocystis jiroveci* identified by PCR in the airway sample. The most beneficial material is fluid obtained by bronchoalveolar lavage [14, 15]. High-dose trimethoprim-sulfamethoxazole remains the preferred drug for advanced PCP [16].

Febrile Neutropenia

"Febrile neutropenia" describes a life-threatening complication that requires immediate effective antibiotics initiation, even without culture results. In most neutropenic patients, colonizing microorganisms represent causative agents. Infection frequency depends on neutropenia depth and duration. Up to 80% of patients with deep and prolonged neutropenia (neutrophils below $0.1 \times 10^9/L$ lasting more than 10 days) develop fever and infectious complications. Fever is very often the only manifestation of an infection in neutropenic patients, since neutrophilic leukocytes that could otherwise create typical inflammation signs are missing (pneumonia without obvious X-ray infiltrates, meningitis without cerebrospinal fluid pleocytosis, urinary tract infections without pyuria). In the most severe cases without immediate antibiotic treatment, the clinical picture of sepsis and septic shock could develop very quickly. Before and during antimicrobial treatment, the patient's risk of complications must be assessed. Before a definitive infectious etiology determination, patient placement into either a low or

high-risk group serves to facilitate prompt appropriate antibiotics initiation within an outpatient or inpatient regimen. Generally, in cases where no potential infection site is identified, empirical antibiotic treatment should cover a broad common bacterial range, taking into account clinical trial results, local epidemiological status, and patient risk, with possible therapy adjustment in subsequent days [17, 18]. However, the most dangerous bacterial spectrum, ie G-bacteria (especially *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp.), must always be covered. Gram-positive (G+) infections are not serious in most cases, permitting empirical antibiotic treatment with an effect on G+ bacteria postponed up to 48-72 hours or initiated in cases strongly suspecting G+ infection (catheter infection, mucositis) or high incidence of G+ infections with a fulminant course (*Streptococcus alfa haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*). One third of patients with ongoing prolonged fever during 7 days of antibiotic treatment develop IFD (caused by *Candida* sp. or *Aspergillus* sp. in most cases) and empirical antifungal treatment is therefore indicated. Detailed diagnosis of fever of unknown etiology (FUO) is an important part of a comprehensive approach with hematology patients.

Fungal infections

Fungal infections are a group of infectious complications associated with a very serious prognosis in hematological patients. According to degree of invasiveness, fungal infections are divided into superficial (affecting body surfaces - e.g oropharyngeal candidiasis, aspergillosis ...) and invasive (invasive candidiasis, candida meningitis, invasive pulmonary aspergillosis, disseminated invasive aspergillosis ...). The issue of opportunistic IFD among immunocompromised patients is detailed by the aspirant in Chapter 1.2.

The epidemiology, diagnosis, treatment, and prognosis of infectious complications in immunocompromised patients are comprehensively addressed in the following journal publications and book chapters by the applicant in the role of author or co-author (sorted chronologically in ascending order). Five selected publications are part of Chapter 1.4. Annexes to Introduction (Annexes 1.4.1 to 1.4.5. sorted thematically):

- Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I., Moulis M., Křikavová L., Mayer J., Vorlíček J. Infekční komplikace v onkologii. *Referátový výběr z onkologie*. 2007;(3-4):45-51. ISSN 0034-2815.
- Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I., Mayer J. Prevence a léčba febrilní neutropenie. *Referátový výběr z onkologie*. 2009;26(1-2):9-20. ISSN 0034-2815.

- Weinbergerová B., Ráčil Z., Mayer J. Podpůrná léčba jako součást terapie chronické lymfocytární leukémie. *Transfúze Hematol. dnes.* 2010;16(1):103-111. ISSN 1805-4587.
- Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Virové infekce. In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie.* 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 363-364. ISBN 978-80-726-2715-8. (see Annex 2 in Chapter 1.4.2.)
- Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Pneumonie způsobená *Pneumocystis jirovecii* (carinii). In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie.* 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 361-363. ISBN 978-80-726-2715-8. (see Annex 3 in Chapter 1.4.3.)
- Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Febrilní neutropenie. In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie.* 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 349-359. ISBN 978-80-726-2715-8. (see Annex 4 in Chapter 1.4.4.)
- Volfova P., Lengerova M., Lochmanova J., Dvorakova D., Ricna D., Palackova M., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *J Clin Virol.* 2014; 61(2):270-274. ISSN 1386-6532.
- Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I. a Mayer J. Bakteriální infekce. In: Cetkovský P., ed. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk.* 1. vyd. Praha: Galén, 2016, s. 129-131. ISBN 978-80-749-2267-1. (see Annex 1 in Chapter 1.4.1.)
- Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I. a Mayer J. Horečka nejasného původu, systémové infekce. In: Cetkovský P., ed. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk.* 1. vyd. Praha: Galén, 2016, s. 122-128. ISBN 978-80-749-2267-1. (see Annex 5 in Chapter 1.4.5.)
- Kabut T., Weinbergerová B., Kocmanová I., Žák P., Zavřelová A., Kouba M., Drgoňa L., Navrátil M., Múdrý P., Kýr M., Keslová P., Haber J., Mallátová N., Tanušková D., Novák J., Mayer J., Ráčil Z. Použití a infekce centrálních venózních katetrů u hematologických pacientů: situace v České republice a na Slovensku a doporučení v jejich prevenci a diagnostice. *Transfúze Hematol. dnes.* 2018;24(1):27-36. ISSN 1805-4587.

- Kabut T., Weinbergerová B., Kocmanová I., Žák P., Zavřelová A., Kouba M., Drgoňa L., Navrátil M., Múdrý P., Štěrba J., Sedláček P., Keslová P., Haber J., Mallátová N., Tanušková D., Novák J., Faber E., Mayer J., Ráčil Z. Prevence infekčních stavů u hematologických pacientů po splenektomii a s funkčním hyposplenismem – doporučení CzEch Leukemia Study Group for Life (CELL). *Transfuze Hematol. dnes.* 2018;24(4):304-313. ISSN 1805-4587.
- Kabut T., Kocmanová I., Žák P., Kouba M., Drgoňa L., Navrátil M., Múdrý P., Sedláček P., Haber J., Mallátová N., Dóczyová D., Novák J., Faber E., Weinbergerová B., Štěrba J., Mayer J., Ráčil Z. Revakcinace dospělých pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk: doporučení České leukemické skupiny – pro život. *Transfuze Hematol. dnes.* 2019;25(3):269-280. ISSN 1805-4587.
- Soják L., Ráčil Z., Kabut T., Weinbergerová B., Mayer J., Haber J., Žák P., Radocha J., Navrátil M., Hájek R., Kozák T., Sedláček P., Múdrý P., Szotkowská R., Papajík T., Szotkowski T., Cetkovský P., Teiserová D., Mallátová N., Lukáš J., Drgoňa L. Odporúčania pre skrining, diagnostiku, profylaxiu a liečbu hepatitíd u hematoonkologických pacientov – odporúčania CELL. *Transfuze Hematol. dnes.* 2020; 26(4):333-342. ISSN 1805-4587.
- Kabut T., Weinbergerová B., Lengerová M., Folber F., Mayer J. Letermovir u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk: přehled literatury. *Transfuze Hematol. dnes.* 2022; In Press. ISSN 1805-4587.

1.2. Invasive Fungal Diseases in Immunocompromised Patients

Invasive fungal infections (IFD) are principal causes of morbidity and mortality in high-risk immunocompromised patients. Significantly, patients with hematological malignancies, especially in induction therapy for acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome, patients after ALO-HSCT, and those undergoing long-term immunosuppressive therapy are at high risk [18]. Furthermore, new immunomodulatory drugs for hematological malignancy treatment address a new spectrum of at-risk patients. Additional risk factors for IFD development include prolonged deep neutropenia and long-term corticosteroids treatment [15]. Despite a number of potent available antifungals, successful IFD treatment is often hampered by limited diagnostic options. Subsequent delay in antifungals initiation is an important factor

contributing to immunocompromised patients' impaired survival. Conversely, excessive employment of prophylactic or empirical treatment without clear evidence of IFD leads to a high overdose rate associated with significant toxic side effects and the risk of developing drug resistance. However, mortality attributed to IFD has generally declined in recent years with advances in diagnosis, preemptive treatment, and prophylaxis.

Invasive Fungal Disease Epidemiology

Fungal infections can be caused by filamentous fungi (*Aspergillus* sp., Mucormycetes, *Fusarium* sp.) and yeast (*Candida albicans* and non-*albicans*, *Cryptococcus* sp.). *Aspergillus* spp. and *Candida* spp. are the most common fungal pathogens inducing IFD among hematological patients [19]. Overall incidence of invasive aspergillosis (IA) is around 1-2% and invasive candidiasis about 1% depending on the baseline hematological disease and prophylactic antifungal treatment [19-21]. Mortality attributed to IA can reach 75% and has, accordingly, a negative prognostic impact on immunocompromised patients' survival.

Over recent decades, routine prophylaxis introduction among patients at high risk for IFD together with other environmental factors have caused a shift in IFD epidemiology, especially to non-*albicans* strains of *Candida* spp. (*C. glabrata*, *C. krusei* and *C. tropicalis*), which may be less sensitive to azole antifungals [22]. Similarly, IA incidence has been demonstrably associated with the widespread use of posaconazole and voriconazole prophylaxis in high-risk patients and a spectrum shift in favor of rare pathogens. Despite improved diagnosis and treatment, mortality associated with IFD remains high, and antifungal prophylaxis is, consequently, an important strategy with high-risk patients [19]. Early diagnosis and treatment are crucial to improving prognosis [15]. Notwithstanding the best of intent, IFD is still frequently a "post-mortem" diagnosis among hematologic patients [23].

Invasive Fungal Disease Diagnosis

IFD diagnosis is often very complicated and based on a combination of clinical signs, imaging, microbiological methods (culture and „non-culture-based“), and/or histological findings in a patient at risk. Based on these diagnostic techniques, we can classify an IFD as proven, probable, and possible. However, IFD symptoms are mostly late, and non-specific in immunocompromised patients with limited inflammatory response. Culture from sterile materials is often negative or late positive, and histopathological diagnosis requiring invasive procedure is very difficult to perform in critical and pancytopenic patients. Conventional microbiological and histological procedures, although a cornerstone in definitive IFD diagnosis

unfortunately come to naught in routine clinical practice. Furthermore, fungal agents are part of the human microbiome limiting the role of antigen detection and fungal colonization can lead to false positive test results. Most IFD diagnosis, as previously noted, is based on the probability determination dependent on the fulfillment of host, microbiological, and clinical criteria according to the recent EORTC / MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer / Mycoses Study Group) recommendations from 2020 [15]. Conventional imaging methods (X-ray of the lungs) again bring late and non-specific information. Computed Tomography (CT) of the lungs is by far the most beneficial of imaging methods. A lung CT is positive in 40-50% of patients with IA and a normal finding with a simple lung X-ray. With IA cases, the clinical criterion for the most common pulmonary form (IPA) is a predefined pathological CT finding [15, 24, 25].

Microbiological IFD criteria include fungal pathogen detection by routine cytology, direct microscopy, culture, or histology of a native or "post mortem" sample. However, these diagnostic methods affirm low sensitivity (SEN) in the early IFD stages. The above-referenced difficulties with early IFD diagnosis have led to a very significant development of so-called "non-culture-based" methods using the detection of fungal cell wall antigens (serological methods of galactomannan detection, panfungal antigen-1,3-beta-D-glucan-determination) or fungal nucleic acids using molecular biological methods. Galactomannan (GM) is an *Aspergillus* cell wall polysaccharide detectable in serum and other body fluids during IA and represents the gold diagnostic standard [15]. The panfungal antigen, 1,3-beta-D-glucan (BDG), is a cell wall polysaccharide of most fungi except *Cryptococcus* spp. and *Mucorales*. Unlike galactomannan, BDG is burdened with a low positive predictive value (PPV) owing to a high rate of false positive samples. Molecular biological methods have undergone tremendous development in terms of IFD diagnosis within the last decade, as evidenced by their inclusion into recent EORTC / MSG recommendations [15]. Real-time detection techniques are fast, reproducible, automated, and their SEN ranges up to 100% for both invasive candidiasis and IA. In IA detection, a combination of PCR and GM assays has recently confirmed both high sensitivity and specificity [26]. In recent years, every effort has been made towards international validation and standardization of PCR methodology as an IA screening test.

Invasive Fungal Disease Treatment

Early antifungal therapy initiation in immunocompromised patients improves their capacity for survival. Various strategies for accessing antifungal treatment are dependent upon many

factors, including individual IFD risk and local epidemiological situation. In high-risk patients (acute myeloid leukemia, ALO-HSCT), neutropenic, afebrile, and without any IFD symptoms, regular screening using "non-culture-based" methods is recommended, especially in patients without antifungal prophylaxis [27, 28].

Among febrile neutropenic patients who do not respond to broad-spectrum antibiotic therapy, either an empirical antifungal approach is initiated, where antifungals are prescribed for persistent fever, or a preemptive approach involves antifungals introduction in case of high IFD risk based on a suspicious imaging finding. Finally, targeted antifungal treatment is indicated if probable and proven IFD criteria meet expert recommendations [15, 27, 29-32].

The European experts societies recommendations for targeted antifungal treatment in the most common IFDs are shown in Table 1.

Table 1. European Experts Societies Recommendations for First-line Targeted Antifungal IFD Treatment.

IFD type	Antifungal to 1st line targeted treatment	Dosage
Invasive aspergillosis	Voriconazole (Vfend)	<i>6mg/kg BID D1 (iv)</i> <i>4mg/kg BID from D2 (iv)</i>
	Isavuconazole (Cresemba)	<i>200mg TID D1-2</i> <i>200mg QD from D3 (po/iv)</i>
Invasive candidiasis	Micafungin (Mycamine)	<i>100 mg QD (iv)</i>
	Amphotericin B lipid complex (Abelcet)	<i>5mg/kg QD (iv)</i>
Invasive mucormycosis	Amphotericin B lipid complex (Abelcet)	<i>5mg/kg QD (iv)</i>
	Isavuconazole (Cresemba)	<i>200mg TID D1-2</i> <i>200mg QD from D3 (po/iv)</i>
Invasive fusariosis	Voriconazole (Vfend)	<i>6mg/kg BID D1 (iv)</i> <i>4mg/kg BID from D2 (iv)</i>

	Amphotericin B lipid complex (Abelcet)	5mg/kg QD (iv)
Invasive geotrichosis	Amphotericin B lipid complex (Abelcet)	5mg/kg QD (iv)
	Voriconazole (Vfend)	6mg/kg BID D1 (iv) 4mg/kg BID from D2 (iv)

Abbreviations: IFD – Invasive Fungal Disease; BID – Twice a Day; TID – Three Times a Day; QD – One a Day

The epidemiology, diagnosis, treatment, and prognosis of IFD in immunocompromised patients are further detailed and discussed within the following journal publications and book chapters with the applicant in the role of author or co-author (in chronologically ascending order). Six selected publications are part of Chapter 1.4. Annexes to Introduction (Annexes 1.4.6. to 1.4.11. sorted thematically):

- Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Křen L., Křikavová L., Mayer J. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2007;9(3):240-252. ISSN 1212-4184. (see Annex 6 in Chapter 1.4.6.)
- Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Lengerová M., Mayer J. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék*. 2007;53(9):990-999. ISSN 1801-7592. (see Annex 9 in Chapter 1.4.9.)
- Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J. Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2007;13(5):176-183. ISSN 1211-264X. (see Annex 10 in Chapter 1.4.10.)
- Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Folber F., Lengerová M., Moulis M., Ťáčková D., Šmardová L., Janíková A., Navrátil M., Dvořáková D., Vorlíček J. Invazivní aspergilové infekce u hematoonkologických nemocných: význam jednotlivých diagnostických metod, léčebných postupů a nástin finanční náročnosti léčby. *Vnitř Lék*. 2008;54(2):24-36. ISSN 1801-7592.

- Ráčil Z., Kocmanová I., Weinbergerová B., Winterová J., Bohatá Š., Mayer J. Léčba invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných. *Farmakoterapie* 2008;2:207-217. ISSN 1801-1209.
- Ráčil Z., Kocmanová I., Mayer J., Weinbergerová B., Lengerová M. Kombinovaná antimykotická léčba invazivní aspergilózy. *Mimořádná příloha Postgraduální medicíny: Novinky a specifické aspekty v léčbě invazivních mykotických infekcí. Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře.* 2008; 10:19-24. ISSN 1212-4184.
- Ráčil Z., Kocmanová I., Weinbergerová B., Bohatá Š., Winterová J., Mayer J. Terapie invazivních mykóz. *Int Med Prax.* 2008;10(4):167-171. ISSN 1212-7299.
- Ráčil Z., Kocmanová I., Weinbergerová B., Mayer J. Antimykotická profylaxe u nemocných s akutní leukémií a myelodysplastickým syndromem. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře.* 2009;11(3):16-21. ISSN 1212-4184.
- Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Mykotické infekce. In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie.* 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 359-362. ISBN 978-80-726-2715-8. (see Annex 7 in Chapter 1.4.7.)
- Chrenková V., Hubáček P., Weinbergerová B., Sedláček P., Keslová P., Kabíčková E., Pavlíčková K., Srámková L., Snajdauf J., Běbrová E., Nyč O., Starý J., Hamal P. Invasive mucormycosis in pediatric hematology patients--single-center experience from 2005-2010. *Klin Mikrobiol Inf Léč.* 2012;18(4):102-108. ISSN 1211-264X.
- Ráčil Z., Kocmanová I., Haber J., Drgoňa L., Mallátová N., Kouba M., Žák P., Weinbergerová B., Sedláček P., Múdry P., Vokurka S., Cetkovský P., Mayer J. Léčba invazivní aspergilózy – doporučení odborníků s podporou CELL. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře.* 2014;16(3):7-9. ISSN 1212-4184.
- Haber J., Ráčil Z., Drgoňa L., Mallátová N., Cetkovský P., Horáková J., Kocmanová I., Kouba M., Weinbergerová B., Múdry P., Sedláček P., Sejnová D., Žák P., Mayer J. Léčba invazivního kandidového onemocnění a hematogenní kandidové infekce – doporučení odborníků s podporou CELL. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře.* 2014;16(3):11-13. ISSN 1212-4184.
- Žák P., Zavřelová A., Radocha J., Haber J., Drgoňa L., Kouba M., Kocmanová I., Mallátová N., Weinbergerová B., Cetkovský P., Mayer J., Ráčil z. Léčba vzácných invazivních mykóz (mukormykózy, fuzariózy a kryptokokózy) u leukémií a po

- transplantaci hematopoetických buněk (doporučení odborníků s podporou CELL, ČHS JEP, ČOS JEP, SOS). *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2014;16(3):14-15. ISSN 1212-4184.
- Kouba M., Ráčil Z., Haber J., Drgoňa L., Žák P., Kocmanová I., Mallátová N., Weinbergerová B., Cetkovský P., Mayer J. Primární profylaxe invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných – doporučení odborníků – s podporou CELL, ČHS JEP, ČOS, SOS. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2014;16(3):19-21. ISSN 1212-4184.
 - Weinbergerová B., Kocmanová I., Ráčil Z., Mayer J. Serological Approaches. In: Lion T., ed. *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1. vyd. New York: Springer Science+Business Media New York; 2017;1508:209-221. ISBN 978-1-4939-6513-7. (see Annex 11 in Chapter 1.4.11.)
 - Weinbergerová B., Kabut T., Kocmanová I., Drgoňa L., Kouba M., Hričinová M., Gabzdilová J., Guman T., Petečuková V., Novák J., Forsterová K., Haber J., Žiaková B., Bojtárová E., Zavřelová A., Karas M., Chrenková V., Sedláček P., Tkáčiková B., Múdry P., Mallátová N., Timr P., Kolenová A., Tanušková D., Horáková J., Navrátil M., Chudej J., Sokol J., Rolencová M., Žák P., Cetkovský P., Mayer J., Ráčil Z. Změny v epidemiologii invazivních mykotických infekcí v českých a slovenských hematologických centrech v letech 2005–2017: analýza dat FIND. *Transfúze Hematol. dnes*. 2019;25(2):186–196. ISSN 1805-4587. (see Annex 8 in Chapter 1.4.8.)

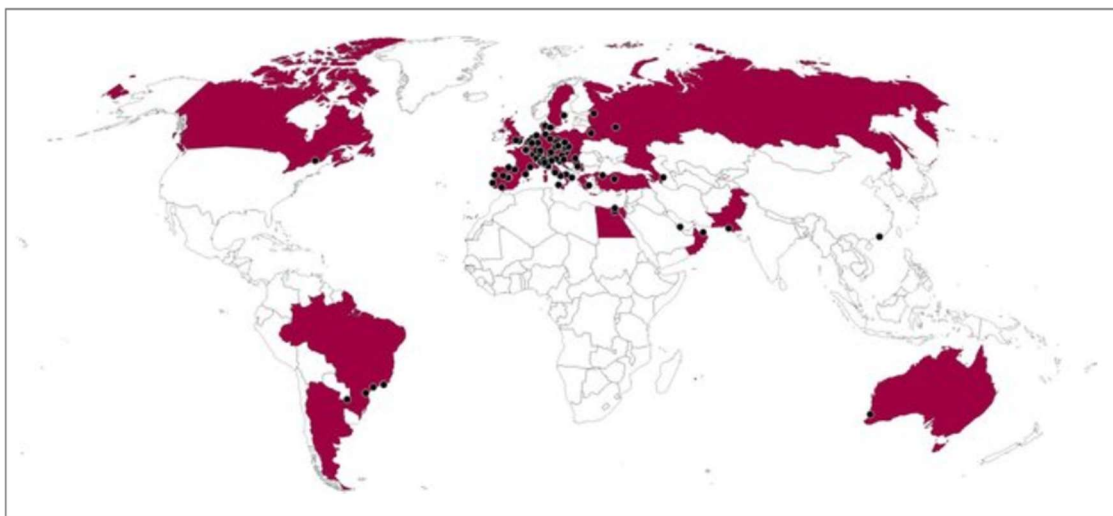
1.3. SARS-CoV-2 Infections in Immunocompromised Patients

Coronavirus Disease 19 (COVID-19), caused by Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus-2 (SARS-CoV-2), was declared a pandemic in March 2020 by the World Health Organization (WHO) which has thus far recognized more than 5 million deaths [33]. Owing to immunodeficiency and immunosuppressive therapy, patients with hematological malignancies are considered to be at high risk for development of a severe and life-threatening case of COVID-19. Additionally, the resulting need to modify the approach and timing of cancer treatment contributes to the deterioration of patients' capacity for survival. Published COVID-19 hematological patient data, applicable to over 50%, notes that mortality is dependent upon

the type and status of the hematological disease, previous cancer treatment, patient age, and comorbidities [34].

COVID-19 cases covering patients with hematological malignancies are registered in the extensive EPICOVIDEHA database (Epidemiology of COVID-19 Infection in Patients with Hematological Malignancies), a worldwide project sponsored by the European Hematology Association (EHA). Active contributors include the Czech hematological centers, one of which is the aspirant's workplace with the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL). The geographical distribution of patients enrolled in EPICOVIDEHA is detailed in Figure 1. To date, a number of extensive analyzes describing epidemiological, clinical, and prognostic data for COVID-19 in hematological patients in which the aspirant participated as a co-author have been published on the basis of substantial data entered in EPICOVIDEHA.

Figure 1. Geographical Distribution of Patients Reported to EPICOVIDEHA.



Adapted from the publication in Annex 27.

1.4. Annexes to Introduction

1.4.1. Annex 1

Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I. a Mayer J. Bakteriální infekce. In: Cetkovský P., ed. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. 1. vyd. Praha: Galén, 2016, s. 129-131. ISBN 978-80-749-2267-1.

**Petr Cetkovský, Jiří Mayer,
Jan Starý, Mariana Hričinová et al.**

TRANSPLANTACE KOSTNÍ DŘENĚ A PERIFERNÍCH HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK



Galén

4.7. Bakteriální infekce

Barbora Weinbergerová, Zdeněk Ráčil,
Iva Kocmanová, Jiří Mayer

ÚVOD

Bakteriální infekce se vyskytují u nemocných po alogenní HCT s největší frekvencí v období do přijetí štěpu. Hlavním rizikovým faktorem tohoto období je těžká granulocytopenie a mukozitida. Pozdní potransplantační období, po dni +100 po HCT, je provázáno vedle defektu buněčné imunity (rekonstituce trvá až 12–24 měsíců) protilátkovým deficitem. Většina pacientů má nízkou hladinu Ig, což vede ke zvýšenému riziku infekcí, způsobenému opouzdřenými (enkapsulovanými) bakteriemi. Hlavním rizikovým faktorem, ovlivňujícím rychlost imunitní rekonstituce, je chronická GvHD. Morbidita a mortalita infekčních komplikací po autologní HCT je nižší. V současné době, kdy jsou ve většině případů použity jako zdroj krvetvorné tkáně periferní hematopoetické buňky, netrvá období granulocytopenie většinou déle než 14 dnů a riziko bakteriálních infekcí je přibližně stejné jako po konvenční chemoterapii vedoucí k dřeňovému útlumu. Protože však jde velmi často o předléčené nemocné, vyskytují se u nich jiné rizikové faktory, které je predisponují k rozvoji infekčních komplikací (nejčastěji prolongovaná kortikoterapie a hypogamaglobulinémie). Pozdní infekční komplikace jsou s výjimkou nemocných, u kterých bylo použito TBI v rámci přípravného režimu, velmi vzácné.

BAKTERIÁLNÍ INFEKCE

■ Období preengraftmentu (období od podání štěpu do hematopoetické rekonstituce)

Bakteriální infekce, které přicházejí v období granulocytopenie před přijetím štěpu, jsou stejné jako při granulocytopenii následující konvenční chemoterapii (viz kap. 4.6.).

■ Intermediární potransplantační období (od hematopoetické rekonstituce do dne +100 po HCT)

Časné potransplantační období (postengraftment), od hematopoetické obnovy do dne +100, je charakterizováno deficitem buněčné imunity se sníženým počtem a funkcí specifických i nespecifických cytotoxických buněk. Hlavním rizikovým faktorem tohoto období, který vede k opoždění imunitní rekonstituce a zvyšuje riziko infekčních komplikací, je akutní GvHD.

Bakteriémie se objeví zhruba u 14 % pacientů v období po uchycení štěpu. Mortalita na bakteriémii je srovnatelná v období před a po uchycení štěpu. Spektrum patogenů u nemocných s dokumentovanou bakteriémií ukazuje převahu G⁺ bakterií (47 % stafylokoků), které jsou odpovědné za 75 % všech infekcí. U nemocných v období preengraftmentu je zastoupení mikrobiologicky dokumentovaných infekcí pouze 5–10 %, naproti tomu v období po uchycení štěpu je jejich zastoupení více než 50 %. Katérové infekce jsou odpovědné za více než 30 % všech bakteriémií během období postengraftmentu. Další časté infekční komplikace během středního potransplantačního období jsou

pneumonie, zvláště způsobené *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*.

■ Pozdní infekce po alogenní HCT (po dni +100 po transplantaci)

Toto období může komplikovat chronická GvHD, charakterizovaná těžkým kombinovaným imunodeficitem buněčným a humorálním. Následkem poškození slizniční bariéry, funkčnímu postižení granulocytů, funkční asplenie a kvalitativní i kvantitativní poruše T- a B-lymfocytů, jsou tyto nemocní ve vysokém riziku infekčních komplikací. Bakteriální infekce postihující horní a dolní dýchací cesty mají hlavní podíl na mortalitě nemocných s GvHD.

Důležité: život ohrožující infekce typicky způsobují enkapsulované bakterie, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*.

Pneumokokové infekce probíhají pod obrazem pneumonie nebo sinusitidy a mohou vyústit až k fulminantnímu septickému stavu. Riziko pneumokokové sepse přetrvává řadu let po HCT. *Haemophilus influenzae* vyvolává infekce horní i dolní části respiračního ústrojí, které mohou opět vyústit v sepsi. U těchto nemocných musí být antimikrobiální léčba zahájena od začátku klinických projevů infekce.

LÉČBA BAKTERIÁLNÍCH INFEKČÍ PO HCT

Léčba bakteriálních infekcí v období granulocytopenie, a to jak empirická, tak cílená, je stejná jako léčba febrilní neutropenie (viz kap. 4.6.).

V období po přijetí štěpu (časném a pozdním), kdy pacient není granulocytopenický, je většinou možné se zahájením antimikrobiální léčby vyčkat do výsledků mikrobiologického vyšetření (např. výsledků z materiálu získaného BAL).

Důležité: dojde-li k rozvoji hypoxie a/nebo příznaků septického stavu, je nutné empirickou ATB léčbu zahájit ihned. Volbou jsou širokospektrá ATB s dobrým účinkem na *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*.

Pokud nedochází po 3–5 dnech empirické ATB léčby ke zlepšení, vždy je nutno vyloučit invazivní mykotickou a virovou infekci.

■ Diagnostika a léčba bakteriálních infekcí podle lokalizace infekčního procesu

Pneumonie

□ Patogeny

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Legionella pneumophila*.

□ Klinický obraz

Febrilie, kašel, expektorace sputa, pleurodynie, dušnost.

□ Diagnostika

RTG snímek plic, HRCT plic, kulturační vyšetření sputa, BAL, sérologické vyšetření.

□ Terapie

Komunitní pneumonie

U ambulantně léčených nemocných bez granulocytopenie a imunosupresivní terapie lze použít monoterapii fluoro-

chinolonem nebo kombinaci betalaktamového ATB (např. amoxicilin/klavulanát, cefuroxim) s makrolidem (např. clarithromycin).

U nemocných vyžadujících hospitalizaci je doporučena monoterapie fluorochinolonem nebo kombinace makrolidu s betalaktamovým ATB (cefalosporin III. generace, ampicilin, event. v určitých případech karbapenemy).

V případě závažné pneumonie nebo u nemocných s granulocytopenií či imunosupresivní léčbou, je indikována kombinace antipseudomonádového betalaktamového ATB (piperacilin/tazobactam, cefepim, karbapenemy) buď s fluorochinolonem (ciprofloxacín/levofloxacín), nebo s makrolidem a zároveň aminoglykosidem.

U pacientů s předchozí infekcí nebo známou kolonizací MRSA lze zvážit přidání vancomycinu.

Nozokomiální pneumonie

Nízké riziko multirezistentních kmenů:

- ceftriaxon nebo levofloxacín/ciprofloxacín nebo ampicilin/sulbactam.

Vysoké riziko multirezistentních G⁻ kmenů:

- protipseudomonádový cefalosporin (cefepim, ceftazidim) nebo protipseudomonádový karbapenem (imipenem, meropenem) nebo betalaktam/β-laktamázový inhibitor (piperacilin/tazobactam plus
- protipseudomonádový fluorochinolon (ciprofloxacín, levofloxacín) nebo aminoglykosid (amikacín, gentamicin, tobramycin).

Při suspekci na *Legionella pneumophila*: do kombinace makrolid či fluorochinolon raději než aminoglykosid. Při vysokém riziku MRSA: linezolid nebo vancomycin.

Katérové infekce

□ Patogeny

Koaguláza-negativní stafylokoky, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, G⁻ bakterie (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*).

□ Klinický obraz

Febrilie/třesavka po i.v. aplikaci do katétru, zarudnutí, sekrece v místě vstupu katétru do kůže.

□ Diagnostika

Současný odběr hemokultury (HMK) z periferní žíly a žilního katétru s časovým rozdílem pozitivit HMK z katétru nejméně 2 h před pozitivitou HMK odebrané z periferní žíly (odběr HMK je nutné provést ještě před nasazením antimikrobiální léčby), kultivační vyšetření žilního katétru.

□ Terapie

Extrakce žilního katétru závisí na lokálním nálezu v okolí jeho vstupu do kůže a typu vykultivovaného patogenu.

Důležité: extrakce žilního katétru je doporučena u nemocných s katérovou infekcí a zároveň těžkou sepsí, hnisavou tromboflebitidou, endokarditidou, pokračující bakteriemií i po 72 h cílené antimikrobiální léčby nebo záchytém *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, hub nebo mykobakteria.

Empirická léčba musí korelovat s lokální epidemiologickou situací a závažností infekce (např. cefalosporin IV. generace, karbapenem nebo betalaktamové ATB s/bz aminoglykosidu).

Vancomycin je doporučen pro empirickou léčbu u nemocných kolonizovaných MRSA.

Kombinovaná empirická léčba s cílem pokrytí G⁻ multirezistentních kmenů, jako *Pseudomonas aeruginosa*, by měla být použita u granulocytopenických pacientů, těžce nemocných v sepsi nebo pacientů se známou kolonizací těmito patogeny.

Abdominální infekce

□ Patogeny

Pseudomonas aeruginosa, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., MRSA, *Enterococcus* spp.

□ Klinický obraz

Bolest, febrilie, nauzea, zvracení, průjem, subileus, ileus.

□ Diagnostika

USG, CT, RTG, kultivační vyšetření sekretů z abscesových formací.

□ Terapie

- Monoterapie
 - betalaktam/betalaktamový inhibitor (ampicilin/sulbactam, piperacilin/tazobactam, ticarcilin/klavulanová kyselina)
 - karbapenemy (ertapenem, imipenem/cilastatin, meropenem)
 - cefalosporiny
- Kombinované režimy
 - aminoglykosid (gentamicin, tobramycin, netilmicin, amikacín) plus ATB s účinkem na anaeroby (clindamycin, metronidazol)
 - cefalosporiny (cefuroxim, ceftriaxon, cefotaxim, cefepim) plus metronidazol
 - ciprofloxacín plus metronidazol

Při suspekci na klostridiovou kolitidu je indikován p.o. metronidazol.

MYKOBAKTERIÁLNÍ INFEKCE

Mykobakteriální infekce se vyskytují u pacientů po HCT s incidencí kolem 0,8 % po alogenních a 0,2 % po autologních HCT. V endemických oblastech se může incidence pohybovat až kolem 15 %. Jedná se obvykle o pozdní infekční komplikaci po HCT, objevující se po dni 100 po HCT. Mortalita na tyto infekce je udávána u nemocných po HCT kolem 15–30 %. Jedná se o typické oportunní infekce. Mykobakteriální infekce rozdělujeme podle původce na tuberkulózu a atypické (netuberkulózní) mykobakteriální infekce.

■ Tuberkulóza

Patogeny, které způsobují toto onemocnění, jsou *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a *M. bovis*.

Obecnými rizikovými faktory pro rozvoj tuberkulózy jsou: imunosuprese, vyšší věk, konkomitantní plicní choroby (chronická obstrukční plicní nemoc, plicní fibróza, bronchiektázie atd.), koexistující jiná infekce, diabetes

Tab. 4.7.-1. Antituberkulotika, jejich dávkování a nežádoucí účinky

Název antituberkulotika	Dávkování	Nežádoucí účinky
Isoniazid	5 mg/kg/den p.o. (max. 300 mg), 15 mg/kg intermit. (max. 1 g)	hepatotoxicita, vzácně periferní neuritidy, event. poškození CNS
Rifampicin	10 mg/kg/den p.o. (max. 600 mg, možno také i.v.), intermit. dávkování stejné	hepatotoxicita, vzácně trombocytopenie, nefrotoxicita Cave: četné lékové interakce! (Snižuje sérové hladiny např. ciclosporinu, tacrolimu, rapamycinu, kortikosteroidů)
Pyrazinamid	25 mg/kg/den p.o., > 55 kg 2 g/den, < 55 kg 1,5 g/den, intermit. 3,5 g/den > 55 kg a 3 g/den < 55 kg	hepatotoxicita, hyperurikémie
Streptomycin	obv. 1 g/den i.m., > 40 let nebo < 50 kg 0,75 g, intermit. dávkování stejné	ototoxicita, nefrotoxicita
Ethambutol	15–20 mg/kg/den p.o., 30 mg/kg 3× týdně, 45 mg/kg 2× týdně	vzácně neuritida n. optici

Pozn.: Kromě uvedených 5 základních antituberkulotik je možné u TBC vyvolané polyrezistentním kmenem *M. tuberculosis* používat v léčbě další léky: ofloxacin, ciprofloxacin, rifabutin, clarithromycin, kanamycin, amikacin, erythromycin, cycloserin, ethionamid, cotrimoxazol, amoxicilin/klavulanová kyselina a další. Používání těchto léků je přísně individualizované a vychází ze zjištěné citlivosti kmene nebo klinického efektu.

mellitus, deficit CD4+ T-lymfocytů, HIV infekce. Rizikovými faktory u nemocných po HCT jsou léky používané v přípravných režimech způsobující depleci/dysfunkci T-lymfocytů (např. fludarabin, ATG, alemtuzumab), převod dárcovského štěpu chudého na T-lymfocyty, podávání kortikosteroidů, celotělové ozáření, GvHD.

Nejčastější způsob rozvoje tuberkulózy po HCT je reaktivace latentní infekce u nemocných s předchozí expozicí. Nejfrekventnější je postižení plic (55 %). Méně časté je mimoplicní postižení (játra, kůže, CNS, skelet, lymfatické uzliny, močový měchýř, GIT a jiné) či diseminovaná forma. Klinickým projevem bývá často pouze FUO. Není jednotný nálezh na RTG/HRCT plic, může se jednat o ložiskové či difuzní intersticiální infiltráty, noduly, pleurální výpotek nebo dutinové léze. Teplota bývá přítomna velmi často. Léze na očním pozadí mohou být časnou známkou diseminace onemocnění.

V diagnostických metodách selhávají jak kultivační metody pro nutnost dlouhodobé (šestitýdenní) kultivace, tak i tuberkulinový test (Mantoux test) pro svou nízkou senzitivitu u anergních imunokompromitovaných nemocných. Zlatým standardem tedy zůstává v diagnostice přímý průkaz acidorezistentních tyčků ve vzorku získaném z místa suspekčního z infekce barvením podle Ziehl-Neelsena či histopatologický průkaz tuberkulózního uzlíku nebo exsudátu v tkáni. Diagnózu podporuje anamnéza, RTG či CT nálezh, tuberkulinový test, bronchoskopie. Relativně novou metodou v diagnostice TBC je Quantiferon-TB test (kvantifikace IFN- γ uvolňovaného ze senzibilizovaných lymfocytů purifikovaným proteinem z *M. tuberculosis*), avšak i u tohoto testu snižuje senzitivitu imunosuprese nemocných po HCT. Další metodou, která významně napomáhá ke zkrácení času do diagnostiky TBC, je PCR.

Současná doporučení pro terapii mykobakteriálních infekcí představují použití kombinované léčby. Iniciální fáze terapie trvá zhruba 2 měsíce a probíhá za hospitalizace, pokračovací fáze (obvykle ambulantní) následuje bezprostředně po fázi iniciální, trvá obvykle 4–6 měsíců a terapie je buď denní nebo intermitentní (většinou 3krát

týdně). Standardní kombinace antituberkulotik užívaná pro iniciální léčbu je: isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol nebo streptomycin, pro pokračovací fázi pak kombinace: isoniazid/rifampicin nebo isoniazid/ethambutol. Léky užívané pro jednotlivé fáze léčby, jejich dávkování a nežádoucí účinky jsou uvedeny v tab. 4.7.-1.

■ Atypické mykobakteriální infekce

Nejčastější druhy netuberkulózních mykobakterií vyvolávající onemocnění jsou: *M. avium* komplex – MAC, které zahrnuje *M. avium* a *M. intracellulare* a dále *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoens*, *M. ulcerans*. V dnešní době je identifikováno více než 120 mykobakteriálních druhů, které mohou vyvolat onemocnění u lidí. Rezervoárem netuberkulózních mykobakterií jsou sladkovodní i mořské vodní plochy, půda, biofilmy. Netuberkulózní mykobakteria jsou méně virulentní než *M. tuberculosis*. Rizikové faktory jsou stejné jako u tuberkulózy.

Plicní manifestace se vyskytuje přibližně u 94 % onemocnění, mimoplicní formy postihují kůži, kosti, lymfatické uzliny. Klinické a RTG nálezy jsou stejné jako u TBC. V diagnostice nám slouží klinické příznaky plicní infekce, obraz nodulární nebo dutinové opacit na RTG plic nebo multifokální bronchiektázie s mnohočetnými drobnými uzlíky na HRCT, vyloučení jiných možných diagnóz včetně TBC a mikrobiologické nálezy (kultivační průkaz netuberkulózního mykobakteria ze dvou separátních vzorků sputa a/nebo z bronchoalveolární laváže a/nebo histopatologický nálezh granulomatózního zánětu nebo acidorezistentních tyčků z transbronchiální nebo jiné plicní biopsie a zároveň pozitivní kultivace).

Léčba trvá obvykle 12 měsíců po dosažení negativní kultivace. Standardem je kombinovaná antimikrobiální léčba. Používanými léky jsou: clarithromycin/azithromycin, ethambutol, rifampicin, a dále např. streptomycin, amikacin, isoniazid, rifabutin, ciprofloxacin. Indikacemi k chirurgické léčbě jsou recidivující hemoptýza, lokalizovaná léze, solitární noduly, případy nereagující na systémovou léčbu, recidiva onemocnění nebo lymfadenitida.

1.4.2. Annex 2

Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Virové infekce. In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 363-364. ISBN 978-80-726-2715-8.

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.3. Annex 3

Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Pneumonie způsobená *Pneumocystis jirovecii* (carinii). In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 361-363. ISBN 978-80-726-2715-8.

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.4. Annex 4

Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Febrilní neutropenie. In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 349-359. ISBN 978-80-726-2715-8.

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.5. Annex 5

Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I., Mayer J. Horečka nejasného původu, systémové infekce. In: Cetkovský P., ed. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. 1. vyd. Praha: Galén, 2016, s. 122-128. ISBN 978-80-749-2267-1.

**Petr Cetkovský, Jiří Mayer,
Jan Starý, Mariana Hričinová et al.**

TRANSPLANTACE KOSTNÍ DŘENĚ A PERIFERNÍCH HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK



Galén

4.6. Horečka nejasného původu, systémové infekce

Barbora Weinbergerová, Zdeněk Ráčil,
Iva Kocmanová, Jiří Mayer

ÚVOD

Nemocní po transplantaci hematopoetických buněk (HCT) mají závažný kombinovaný imunodeficit. V období před příhojením (tzv. preengraftmentu) stoupá riziko rozvoje oportunních infekcí převážně díky dlouhodobé a hluboké granulocytopenii. U pacientů s velmi závažnou granulocytopenií, která trvá déle než 10 dní, se v 80 % objeví horečka a infekční komplikace. U více než 50 % febrilních epizod nelze identifikovat místo infekce.

DEFINICE FEBRILNÍ NEUTROPENIE

Granulocytopenie (méně přesně tzv. neutropenie) je definována jako pokles neutrofilních granulocytů $< 0,5 \cdot 10^9/l$ nebo pokles $< 1,0 \cdot 10^9/l$ s předpokládaným poklesem $< 0,5 \cdot 10^9/l$ v následujících dnech. Podle hloubky poklesu granulocytů rozlišujeme granulocytopenii mírnou: $< 1,0 \cdot 10^9/l$, středně závažnou: $< 0,5 \cdot 10^9/l$ a velmi závažnou: $< 0,1 \cdot 10^9/l$.

Febrilie: existuje více definic: jednou z nich je např. jednorázově změřená orální teplota $\geq 38,3^\circ\text{C}$ nebo teplota $\geq 38^\circ\text{C}$ trvající ≥ 1 h.

Jakékoliv spojení febrilie s granulocytopenií označujeme jako **febrilní neutropenii (FN)**, i když horečka nemusí

být vždy způsobena infekcí. Na druhé straně mohou být u některých granulocytopenických nemocných příznaky infekce i bez doprovodné teploty (např. bolest břicha nebo okolí konečníku, bolestivé kožní infiltráty, těžká mukozitida). Horečka může chybět také při současné léčbě kortikosteroidy, nesteroidními antiflogistiky. I tyto osoby by měly být považovány za nemocné s aktivní infekcí a měly by být léčeny dle zásad pro FN.

EPIDEMIOLOGIE FEBRILNÍ NEUTROPENIE

U většiny granulocytopenických nemocných původcem infekce **kolonizující mikroorganismy**, naopak méně často pak jde o mikroorganismy získané z okolí. Iniciálními patogeny jsou nejčastěji bakterie, méně často viry. V pozdější fázi FN mohou vznikat druhotné infekce způsobené často kvasinkami a plísněmi. Tomu napomáhá léčba širokospektrými antibiotiky (ATB). V nejvýznamnější skupině bakteriálních infekcí u granulocytopenických pacientů od 80. let minulého století výrazně dominují infekce grampozitivní (G^+) nad gramnegativními (G^-), tvoří 70–80 % mikrobiologicky dokumentovaných bakteriálních infekcí (tab. 4.6.-1.).

Primárním anatomickým místem vzniku infekce je nejčastěji gastrointestinální trakt, vedlejší nosní dutiny, plíce nebo kůže. Protinádorové léčebné postupy totiž narušují slizniční bariéru, což umožní invazi mikroorganismů s nízkou patogenitou, kolonizujících tělesné povrchy. Další bránou vstupu infekce do těla jsou invazivní zákroky narušující přirozené bariéry.

Incidence FN u pacientů po HCT se pohybuje až kolem 90 %.

Tab. 4.6.-1. Nejčastější patogeny při febrilní neutropenii

Bakterie	Viry	Kvasinky a plísně
G⁺: stafylokoky koaguláza-negativní <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus</i> spp. viridující streptokoky <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virus herpes simplex 1 + 2 Lidský herpetický virus 6 Cytomegalovirus Respirační viry (respiračně syncyální virus, virus parainfluenzy, viry influenzy, adenoviry)	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.
G⁻: <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella</i> spp. jiné enterobakterie		

Tab. 4.6.-2. Rizikové faktory pro rozvoj infekce u granulocytopenického pacienta

Rizikový faktor	Příklad
Nádorové onemocnění	akutní leukémie (granulocytopenie), chronická lymfatická leukémie (hypogamaglobulinémie), lymfomy (defekt buněčné imunity), mnohočetný myelom (abnormální imunoglobuliny)
Protinádorová léčba	chemoterapie, radioterapie, kortikoterapie, HCT, splenektomie
Narušení fyziologických bariér	poškození sliznic chemoterapií nebo radioterapií, zavedené intravenózní katétry, močový katétr, umělá plicní ventilace, narušení fyziologické mikroflóry
Obstrukce dýchacích cest, močových cest a trávicího ústrojí nádorem	
Malnutrice	
Přidružené choroby doprovázené poruchou obranyschopnosti	diabetes mellitus, renální insuficience

Tab. 4.6.-3. Rozdělení nemocných do prognostických skupin

Nízké riziko	Vysoké riziko
<ul style="list-style-type: none"> absolutní počet granulocytů a očekávaný nejnižší počet granulocytů $\geq 0,1 \cdot 10^9/l$ granulocytopenie v době infekce trvá < 7 dnů a celková očekávaná doba granulocytopenie < 10 dnů nejvyšší teplota $< 39^\circ C$ nepřítomnost známek sepse / závažné infekce (hypotenze, tachykardie, dehydratace, bolest břicha, neurologické změny) normální funkce jater a ledvin není infekce nitrožilního katétru klinicky stabilní pacient / ambulantní pacient nádorové onemocnění v remisi není přidružená žádná jiná závažná choroba (diabetes mellitus, CHOPN, chronická srdeční insuficience) dobrá performance status nemocný dříve neprodělal mykotickou infekci věk < 60 roků 	<ul style="list-style-type: none"> absolutní počet granulocytů a očekávaný nejnižší počet granulocytů $< 0,1 \cdot 10^9/l$ granulocytopenie v době infekce trvá ≥ 7 dnů a celková očekávaná doba granulocytopenie > 10 dnů teplota $> 39^\circ C$ klinicky nestabilní pacient (hypotenze, tachykardie, dehydratace, bolest břicha, neurologická symptomatologie) / hospitalizovaný pacient špatná funkce jater nebo ledvin patologie na RTG hrudníku HCT akutní leukémie, pokud není v remisi progredující nádorové onemocnění závažně přidružené onemocnění (diabetes mellitus, chronická obstrukční plicní nemoc, chronická srdeční insuficience) věk > 60 roků

Pozn.: Nízké riziko má nemocný splňující většinu kritérií v levém sloupci. Vysoké riziko má nemocný, který splňuje i jen jediný faktor uvedený v pravém sloupci tabulky.

Rizikové faktory: vedle hloubky a délky granulocytopenie predisponuje granulocytopenického nemocného ke vzniku infekčních komplikací celá řada faktorů, které působí synergiicky s poklesem granulocytů (tab. 4.6.-2.).

KLINICKÝ OBRAZ FN

Důležité: horečka je velmi často jediným projevem přítomné infekce u granulocytopenických nemocných, neboť na vytvoření dalších typických známek zánětu (infiltrátů a jejich klinických projevů) chybějí granulocyty.

Je-li zřejmé ložisko infekce, potom klinický obraz odpovídá zánětlivému postižení v dané lokalizaci. V nejzávažnějších případech a bez okamžité ATB léčby pak může velmi rychle dojít k rozvoji klinického obrazu sepse a septického šoku.

VYŠETŘENÍ NEMOCNÉHO S FN

Vyšetření nemocného s FN zahrnuje důkladné klinické a laboratorní vyšetření (KO s diferenciálním rozpočtem leukocytů, biochemické vyšetření včetně CRP a/nebo prokalcitoninu, koagulační vyšetření včetně markerů DIC a biochemické a mikroskopické vyšetření moči a močového sedimentu). Dále pak mikrobiologická vyšetření s odběrem hemokultury (HMK), obvykle z periferní žíly i ČŽK, moči, stolice, stěru z dutiny ústní a dalších míst suspektních z infekce ještě před zahájením ATB terapie.

Doporučováno je **pravidelné monitorování mikrobiologické flóry** (dutiny ústní, moči a rekta) granulocytopenického nemocného (a to i afebrilního) bez známek lokalizované infekce minimálně v týdenních intervalech, které může napomoci při volbě iniciálních ATB (MRSA, VRE, *Klebsiella* spp. – produkci širokospektré β -laktamázy, multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, kolonizace kmenem *Candida tropicalis*). K mikrobiologickému monitorování u vysoce rizikových granulocytopenických nemocných patří v současné době také pravidelné odběry séra (minimálně 2krát týdně) k průkazce povrchových antigenů *Aspergillus* spp. – galaktomananu – pomocí sandwich ELISA (Platelia *Aspergillus* test), které mohou urychlit

včasný záchyt invazivní aspergilózy. V potransplantačním období jsou součástí pravidelného monitoringu i odběry na virologická vyšetření (CMV, EBV atd.).

Ze zobrazovacích metod je nutné provedení RTG srdce a plic, a to při vstupním vyšetření a následně při klinických známkách infekce dýchacích cest. U nemocných s plicní symptomatologií (i při negativním RTG) a/nebo perzistujícími febriliemi déle než 5–7 dní i přes ATB léčbu, je nutné provedení HRCT plic, které zachytí známky pneumonie u více než poloviny pacientů s FN s normálním nálezem na RTG plic a navíc je schopno odlišit charakter infiltrací, přesněji určit lokalizaci infekce a lépe zobrazit dutinový proces. Při klinických známkách infekce v oblasti paranazálních dutin je nutné RTG, event. CT vyšetření této lokalizace. Při klinických známkách cholecystitidy, pyelonefritidy, apendicitidy, peritonitidy, hepatosplenomegalie či jiné patologie v dutině břišní, je nutné provést USG, případně CT vyšetření. Při podezření na endokarditidu nebo při přetrvávajících febriliích i přes ATB terapii (zvláště u nemocných s anamnézou kanylové infekce či chlopenní vady), je indikováno provedení ECHO (transezofageální, event. transthorakální).

Vyšetření materiálu z infekčního ložiska by mělo být provedeno vždy, pokud to klinický stav a laboratorní hodnoty umožňují. Materiál slouží k histologickému (cytologickému), mikrobiologickému, event. biochemickému a imunologickému vyšetření. Absolutně nejčastěji jde o vyšetření materiálu získaného BAL, která je indikována vždy při klinických a RTG známkách plicní infekce. V některých případech může být indikována plicní biopsie (tenkojehlová nebo otevřená), a to především při podezření na invazivní mykotickou infekci. Dále je nutná punkce pleurálního výpotku, punkce paranazálních dutin, vyšetření likvoru a punkce nebo biopsie kožních lézí při známkách infekce či patologie v těchto oblastech.

STANOVENÍ RIZIKA ROZVOJE KOMPLIKACÍ FN

Před zahájením a v průběhu antimikrobiální léčby je nutné zhodnotit stupeň rizikovitosti nemocného pro rozvoj komplikací. Rozdělení nemocných s FN na skupinu

s nízkým a vysokým rizikem rozvoje komplikací slouží k volbě vlastních ATB a rozhodnutí o ambulanci nebo hospitalizační terapii (tab. 4.6.-3., 4.6.-4.).

Tab. 4.6.-4. Skórovací systém pro určení rozvoje rizika komplikací u pacientů s febrilní neutropenií, založený na MASCC prediktivním modelu

Charakteristika	Skóre
Míra nemoci = klinický stav (vybírá se pouze jedna ze tří možností)	
Žádné symptomy	5
Mírné symptomy	5
Střední symptomy	3
Není hypotenze	5
Není chronická obstrukční plicní nemoc	4
Jde o solidní nádor nebo není přítomna mykotická infekce	4
Není dehydratace	3
Febrilní neutropenie vznikla mimo hospitalizaci	3
Věk do 60 let	2
Nejvyšší teoretické skóre je 26. Pokud dosáhneme skóre 21 a vyšší, znamená to, že pacient má velkou pravděpodobnost projít febrilní neutropenií bez větších komplikací. <i>Poznámka:</i> Skórování nelze použít u dětí mladších 16 let – zde je ukazatelem nekomplikovaného průběhu počet monocytů > 0,1 · 10 ⁹ /l, nepřítomnost komorbidit a normální nález na RTG plic.	

MASCC – Multinational Association for Supportive Care in Cancer

Tab. 4.6.-5. Antibiotická monoterapie

Název	Dávka/den
cefepim i.v. nebo	3× 2 g
ceftazidim i.v. * nebo	3× 2 g
cefoperazon/sulbactam i.v. nebo	3× 2 g
piperacilin/tazobactam i.v. nebo	3× 4,5 g
imipenem/cilastatin i.v. ** nebo	3–4× 1 g
meropenem i.v. **	3× 1 g

* méně vhodný pro monoterapii;

** spíše výjimečně u těžkých stavů

Tab. 4.6.-6. Kombinovaná ATB léčba bez glykopeptidu

	ATB 1		ATB 2	
	Název	Dávka/den	Název	Dávka/den
Nízké riziko	ciprofloxacín i.v. *	2× 400 mg	amoxicilin/klavulanát i.v.	3× 1,2 g
Vysoké riziko	amikacin i.v.	1× 15 mg/kg (max. 1,5 g)	cefepim i.v. nebo ceftazidim i.v. nebo cefoperazon/sulbactam i.v. nebo piperacilin/tazobactam i.v.	3× 2 g 3× 2 g 3× 2 g 3× 4,5 g

* není doporučeno u nemocných s profylaxí chinolony

INICIÁLNÍ ANTIBIOTICKÁ LÉČBA FN

Protože se infekce při granulocytopenii může dramaticky vyvíjet během hodin až do obrazu sepse, septického šoku a smrti, je nezbytné **okamžitě zahájení účinné empirické antimikrobiální léčby** ještě před definitivním průkazem infekce. Volba ATB a rozhodnutí o ambulanci nebo hospitalizační léčbě FN vychází z revidovaných doporučení IDSA (Infectious Diseases Society of America) z roku 2010 a závisí na určení stupně rizika vzniku komplikací u daného nemocného (viz tab. 4.6.-3. a 4.6.-4.), na přítomnosti nebo nepřítomnosti možného zdroje infekce a na lokální epidemiologické situaci daného pracoviště.

Empirická ATB léčba FN musí krýt široké spektrum bakterií (viz tab. 4.6.-2.). **Vždy však musí být pokryta nejnebezpečnější část spektra bakteriálních infekcí, tedy G⁻ bakterie** (především *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp.). G⁺ infekce nemívají ve většině případů dramatický průběh, což umožňuje zahájit u většiny pacientů empirickou léčbu ATB s účinkem na G⁺ bakterie až po 48–72 h od vzniku FN. Avšak na pracovištích s vysokým výskytem G⁺ infekcí s fulminantním průběhem (*Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) musí být iniciální empirická ATB léčba zaměřena i na pokrytí těchto patogenů.

■ Iničiální empirická antibiotická léčba nemocných s nízkým rizikem vzniku komplikací – léčba perorálními antibiotiky v ambulanci péči

Indikace: dobře spolupracující nemocný, léčený v dosahu pracoviště s nepřetržitým provozem, s možností okamžitého návratu do nemocnice při známkách zhoršování klinického stavu po celých 24 h.

Vhodná ATB: kombinace amoxicilinu/klavulanátu p.o. 3× 625 mg denně a ciprofloxacínu p.o. 2× 500 mg denně.

■ Iničiální empirická antibiotická léčba nemocných s vysokým rizikem vzniku komplikací – léčba intravenózními antibiotiky za hospitalizace

Indikace: většina nemocných s FN, včetně nemocných s nízkým rizikem, nemajících možnost okamžitého návratu do nemocnice a/nebo nespolečující.

Iničiální empirická ATB léčba i.v. antibiotiky je volbou jednoho ze tří schémat.

Antibiotická monoterapie

Indikace: nemocní s nízkým rizikem a/nebo vysokým rizikem v dobrém klinickém stavu.

Tab. 4.6-7. Indikace použití vancomycinu v iniciální léčbě febrilní neutropenie

Pracoviště s vysokým výskytem infekcí vyvolaných viridujícími streptokoky
Těžká mukozitida GIT
Podezření na závažnou kanylovou infekci
Známa kolonizace MRSA a penicilin a cefalosporin rezistentními kmeny pneumokoků
Hypotenze nebo jiné známky hemodynamické nestability při septickém stavu bez známého původce (zvláště při prudkém vzestupu teploty nad 40 °C)

Vhodná ATB: doporučená je monoterapie antipseudomonádovým betalaktamovým ATB, karbapenemy nebo piperacilin/tazobactamem (tab. 4.6.-5.).

Kombinovaná antibiotická léčba bez glykopeptidu

Indikace: nemocní s velmi vysokým rizikem komplikovaného průběhu a/nebo klinicky nestabilní nemocní.

Výhoda: vyšší a rychlejší baktericidní aktivita vůči nejvíce virulentním G^- bakteriím (*Pseudomonas* spp.) díky potencionálně synergickému účinku a snížení rizika vzniku rezistence v průběhu léčby.

Vhodné kombinace ATB: tab. 4.6.-6.

Kombinovaná antibiotická léčba glykopeptidovým antibiotikem s jedním nebo dvěma dalšími antibiotiky

Indikace: tab. 4.6.-7.

Nevýhoda: riziko nárůstu incidence G^+ mikroorganismů rezistentních na glykopeptidy (především VRE)! Proto pokud je tento postup zvolen a není-li po 48–72 h identifikován jako zdroj febrilní patogen citlivý pouze na glykopeptid, je nutné jeho podávání ukončit.

Vhodná ATB: vancomycin i.v. 1 g 2× denně. Další ATB s účinkem na G^+ bakterie: teicoplanin i.v. 10 mg/kg 1× denně, tigecyclin i.v. 50 mg 2× denně, telavancin i.v. 10 mg/kg 1× denně, daptomycin i.v. 6 mg/kg 1× denně.

POKRAČOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÉČBY FEBRILNÍ NEUTROPENIE PO 72 HODINÁCH

■ Pacient je v průběhu 72hodinového trvání empirické léčby afebrilní

Původce infekce byl identifikován

Pokud je zřejmý původce infekce, pak je nutné upravit antimikrobiální léčbu k dosažení optimálního účinku za současného zachování širokospektrého krytí jako prevence superinfekce, pokud je nemocný nadále granulocytopenický.

Původce infekce nebyl identifikován

Nepodaří-li se zjistit ložisko infekce ani izolovat patogenní mikroorganismus, závisí léčba na rizikovosti nemocného. Nemocní zařazení do vysokého rizika rozvoje komplikací pokračují v zavedené empirické i.v. ATB léčbě. Pokud je součástí iniciální empirické léčby vancomycin a nebyl-li izolován rezistentní G^+ patogen, je po 3–4 dnech doporučeno ukončení jeho podávání. Iniciálně níže rizikový

nemocní mohou přejít na p.o. režim, který může probíhat ambulantně.

■ Pacient je i po 72hodinovém trvání empirické léčby febrilní

Granulocytopenický pacient febrilní po 3 dnech ATB léčby musí být znovu podrobně přešetřen v rámci možného fokusu infekce (fyzikální vyšetření, stav nitrožilních katétrů, mikrobiologické a zobrazovací vyšetření se zaměřením na orgány podezřelé z infekčního postižení). Pokud nezjistíme zdroj infekce, pak buď pokračujeme v léčbě zavedenými ATB, nebo měníme celou ATB kombinaci nebo přidáváme další ATB.

Pokračování v léčbě zavedenými antibiotiky

Zavedená ATB neměníme u granulocytopenického nemocného s přetrvávajícími febriliemi v klinicky stabilním stavu, a to zejména pokud očekáváme konec granulocytopenie během 5 následujících dnů. Je-li součástí iniciální empirické léčby glykopeptid, je indikováno ukončení jeho podávání.

Změna celé antibiotické kombinace nebo přidání dalšího antibiotika

Indikace a volba antimikrobiální kombinace druhé řady závisí na potenciálním/prokázaném ložisku infekce a na složení iniciální léčby.

1. Zhoršování celkového klinického stavu

(hypotenze, tachykardie, rozvoj septického šoku)

bez klinického/mikrobiologického průkazu infekce

a) iniciální léčba je kombinace ciprofloxacinu s amoxicilinem/klavulanátem, pak změna za kombinaci protipseudomonádového cefalosporinu nebo penicilinu s aminoglykosidem se současným nebo následným přidáním glykopeptidu při splnění kritérií (viz tab. 4.6.-7.) za dalších 48–72 h;

b) iniciální léčba je monoterapie, pak přidání aminoglykosidu se současným nebo následným přidáním glykopeptidu při splnění kritérií za dalších 48–72 h;

c) iniciální léčba je dvojkombinace ATB bez glykopeptidu, pak je indikováno jeho přidání při splnění kritérií pro použití. Naopak, jestliže iniciální léčba je kombinací ATB s glykopeptidem a nejsou splněna kritéria pro jeho použití, je indikováno ukončení jeho podávání, a ostatní kombinaci ATB podáváme dál.

2. Progrese do klinicky jednoznačné infekce bez izolace původce (plicní infiltráty, známky katérové infekce, bolesti břicha)

Pokud zavedená ATB nepokrývají nejčastější původce infekce v postižené lokalizaci nebo jejich průnik do postiženého orgánu je nedostatečný, je indikována změna nebo rozšíření ATB kombinace při zachování širokospektrého krytí.

3. Rozvoj komplikací (mukozitida, změna ve výsledcích při monitoraci mikrobiologické flóry, toxicita léčby, orgánové postižení)

Je indikována změna nebo rozšíření ATB kombinace s cílem maximálně pokrýt možný zdroj infekce, minimalizovat nežádoucí účinky při zachování širokého spektra (např. při nefrotoxicitě aminoglykosidů nebo renálním selhání z jiných důvodů je nutná změna

Tab. 4.6.-8. Systémová antimykotika a jejich dávkování v empirické léčbě febrilní neutropenie

Název	Dávka/den
amfotericin B deoxycholát i.v.*	0,5–1 mg/kg/den
Liposomální formy amfotericinu B:	
amfotericin B koloidní disperse i.v.	4 mg/kg/den
amfotericin B lipidový komplex i.v.	5 mg/kg/den
liposomální amfotericin B i.v.*	3 mg/kg/den
Azoly:	
fluconazol i.v./ p.o. **	400 mg
itraconazol i.v./ p.o.	první 2 dny 2× 200 mg/den, následující dny 1× 200 mg/den
voriconazol i.v./p.o.	první den 2× 6 mg/kg i.v. (2× 400 mg p.o.), následující dny 2× 4 mg/kg i.v. (2× 200 mg p.o.)
Echinokandiny:	
micafungin i.v.	100 mg/den
caspofungin i.v.	první den 70 mg/den následující dny 50 mg/den

* V současné době není v ČR k dispozici, pouze na mimořádný dovoz

** Přijatelná alternativa pouze v zařízeních, v nichž je vzácná izolace *Aspergillus* spp. a *Candida* spp. rezistentních na azolová antimykotika. Pro léčbu fluconazolem však nejsou vhodné nemocní, kteří mají známky sinusitidy, plicní infekce, anebo měli fluconazol v profylaxi. Z těchto důvodů je jeho možnost použití málo častá.

kombinace betalaktamového ATB s aminoglykosidem za karbapenem).

4. Došlo k izolaci původce infekce

Je nutné upravit antimikrobiální léčbu na základě citlivosti patogenu, tak aby bylo dosaženo optimálního účinku při zachování širokospektrého krytí.

■ Pacient je i po dalších 72 h (5–7 dnů) trvání empirické léčby febrilní – empirická antimykotická léčba

Důležité: nemocní s horečkou přetrvávající i po týdnu ATB léčby mají nejméně v jedné třetině případů systémovou mykotickou infekci, dominantně způsobenou *Candida* spp. nebo *Aspergillus* spp., a je proto u nich indikována empirická antimykotická léčba.

Nemocní, kteří nemají žádná zjištěná mykotická ložiska, nejsou kolonizováni kvasinkami ani vláknitými houbami, nemají rizikové faktory mykotické infekce a je u nich očekáván brzký vzestup granulocytů během několika málo dní, nejsou nutné indikováni k zahájení antimykotické léčby. Vhodná antimykotika jsou uvedena v tab. 4.6.-8.

UKONČENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÉČBY FEBRILNÍ NEUTROPENIE

■ Ukončení antibiotické a antimykotické léčby u afebrilních nemocných

U granulocytopenických nemocných s prokázanou bakteriální infekcí by ATB léčba měla být podávána až do klinického, mikrobiologického i radiologického ústupu infekce. Většina slizničních infekcí může být léčena i méně než 1 týden, pro většinu bakteriemií je dostačující léčba trvající 1–2 týdny, zatímco plicní infekce obvykle vyžadují delší léčbu.

U nemocných s empirickou ATB léčbou, u nichž se ani dodatečně nezjistí klinicky nebo mikrobiologicky prokázaná bakteriální infekce, je nejdůležitějším faktorem při rozhodování o délce ATB léčby počet granulocytů

v periferní krvi a klinický stav. Léčbu je možno ukončit u nemocných s hodnotou granulocytů $> 0,5 \cdot 10^9/l$, kteří jsou alespoň 48 h afebrilní. U nemocných s hodnotou granulocytů $< 0,5 \cdot 10^9/l$, původně níže rizikových a ve stabilizovaném stavu, je možno ukončit léčbu, pokud jsou afebrilní déle než 5–7 dní. Nemocní původně vysoce riziková a/nebo s hodnotou granulocytů $< 0,1 \cdot 10^9/l$ a/nebo nestabilní a/nebo s mukozitidou, je doporučeno pokračovat v ATB léčbě do vzestupu granulocytů $> 0,5 \cdot 10^9/l$; jde-li však o dlouhodobou granulocytopenii, pak ukončit léčbu po 14 dnech.

U granulocytopenických nemocných s prokázanou systémovou mykotickou infekcí je délka antimykotické léčby závislá na původci a na rozsahu onemocnění. U afebrilních granulocytopenických nemocných s empirickou antimykotickou léčbou, u nichž se ani dodatečně nezjistí klinicky nebo mikrobiologicky prokázaná systémová mykotická infekce, by však minimální délka podávání měla být přibližně 14 dní.

■ Ukončení antibiotické a antimykotické léčby u nemocných s přetrvávající horečkou

Febrilní nemocní i po několika dnech léčby širokospektrými ATB a systémovými antimykotiky musí být znovu celkově vyšetřeni se zaměřením především na hluboké mykotické, virové a mykobakteriální infekce. CT břicha a hrudníku jsou zásadními metodami pro hledání mykotických ložisek. Platí to jak pro febrilní nemocné stále granulocytopenické, tak zejména pro nemocné, u kterých granulocytopenie již odezněla. Mykotická ložiska se často zvětší nebo zviditelní až po vzestupu počtu granulocytů.

DALŠÍ ZPŮSOBY LÉČBY FEBRILNÍ NEUTROPENIE

■ Transfuze granulocytů

Podávání transfuzí granulocytů nemocným s FN nevede ke snížení mortality a navíc je zatíženo vysokým rizikem komplikací. Z těchto důvodů dnes **není doporučeno pro rutinní léčbu FN**. Někteří autoři je doporučují jen u těžké

granulocytopenie s prokázanou bakteriální nebo mykotickou infekcí nereagující na antimikrobiální léčbu.

■ Leukocytární růstové faktory

Podávání faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF) současně s další léčbou FN signifikantně zkrátí trvání granulocytopenie, ale trvání horečky, podávání protinfekčních léků, morbiditu a především mortalitu nesníží.

Jeho podání je tedy vhodné **pouze ve velmi závažných případech se zřetelnou těžkou infekcí** (pneumonie, sinusitida, invazivní mykotické onemocnění, sepse s multiorgánovým selháním), kdy nelze očekávat brzké obnovení krvetvorby. Léčba G-CSF může být zvažena u pacientů dlouhodobě granulocytopenických, s dokumentovanou infekcí nereagující dobře na antimikrobiální léčbu.

■ Léčba gram pozitivní infekce rezistentní na vancomycin

Pro léčbu vancomycin-rezistentních G⁺ mikroorganismů jsou k dispozici dva preparáty.

Vhodná ATB: linezolid 600 mg 2× denně p.o. i i.v., daptomycin 6 mg/kg 1× denně i.v.

SEPSE A SEPTICKÝ ŠOK

■ Definice

Sepse

Systémová odpověď na infekci. Odpověď na infekci se manifestuje dvěma nebo více následujícími projevy:

- teplota > 38 °C nebo < 36 °C;
- tepová frekvence > 90 tepů/min;
- dechová frekvence > 20 dechů/min nebo PaCO₂ < 4,3 kPa (32 torr);
- počet leukocytů > 12 · 10⁹/l nebo > 10 % nezralých forem (tyčič).

Těžká sepse – severe sepsis

Sepse spojená s orgánovou dysfunkcí, hypoperfuzí nebo hypotenzí. Hypoperfuze a abnormality perfuze mohou zahrnovat laktátovou acidózu, oligurii a/nebo akutní alteraci mentálního stavu.

Septický šok

Sepse s hypotenzí přes adekvátní tekutinovou resuscitaci současně se známkami poruchy tkáňové perfuze. Nemocní na vazopresorické nebo inotropní podpoře nemusí mít hypotenzi v době stanovení abnormalit tkáňové perfuze. Jedná se tedy o klinické známky (přítomnost alespoň dvou příznaků – viz výše: projevy sepse) a zároveň přítomnost alespoň jednoho z následujících příznaků:

- alterace vědomí;
- známky periferní vazodilatace;
- hypotenze (systolický TK < 90 mm Hg nebo střední arteriální tlak < 65 mm Hg);
- saturace Hb kyslíkem (SpO₂ nebo SaO₂) < 90 % bez ohledu na oxygenoterapii;
- oligurie (diuréza < 0,5 ml/kg/h) po dobu minimálně 2 h;
- vzestup kreatininu v séru > 176,8 μmol/l;
- hyperbilirubinémie > 34,2 mmol/l;
- trombocytopenie < 100 · 10⁹/l;

- vzestup laktátu v séru > 2 mmol/l;
- zvýšená hladina prokalcitoninu, CRP.

Syndrom multiorgánové dysfunkce

Syndrom multiorgánové dysfunkce (MODS) představuje paralelní či postupné selhání dvou a více orgánů takového stupně, že udržení homeostázy organismu není možné bez intervence, je častou komplikací sepse.

■ Léčba sepse a septického šoku

Iniciální resuscitace oběhu

Důležité: iniciální resuscitace oběhu musí být u těžké sepse/septického šoku zahájena neprodleně!

Cílem je dosažení definovaných hodnot vybraných parametrů v průběhu 6 h od zahájení resuscitace.

Hemodynamické cíle iniciální resuscitace jsou uvedeny v tab. 4.6.-9.

Tab. 4.6.-9. Hemodynamické cíle iniciální resuscitace v průběhu prvních 6 h od diagnostiky sepse

Centrální žilní tlak (CVP) > 8–12 mm Hg
Střední arteriální tlak (MAP) > 65 mm Hg
Diuréza > 0,5 ml/kg/h
Saturace smíšené žilní krve (SvO ₂) nebo krve z centrální žíly (SvcO ₂) ≥ 70 %
Není-li možno dosáhnout SvO ₂ > 70 % při dosažení cílových hodnot CVP, je indikována substituce erytrocytů s cílovým HtK > 30 % a/nebo podávání dobutaminu v dávce až 20 μg/kg/min

□ Léčba tekutinami

K resuscitaci tekutinami mohou být použity **krystaloidy nebo koloidy**. U pacientů s podezřením na hypovolémii by měla být testována odpověď na podání tekutin: podání 500–1000 ml krystaloidů nebo 300–500 ml koloidů v průběhu 30 min. Test může být opakován v závislosti na klinické odpovědi (krevní tlak, diuréza) a přítomnosti známek tolerance tekutin (klinické známky objemového přetížení). V prvních 24 h může být tekutinová bilance výrazně pozitivní (v důsledku vazodilatace a úniku tekutin extravaskulárně).

□ Vazopresory

Jsou indikovány vždy, když není možné dosáhnout cílů terapie podáním tekutin. **Důležité:** podání vazopresorů je někdy nutné i před podáním tekutin u stavů hypotenze ohrožující život.

Iniciální farmaka volby při hypotenzii jsou **noradrenalin nebo dopamin**, kdy noradrenalin je efektivnější a má méně nežádoucích účinků.

Nízké dávky dopaminu s cílem prevence renální dysfunkce by se neměly používat.

Vazopresin je možno zvažít u nemocných s refrakterní hypotenzí nereagující na podání tekutin a katecholaminů. V případě jeho použití by se měl podávat formou infuze rychlostí 0,01–0,04 jednotek/min.

□ Inotropika

U pacientů se známkami nízkého srdečního výdeje i přes podávání tekutin lze použít dobutamin. Při současně

hypotenzi by se měl používat v kombinaci s vazopresory (tab. 4.6.-9.).

Antibiotická léčba

Důležité: vzorky pro mikrobiologické vyšetření by měly být odebrány vždy před zahájením antimikrobiální terapie.

Při odběru HMK se doporučuje odebrání minimálně dvou vzorků, optimálně odběr z přímého žilního vpichu a současně ze všech linek zavedených cévních katétrů > 48 h. Záchyt pozitivních HMK má kolem 30–50 % pacientů s těžkou sepsí a septickým šokem.

Současně je nutné provést odběr vzorků z ostatních pravděpodobných zdrojů infekce (dýchací cesty, moč, drény, likvor, operační rány apod.). Zobrazovací metody USG, RTG, CT) se doporučují ke stanovení odstranitelných zdrojů infekce (abscesy, peritonitida apod.).

Důležité: léčba ATB by měla být zahájena neprodleně po diagnostice těžké sepse/septického šoku.

Iniciální volba ATB by měla pokrývat všechny předpokládané patogeny se zohledněním lokální epidemiologické situace a se schopností průniku zvoleného ATB do místa předpokládaného zdroje infekce.

Léčba ATB by měla být přehodnocena po 48–72 h na základě výsledků mikrobiologického vyšetření. Délka ATB léčby by měla vycházet z průběhu klinického stavu, zpravidla trvá 7–10 dnů. Ponechání ATB delší dobu je doporučeno pouze v případech pomalé odpovědi na léčbu, nedrénovaného ložiska infekce, nebo u pacientů s imunitním deficitem. Rutinní použití kombinované terapie se nedoporučuje.

Kombinace ATB by měla být zvážena u granulocytopenických nemocných a u infekcí kmeny *Pseudomonas* spp.

Kontrola zdroje infekce

Nalezení a řešení zdroje infekce (chirurgická revize, drenáž abscesu) se má provést neprodleně po časně resuscitaci oběhu.

Volba způsobu kontroly zdroje infekce by měla vždy vycházet z posouzení poměru rizika a přínosu zvažované metody/intervence. Preferují se metody s nejnižším potenciálem zhoršení pacientova stavu, tedy raději perkutánní než chirurgická drenáž abscesu.

Jestliže je možným zdrojem těžké sepse nitrožilní vstup, měl by být odstraněn co nejdříve po zajištění jiného vstupu.

Steroidy

U pacientů s přetrvávajícím septickým šokem a současnou nutností podávání vazopresorů se doporučuje podání **hydrocortisonu 200–300 mg/den**, rozděleného do 3 až 4 dávek po dobu 7 dní.

Někteří experti doporučují současně podávat fludrocortison 50 µg 4krát denně p.o.

Rekombinantní lidský aktivovaný protein C (rhAPC)

Podání rhAPC se doporučuje u nemocných s těžkou sepsí a vysokým rizikem smrti bez rizika krvácení (APACHE II skóre ≥ 25 nebo selhávání dvou a více orgánů).

Tab. 4.6.-10. Postup ventilační strategie u nemocných v sepsi a septickém šoku

Nastavení režimu PRVC (pressure regulated volume control, tlakem regulovaný objemově kontrolovaný)
Snížení dechového objemu na hodnotu 6 ml/kg ideální tělesné hmotnosti
Udržování horní hranice inspiračního tlaku v pásmu < 30 cm H ₂ O
Snaha o udržení SaO ₂ (SpO ₂) > 90 %
Doporučeno užití end-expiračního přetlaku (PEEP) k prevenci kolapsu plicních alveolů na konci výdechu

Transfuzní přípravky a krevní deriváty

Po dosažení kontroly tkáňové hypoperfuze se erytrocytární transfuze doporučuje pouze při poklesu Hb < 70 g/l s cílem dosažení hodnot 70–90 g/l (detaily viz kap. 4.3.). Transfuze krevních destiček u nemocných v sepsi se doporučuje při hodnotě < 10 · 10⁹/l i při absenci klinických známek krvácení, při hodnotě 10–30 · 10⁹/l u nemocných s rizikem krvácení nebo při hodnotě < 50 · 10⁹/l před invazivním zákrokem (detaily viz kap. 4.3.).

Rutinní podávání plazmy s cílem korekce laboratorních abnormalit při absenci klinických známek krvácení se nedoporučuje.

Preventivní podávání antitrombinu v léčbě těžké sepse a septického šoku se nedoporučuje, substituce při nízkých hodnotách je vhodná.

Umělá plicní ventilace u akutního plicního poškození (ALI/ARDS) v sepsi

Postup ventilační strategie u sepse/septického šoku je uveden v tab. 4.6.-10.

Kontrola glykémie

Po úvodní stabilizaci pacientů s těžkou sepsí by se měla glykémie udržovat v pásmu do 8,3 mmol/l.

Náhrada renálních funkcí

Kontinuální eliminační techniky se považují za ekvivalentní s intermitentními technikami u kriticky nemocných, přičemž však kontinuální mohou být u hemodynamicky nestabilních pacientů výhodnější.

Podávání bikarbonátu

Podávání bikarbonátu se nedoporučuje v terapii laktátové acidózy s pH ≥ 7,15.

Profylaxe hluboké žilní trombózy

Profylaxe hluboké žilní trombózy heparinem (nefrakcionovaným nebo nízkomolekulárním) by se měla u nemocných v sepsi použít. U nemocných s kontraindikací k heparinu se doporučuje používat mechanické způsoby prevence hluboké žilní trombózy.

Profylaxe stresových ulcerací

Profylaxe stresových ulcerací by měla být podána všem nemocným v sepsi. Je doporučeno užití H₂-blokátorů nebo blokátorů protonové pumpy.

1.4.6. Annex 6

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Křen L., Křikavová L., Mayer J. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2007;9(3):240-252. ISSN 1212-4184.

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

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

¹MUDr. Zdeněk Ráčil, ²Mgr. Iva Kocmanová, ³MUDr. Barbora Wagnerová, ⁴MUDr. Leoš Křen, Ph.D., ⁵MUDr. Lucie Křikavová, ¹prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.

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

²FN Brno, Oddělení klinické mikrobiologie

³FN Brno, Interní hematologická klinika

⁴Masarykova univerzita v Brně, LF MU a FN Brno, Ústav patologie

⁵FN Brno, Radiologická klinika

Souhrn

Invazivní mykotické infekce představují závažnou infekční komplikaci imunokompromitovaných nemocných s nádorovým onemocněním. Ve srovnání s bakteriálními infekcemi je jejich výskyt jednoznačně méně častý, na druhou stranu incidence invazivních mykotických infekcí narůstá a morbidita a mortalita s nimi spojená je výrazně vyšší, než je tomu u infekcí bakteriálních. Přestože invazivní mykózy postihují celou skupinu nemocných s nádorovým onemocněním, je jejich výskyt u pacientů se solidními nádory spíše vzácný. Naopak velice časté jsou u nemocných s hematologickými malignitami, a to především je-li součástí léčebného režimu transplantace krevetvorné tkáně.^(1,2) Předcházející dvě desetiletí přinesly významné změny v epidemiologii invazivních mykóz a během posledních několika málo let pak došlo i ke značným pokrokům v diagnostice a léčbě těchto velmi závažných infekcí.

Klíčová slova

Invazivní mykotické infekce • rizikové faktory • klinické příznaky • diagnostika

Původci invazivních mykotických infekcí

Více než devadesát procent invazivních mykotických infekcí u nemocných s nádorovým onemocněním je vyvoláno kmeny *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. Nicméně stále častěji se můžeme setkat i s infekcemi vyvolanými takzvanými vzácnými mykotickými patogeny, jako jsou především mikromycety třídy *Zygomycetes* (*Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp.), *Fusarium* spp., a eventuálně i některé další, vysloveně vzácné houby (*Alternaria* spp., *Scedosporium* spp. aj.).⁽³⁾ Přestože je popsáno přes 100 druhů kandiđ, více než 95 % všech invazivních infekcí vyvolává pouze 5 z nich: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Kmeny kvasinek jsou

běžnými komenzály povrchu lidského těla (především sliznic trávicího ústrojí). Není proto překvapivím, že většina případů invazivní kandidózy u onkologických, a zvláště pak hematologických nemocných je infekcí endogenní (prostup kolonizujících kmenů kvasinek poškozenou sliznicí při mukozitidě do cirkulace). Může však jít i o infekci exogenní, jak je tomu u většiny kvasinkových infekcí centrálních žilních katétrů (přenos především rukama personálu).^(1,2) Podobně jako u kandiđ je také dokumentováno kolem 100 aspergilových rodů, ale naprostou většinu invazivních infekcí u lidí vyvolává jen několik z nich: *A. fumigatus*, méně častěji pak *A. flavus*, *A. niger* a *A. terreus*.⁽⁴⁾ Aspergilové konidie jsou ubikvitní a vyskytují se ve vzduchu, prachu a teplotě půdy. V nemocničním prostředí je pak můžeme nacházet ve vzduchu, spráčkách, rezervoárech vody a květináčích. Jejich množství ve vzduchu se výrazně zvyšuje při různých rekonstrukcích a stavebních úpravách v nemocnicích a jejich okolí. Invazivní aspergilóza je

1.4.7. Annex 7

Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Mykotické infekce. In: Adam Z., ed. *Obečná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 359-362. ISBN 978-80-726-2715-8.

Zdeněk Adam, Marta Krejčí, Jiří Vorlíček et al.

OBEČNÁ ONKOLOGIE



28.2.2.	Patofyziologie sepsě a septického šoku.....	337
28.2.3.	Klinický a laboratorní obraz	341
28.2.4.	Diagnóza infekčního agens při sepsi a při febrilní neutropenii	342
28.2.5.	Léčba sepsě.....	344
28.3.	Febrilní neutropenie	349
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.3.1.	Definice.....	349
28.3.2.	Incidence.....	350
28.3.3.	Etiopatogeneze.....	351
28.3.4.	Klinický obraz	351
28.3.5.	Vyšetření nemocného s febrilní neutropenií	351
28.3.6.	Stanovení rizika rozvoje komplikací febrilní neutropenie.....	353
28.3.7.	Iniciální antibiotická terapie	353
28.3.8.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po třech dnech antimikrobiální terapie	356
28.3.9.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po 5–7 dnech antimikrobiální terapie.....	356
28.3.10.	Ukončení antimikrobiální léčby.....	358
28.3.11.	Další způsoby léčby febrilní neutropenie	358
28.3.12.	Antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných	359
28.4.	Mykotické infekce	359
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.5.	Pneumonie způsobená <i>Pneumocystis jiroveci</i> (carinii)	361
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.6.	Virové infekce.....	363
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
29.	ALTERNATIVNÍ MEDICÍNA A ONKOLOGIE.....	365
	<i>(Vojtěch Mornstein)</i>	
	Nevědecký charakter alternativní medicíny	365
	Motivace pacientů.....	366
	Motivace lékařů.....	366
	Vybrané metody alternativní medicíny	366
	Alternativní a sporná medikace v onkologii	368
	Shrnutí rozporu vědeckého vývoje a rozvoje alternativní léčby	369
30.	STATISTICKÉ ÚDAJE O NOVOTVARECH V ČR.....	371
	<i>(Ladislav Dušek, Jan Mužík, Jana Koptíková)</i>	
30.1.	Souhrn onkologické statistiky	371
30.2.	Epidemiologické charakteristiky	371
30.3.	Evidence novotvarů v ČR a ve světě....	372
30.4.	Trendy nádorové incidence a prevalence v ČR.....	375
30.5.	Srovnání ČR a některých zemí u vybraných nádorů	375
30.6.	Výskyt novotvarů mizní a krevetvorné tkáně	376
31.	SÍŤ KOMPLEXNÍCH ONKOLOGICKÝCH CENTER ČR.....	377
	<i>(Jiří Vorlíček, Jiří Finek, Ladislav Dušek, Martin Komenda)</i>	
	Vznik a rozvoj sítě onkologických pracovišť v ČR	377
	Současný stav sítě.....	378
	Dostupné informační zdroje o síti KOC.....	379
	Seznam zkratk.....	381
	Rejstřík	387

Rutiní používání leukocytárních růstových faktorů není indikováno u nekomplikované febrilní neutropenie. Jejich podávání je možno považovat za vhodné pouze ve velmi závažných případech se zřetelnou závažnou infekcí (pneumonie, hypotenze, závažná celulitida nebo sinusitida či systémová mykotická infekce s multiorgánovým selháním a sepsi), kdy nelze očekávat brzké obnovení neutrofilní krevtvorby. Léčba leukocytárními růstovými faktory může být zvažována u pacientů dlouhodobě neutropenických, s dokumentovanou infekcí, která neodpovídá dobře na antimikrobiální léčbu.

Léčba grampozitivní infekce rezistentní na vankomycin

Pro léčbu infekcí vyvolaných vankomycin-rezistentními grampozitivními mikroorganismy se v nedávné době objevily dva nové přípravky, linezolid a synergid. Oba jsou dnes indikovány výlučně v případech prokázané rezistence izolovaných grampozitivních bakterií na vankomycin.

- **Linezolid** je řazen mezi novou skupinu antibiotik – oxazolidinony – a nejvíce zkříženou rezistenci s ostatními antibiotiky, biologická dostupnost po perorálním podání je téměř 100 %. Dávkování: intravenózně, ale i perorálně v dávkách 600 mg každých 12 hodin.
- **Quinopristin/dalfopristin** je směs dvou různých antibiotik. Dávkování: 7,5 mg/kg intravenózně každých 8 hodin.

28.3.12. Antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných

Výskyt febrilních epizod při neutropenii může být snížen profylaktickým podáváním antibiotik včasné afebrilní fázi neutropenie. Přínos antimikrobiální profylaxe je však často anulován toxicitou léčby, přerůstáním mykotické infekce a vznikem rezistentní bakteriální a mykotické flóry.

Vzhledem k výše zmíněnému platí, že s výjimkou profylaxe *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*) není antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných všeobecně doporučována.

Profylaxe infekce *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*)

Je indikována u všech nemocných se zvýšeným rizikem této infekce ($CD4 < 200 \cdot 10^6$), a to bez ohledu na skutečnost, zda je přítomna neutropenie.

Vhodná antibiotika: **trimethoprim-sulfamethoxazol** p.o. 1× 480 mg denně nebo 3× 960 mg týdně.

Profylaxe mykotických infekcí

Indikována je u nemocných s vysokým rizikem rozvoje mykotických infekcí (alogenní transplantace krevetvorných buněk, indukční a reindukční léčba akutní myeloidní leukémie, léčba spojená s neutropenií trvající déle než 7 dní, těžká mukozitida). Rutiní podávání antimykotické profylaxe u všech neutropenických pacientů v podobě azolových antimykotik není doporučováno.

Vhodná antimykotika:

- **posakonazol** p.o. 3× 200 mg denně (u nejvyššího rizika – AML/MDS indukce/reindukce, alogenní transplantace s reakcí štěpu proti hostiteli);
- **vorikonazol** p.o. 2× 200 mg denně (u alogenní transplantace);
- **flukonazol** p.o. 2× 200 mg denně;
- **itrakonazol** p.o. 2× 200 mg denně (nebo perorální roztok 2× 100–200 mg denně) (nutný monitoring hladin léku, riziko lékových interakcí).

Profylaxe bakteriálních infekcí

Nejčastěji se k profylaxi bakteriálních infekcí používají perorální chinolony a co-trimoxazol. Chinolony jsou v prevenci účinnější než co-trimoxazol, ale jejich nevýhodou je nedostatečný účinek proti G+ flóře a nárůst výskytu rezistentních G– mikroorganismů v průběhu léčby.

Rutiní profylaxe chinolony u nemocných s neutropenií není indikována. Pokud je v individuálních případech přece jen použita (chemoterapie vedoucí k dlouhodobé neutropenii a těžké mukozitidě), pak v kombinaci s penicilinem V nebo co-trimoxazolem (pokrytí G+ flóry) a měla by být podávána co nejkratší dobu a u co nejmenšího počtu vybraných rizikových nemocných.

Vhodná antibiotika: **ciprofloxacin** p.o. 2× 500 mg denně.

28.4. Mykotické infekce

Mykotické infekce představují skupinu infekčních komplikací, které jsou u onkologických nemocných spojeny s velmi závažnou prognózou.

Hlavními rizikovými faktory pro vznik mykotických infekcí jsou hematologická malignita, transplantace krevetvorné tkáně (hlavně alogenní), reakce štěpu proti hostiteli, neutropenie trvající déle než 10 dní a kortikoterapie.

Podle stupně invazivity můžeme mykotické infekce rozdělit na povrchové (postihující tělesné povrchy – např. orofaryngeální kandidóza) a invazivní (invadující do tkání).

Tab. 28.14. Nejčastější vyvolavatelé mykotických infekcí u onkologických nemocných a formy onemocnění, které způsobují

	Neinvazivní infekce	Invazivní infekce
Kvasinky		
<i>Candida albicans</i>	orofaryngeální kandidóza, kandidová ezofagitida, kandidová infekce močových cest	kandidémie, kandidová meningitida, kandidová endoftalmitida, chronická hepatosplenická kandidóza, ostatní
<i>Candida non-albicans</i> (<i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> a další)		
<i>Cryptococcus</i> spp.	–	postižení CNS, méně často plic
Plísně		
<i>Aspergillus</i> spp.	aspergilom	invazivní aspergilóza plic, invazivní postižení paranazálních dutin, diseminovaná aspergilová infekce (postižení plic, jater, sleziny, CNS event. dalších orgánů)
Zygomycetes (<i>Mucor</i> spp., <i>Rhizomucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> sp.)	–	postižení paranazálních dutin, CNS, diseminace
<i>Fusarium</i> spp.	–	postižení paranazálních dutin, CNS, diseminace

Etiologie: mykotické infekce mohou být způsobeny jednak vláknitými houbami a jednak kvasinkami. Nejčastější původci mykotických infekcí u onkologických nemocných a formy onemocnění, které způsobují, jsou uvedeny v tab. 28.14.

V posledním desetiletí došlo z celé řady příčin (např. profylaxe flukonazolem, změna v transplantačních postupech) ke změně v epidemiologii invazivních mykotických infekcí. Incidence invazivních kandidových infekcí se snížila a většina z nich je způsobena kmeny rezistentními vůči flukonazolu. Naopak došlo k nárůstu incidence infekcí vyvolaných vláknitými plísněmi, především invazivních aspergilových infekcí, které dnes tvoří většinu z in-

vazivních mykotických infekcí u pacientů s hematologickou malignitou. Stále častější jsou pak také infekce vyvolané vzácnými plísněmi (*Fusarium* spp., *Mucor* spp.).

Diagnostika: stanovení diagnózy povrchové kandidové infekce se opírá zejména o klinické vyšetření, event. v kombinaci s fibroskopickým vyšetřením (u kandidové ezofagitidy). O etiologii nás pak informuje kulturační vyšetření ze stěrů. Diagnózu aspergilomu stanovíme až histologickým a kulturačním vyšetřením materiálu získaného resekci při chirurgickém výkonu (event. tenkojehlovou biopsií), které je prováděno na základě zjištění ložiskového procesu na RTG hrudníku a CT plic.

Tab. 28.15. Kritéria pravděpodobnosti invazivní mykotické infekce

Pravděpodobnost infekce	Kritéria
Jistá diagnóza invazivní mykózy	histologický a/nebo kulturační průkaz mykotických patogenů ve sterilním materiálu (např. biopsie, mozkomíšni mok)
Pravděpodobná diagnóza invazivní mykózy	kulturační nebo cytologický průkaz mykotických patogenů v materiálu z nesterilních míst (BAL, sputum) a nebo pozitivita nekulturačních metod pro průkaz mykóz (galaktomannan, 1,3-β-D glukán) A SOUČASNĚ odpovídající nález na zobrazovacích metodách (např. CT plic, CT paranazálních dutin, CT mozku) A/NEBO klinický obraz charakteristický pro invazivní mykózu (např. febrilie a příznaky z postižení plicního parenchymu) u pacienta s rizikovými faktory pro invazivní mykózu (např. dlouhodobá neutropenie)
Možná diagnóza invazivní mykózy	kulturační nebo cytologický průkaz mykotických patogenů v materiálu z nesterilních míst (BAL, sputum) nebo pozitivita nekulturačních metod pro průkaz mykóz NEBO nález na zobrazovacích metodách (např. CT plic, CT PND, CT mozku), který může odpovídat invazivní mykóze A/NEBO klinický obraz charakteristický pro invazivní mykózu (např. febrilie a příznaky z postižení plicního parenchymu) u pacienta s rizikovými faktory pro invazivní mykózu (např. dlouhodobá neutropenie)

Tab. 28.16. Antimykotika a jejich účinnost *in vitro*

	Amfotericin B a jeho liposomální formy	Flukonazol	Itrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	Echinokandiny (kasposungin, mikafungin, anidulafungin)	5-flucytosin
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	+	-	+/-	+	+/-	+	+
<i>Aspergillus</i> spp.	+	-	+	+	+	+	-
Zygomycetes (<i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.)	+	-	-	-	+	-	-
<i>Fusarium</i> spp.	+	-	-	+/-	+/-	-	-
<i>Cryptococcus</i> spp.	+	+	+	+	+/-	-	+

Diagnóza invazivních mykotických infekcí je často velice komplikovaná a stanoví se na základě kombinace klinického vyšetření, zobrazovacích metod, mikrobiologického vyšetření (kultivační i nekultivační metody) a/nebo histologického vyšetření u nemocného s rizikovými faktory.

Invazivní mykotickou infekcí pak můžeme označit jako jistou, pravděpodobnou nebo možnou. Kritéria shrnuje tab. 28.15.

Terapie: tab. 28.16. a 28.17. uvádějí antimykotika používaná v léčbě mykotických infekcí u onkologických nemocných a jejich spektra účinnosti.

28.5. Pneumonie způsobená *Pneumocystis jirovecii* (carinii)

Pneumocystis jirovecii je eukaryotický mikroorganismus, který byl až v poslední době, po prostudování jeho genomu, zařazen mezi houby. V roce 1999 byly lidské kmeny *Pneumocystis carinii* přejmenovány na počest českého parazitologa prof. Jirovce na *Pneumocystis jirovecii*. Je extracelulárním parazitem, jehož vývojový cyklus zahrnuje stadium trofické a cystické. Při infekci jeví významnou vazbu na alveolární epitelie, přičemž vyplňuje alveoly, aniž by došlo k bouřlivé zánětlivé reakci. Přenos se děje vzdušnou cestou, je však možné, že u dospělých jedinců jde o reaktivaci endogenní infekce, s níž se většina zdravých jedinců bez poruchy imunity setká již v dětském věku. Primární infekce proběhne buď asymptomaticky, nebo pod obrazem lehké respirační infekce, takže do tří let věku již má

velká většina dětí protilátky proti tomuto mikroorganismu.

Jde o typickou oportunní infekci. Hlavními rizikovými faktory jsou alogenní transplantace krvetvorné tkáně, reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), kortikoterapie a lymfopenie s inverzním poměrem lymfocytů CD4+/CD8+. Zavedení profylaxe trimethoprimem-sulfamethoxazolem snížilo incidenci pneumocystové pneumonie u nemocných po transplantaci krvetvorné tkáně z přibližně 10% na současnou hodnotu 0,3–0,5%. Mortalita však zůstává stále velmi vysoká – přibližně 30%.

Klinický obraz: dvě třetiny nemocných mají fulminantní začátek choroby s vysokou horečkou a rychlým rozvojem dušnosti, tachypnoe a těžké hypoxémie, ostatní mají subakutní začátek s nízkými teplotami, neproduktivním kašlem a pomalejším rozvojem dušnosti po dobu i několika dní. Nejčastějšími klinickými příznaky jsou dušnost (90%) a teplota (85%).

Diagnostika se opírá o kombinaci výše popsaného klinického obrazu, nálezu atypické pneumonie při klinickém vyšetření a obrazu na RTG snímku hrudníku a nebo CT. Při provedení těchto zobrazovacích metod se nejčastěji setkáme s intersticiálními plicními infiltráty.

Definitivní potvrzení etiologie však umožňuje pouze mikrobiologické vyšetření biologického materiálu – imunofluorescence a PCR, které má vyšší senzitivitu. Nejprůnosnějším materiálem je tekutina získaná bronchoalveolární laváží. Sputum a indukované sputum (sputum po inhalaci mukolytika nebo roztoku NaCl) je méně průnosné.

Profylaxe pneumocystové infekce: vhodnými chemoterapeutiky jsou trimethoprim-sulfamethoxazol p.o. 480 mg 1× denně nebo 960 mg 3× týdně.

Tab. 28.17. Informace o léčbě nejčastějších forem mykotických infekcí u onkologických nemocných

Typ infekce	Lék I. volby	Lék II. volby	Délka podávání	Poznámky
Kandidóvé infekce				
Orofaryngeální kandidóza	flukonazol tbl nebo soluce p.o. 100–200 mg/den	itrakonazol soluce p.o. 200 mg/den	7–14 dní po klinickém zlepšení	
Kandidová ezofagitida	flukonazol tbl nebo soluce p.o. nebo i.v. 100–200 mg/den, itrakonazol soluce p.o. 200 mg/den	amfotericin B i.v. 0,3–0,7 mg/kg/den, kaspofungin i.v. 50 mg/den, vorikonazol p.o./i.v. 4 mg/kg 2x D	14–21 dní po klinickém zlepšení	
Kandidémie bez neutropenie	amfotericin B i.v. 0,6–1,0 mg/kg/den, flukonazol i.v. 400–800 mg/den, kaspofungin 50 mg/den, mikafungin 100 mg/den, anidulafungin 100 mg/den	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	14 dní po poslední pozitivní hemokultuře a ukončení klinických příznaků	odstranit všechny žilní katetry
Kandidémie s neutropenií	amfotericin B i.v. 0,7–1,0 mg/kg/den, kaspofungin 50 mg/den, mikafungin 100 mg/den, anidulafungin 100 mg/den	flukonazol 400–800 mg/den	14 dní po poslední pozitivní hemokultuře, ukončení klin. příznaků a ukončení neutropenie	odstranění žilních katétrů není imperativem (zdrojem často GIT)
Kandidémie způsobená <i>C. glabrata</i> a <i>C. krusei</i>	amfotericin B i.v. 0,7–1,0 mg/kg/den, kaspofungin 50 mg/den, mikafungin 100 mg/den, anidulafungin 100 mg/den	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	viz kandidémie u pacientů s neutropenií nebo bez neutropenie	
Aspergilové infekce				
Aspergilom	chirurgická léčba			
Invazivní aspergilóza	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	kaspofungin i.v. 50 mg/den, liposomální formy amfotericinu B i.v. 3–5 mg/kg/den, kombinace echinokandinu s vorikonazolem, posakonazol 800 mg/den	dlouhodobě	
Mukormykóza a ostatní zygomykózy				
Invazivní forma	liposomální formy amfotericinu B 3–5 mg/kg/den event. vyšší	posakonazol 800 mg/den p.o.	dlouhodobě	u lokalizovaných forem je doporučeno současně navíc provést chirurgickou resekci ložiska
Fusarióza				
Invazivní forma	liposomální formy amfotericinu B 3–5 mg/kg/den event. vyšší	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	dlouhodobě	
Kryptokoková infekce				
Invazivní forma	amfotericin B i.v. 0,7–1 mg/kg/den + 5-flucytosin i.v. 100 mg/kg/den 2 týdny, pak flukonazol 400 mg/den p.o.	amfotericin B i.v. 0,7–1 mg/kg/den i.v. + 5 flucytosin i.v. 100 mg/kg/den po celou dobu léčby, vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg/den	celkem minimálně 12 týdnů	následuje dlouhodobě podávání flukonazolu 200 mg/den 6–12 měsíců

1.4.8. Annex 8

Weinbergerová B., Kabut T., Kocmanová I., Drgoňa L., Kouba M., Hričinová M., Gabzdilová J., Guman T., Petečuková V., Novák J., Forsterová K., Haber J., Žiaková B., Bojtárová E., Zavřelová A., Karas M., Chrenková V., Sedláček P., Tkáčiková B., Múdry P., Mallátová N., Timr P., Kolenová A., Tanušková D., Horáková J., Navrátil M., Chudej J., Sokol J., Rolencová M., Žák P., Cetkovský P., Mayer J., Ráčil Z. Změny v epidemiologii invazivních mykotických infekcí v českých a slovenských hematologických centrech v letech 2005–2017: analýza dat FIND. *Transfúze Hematol. dnes.* 2019;25(2):186–196. ISSN 1805-4587.

Změny v epidemiologii invazivních mykotických infekcí v českých a slovenských hematoonkologických centrech v letech 2005–2017: analýza dat FIND

Weinbergerová B.¹, Kabut T.¹, Kocmanová I.², Drgoňa L.³, Kouba M.⁴, Hričinová M.⁴, Gabzdilová J.⁵, Guman T.⁵, Petečuková V.⁶, Novák J.⁶, Forsterová K.⁷, Haber J.⁷, Žiaková B.⁸, Bojtárová E.⁸, Zavřelová A.⁹, Karas M.¹⁰, Chrenková V.¹¹, Sedláček P.¹¹, Tkáčiková B.¹², Múdry P.¹², Mallátová N.¹³, Timr P.¹³, Kolenová A.¹⁴, Tanušková D.¹⁵, Horáková J.¹⁵, Navrátil M.¹⁶, Chudej J.¹⁷, Sokol J.¹⁷, Rolencová M.¹, Žák P.⁹, Cetkovský P.⁴, Mayer J.^{1,18}, Ráčil Z.^{1,18}

¹Interní hematologická a onkologická klinika LFMU a FN Brno

²Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno

³Klinika onkohematologie, NOÚ a LF UK Bratislava

⁴Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

⁵Klinika hematologie a onkohematologie, UN LP Košice

⁶Interní hematologická klinika, FNKV Praha

⁷I. interní klinika-klinika hematologie, VFN Praha

⁸Klinika hematologie a transfuziologie, UN Bratislava

⁹IV. interní hematologická klinika, FN Hradec Králové

¹⁰Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň

¹¹Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha

¹²Klinika dětské onkologie, LFMU a FN Brno

¹³Dětské oddělení, Nemocnice České Budějovice

¹⁴Klinika dětské hematologie a onkologie, DFNSP Bratislava

¹⁵Transplantační jednotka kostnej drene, KDHaO, DFNSP Bratislava

¹⁶Klinika hematoonkologie, FN Ostrava

¹⁷Klinika hematologie a transfuziologie, JLF a UN Martin

¹⁸CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University Brno

Transfúze Hematol. dnes, 25, 2019, No. 2, p. 186–196

SOUHRN

Úvod: Invazivní mykotické infekce představují život ohrožující infekční komplikace u hematologických pacientů a jejich časná diagnostika může přispět ke zlepšení přežívání těchto nemocných. Jejich zastoupení se v posledních letech mění zejména vlivem selektivního tlaku antimykotik.

Materiál a metodika: Cílem naší práce bylo retrospektivní zhodnocení změn v epidemiologii invazivních aspergilóz, invazivních kandidóz a vzácných mykóz u hematologických nemocných v českých a slovenských hematoonkologických centrech v letech 2005–2017. Sledované období bylo rozděleno na 1. období (2005–2012) a 2. období (2013–2017). K analýze byla použita data zadaná do databáze FIND (Fungal INfection Database) na základě diagnostických EORTC/MSG kritérií z roku 2008. Spotřeba vybraných antimykotik byla vyjádřena v relativní roční spotřebě na 1 000 lůžkodní.

Výsledek: Celkem bylo zdokumentováno 349 invazivních aspergilóz, 168 invazivních kandidóz a 102 vzácných mykóz (z toho 65,7 % invazivních zygomycóz). Výskyt invazivní aspergilózy vzrůstal v 1. období, přičemž od roku 2013 nastal naopak klesající trend (průměrný počet případů na centrum v letech 2005–2012–2017: 1,1–3,6–0,7). Snížilo se zastoupení invazivních aspergilóz u vysoce rizikových pacientů (2005 – 72,7 %; 2010 – 40,7 %; 2017 – 18,2 %). Celková spotřeba

posakonazolu rostla od roku 2005 (rDDD v roce 2005–2010–2015: 0–831–1043). Celkový počet invazivních kandidóz a vzácných mykóz zůstal v letech neměnný. Zastoupení druhů *Candida albicans* vs. *non-albicans* se také v 1. a 2. období nelišilo (26,1 % vs. 29,1 %; $p = 0,732$). U průlomových infekcí na profylaxi posakonazolem nebo vorikonazolem se signifikantně častěji vyskytovaly vzácné patogeny ve srovnání s infekcemi vzniklými u pacientů bez této profylaxe (35,3 % vs. 14,4 %; $p = 0,000$).

Závěr: Na základě analýzy byl potvrzen klesající výskyt invazivních aspergilóz dominantně v souvislosti se zavedením rutinní antimykotické profylaxe posakonazolem u vysoce rizikových pacientů. Zastoupení zygomykózy u těchto nemocných také kleslo. U pacientů na profylaxi posakonazolem nebo vorikonazolem došlo ke změně spektra infekcí ve prospěch vzácných patogenů.

KLÍČOVÁ SLOVA

invazivní mykotické infekce – hematologický pacient – epidemiologie – akutní leukemie

SUMMARY

Weinbergerová B., Kabut T., Kocmanová I., Drgoňa L., Kouba M., Hričinová M., Gabzdilová J., Guman T., Petečuková V., Novák J., Forsterová K., Haber J., Žiaková B., Bojtárová E., Zavřelová A., Karas M., Chrenková V., Sedláček P., Tkáčiková B., Múdry P., Mallátová N., Timr P., Kolenová A., Tanušková D., Horáková J., Navrátil M., Chudej J., Sokol J., Rolencová M., Žák P., Cetkovský P., Mayer J., Ráčil Z.

Changing epidemiology of invasive mould infections at Czech and Slovak haematological institutions from 2005 to 2017: analysis of the FIND

Background: Invasive fungal diseases are life-threatening infectious complications affecting haematological patients and their early diagnosis can contribute to improved survival of affected patients. In the last years, the patterns of invasive fungal infections have changed mainly due to the selection pressure of antifungals.

Material and Methods: The aim of our analysis to evaluate retrospectively changes in the epidemiology of invasive aspergillosis, invasive candidiasis and rare mycoses in haematological patients at Czech and Slovak haematological centres from 2005–2017. The observed period was divided into: 2005–2012 (1st period) and 2013–2017 (2nd period). Data entered into FIND – Fungal INfection Database (according to the EORTC/MSG criteria from 2008) was used for the analysis. The total consumption of posaconazole and micafungin was expressed in relative annual consumption per 1000 bed-days.

Results: A total of 349 invasive aspergillosis, 168 invasive candidiasis and 102 rare mycoses (65.7% invasive zygomycosis) were documented. The incidence of aspergillosis increased from 2005 to 2012, with a declining trend since 2013 (the average number of cases per centre in 2005–2012–2017 was: 1.1–3.6–0.7). The incidence of aspergillosis in high risk patients decreased (2005 – 72.7%, 2013 – 42.4%, 2017 – 18.2%). Total consumption of posaconazole has been on the increase since 2005 (rDDD in 2005–2010–2015: 0–831–1043). The total number of invasive candidiasis and rare mycoses remained unchanged over the years. The *Candida albicans* vs. *non-albicans* ratio remained unchanged in the 1st and 2nd periods (26.1% vs. 29.1%, $p=0.732$). There was a significant increase in rare mycoses in breakthrough infections on posaconazole or voriconazole prophylaxis compared to non-breakthrough infections (35.3% vs. 14.4%).

Conclusion: Based on our analysis, we have confirmed a decrease in the incidence of invasive aspergillosis from 2013 after the introduction of routine antifungal prophylaxis with posaconazole in high-risk patients. The ratio of high-risk patients with invasive zygomycosis has also decreased. Patients on posaconazole or voriconazole prophylaxis have changed the spectrum of infections in favour of rare pathogens.

KEY WORDS

invasive fungal infection – haematological patient – epidemiology – acute leukaemia

ÚVOD

Invazivní mykotické infekce (IMI) představují život ohrožující komplikace u imunokompromitovaných nemocných. Za nejvíce rizikové pro rozvoj IMI jsou považováni pacienti s hematologickými malignitami, především s akutní leukemií (AL) v indukci a reindukci a nemocní podstupující alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (human stem cell transplantation, HSCT) [1–3]. Výsledky SEIFEM studie uvádějí 4,6% incidenci IMI u hematologických pa-

cientů, přičemž u pacientů s akutní myeloidní leukemií (AML) 12% [4].

Historicky nejčastější kauzální patogeny IMI představovaly kvasinky, především *Candida* spp. [2]. Nicméně nedávné epidemiologické studie jasně ukázaly, že se invazivní kandidové infekce pravděpodobně díky účinné antifungální profylaxi v současnosti vyskytují u hematologických pacientů již s nízkou frekvencí [5] a vlivem faktorů prostředí dochází ke změně spektra kandidových infekcí ve prospěch kmenů *Candida*

non-*albicans* [4, 6–9]. Na druhé straně se v posledních letech do popředí dostaly IMI způsobené vláknitými houbami, zejména rodem *Aspergillus* spp. [4]. Na základě těchto pozorování byly publikovány studie určující rizika rozvoje IMI u hematologických nemocných [4, 10–12]. Navzdory zlepšení diagnostiky a léčby IMI zůstává úmrtnost s nimi spojená stále vysoká a infekční komplikace představují i nadále hlavní příčinu úmrtí hematologických pacientů, a navyšují tak náklady na péči o tyto nemocné [13, 14]. Epidemiologické studie posledních let potvrzují fakt recentně klesajícího trendu incidence invazivní aspergilózy (IA) a současný nárůst výskytu mukormykózy a opět i kandidových IMI u hematologických pacientů [15].

U hematologických pacientů ve vysokém riziku rozvoje IMI je stále častěji používána antimykotická profylaxe azoly s účinkem na vláknité houby (posakonazol, POSA nebo vorikonazol, VORI) s cílem snížení pravděpodobnosti rozvoje těchto život ohrožujících infekcí [16–18]. Nicméně plošná expozice azolovým antimykotikům může vést ke zvýšení incidence rezistentních kmenů a průlomových IMI [19–21]. V literatuře bylo doposud publikováno velmi málo dat analyzujících průlomové IMI, většinou invazivních kandidóz (IK) na profylaxi flukonazolem [22–26].

Naše původní práce předkládá rozsáhlou retrospektivní analýzu epidemiologických dat týkajících se vývoje výskytu případů IMI na českých a slovenských hematologických centrech zadaných do mezinárodní databáze IMI-FIND (*Fungal Infection Database*).

MATERIÁL A METODIKA

Provedli jsme retrospektivní zhodnocení změn v epidemiologii IMI (invazivní aspergilózy, invazivní kandidózy a invazivních vzácných mykóz) u hematologických nemocných diagnostikovaných celkem v 15 českých a slovenských hematologických centrech v letech 2005–2017. Sledované období jsme rozdělili do dvou period: 2005–2012 (1. období) a 2013–2017 (2. období) s ohledem na zavedení antimykotické profylaxe POSA do rutinní klinické praxe u vysoce rizikových pacientů. K analýze byla použita data zadaná do mezinárodní databáze IMI-FIND (*Fungal Infection Database*), která vznikla pod záštitou České leukemické skupiny – pro život (*the Czech Leukemia Study Group – for Life*, CELL) a je schválena Etickými komisemi jednotlivých zúčastněných pracovišť. Diagnóza pravděpodobné a prokázané IMI byla stanovena na základě EORTC/MSG kritérií z roku 2008 [27]. U vzácných IMI byl jako mikrobiologické kritérium uznán navíc průkaz vzácné houby pomocí diagnostiky PCR (*polymerase chain reaction*; polymerázové řetězové reakce). Hodnocenými parametry byly hematologické

onemocnění, protinádorová léčba před diagnózou IMI a rizikové faktory IMI (neutropenie, kortikoterapie a reakce štěpu proti hostiteli). Průlomová infekce byla definována jako IMI, která se rozvinula u pacienta na antimykotické profylaxi POSA nebo VORI trvající 7 a více dní. Vývoj spotřeby POSA a mikafunginu (MIKA) definovaný jako relativní roční spotřeba na 1 000 lůžkodní (rDDD) byl analyzován v letech 2005, 2010 a 2015 souhrnně na celkem 4 velkých českých a slovenských hematologických centrech – IHOK FN Brno, ÚHKT Praha, 4. interní klinika FN Hradec Králové a NOÚ Bratislava. Léčebná odpověď byla hodnocena na základě EORTC/MSG kritérií z roku 2008 [28]. Statistické zhodnocení dat bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu. Spojité proměnné byly porovnány Mannovým-Whitneyovým U testem. Pro všechny analýzy byla použita jako úroveň statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Práce byla podpořena Českou leukemickou skupinou – pro život (CELL), grantem MUNI/A/1105/2018 a grantem MZ ČR – RVO (FNBr 65269705).

VÝSLEDKY

1. Invazivní aspergilóza

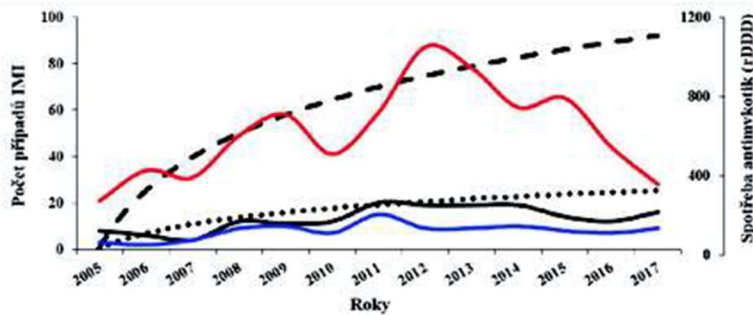
Analýzovaný soubor zahrnuje celkem 258 (73,9 %) pravděpodobných a 91 (26,1 %) jistých IA. Kompletní charakteristika souboru je uvedena v tabulce 1. Medián věku pacientů v době diagnózy IA byl stacionární v obou sledovaných obdobích – 58 let (min-0,4; max-87). Od roku 2013 vzrostl podíl pravděpodobných IA v porovnání s 1. obdobím (81,6 % vs. 69,1 %; $p = 0,009$). Protrahovaná a hluboká neutropenie v době diagnózy IA byla identifikována jako frekventní rizikový faktor u 251 (71,9 %) případů. Ve 2. sledovaném období kleslo zastoupení pacientů s reakcí štěpu proti hostiteli (*graft versus host disease*, GvHD) po alogenní HSCT před diagnózou IA (8,9 % vs. 1,5 %; $p = 0,005$). Celkem 46 pacientů (13,2 %) mělo průlomovou IA na antimykotické profylaxi POSA nebo VORI. Nejčastěji byl v 1. linii cílené antimykotické léčby ve 229 případech (78,2 %) použit VORI v monoterapii nebo kombinaci. Celková léčebná odpověď po 1. linii cílených antimykotik byla dosažena u 47,4 % případů. Celková úmrtnost ve 3 měsících od diagnózy IA byla 43,3 %, přičemž klesá ve 2. sledovaném období (47,4 % vs. 36,8 %; $p = 0,060$). Pacienti umírají do třetího měsíce po stanovení diagnózy převážně v souvislosti s IA (84,1 %).

Výskyt IA vzrůstal v 1. období v letech 2005–2012. Od roku 2013 dochází k poklesu incidence IA dominantně v souvislosti se zavedením profylaxe POSA do rutinní klinické praxe u vysoce rizikových pacientů s AML a kortikoid-rezistentních pacientů s GvHD po alogenní HSCT (celkový počet případů IA v letech 2005–2012–2017

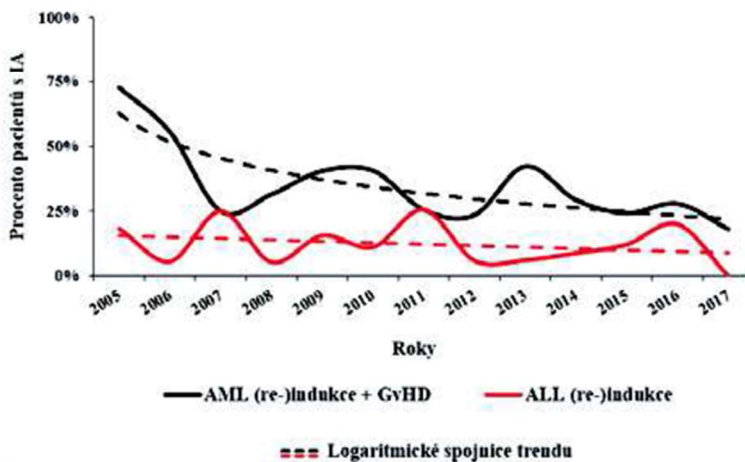
Tab. 1. Charakteristika souboru pacientů s invazivní aspergilózou

	1. období (2005–2012)	2. období (2013–2017)
Celkový počet pacientů, n (%)	213 (61,1 %)	136 (38,9 %)
Věk, medián (min–max), roky	57 (2–79)	58 (0,4–87)
Pohlaví, muži, n (%)	136 (63,9 %)	78 (57,4 %)
Typ IA podle EORTC/MSG 2008, n (%)		
Pravděpodobná	147 (69,1 %)	111 (81,6 %)
Jistá	66 (30,9 %)	25 (18,4 %)
Typ IA podle lokalizace infekce, n (%)		
Izolovaná plicní	178 (83,6 %)	118 (86,8 %)
Diseminovaná	30 (14,1 %)	12 (8,8 %)
Izolovaná jiná	5 (2,3 %)	6 (4,4 %)
Rizikové faktory pro IA, n (%)		
Neutropenie	153 (71,8 %)	98 (72,1 %)
Kortikoterapie	61 (28,6 %)	32 (23,5 %)
Neutropenie a kortikoterapie současně	22 (10,3 %)	10 (7,4 %)
GvHD	19 (8,9 %)	2 (1,5 %)
Hematologická diagnóza, n (%)		
Akutní myeloidní leukemie	79 (37,1 %)	45 (33,1 %)
Akutní lymfoblastická leukemie	41 (19,3 %)	20 (14,7 %)
Chronická lymfatická leukemie	26 (12,2 %)	23 (16,9 %)
Non-/hodgkinský lymfom	29 (13,6 %)	20 (14,7 %)
Ostatní	38 (17,8 %)	28 (20,6 %)
Onkologická léčba před dg. IA, n (%)		
Re-/indukce akutní leukemie	81 (38,1 %)	46 (33,8 %)
Alogenní transplantace krvetvorných buněk	44 (20,7 %)	29 (21,3 %)
Jiná léčba	74 (34,6 %)	52 (38,3 %)
Žádná léčba	14 (6,6 %)	9 (6,6 %)
Antimykotická profylaxe \geq 7 dní před dg. IA, n (%)	46 (21,6 %)	28 (20,6 %)
Antimykotická profylaxe – posakonazol, n (%)	20 (9,4 %)	14 (10,3 %)
Antimykotická profylaxe – vorikonazol, n (%)	8 (3,8 %)	4 (2,9 %)
Cílená antimykotika \geq 5 dní v 1. linii, n (%)	181 (85,0 %)	112 (82,4 %)
Vorikonazol monoterapie	84 (46,4 %)	75 (67,0 %)
Vorikonazol kombinace	55 (30,4 %)	15 (13,4 %)
Amfotericin B lipidové formy	20 (11,0 %)	13 (11,6 %)
Jiná léčba	22 (12,2 %)	9 (8,0 %)
Efekt 1. linie cílené léčby \geq 5 dní, n (%)		
Léčebná odpověď (kompletní a parciální remise)	86 (47,5 %)	53 (47,3 %)
Stabilní onemocnění	18 (10,0 %)	16 (14,3 %)
Progrese	75 (41,4 %)	38 (33,9 %)
Nelze hodnotit	2 (1,1 %)	5 (4,5 %)
Úmrtí, n (%)		
Úmrtí celkem	138 (64,8 %)	63 (46,3 %)
Úmrtí v souvislosti s IA	92 (43,2 %)	49 (36,1 %)
Úmrtí do 3 měsíců od diagnózy IA	101 (47,4 %)	50 (36,8 %)
Úmrtí do 3 měsíců od diagnózy v souvislosti s IA	82 (38,5 %)	45 (33,1 %)

IA – invazivní aspergilóza; EORTC/MSG – 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; GvHD – Graft versus host disease



Graf 1. Vývoj celkového počtu invazivních mykotických infekcí a spotřeby posakonazolu a mikafunginu v letech 2005-2017
Pozn.: spotřeba POSA a MIKA souhrnně celkem ve 4 hematologických centrech
IMI – invazivní mykotické infekce; rDDD – relativní roční spotřeba na 1 000 lůžkodní; POSA – posakonazol; MIKA – mikafungin; spotřeba antimykotik vyjádřená jako logaritmická spojnice trendu



Graf 2. Vývoj zastoupení případů invazivní aspergilózy u pacientů s AML indukci/reindukcí a GvHD po alogenní HSCT v letech 2005-2017
AML – akutní myeloidní leukemie; GvHD – graft versus host disease; HSCT – hematopoietic stem cell transplantation

byl: 11-51-11; průměrný počet případů na centrum v letech 2005-2012-2017 byl: 1,1-3,6-0,7) (graf 1). Celková spotřeba POSA a MIKA dohromady na 4 velkých českých a slovenských hematologických centrech od roku 2005 stoupá (POSA: rDDD v roce 2005-2010-2015: 0-831-1043; MIKA: rDDD v roce 2005-2010-2015: 15-228-290) (graf 1). Přičemž data týkající se výskytu IA na těchto 4 centrech kopírují již zmíněný trend (celkový počet případů IA v letech 2005-2012-2017 byl: 8-21-6). Ve sledovaném období klesá zastoupení případů IA u pacientů s AML v indukci či reindukci a pacientů s GvHD po alogenní HSCT (2005 – 72,7 %; 2010-40,7 %; 2015 – 24,3 % a 2017 – 18,2 %) (graf 2). Zastoupení pacientů s akutní lymfoblas-

tickou leukemií (ALL) v indukci či reindukci vykazuje také mírně klesající tendenci (viz graf 2).

2. Invazivní kandidóza

Celkem bylo zdokumentováno 168 jistých IK (85,1 % kandidemií). Kompletní charakteristika souboru je uvedena v tabulce 2. Zavedený centrální žilní katétr a protrahovaná a hluboká neutropenie byly identifikovány jako nejčastější rizikové faktory u 88,1 % a 70,8 % případů. Počet případů s antimykotickou profylaxií v době diagnózy IK je stacionární v obou obdobích (47,8 % vs. 46,1 %; $p = 0,877$). V profylaxií dominuje použití flukonazolu u 42,5 % případů IK. Pouze 11 pacientů (6,6 %) mělo průlomovou IK na antimykotické profylaxií POSA nebo VORI. Nejčastějšími cílenými antimykotiky v 1. linii byly echinokandiny (49,1 %). Celková léčebná odpověď byla dosažena u 73,8 % případů. Celková úmrtnost ve 3 měsících od diagnózy IK byla 32,1 % a významně se nemění ve sledovaných obdobích. Zhruba polovina pacientů zemře do třetího měsíce v souvislosti s IK (53,7 %).

Celkový počet IK v jednotlivých letech zůstává neměnný (průměrný počet případů na centrum a rok: 1,3) – viz graf 1). Signifikantně stoupá relativ-

ní zastoupení pacientů se solidním tumorem (1. vs. 2. období: 10,8 % vs. 25,0 %; $p = 0,040$). Zastoupení druhů *Candida albicans* vs. non-*albicans* vykazuje v 1. i 2. období obdobnou frekvenci (26,1 % vs. 29,1 %; $p = 0,732$). U pacientů se solidním tumorem jsou signifikantně častěji zastoupeny kmeny *Candida albicans* oproti pacientům s hematologickými malignitami (51,4 % vs. 27,8 %; $p < 0,007$).

3. Vzácné invazivní mykózy

Celkem bylo zdokumentováno 24 pravděpodobných a 78 prokázaných vzácných mykóz, dominantně invazivních zygomykóz (IZ; 65,7 %). Podrobná charakteristi-

Tab. 2. Charakteristika souboru pacientů s invazivní kandidózou

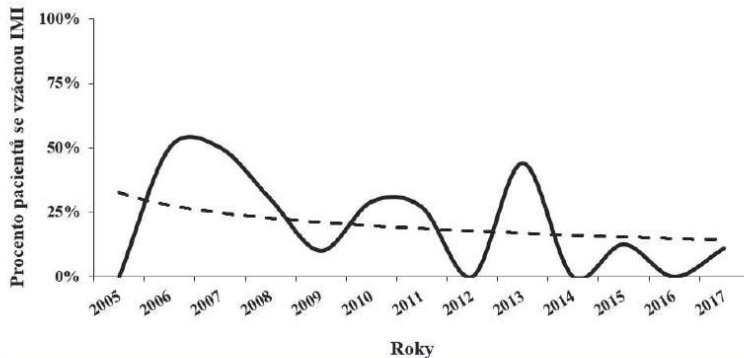
	1. období (2005–2012)	2. období (2013–2017)
Celkový počet pacientů, n (%)	92 (54,8 %)	76 (45,2 %)
Věk, medián (průměr; min – max), roky	42 (38; 0,8–84)	21 (30; 1–75)
Pohlaví, muži, n (%)	56 (60,9 %)	46 (60,5 %)
Typ IK podle EORTC/MSG 2008, n (%)		
Pravděpodobná	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Jistá	92 (100,0 %)	76 (100,0 %)
Typ IK podle lokalizace infekce, n (%)		
Kandidémie	78 (84,8 %)	65 (85,5 %)
Diseminovaná kandidóza	14 (15,2 %)	11 (14,5 %)
Rizikové faktory pro IK, n (%)		
CVK	79 (85,9 %)	69 (90,8 %)
Neutropenie	64 (69,6 %)	55 (72,4 %)
Hematologická diagnóza, n (%)		
Akutní myeloidní leukemie	23 (25,0 %)	19 (25,0 %)
Akutní lymfoblastická leukemie	16 (17,4 %)	11 (14,5 %)
Chronická lymfatická leukemie	3 (3,3 %)	0 (0,0 %)
Non-/hodgkinský lymfom	26 (28,3 %)	13 (17,1 %)
Solidní tumor	10 (10,8 %)	19 (25,0 %)
Ostatní	14 (15,2 %)	14 (18,4 %)
Antimykotická profylaxe ≥ 7 dní, n (%)	44 (47,8 %)	35 (46,1 %)
Antimykotická profylaxe-micafungin, n (%)	7 (7,6 %)	12 (15,8 %)
Antimykotická profylaxe-micafungin u ALL, n (%)	3 (3,3 %)	5 (6,6 %)
Antimykotická profylaxe-posakonazol, n (%)	3 (3,3 %)	4 (5,3 %)
Antimykotická profylaxe-vorikonazol, n (%)	2 (2,2 %)	2 (2,6 %)
Cílená antimykotická léčba ≥ 5 dní v 1. linii, n (%)	65 (70,7 %)	51 (67,1 %)
Flukonazol	14 (21,5 %)	10 (19,6 %)
Echinokandiny	28 (43,1 %)	29 (56,9 %)
Vorikonazol	9 (13,9 %)	2 (3,9 %)
Jiná léčba	14 (21,5 %)	10 (19,6 %)
Celkový efekt na konci cílené léčby, n (%)		
Léčebná odpověď (kompletní a parciální remise)	68 (73,9 %)	56 (73,7 %)
Stabilní onemocnění	13 (14,1 %)	7 (9,2 %)
Progrese	2 (2,2 %)	0 (0,0 %)
Nelze hodnotit	9 (9,8 %)	13 (17,1 %)
Úmrtí, n (%)		
Úmrtí celkem	44 (47,8 %)	34 (44,7 %)
Úmrtí v souvislosti s IK	17 (18,5 %)	12 (15,8 %)
Úmrtí do 3 měsíců od diagnózy IK	30 (32,6 %)	24 (31,6 %)
Úmrtí do 3 měsíců od diagnózy v souvislosti s IK	17 (18,5 %)	12 (15,8 %)

IK – invazivní kandidóza; EORTC/MSG – 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; CVK – centrální venózní katétr; ALL – akutní lymfoblastická leukemie

Tab. 3. Charakteristika souboru pacientů se vzácnou invazivní mykózou

	1. období (2005-2012)	2. období (2013-2017)
Celkový počet pacientů, n (%)	59 (57,8 %)	43 (42,2 %)
Věk, medián (min - max), roky	36 (0,8-72)	45 (4-70)
Pohlaví, muži, n (%)	31 (52,5 %)	27 (62,8 %)
Typ vzácné IMI podle EORTC/MSG 2008, n (%)		
Pravděpodobná	7 (11,9 %)	17 (39,5 %)
Jistá	52 (88,1 %)	26 (60,5 %)
Typ vzácné IMI podle etiologického agens, n (%)		
Invazivní zygomycóza (IZ)	38 (64,4 %)	29 (67,4 %)
Ostatní	21 (35,6 %)	14 (32,6 %)
Typ vzácné IMI podle lokalizace infekce, n (%)		
Izolovaná plicní	13 (22,0 %)	18 (41,9 %)
Diseminovaná	36 (61,0 %)	24 (55,8 %)
Izolovaná PND	3 (5,1 %)	1 (2,3 %)
Izolovaná jiná	7 (11,9 %)	0 (0,0 %)
Rizikové faktory pro vzácné IMI, n (%)		
Neutropenie	53 (89,3 %)	33 (76,7 %)
Kortikoterapie	25 (42,4 %)	23 (53,5 %)
Neutropenie a kortikoterapie	21 (35,6 %)	16 (37,2 %)
Hematologická diagnóza, n (%)		
Akutní myeloidní leukemie	25 (42,4 %)	13 (30,2 %)
Akutní lymfoblastická leukemie	16 (27,1 %)	15 (34,9 %)
Chronická lymfatická leukemie	1 (1,7 %)	4 (9,3 %)
Non-/hodgkinský lymfom	5 (8,5 %)	3 (7,0 %)
Solidní tumor	5 (8,5 %)	0 (0,0 %)
Ostatní	7 (11,8 %)	8 (18,6 %)
Onkologická léčba před dg. vzácné IMI, n (%)		
Re-/indukce akutní leukemie	22 (37,3 %)	16 (37,2 %)
Alogenní transplantace krvetvorných buněk	14 (23,7 %)	14 (32,6 %)
Jiná	23 (39,0 %)	11 (25,6 %)
Žádná	2 (3,4 %)	2 (4,6 %)
Antimykotická profylaxe \geq 7 dní, n (%) - IZ pouze	23 (60,5 %)	25 (86,2 %)
Posakonazol	2 (5,3 %)	6 (20,7 %)
Vorikonazol	4 (10,5 %)	9 (31,1 %)
Cílená antimykotika \geq 5 dní 1. linie, n (%) - IZ pouze	22 (57,9 %)	19 (65,5 %)
Abelcet	8 (21,1 %)	5 (17,2 %)
Abelcet + posakonazol	4 (10,5 %)	6 (20,7 %)
Posakonazol	2 (5,2 %)	1 (3,5 %)
Jiná léčba	8 (21,1 %)	7 (24,1 %)
Žádná léčba	16 (42,1 %)	10 (34,5 %)
Efekt na konci cílené léčby \geq 5 dní, n (%) - IZ pouze		
Léčebná odpověď (kompletní a parciální remise)	14 (36,8 %)	14 (48,3 %)
Stabilní onemocnění	2 (5,3 %)	1 (3,5 %)
Progrese	8 (21,1 %)	7 (24,1 %)
Nelze hodnotit	14 (36,8 %)	7 (24,1 %)
Úmrtí, n (%)		
Úmrtí celkem	39 (66,1 %)	21 (48,8 %)
Úmrtí v souvislosti se vzácnou IMI	33 (55,9 %)	16 (37,2 %)
Úmrtí do 3 měsíců od diagnózy vzácné IMI	29 (49,2 %)	14 (32,6 %)
Úmrtí do 3 měsíců od diagnózy v souvislosti se vzácnou IMI	29 (49,2 %)	13 (30,2 %)

IMI - invazivní mykotická infekce; EORTC/MSG - 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; IZ - invazivní zygomycóza



Graf 3. Vývoj zastoupení případů se vzácnou IMI u pacientů s AML v indukci/reindukci v letech 2005-2017
AML – akutní myeloidní leukemie; IMI – invazivní mykotické infekce

ka souboru je uvedena v tabulce 3. Medián věku pacientů byl 41 let (min-0,8; max-72). V období od roku 2013 narůstá podíl pravděpodobných vzácných mykóz (39,5 % vs. 11,9 %; $p = 0,002$) a izolovaných plicních forem (41,9 % vs. 22,0 %; $p = 0,049$). Protrahovaná a hluboká neutropenie byla identifikována jako frekventovaný rizikový faktor (84,3 % případů). Antimykotickou profylaxi POSA mělo 11,9 % případů IZ. Celkem 31 pacientů (30,4 %) mělo průlomovou vzácnou IMI na antimykotické profylaxi POSA nebo VORI. Nejčastěji byly v 1. linii cílené antimykotické léčby IZ použity amphotericin B lipidový komplex případně v kombinaci s POSA (63,4 % případů). Celková léčebná odpověď byla dosažena u 41,8 % IZ. Celková úmrtnost ve 3 měsících od diagnózy vzácné IMI byla 42,2 % a signifikantně se ve sledovaných obdobích neliší, téměř ve všech případech v souvislosti se vzácnou IMI (97,7 %).

Celkový počet vzácných IMI se v jednotlivých letech neměnil (průměrný počet případů na centrum a rok: 0,9) – viz graf 1. V 1. i 2. období dominuje IZ (64,4 % a 67,4 %; $p = 1,0$). Zastoupení pacientů se vzácnou IMI

a AML v indukci nebo reindukci klesá (graf 3).

4. Průlomové invazivní mykotické infekce

Zastoupení jednotlivých typů IMI u 88 (14,2 %) průlomových infekcí na POSA nebo VORI vs. 541 (85,8 %) infekcí bez antimykotické profylaxe je zobrazeno v grafu 4. U průlomových IMI jsou častěji zastoupeny vzácné mykózy (67,7 % zygomycózy) ve srovnání s infekcemi bez profylaxe POSA nebo VORI (35,3 % vs. 14,4 %; $p = 0,000$). Naopak IK a IA jsou zastoupeny s větší frekvencí u IMI bez profylaxe oproti průlomovým

IMI (IK: 29,0 % vs. 12,5 %; $p = 0,001$; IA: 56,0 % vs. 52,2 %; $p < 0,00001$).

DISKUSE

V posledních dekádách dochází ke změnám v incidenci IMI u hematologických pacientů jako důsledek změn v protinádorové léčbě a dalších hostitelských faktorech, zlepšení diagnostiky a zavedení nových antimykotik do klinické praxe [4, 5, 9, 15, 29-32]. Naše retrospektivní analýza předkládá vývoj epidemiologie IMI na českých a slovenských hematologických centrech a hodnotí faktory ovlivňující spektrum kauzálních patogenů a další epidemiologické parametry.

V současné době publikovaná data potvrzují souvislost používání antimykotické profylaxe se změnou spektra IMI a celkovým poklesem jejich výskytu u hematologických pacientů. Studie sekčních nálezů hematologických nemocných potvrdila klesající incidenci IA a současný nárůst výskytu mukormycózy a kandidových IMI [15]. Chamilos et al. publikovali 30% prevalenci IMI zachycených v sekčních nálezech u hematologických nemocných v letech 1989-2003 [29]. Následně stejný tým publikoval v letech 2004-2008 signifikantní pokles prevalence IMI na 19 % [15]. Podobně pozorujeme v našem souboru od roku 2013 klesající trend výskytu IMI, respektive IA, s relativním nárůstem zastoupení IK a vzácných IMI. Výskyt IA nejprve narůstal do roku 2013 s následným poklesem pravděpo-



Graf 4. Zastoupení jednotlivých typů IMI u pacientů bez profylaxe posakonazolem nebo vorikonazolem a průlomových infekcí na profylaxi posakonazolem nebo vorikonazolem
IMI – invazivní mykotické infekce; POSA – posakonazol; VORI – vorikonazol

dobně dominantně v souvislosti s rutinním zavedením profylaxe POSA do klinické praxe u vysoce rizikových hematologických pacientů. Zlepšení diagnostiky IA pomocí časného sérologického markeru, galaktomananu, způsobilo signifikantní nárůst podílu pravděpodobných forem IA oproti jistým [33]. Celkový počet vzácných IMI a IK se v našem souboru v letech nemění. Roste zastoupení pravděpodobných a izolovaných plicních forem vzácných IMI dominantně v souvislosti se zavedením diagnostiky hub pomocí PCR z BAL do rutinní klinické praxe v posledních letech.

Za nejvíce rizikové pro rozvoj IMI jsou považováni pacienti s hematologickými malignitami, především s akutní leukémií v indukci a reindukci a nemocní podstupující alogenní HSCT [1-3, 34]. Randomizovaná multicentrická studie Cornelyho et al. potvrdila signifikantní benefit antimykotické profylaxe POSA u vysoce rizikových neutropenických pacientů s AML v souvislosti se snížením incidence IMI a jejich mortality [16]. Následně byla pro vysokou úroveň důkazu profylaxe POSA u vysoce rizikových pacientů doporučena v mezinárodních guidelines [35-37]. Tento fakt podpořila i prospektivní studie skupiny SEIFEM, která prokázala snížení incidence IMI u 881 pacientů s AML po indukci na profylaxi POSA [38]. Podobně naše data ukazují klesající trend incidence IA a vzácných IMI u vysoce rizikové skupiny pacientů s akutní leukémií v indukci či reindukci a GvHD po alogenní HSCT ve sledovaném období. Jedním z možných faktorů vysvětlujících tento fakt může být právě plošné pokrytí vysoce rizikových nemocných antimykotickou profylaxí POSA, případně pacientů s ALL v indukci či reindukci profylaxí MIKA. Podobné výsledky týkající se nízké incidence (4,1 %) průlomových IMI u 49 pacientů s ALL v indukci na profylaxi MIKA uvedli ve svém abstraktu Kabut et al. [39].

Oproti literárním datům se v případě IK zastoupení kmenů *C. albicans* vs. *non-albicans* v naší studii v letech nemění [4, 6-9]. Tento fakt může být dán kromě jiných faktorů vlivem vyššího relativního zastoupení flukonazolu v profylaxi u vysoce rizikových pacientů v 1. období oproti 2. období. Chyba malých čísel se také může podílet na odlišném výsledku oproti publikovaným údajům. V souladu s publikovanými daty jsme u pacientů s IK a solidním tumorem signifikantně častěji zachytili kmeny *Candida albicans* v porovnání s pacienty s hematologickými malignitami (51,4 % vs. 27,8 %; $p < 0,007$). Vyšší incidence *C. non-albicans* kmenů u pacientů s hematologickými malignitami se převážně přisuzuje frekventovanějšímu používání profylaxe flukonazolem u těchto nemocných [40].

Lamoth et al. publikovali retrospektivní analýzu hodnotící 24 průlomových mikrobiologicky dokumentovaných IMI na profylaxi POSA nebo VORI a 66 IMI bez této profylaxe u hematologických nemocných a pacientů po transplantaci solidního orgánu [26]. Prokázali zvýšení výskytu „non-aspergilových“ vláknitých hub u průlomových infekcí vs. IMI bez profylaxe POSA nebo VORI (76 % vs. 44 %; $p = 0,003$) se signifikantním nárůstem azol-rezistentních kmenů u průlomových IMI. Podobně v naší práci průlomové IMI na POSA nebo VORI byly signifikantně s vyšší frekvencí způsobeny vzácnými patogeny (nejčastěji IZ) v porovnání s IMI bez profylaxe POSA nebo VORI (35,3 % vs. 14,4 %; $p = 0,000$). Naopak IK a IA byly u průlomových IMI zastoupeny v signifikantně nižší frekvenci.

Naše studie je zatížena limitacemi včetně jejího retrospektivního multicentrického designu a možným rizikem nekonzistentních postupů v diagnostice IMI.

ZÁVĚR

Naše analýza potvrdila klesající trend výskytu IA od roku 2013 dominantně u vysoce rizikové skupiny hematologických pacientů s velkým podílem zavedení rutinní antimykotické profylaxe POSA a MIKA u těchto nemocných. Zastoupení vysoce rizikových pacientů s IZ také v posledních letech klesá. U pacientů na profylaxi POSA nebo VORI dochází ke změně spektra kauzálních patogenů průlomových IMI v relativní prospěch vzácných patogenů, dominantně IZ. Poměr kmenů *C. albicans* a *non-albicans* se v letech nemění. U hematologických nemocných se častěji vyskytují *C. non-albicans* kmeny s vysokým podílem vlivu antimykotické profylaxe flukonazolem, u pacientů se solidními tumory je poměr opačný.

LITERATURA

- Herbrecht R, Bories P, Moulin JC, Ledoux MP, Letscher-Bru V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1272:23-30.
- Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(Suppl 1):i5-14.
- Racil Z, Weinbergerova B, Kocmanova I, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics: Fungal InfectioN Database (FIND) analysis, 2005-2009. *Int J Infect Dis* 2013;17(2):e101-109.
- Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006;91:1068-1075.
- Cornely OA, Gachot B, Akan H, et al. Epidemiology and outcome of

- fungemia in a cancer Cohort of the Infectious Diseases Group (IDG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 65031). *Clin Infect Dis* 2015;61:324–331.
6. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods Mol Biol* 2017;1508:17–65.
 7. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:317–322.
 8. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:78–81.
 9. Haber J, Ráčil Z, Mayer J, Mallátová N, Kouba M, Sedláček P, et al. Léčba invazivní kandidózy – doporučení odborných společností. *Transfuzie Hematol dnes* 2009;15(1):7–16.
 10. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010;50:1091–1100.
 11. Omer AK, Ziakas PD, Anagnostou T, et al. Risk factors for invasive fungal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1190–1196.
 12. Girmenia C, Raiola AM, Piciocchi A, et al. Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic stem cell transplantation: a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:872–880.
 13. Ananda-Rajah MR, Cheng A, Morrissey CO, et al. Attributable hospital cost and antifungal treatment of invasive fungal diseases in high-risk hematology patients: an economic modeling approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1953–1960.
 14. Heimann SM, Vehreschild MJ, Cornely OA, et al. A cost and resource utilization analysis of micafungin bridging for hemato-oncological high-risk patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2015;94:526–531.
 15. Lewis RE, Cahyame-Zuniga L, Leventakos K, et al. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. *Mycoses* 2013;56:638–645.
 16. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007;356:348–359.
 17. Neoh CF, Snell GI, Kotsimbos T, et al. Antifungal prophylaxis in lung transplantation - a world-wide survey. *Am J Transplant* 2011;11:361–366.
 18. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007;356:335–347.
 19. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis* 2016;62:362–368.
 20. van der Linden JW, Arendrup MC, Melchers WJ, et al. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised patients with invasive aspergillosis. *Emerg Infect Dis* 2016;22:158–159.
 21. Wang E, Farmakiotis D, Yang D, et al. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2362–2368.
 22. Auberger J, Lass-Flörl C, Aigner M, et al. Invasive fungal breakthrough infections, fungal colonization and emergence of resistant strains in high-risk patients receiving antifungal prophylaxis with posaconazole: real-life data from a single-centre institutional retrospective observational study. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2268–2273.
 23. Biehl LM, Vehreschild JJ, Liss B, et al. A cohort study on breakthrough invasive fungal infections in high-risk patients receiving antifungal prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2634–2641.
 24. Corzo-León DE, Satlin MJ, Soave R, et al. Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens. *Mycoses* 2015;58:325–336.
 25. Lerolle N, Raffoux E, Socie G, et al. Breakthrough invasive fungal disease in patients receiving posaconazole primary prophylaxis: a 4-year study. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:952–959.
 26. Lamoth F, Chung SJ, Damonti L, et al. Changing epidemiology of invasive mold infections in patients receiving azole prophylaxis. *Clin Infect Dis* 2017;64 (11):1619–1621.
 27. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, 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. *Clin Infect Dis* 2008;46:1813–1821.
 28. Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 2008;47(5):674–683.
 29. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989–2003). *Haematologica* 2006;91:986–989.
 30. Ráčil Z, Mayer J, Kocmanová I, et al. Léčba invazivní aspergilózy – doporučení odborných společností. *Transfuzie Hematol dnes* 2009;15(1):17–24.
 31. Gabzdilová J, Tóthová E, Guman T, Raffač Š, Jarčuška P. Mykotické komplikácie po autológnej transplantácii krvotvorných buniek u pacientov s mnohopočetným myelómom. *Transfuzie Hematol dnes* 2015;21(1):24–29.
 32. Haber J, Ráčil Z. Prístupy k antimykotické terapii: od profylaxe k léčbě. *Transfuzie Hematol dnes* 2013;19(1):39–43.
 33. Weinbergerova B, Kocmanova I, Racil Z, Mayer J. Serological approaches. *Methods Mol Biol* 2017;1508:209–221.

34. Čerňan M, Sztokowski T, Kolář M, Hubáček J, Faber E. Infekčné komplikácie behom indukčnej liečby akútnej myeloidnej leukémie bez použitia antibiotickej profylaxie. *Transfuzie Hematol dnes* 2015;21(1):14-23.
35. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46:327-360.
36. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 update. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:709-718.
37. Cornely OA, Böhme A, Buchheidt D, et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies: recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Oncology. *Haematologica* 2009;94:113-122.
38. Caira M, Candoni A, Verga L, et al. SEIFEM group: Prechemotherapy risk factors for invasive fungal diseases: prospective analysis of 1,192 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (SEIFEM 2010- a multicenter study). *Haematologica* 2015;100:284-292.
39. Kabut T, Folber F, Šálek C, et al. Primární antimykotická profylaxe micafunginem, v dávce 50 mg na den, u dospělých pacientů během indukční chemoterapie akutní lymfoblastické leukémie (ALL): hodnocení z pohledu běžné klinické praxe. *Transfuzie Hematol dnes* 2016;22(S1):133-135.
40. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, et al. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991;325:1274-1277.

Podíl autorů na přípravě rukopisu

BW – napsání rukopisu

BW, MR, ZR, JM – příprava analýzy

BW, TK, IK, LD, MK, MH, JG, TG, VP, JN, KF, JH, BŽ, EB, AZ, MK, VCH, PS, BT, PM, NM, PT, AK, DT, JH, MN, JCH, JS, MR, PŽ, PC, JM, ZR – diagnostika a léčba nemocných, revize rukopisu

Čestné prohlášení

BW, TK, IK, LD, MK, MH, JG, TG, VP, JN, KF, JH, BŽ, EB, AZ, MK, VCH, PS, BT, PM, NM, PT, AK, DT, JH, MN, JCH, JS, MR, PŽ, PC, JM, ZR – autoři prohlašují, že nemají žádný relevantní konflikt zájmů.

Poděkování

Práce byla podpořena Českou leukemickou skupinou – pro život (CELL), grantem MUNI/A/1105/2018 a grantem MZ ČR – RVO (FNBr 65269705).

Do redakce doručeno dne 2. 1. 2019.

Přijato po recenzi dne 8. 2. 2019.

MUDr. Barbora Weinbergerová

Interní hematologická a onkologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: weinbergerova.barbora@fnbrno.cz

1.4.9. Annex 9

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Lengerová M., Mayer J. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék.* 2007;53(9):990-999. ISSN 1801–7592.

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod

Z. Ráčil¹, I. Kocmanová¹, B. Wagnerová¹, M. Lengerová¹, J. Mayer²

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4.10. Annex 10

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J. Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2007;13(5):176-183. ISSN 1211-264X.

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy

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

¹Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

²Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

SOUHRN

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

Klin mikrobiol inf léc 2007;13(5):176-183

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

Došlo do redakce: 3. 7. 2007

Přijato k tisku: 5. 9. 2007

Úvod

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

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

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

1.4.11. Annex 11

Weinbergerova B., Kocmanova I., Racil Z., Mayer J. Serological Approaches. In: Lion T., ed. *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1. vyd. New York: Springer Science+Business Media New York; 2017;1508:209-221. ISBN 978-1-4939-6513-7.

Methods in
Molecular Biology 1508

Springer Protocols

Thomas Lion *Editor*

Human Fungal Pathogen Identification

Methods and Protocols

 Humana Press

Chapter 11

Serological Approaches

Barbora Weinbergerova, Iva Kocmanova, Zdenek Racil, and Jiri Mayer

Abstract

The diagnosis of invasive fungal diseases (IFD) based on clinical, radiological, and conventional microbiological findings is not reliable and is often delayed. Non-culture-based methods with higher sensitivity and specificity may reduce diagnostic time and result in decreased IFD morbidity and mortality. These methods are now increasingly used to manage patients at risk of IFD. Among available biomarkers, fungal antigens have been investigated as an aid to early diagnosis and are predominantly used as screening tests to prompt antifungal treatment mainly in patients with hematological malignancies. The revised version of the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) consensus definitions includes some of these biological markers (galactomannan, 1,3-beta-D-glucan, cryptococcus antigen).

Key words Galactomannan, The Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay, Latex agglutination, *Aspergillus* lateral-flow device, 1,3-beta-D-glucan, Fungitell assay

1 Galactomannan Detection

1.1 Introduction

Galactomannan (GM) is a critical microbiological criterion for diagnosis of invasive aspergillosis (IA). GM represents a fungal cell wall component of *Aspergillus* along with chitin, 1,3- and 1,4-beta-D-glucan [1]. Detection of this carbohydrate molecule was recorded in 1992 by Stynen, using a monoclonal antibody (MoAb) EBA-2 [2] which specifically binds to four galactofuranosyl residues. Circulating GM can be detected in serum or plasma, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), cerebrospinal fluid (CSF), and other body fluids.

The release of GM is thought only to occur during cell wall lysis when nutrients are limited in necrotic oxygen deprived tissue [3]. An “*in vitro*” model demonstrated that GM is not released into circulation during infection until the fungus invades the endothelial compartment [4]. This suggests that circulating GM cannot be detected in the serum until angioinvasion by the fungus occurs. Furthermore, it has been observed that serum GM (S-GM) is almost always readily detected in neutropenic hematological and

human stem cell transplant (HSCT) patients as a result of poor immune response where angioinvasion is observed in characteristic “halo” signs in high resolution computer tomography (HRCT) [5]. On the other hand, with non-neutropenic patients, such as hematological patients after bone marrow recovery or non-hematological patients treated with long-term corticosteroids and other immunosuppressive regimens, a significant local inflammation limiting the angio-invasive process occurs, and patients could be S-GM negative [6].

1.1.1 Latex Agglutination

The original GM assay was a latex agglutination test with a detection limit of 15 ng/mL [7]. This assay was superseded by an enzyme immunoassay (EIA) able to detect less than 1 ng/mL [2], and most reports on assay now relate to the EIA assay.

1.1.2 *Aspergillus* Lateral-Flow Device

A recent test developed and marketed for *Aspergillus* spp. detection is an antigen test identifying an extracellular glycoprotein antigen only produced during active growth of the fungus. This test uses a lateral flow device (LFD) format [8]. The assay is specific for *Aspergillus* spp. and reacted positively to sera from patients diagnosed with IA by GM and 1,3-beta-D-glucan (BDG) assay results [8, 9]. A meta-analysis of Pan et al. assessed the diagnostic accuracy of the LFD test in patients with IA according to EORTC/MSG definitions from seven published studies [10]. The pooled sensitivity, specificity, and diagnostic odds ratio (DOR) were 0.86 (95% CI, 0.76–0.93), 0.93 (95% CI, 0.89–0.96), and 65.94 (95% CI, 27.21–159.81) in the LFD test using BALF, and 0.68 (95% CI, 0.52–0.81), 0.87 (95% CI, 0.80–0.92), and 11.90 (95% CI, 3.54–39.96) in the LFD test using serum (*see* Table 1). The authors concluded that the *Aspergillus* LFD had a positive diagnostic value in immunocompromised patients at risk of IA. The LFD using BALF might have a better performance than the serum LFD test. The *Aspergillus* LFD test showed promising results for IPA diagnosis. Furthermore, the LFD test can be performed easily and provides rapid results. Therefore, it may be a reliable alternative for IPA diagnosis in centers where GM results are not rapidly available and in centers with few samples.

Table 1
Diagnostic accuracy of *Aspergillus* lateral-flow device (LFD) test for IA diagnosis

	Meta-analysis	SEN (%)	SPE (%)	DOR
Serum	Pan et al. [10]	68	87	11.90
BALF	Pan et al. [10]	86	93	65.94

SEN pooled sensitivity, SPE pooled specificity, DOR diagnostic odds ratio

1.1.3 *Platelia*TM *Aspergillus* Enzyme Immunoassay

The *Platelia*TM *Aspergillus* EIA, a single commercial assay (Bio-Rad Laboratories, Marne La-Coquette, France), is the most commonly used technique for GM detection and for this reason, we will focus exclusively on this method. It is a one-stage immunoenzymatic sandwich microplate assay that detects GM in biological samples.

This assay uses rat EBA-2 MoAb, which are directed against *Aspergillus* GM. The MoAb are used to coat the microplate wells, bind the antigen, and then detect the antigen bound to the sensitized microplate (conjugate reagent: peroxidase-linked MoAb).

Cutoff is calculated by dividing the optical density (OD) of the patient's sample by that of the threshold control, which contains 1 ng/L of GM. GM concentration is expressed as an index, and with serum (and plasma) a cutoff GM index for 0.5 positivity (IP) is recommended.

Regular monitoring for S-GM is recommended with neutropenic patients who have a relatively high a priori probability (>5–10%) of developing IA—including patients with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) undergoing intensive chemotherapy and patients receiving allogeneic HSCT in the early engraftment phase [11–13].

In addition to blood, GM can be detected in CSF or BALF [14, 15]. Experience of GM detection in pleural fluid, sputum, urine, and other specimens is insufficient to formulate specific recommendations. BALF and serum are currently the only specimens with manufacturer approval for EIA analysis.

The EIA performance of S-GM and BALF-GM testing has been thoroughly reviewed and reassessed in recent meta-analyses [16, 17]. The reported pooled sensitivity and specificity in hematological patients is 62 and 95% consecutive positivity of S-GM, and for BALF-GM: 82 and 92% (*see* Table 2). The heterogeneity of sensitivity may be related to several factors that can influence results, including patient characteristics [18], variability in the definitions of IPA [19, 20], different cutoff of OD values of GM used in BALF [15, 21, 22], administration of mould-active antifungal drugs [23–25], presence of neutropenia [24, 26, 27], and finally standardization of BAL procedures [28]. GM EIA specificity may

Table 2
Diagnostic accuracy of galactomannan (*Platelia Aspergillus* EIA) test for IA diagnosis

	Meta-analysis	SEN (%)	SPE (%)	NLR	PLR
Serum	Arvanitis et al. [17]	62	95	0.40	12.1
BALF	Heng et al. [16]	82	92	0.19	10.9

SEN pooled sensitivity, SPE pooled specificity, NLR negative likelihood ratio, PLR positive likelihood ratio

Table 3
Possible causes of galactomannan test false positivity (Platelia
***Aspergillus* EIA)**

Treatment with beta-lactam antibiotics (e.g., piperacillin–tazobactam)
Plasma-Lyte solution administration
Patients with graft versus host disease
Bifidobacterial lipoglycan (present in human gut, especially in neonates)
Gastrointestinal tract mucositis
Patients with multiple myeloma
Contamination of sample during processing

be limited by the false positivity caused by numerous factors, including cross-reactivity with certain beta-lactam antibiotics and a Plasma-Lyte solution [29, 30]. These factors are listed in Table 3.

In the commercial kit, there is a pretreatment step with an ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution which is heated in order to precipitate proteins and break up immune complexes. This may reduce the activity of the GM acid labile furanosyl side chains, and some galactofuranosyl moieties of glycoproteins may also be lost in this step [3]. It has been suggested that a microfiltration concentration step can be used to increase analytical and clinical sensitivity [31]. Certain authors have described problems with the reproducibility of the assay [32].

1.2 Materials

All procedures strictly correspond to the manufacturer's instructions [33].

1. Microplate (12 strips of 8 wells each) coated with antiGM MoAb.
2. Concentrated washing solution (Tris–NaCl buffer, 1 % Tween[®] 20, 0.01 % thimerosal).
3. Positive, cutoff and negative control serum (freeze-dried human serum).
4. Conjugate (antiGM MoAb/peroxidase labeled with 0.01 % thimerosal).
5. Sample treatment solution (EDTA acid solution).
6. Tetramethylbenzidine (TMB) substrate buffer (citric acid and sodium acetate, 0.009 % hydrogen peroxide, 4 % dimethylsulfoxide).
7. Chromogen TMB Solution (90 % dimethylsulfoxide solution with 0.6 % TMB).
8. Stopping solution (1.5 N sulphuric acid).

1.3 Methods

1.3.1 Specimen Collection

The test is performed on serum and BALF (*see Note 9*). Collect samples according to standard laboratory procedures. Unopened samples can be stored at 2–8 °C for up to 5 days (for serum) or 1 day (for BALF) prior to testing. For longer storage, keep the serum at –70 °C and the BALF at –20 °C or less. Serum samples and BALF can be subjected to a maximum of four freezing–thawing cycles.

1.3.2 Treatment of the Sera/BALF

All control sera must be processed at the same time as samples.

1. Pipette 300 µL of each test material and control into individual 1.5 mL polypropylene tubes.
2. Add 100 µL of treatment solution to each tube.
3. Mix tubes thoroughly with vigorous mixing or vortexing to blend thoroughly. Tightly close the tube to prevent opening during heating; use a cap lock for snap cap tubes.
4. Heating of tubes
 - (a) Heat block option: heat tubes for 6 min in a heat block at 120 °C (recommended are Grant block). Tubes must only be placed in the block when the prescribed temperature is reached.
 - (b) Water bath option: heat tubes for 3 min at 100 °C.
5. Carefully remove hot tubes from the heat block or the boiling water bath and place in a centrifuge. Centrifuge tubes at 10,000 × *g* for 10 min.
6. The supernatant is used for GM antigen detection.

1.3.3 Enzyme Immunoassay

1. Prepare washing solution and controls.
2. Prepare a chart for identification of test samples and controls.
3. Add 50 µL of conjugate to each well. Next, add 50 µL of supernatant to each well as designated above.
4. Cover plate with plate sealer or other means to prevent evaporation, ensuring that the entire surface is covered and watertight.
5. Incubate microplate in a dry microplate incubator for 90 ± 5 min at 37 °C (±1 °C).
6. Remove the plate sealer. Aspirate the contents of all wells into a waste container (containing sodium hypochlorite). Wash the plate five times using a minimum of 800 µL of washing solution. After the fifth wash, invert the microplate and gently tap on absorbent paper to remove remaining liquid.
7. Rapidly add 200 µL of chromogen TMB solution to each well, avoiding exposure to bright light.
8. Incubate microplate in the dark at room temperature (18–25 °C) for 30 ± 5 min.

9. Add 100 μ L of stopping solution to each well, utilizing the same order for addition of chromogen TMB solution. Mix well.
10. Read the optical density of each well at 450 nm (reference filter of 620/630 nm). Microplates must be read within 30 min after adding stopping solution.

1.3.4 Interpretation of Results

1. Calculate a validity criteria and then an index for each test sample.
2. $IP = OD \text{ sample} / \text{mean cutoff control OD}$.
3. Samples with an $IP < 0.50$ are considered to be negative for GM antigen.
4. Samples with an $IP \geq 0.50$ are considered to be positive for GM antigen, but for the BALF this point is debatable (*see Notes 3–6, 8 and 11*) [15, 21, 22].

1.4 Notes

1. Strictly comply with proposed protocol.
2. According to manufacturer recommendations, a positive result for S-GM and BALF-GM is ≥ 0.50 IP.
3. For clinical practice use there are both ECIL (European Conference on Infections in Leukemia) recommendations for S-GM positivity: A single positive GM of ≥ 0.7 IP or two consecutive samples of ≥ 0.5 IP and for BALF-GM positivity: 1 sample of ≥ 0.5 IP and EORTC/MSG recommendations for S-GM positivity: Two consecutive samples of ≥ 0.5 IP and for BALF-GM positivity: 1 sample of ≥ 0.5 IP [13, 20].
4. In case of isolated S-GM positivity, mainly in patients without risk factors for IA (neutropenia, corticotherapy, etc.), it is necessary to consider possible false positivity (*see Table 3*).
5. A lower clinical utility and false negative S-GM test is possible among patients treated with antifungal prophylaxis affecting *Aspergillus* spp. (posaconazole, voriconazole or echinocandins). In this case, a BALF-GM examination may be advantageous.
6. A negative test cannot rule out an IA diagnosis. Serum samples from patients at risk for IA should be tested twice a week.
7. The performance of the Platelia™ *Aspergillus* EIA has not been evaluated with neonatal samples.
8. The Platelia™ *Aspergillus* EIA may be affected by reduced detection of GM in patients with chronic granulomatous disease (CGD) and Job's syndrome.
9. The Platelia™ *Aspergillus* EIA has not been evaluated for use with plasma or other sample types such as urine or CSF.
10. Other genera of fungi such as *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Geotrichum*, and *Histoplasma* have shown

reactivity with rat, EBA-2 MoAb used in the assay for *Aspergillus* GM detection. Histoplasmosis should be considered in endemic areas including parts of the United States.

11. The BALF sample results from non-immunocompromised patient should be interpreted with caution.

2 1,3-Beta-D-Glucan Detection

2.1 Introduction

The glucose polymer 1,3-beta-D-glucan (BDG), a major cell wall component of most fungal species (with exception of zygomycetes and *Cryptococcus* spp.), is released in blood and tissues in the course of IFD. Measurement of BDG levels is based on activation by BDG of factor G of the coagulation cascade in the amoebocyte lysate from the horseshoe crab, which leads to quantifiable transformation of a chromogenic substrate [34]. Four commercial BDG antigenemia assays are available (Fungitell, Fungitec-G, Wako, and Maruha) with similar accuracy for the diagnosis of IFD in hematological patients [35]. The kits differ in the source of the amoebocyte lysate from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* (North-America) or *Tachypleus tridentatus* (Japan). This results in different reactivities for BDG detection and cutoffs for defining positivity of tests: Fungitell 60–80 pg/mL, Fungitec-G 20 pg/mL, Wako and Marhua 11 pg/mL. The Fungitell assay has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) and is available in the United States and Europe; the other three tests are available only in Japan. The screening performance of serum BDG in patients with IFD has been evaluated in the recent meta-analysis of prospective cohorts studies with the pooled sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, and diagnostic odds ratio (DOR): 75 %, 87 %, 5.85, 0.30, and 19.53, respectively (see Table 4) [36]. In another recent meta-analysis, the BDG assay diagnostic performance in proven/probable IFD was better with two consecutive than one single positive test result (DOR: 111.8

Table 4
Diagnostic accuracy of 1,3-beta-D-glucan test (Fungitell assay) for IFD diagnosis

	Study	SEN	SPE	NLR	PLR
Serum	Hou et al. [36]	75 %	87 %	0.30	5.85
	Study	SEN	SPE	NPV	PPV
BALF	Mutschlechner et al. [39]	79 %	39 %	86 %	28 %

SEN pooled sensitivity, SPE pooled specificity, NLR negative likelihood ratio, PLR positive likelihood ratio, NPV negative predictive value, PPV positive predictive value

vs 16.3) [35]. For 2 consecutive tests, sensitivity and specificity were 49.6 and 98.9%, respectively. Estimated positive and negative predictive values for an IFD prevalence of 10% were 83.5 and 94.6%, respectively. Because sensitivity is low, the test needs to be combined with clinical, radiological, and microbiological findings.

Many issues remain open and need to be addressed in further studies (e.g., BDG monitoring in high-risk patients, diagnostic yield in allogeneic HSCT recipients, detection in biological fluids other than blood, utility in follow-up of IFD). Attention should be paid to the potential causes of false-negative results (ongoing anti-fungal prophylaxis or therapy, pathogenic fungi not detected by the BDG assay, such as zygomycetes and *Cryptococcus*, non/semi-invasive fungal disease), and false-positive results (see Table 5).

Serum BDG appears to be a good marker for *Pneumocystis* pneumonia (PCP). The recent meta-analysis showed high diagnostic accuracy of the BDG assay for PCP with the pooled sensitivity 96%, specificity 84%, and DOR 102.3 [37]. Because the sensitivity for PCP is particularly high, the BDG assay can be used as a screening tool for PCP.

Rose et al. retrospectively studied and evaluated the utility of BALF-BDG for the diagnosis of IFD in a large unselected population of high-risk patients [38]. BALF-BDG was 100% sensitive for *Pneumocystis*. For all IFD, BALF-BDG had a sensitivity of 53% and specificity of 68%. A prospective multicenter analysis of the Fungitell assay was performed on BALF samples obtained from solid-organ transplantation patients suffering from probable, proven, or no IFD [39]. Based on a 100 pg/mL cutoff per test, sensitivity, specificity, positive, and negative predictive values were 79.2, 38.5, 27.6, and 86.3% (see Table 4). Although the high negative predictive value of the Fungitell assay in BALFs may support exclusion of pulmonary IFD, the low positive predictive value

Table 5
Possible causes of 1,3-beta-D-glucan test false positivity

Thrombocyte infusion with leukocyte-removing filters
Human blood products (immunoglobulins or albumins)
Hemodialysis/hemofiltration with cellulose membranes
Beta-lactam antibiotics (e.g., piperacillin–tazobactam, amoxicillin–clavulanate)
Severe mucositis
Cellulose dressings
Contamination of specimens by organic dust or waste at bedside or during preanalytical or analytical processing
Bacterial infections

limits its utility as a screening tool for early IFD diagnosis. Identification of the BAL-specific factors that may interfere with the performance of the assay could improve the clinical usefulness of BALF-BDG testing.

2.1.1 Fungitell Assay

The Fungitell assay is a protease zymogen-based colorimetric assay for the qualitative detection of BDG in serum. The assay is based upon a modification of the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) pathway. BDG activates Factor G, a serine protease zymogen. The activated Factor G converts the inactive proclotting enzyme to an active clotting enzyme, which in turn cleaves pNA from the chromogenic peptide substrate, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, creating a chromophore that absorbs at 405 nm. The Fungitell kinetic assay, described below, is based upon the determination of the OD rate increase produced by a sample. This rate is interpreted against a standard curve to produce estimates of BDG concentration in the sample.

2.2 Materials

All procedures strictly correspond to manufacturer instructions [40].

1. 96-well, uncoated microplates, with lids.
2. Lyophilized (1, 3)- β -D-glucan specific LAL.
3. 1.2 M KCl.
4. 0.2 M Tris-HCl pH 7.4.
5. 0.25 M KOH.
6. Lyophilized pachyman.
7. Reagent water.

All laboratory materials must be glucan-free (e.g., pipette tips, test tubes, container).

2.3 Methods

2.3.1 Specimen Collection

Serum samples should be collected in sterile tubes and allowed to clot. The serum is then separated from the clot and decanted to a container. Serum samples can be stored at 2–8 °C before assay or frozen at –20 °C or colder. Testing should be conducted promptly to avoid the possibility of sample degradation.

2.3.2 Preparation of Glucan Standard

1. Dissolve the glucan standard with the volume of reagent water and prepare five standards (concentration 100; 50; 25; 12.5; and 6.25 pg/mL) (*see Note 6*).
2. When plotting the standard curve, multiply the concentration of the standards by five so that the range is from 500 to 31 pg/mL (the volume of standard in the assay is 25 μ L per well or five times the volume of the serum).

2.3.3 Serum Pretreatment Reagent

1. The alkaline serum pretreatment reagent converts triple-helix glucans into single-stranded glucans, which are more reactive

in the assay. The high pH also inactivates the serine proteases and serine-protease inhibitors in a serum that can give a false positive and a false negative result, respectively.

2. Prepare the serum pretreatment reagent by combining equal volumes of 0.25 M KOH and 1.2 M KCl, and vortexing well.

2.3.4 Procedure

1. Transfer 5 μ L of identical serum sample to at least two of its designated wells at least twice. Repeat this parallel testing for each serum sample (*see Notes 1–4*).
2. Add 20 μ L of the serum pretreatment reagent to each well containing serum.
3. Agitate the plate for 5–10 s to mix the well contents (the reader's plate agitation function may be used), then incubate for 10 min at 37 °C (*see Note 5*).
4. Reconstitute one vial of Fungitell reagent by adding 2.8 mL of reagent water and then adding 2.8 mL of pyrosol buffer. Swirl the vial gently to dissolve completely—do not vortex.
5. At the end of serum pretreatment incubation, remove the plate from the incubating plate reader and add the standards and negative controls to the plate (25 μ L at least twice for parallel testing).
6. Add 100 μ L of Fungitell reagent to each well (containing negative controls, standards, and samples) using the stepper pipettor.
7. Insert the plate into the microplate reader (equilibrated to 37 °C) and shake for 5–10 s. Read the plate at 405 nm minus 490 nm, for 40 min at 37 °C.
8. Collect the data and analyze as follows: Examine OD plots of test samples, and check for kinetic trace patterns other than a smooth increase comparable to those of standards. Invalidate plots indicating optical interference. Calculate the mean rate of OD change (milli-absorbance units per minute) for all points between 0 and 40 min.

2.3.5 Interpretation of Results

1. The results are expressed in pg/mL of serum and range from non-detectable (<31 pg/mL) to >500 pg/mL and are printed out by the software or read from the standard curve. Accurate values above 500 pg/mL require that the sample be diluted in reagent water and retested.
2. BDG values < 60 pg/mL are interpreted as negative results.
3. Values \geq 80 pg/mL are interpreted as positive. A positive result means that BDG was detected. A positive result does not define the presence of disease and should be used in conjunction with other clinical findings to establish a diagnosis (*see Notes 7 and 8*).

4. Values from 60 to 79 pg/mL suggest a possible fungal infection. Additional sampling and testing of sera is recommended. Frequent sampling and testing improves the utility for diagnosis.
5. The laboratory performing the test should inform the ordering physician that the Fungitell test does not detect certain fungal species such as the genus *Cryptococcus*, which produces very low levels of BDG. The test also does not detect Zygomycetes such as *Absidia*, *Mucor*, and *Rhizopus*, which are not known to produce BDG.

2.3.6 Procedural Limitations

1. The tissue locations of fungal infection, encapsulation, and the amount of BDG produced by certain fungi may affect the serum concentration of this analyte.
2. Some individuals have elevated levels of BDG that fall into the indeterminate zone. In such cases, additional testing is recommended.
3. The frequency of patient testing will depend upon the relative risk of fungal infection.
4. Positive results have been found in hemodialysis patients, subjects treated with certain fractionated blood products such as serum albumin and immunoglobulins, and in specimens or subjects exposed to glucan-containing gauze (*see Note 9*).
5. Test levels were established with adult subjects. Infant and pediatric normal levels approach those of adults.

2.4 Notes

1. Work on lab table after disinfection with alcohol. Do not use flow box.
2. Cover plates and do not tip over or turn upside down in order to avoid contamination of biological material.
3. Avoid unnecessary movement of covered plates, and avoid moving unnecessarily over plates, as dust particles, e.g., from our clothes or hair, can affect test.
4. Pipette sample carefully into the well, and leave a sample drop in the well's upper left corner. Since pipette tip can touch the wall, insure that all sample residue in the tip is transferred into the well.
5. Handle only the side of the plate; do not touch the bottom when carrying plates.
6. Glucan standard is viscous. Pipette slowly with care, and do not leave residues in the tip. Begin with the lowest glucan standard concentration, and change pipette tip with each concentration used.
7. With positive results, it is necessary to provide a differential diagnosis of IA and invasive candidiasis (GM, mannan, and antimannan).

8. With extremely high levels and typical clinical and radiological (pulmonary X-ray/HRCT) findings, it is necessary to consider Pneumocystis pneumonia.
9. With an isolated positive value of serum BDG in patients with low risk of IFD, it is necessary to consider possible false positivity (*see* Table 5).

References

1. Fontaine T, Simenel C, Dubreucqetal G et al (2000) Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* 275:27594–27607
2. Stynen D, Sarfati J, Goriset al A et al (1992) Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immun* 60:2237–2245
3. Mennink-Kersten MASH, Donnelly JP, Verweij PE (2004) Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 4:349–357
4. Hope WW, Kruhlak MJ, Lymanetal CA et al (2007) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an *in vitro* model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J Infect Dis* 195:455–466
5. Franquet T, Müller NL, Giménez A et al (2001) Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. *Radiographics* 21:825–837
6. Verweij PE, Weemaes CM, Curfs JHAJ et al (2000) Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 38:3900–3901
7. Van Cutsem J, Meulemans L, Van Gerven F et al (1990) Detection of circulating galactomannan by Pastorex *Aspergillus* in experimental invasive aspergillosis. *Mycoses* 33:61–69
8. Thornton CR (2008) Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol* 15:1095–1105
9. Thornton C, Johnson G, Agrawal S (2012) Detection of invasive pulmonary aspergillosis in haematological malignancy patients by using lateral-flow technology. *J Vis Exp* 61:3721
10. Pan Z, Zhang J, Zhou H et al (2015) Diagnostic accuracy of a novel lateral-flow device in invasive aspergillosis: a meta-analysis. *J Med Microbiol* 64:702–707
11. Cordonnier C, Pautas C, Maury S et al (2009) Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis* 48:1042–1051
12. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G et al (2005) Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 41:1242–1250
13. Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M et al (2012) ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups. *Bone Marrow Transplant* 47:846–854
14. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J et al (2008) Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 177:27–34
15. Maertens J, Maertens V, Theunissen K et al (2009) Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis* 49:1688–1693
16. Heng SC, Morrissey O, Chen SC et al (2015) Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Microbiol* 41:124–134
17. Arvanitis M, Anagnostou T, Mylonakis E (2015) Galactomannan and polymerase chain reaction-based screening for invasive aspergillosis among high-risk hematology patients: a diagnostic meta-analysis. *Clin Infect Dis* 61:1263–1272
18. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N et al (2006) Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 42:1417–1427
19. Asciglu S, Rex JH, de Pauw B et al (2002) Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants:

- an international consensus. *Clin Infect Dis* 34:7–14
20. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813–1821
 21. D’Haese J, Theunissen K, Vermeulen E et al (2012) Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. *J Clin Microbiol* 50:1258–1263
 22. Guo YL, Chen YQ, Wang K et al (2010) Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest* 138:817–824
 23. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L et al (2004) Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 190:641–649
 24. Becker MJ, de Marie S, Willemse D et al (2000) Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol* 38:1434–1438
 25. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A et al (2005) Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 40:1762–1769
 26. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R et al (2009) Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 15:81–86
 27. Vallor AC, Kirkpatrick WR, Najvar LK et al (2008) Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2593–2598
 28. Racil Z, Kocmanova I, Toskova M et al (2011) Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases—the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis* 15:e874–e881
 29. Viscoli C., Machetti M., Cappellano P. et al. False positive galactomannan Platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin–tazobactam. *Clin Infect Dis* 38, 913–916.
 30. Racil Z., Kocmanova I., Lengerova M. et al. Intravenous PLASMALYTE as a major cause of false-positive results of Platelia *Aspergillus* test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol* 45, 3141–3142.
 31. Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, Klont RR et al (2008) Improved detection of circulating *Aspergillus* antigen by use of a modified pretreatment procedure. *J Clin Microbiol* 46:1391–1397
 32. Oren I, Avidor I, Sprecher H (2012) Lack of intra-laboratory reproducibility in using Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay test for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen. *Transpl Infect Dis* 14:107–109
 33. Platelia™ *Aspergillus* EIA, laboratory manual, Bio-Rad.
 34. Obayashi T, Yoshida M, Tamura H et al (1992) Determination of plasma (1/3)-b-D-glucan: a new diagnostic aid to deep mycosis. *J Med Vet Mycol* 30:275–280
 35. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C et al (2012) β-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis* 54:633–643
 36. Hou TY, Wang SH, Liang SX et al (2015) The screening performance of serum 1,3-beta-D-glucan in patients with invasive fungal diseases: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS One* 10, e0131602. doi:10.1371/journal.pone.0131602
 37. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y et al (2012) Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 50:7–15
 38. Rose SR, Vallabhajosyula S, Velez MG et al (2014) The utility of bronchoalveolar lavage beta-D-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections. *J Infect* 69:278–283
 39. Mutschlechner W, Risslegger B, Willinger B et al (2015) Bronchoalveolar lavage fluid (1,3) β-D-glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in solid organ transplantation: a prospective multicenter study. *Transplantation*. doi: 10.1097/TP.0000000000000635
 40. Fungitell™, laboratory manual, Associates of Cape Cod International. http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Fungitell_multilang_pisheets/Fungitell%20Insert%20EN.pdf

2. Habilitation Thesis Goals

Habilitation thesis objectives are divided into 2 thematic areas related to the diagnosis and treatment optimization of IFD and COVID-19 in hematological patients.

IFD diagnosis in hematological patients is, as previously ascribed, generally very difficult, and late conventional microbiological and radiodiagnostic methods are insufficiently sensitive. IFD diagnosis is therefore primarily based on prespecified pathological imaging results, most frequently lung CT, combined with serological detection of fungal cell wall antigen in defined material or detection of a fungal pathogen in sterile material using culture, histological, or, more frequently, PCR procedures. As a co-author, the applicant, as noted in Chapter 3.1, participated in an international survey on the importance of pulmonary CT performed at the onset of hematological disease in IA diagnosis.

Epidemiological data, diagnostic and treatment procedures, and their effectiveness both at the local, national, and international levels cannot be evaluated without voluminous high-quality data from actual clinical practice. Within the Czech Republic, the applicant worked with the Institut of Biostatistics and Analyses (IBA), a spin-off company of the Masaryk University (MU) Brno, to create FIND, an IFD database for hematological patients, and published several works describing entered data analysis. The FIND database is detailed in Chapter 3.1.

Azole plasma level monitoring is an integral part of IFD treatment optimization in connection with effectivity and toxicity. This issue is summarized in Chapter 3.1.1.3. of Annex 14.

Since the beginning of the 20th century, serological diagnostics of fungal cell wall antigens have been the main tool and fundamental objective for IFD management optimization among immunocompromised patients. Throughout her professional career, the aspirant has been predominantly committed to improving IA diagnosis using GM and IFD diagnosis by generally using the common marker BDG from both serum and fluid obtained from BAL. Significantly, the applicant worked with the Center of Molecular Biology and Genetics (CMBG) at IHOK MU Brno to optimize IFD diagnosis in various body materials using PCR methods, where new methods were subsequently designed and incorporated into real clinical practice. Based on the candidate's numerous years of work in this field, she was the first author or co-author in a number of papers describing, among other matters, factors affecting diagnostic test performance in connection with possible false positives. These results are recorded described in Chapters 3.2., 3.3. and 3.4.

Relating to the coronavirus SARS-CoV-2 pandemic, the aspirant's home workplace under the leadership of Professor Jiří Mayer became a pilot center initiating several local and national projects focusing on epidemiology, diagnostics, clinical course, treatment and prognosis of COVID-19, predominantly among hematological patients. In March 2020, one of the initial studies during Czech Republic's first pandemic wave was the interdisciplinary prospective observational questionnaire-based project COVID-JMK-20, which through telemonitoring described the COVID-19 course among the general population and illustrated the relationship between symptomatology and viral load, and complicated individual dynamics. This undertaking was published with the applicant credited as the primary author. Throughout the pandemic, severe COVID-19 high incidence, prolonged and recurrent infections requiring frequent re-treatment with antiviral, remdesivir -- initially in combination with convalescent plasma (CP) with a high titer of virus-neutralizing antibodies and a frequent solution to anticancer treatment modification -- were on our regular agenda. Despite all efforts, however, high COVID-19 mortality still persists in hematological patients. With the candidate's contribution as a primary author, we have published two papers on this topic in IF journals. The first study evaluated infection course and the effectiveness of early treatment with a combination of remdesivir and CP in hematological patients with COVID-19. The second multicenter prospective project analyzed the effectiveness of monoclonal SARS-CoV-2 neutralizing antibodies early administration in COVID-19 positive hematology patients at Czech hematology centers during the beginning of 2021. Analysis of immense epidemiological data, COVID-19 course and prognosis first in all hematological patients, then in the group of patients after treatment with Chimeric Antigen Receptor T cells (CAR-T), and finally from the group of hematological patients vaccinated against SARS-CoV- 2 were evaluated. Our endeavors focusing on COVID-19 issues are summarized within the adept of Chapter 4.1.

3. Invasive Fungal Diseases in Immunocompromised Patients

3.1. Invasive Fungal Infections – Optimization of Diagnostics and Treatment

CT as the Gold Standard in the IFD Diagnosis

The IFD diagnosis is very complex, determining its probability in immunocompromised individuals on the basis of host, microbiological, and clinical criteria [15]. In recent years, there has been significant progress in this area, diagnostic methods improvement, and thus a significant reduction in time to final diagnosis and treatment initiation. Non-culture-based methods for fungal antigen detection, both serological and PCR, and their optimization are discussed in separate Chapters 3.2., 3.3. and 3.4. Lung CT has become a clinical criterion representing an inseparable gold standard in the number of pulmonary IFDs diagnoses, especially IA and invasive mucormycosis. Conventional imaging methods (X-ray of the lungs) provide late and non-specific information [15, 24, 35]. CT also has an evident place in treatment effectiveness monitoring [36]. The applicant actively participated in the form of a co-authored publication on mapping lung CT importance in an IPA diagnosis at the time of hematological disease onset in high-risk patients, which is part of Annex 12 in Chapter 3.1.1.1.

IFD Database - FIND (Fungal Infection Database)

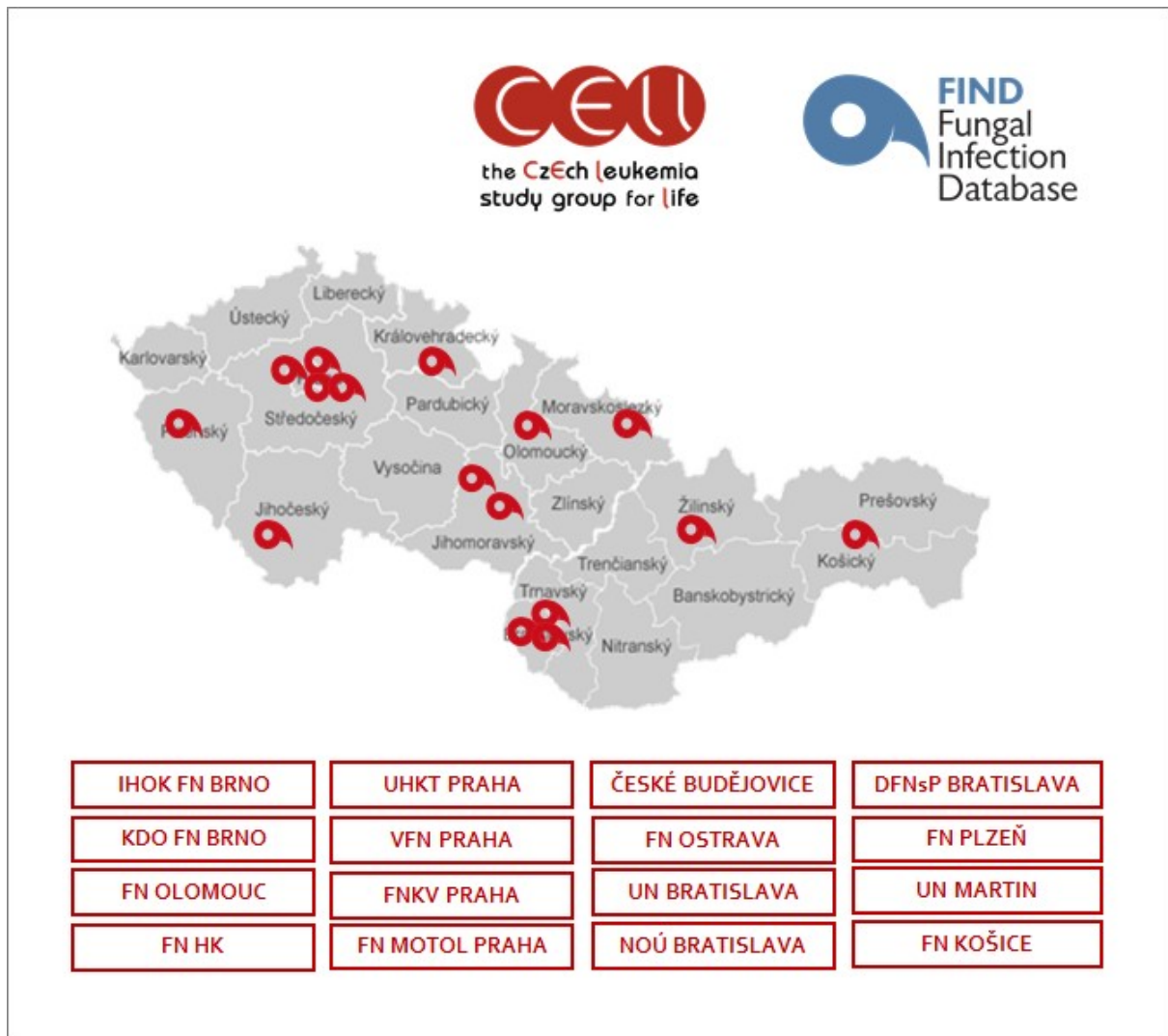
IFD diagnosis and treatment optimization with the aim of improving patient care in the Czech Republic and accelerating research in this area cannot be imagined without quality data and cooperation at both the local, national, and international levels. The aspirant's workplace has a well-established close multidisciplinary collaboration of clinicians with colleagues from CMBG, microbiologists, pathologists, pharmacologists, and biochemists within the Working Group for Opportunistic Infections at IHOK. At the national and transnational level, CELL brings together specialists in opportunistic infections among hematological patients. The results of this cooperation are presented annually at a meeting of experts within the Workshop for Opportunistic Infections and the Mycological Pre-Workshop. IFD cases diagnosed in hematological patients at Czech and Slovak hematology centers are recorded in the "FIND" (Fungal Infection Database). This database was created on behalf of CELL, the "Opportunistic Infections in Hematooncology Patients" project, and is the largest IFD database in Central Europe. During the database creation in 2003 -- first as an Excel spreadsheet, then in the TrialDB system, and finally with transfer to its most modern form to the Clinical Data Warehousing Information System (CLADE-IS) platform -- the applicant was an active participant and is currently the main project coordinator. The professional guarantee of the

project is enshrined on the basis of a contractual cooperative relationship between CELL and the Czech Medical Society, the Leukemia Section of the Czech Hematological Society. The register consists of three separate parts - FIND aspergillus, FIND candida, FIND rare fungi - covering the entire IFD spectrum in hematooncological patients. Multicenter data collection representing the active participation of a total of 16 hematology centers in the Czech Republic and Slovakia ensures coverage of the maximum population sample (see Figure 2). The maximum quality of the entered data is guaranteed by exclusive representation of the center data with their validation by the joint CELL data manager. The project monitors epidemiological and demographic data and standardizes and compares diagnostic and treatment procedures and their effectiveness between centers with regard to current recommendations, long-term "follow-up" patients, including monitoring overall survival. Another integral part of FIND is the pharmacovigilance data recording to ensure maximum safety and the best "benefit-to-risk" ratio. Regardless of age, all patients with a diagnosis of probable or proven IA, candidiasis, and rare IFD (dominant invasive mucormycosis) can be included in the databases. The database currently contains over 1000 IFD cases entered since 2003.

The FIND register consists of a fully electronic database accessible via a web browser on the CELL website: <http://www.leukemia-cell.org/>. In addition to the work of trained data managers, a key part of the entire project is the basic security of the database IT (Information Technology) infrastructure at the IBA MU Brno. Data is entered into online forms, stored, and backed up using the EDC (Electronic Data Capture) system. No additional software requires installation to use online data collection. EDC systems enable entrance and data viewing in real-time and additionally effect online validation of entered data, thus achieving more efficient data quality at the moment of introduction. All data are so-called pseudo-anonymized, ie. kept under a code that can only identify selected personnel of the workplace where the patient is monitored and treated. Only authorized persons have access to the database via their unique login and password. The system is monitored by predefined validation rules to ensure controlled data collection (eg checking the correct data format, checking limits, checking the presence of data-mandatory items, checking logical dependencies between data). This validation system therefore helps to eliminate data discrepancies, rendering ideal prophylaxis for statistical analysis. All data are, therefore, carefully validated before subsequent analyzes use by both the control system and the authorized physician-coordinator and data managers. As part of the summary, the annual registry analyzes and, in cases of sub-analyzes, there is agreement that

data quality is also checked using "data review" or an interactive, online search for invalid patients.

Figure 2. Czech and Slovak Hematooncology Centers Participating in the FIND Database.



The FIND data analysis was published with the applicant's contribution as the first author or co-author in the form of conference abstracts at a number of international conferences and presented orally at national hematology and infectology congresses. Analysis conclusions became the basis for the published CELL experts' recommendations for IFD diagnosis and treatment with the candidate contribution as a co-author. Ultimately, the aspirant participated as co-author in a comprehensive analysis of invasive aspergillosis cases chronicled in FIND among patients with hematological diseases diagnosed and treated in the Czech Republic and Slovakia published in an impact journal (Annex 13 in Chapter 3.1.1.2).

IFD Treatment Optimization-Plasma Azole Antifungal Levels Monitoring

As part of IFD treatment optimization, the applicant was co-investigator with the grant of the Ministry of Health of the Czech Republic-IGA NS10441-3 / 2009 - Monitoring of voriconazole plasma levels (2009–2011). Our work output was an extensive retrospective study evaluating the results of monitoring voriconazole plasma levels in hematological patients treated at 3 large hematology centers in the Czech Republic during the years 2005 to 2010. Work conclusions recognized significant inter-and intra-patient variability of measured concentrations. With the exception of omeprazole, there was no relevant relationship between measured voriconazole concentrations and drug dose, route of administration, age, gender, CYP2C19 * 2 genotype, gastrointestinal abnormality, nasogastric tube feeding, serum creatinine, and liver enzymes. However, analysis per patient revealed a significant role for the individual dose of voriconazole and the change in dosage form to a measured plasma concentration. Measured voriconazole concentrations did not correlate with the outcome of IA treatment. The applicant participated in the publication as a co-author (Annex 14 in Chapter 3.1.1.3).

Azole plasma levels monitoring in relation to treatment response and toxicity has recently become a routine part of IFD treatment and has been included in the recommendations for IFD treatment by international panels of experts [25, 27, 29].

IFD diagnosis and treatment optimization in order to improve the prognosis of immunocompromised patients is further detailed in the following journal publications and book chapters with the applicant in the role of author or co-author (sorted chronologically in ascending order). Three selected publications are part of Chapter 3.1.1. Annexes to Chapter 3.1. (Annexes 12 to 14 sorted thematically):

- Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I., Lengerová M., Bohatá Š., Moulis M., Mayer J. Diseminovaná invazivní aspergilóza úspěšně léčená kombinovanou antimykotickou terapií – kazuistika. *Mimořádná příloha Postgraduální medicíny: Novinky a specifické aspekty v léčbě invazivních mykotických infekcí. Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře.* 2008; 10:19-24. ISSN 1212-4184.
- Weinbergerová B., Winterová J., Ráčil Z., Kocmanová I., Lengerová M., Moulis M., Mayer J. Význam měření plazmatických koncentrací vorikonazolu pro monitorování jeho léčebného efektu a možných projevů toxicity – kazuistika. *Mimořádná příloha Postgraduální medicíny: Novinky a specifické aspekty v léčbě invazivních mykotických*

- infekcí. Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře.* 2008; 10:19-24. ISSN 1212-4184.
- Ráčil Z., Malášková L., Kocmanová I., Weinbergerová B., Lengerová M., Winterová J., Mayer J. Význam měření plazmatických koncentrací vorikonazolu a posakonazolu. *Mimořádná příloha Postgraduální medicíny: Novinky a specifické aspekty v léčbě invazivních mykotických infekcí. Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře.* Med. 2008; 10:45-51. ISSN 1212-4184.
 - Racil Z., Winterova J., Kouba M., Zak P., Malaskova L., Buresova L., Toskova M., Lengerova M., Kocmanova I., Weinbergerova B., Timilsina S., Rolencova M., Cetkovsky P., Mayer J. Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience. *Mycoses.* 2012;55(6):483-492. ISSN 1439-0507. (see Annex 14 in Chapter 3.1.1.3.)
 - Racil Z., Weinbergerova B., Kocmanova I., Muzik J., Kouba M., Drgona L., Masarova L., Guman T., Tothova E., Forsterova K., Haber J., Ziakova B., Bojtarova E., Vydra J., Mudry P., Foralova R., Sejnova D., Mallatova N., Kandrnal V., Cetkovsky P., Mayer J. Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics: Fungal InfectioN Database (FIND) analysis, 2005-2009. *Int J Infect Dis.* 2013;17:e101-e109. ISSN 1201-9712. (see Annex 13 in Chapter 3.1.1.2.)
 - Chrenkova V., Hubka V., Cetkovsky P., Kouba M., Weinbergerova B., Lyskova P., Hornofova L., Hubacek P. Proven Invasive Pulmonary Aspergillosis in Stem Cell Transplant Recipient Due to Aspergillus sublatus, a Cryptic Species of A. nidulans. *Mycopathologia.* 2018;183(2):423-429. ISSN 1573-0832.
 - Stemler J., Bruns C., Mellinshoff SC., Alakel N., Akan H., Ananda-Rajah M., Auberger J., Bojko P., Chandrasekar PH., Chayakulkeeree M., Cozzi JA., de Kort EA., Groll AH., Heath CH., Henze L., Jimenez MH., Kanj SS., Khanna N., Koldehoff M., Lee D., Mager A., Marchesi F., Martino-Bufarull R., Nucci M., Oksi J., Pagano L., Phillips B., Prattes J., Pyrpasopoulou A., Rabitsch W., Schalk E., Schmidt-Hieber M., Sidharthan N., Soler-Palacín P., Stern A., Weinbergerová B., El Zakhem A., Cornely OA., Koehler P. Baseline Chest Computed Tomography as Standard of Care in High-Risk Hematology Patients. *J. Fungi.* 2020;6(1):36. doi: 10.3390/jof6010036. ISSN 2309-608X. (see Annex 12 in Chapter 3.1.1.1.)

3.1.1. Annexes to Chapter 3.1.

3.1.1.1. Annex 12





















Stemler J., Bruns C., Mellinghoff SC., Alakel N., Akan H., Ananda-Rajah M., Auberger J., Bojko P., Chandrasekar PH., Chayakulkeeree M., Cozzi JA., de Kort EA., Groll AH., Heath CH., Henze L., Jimenez MH., Kanj SS., Khanna N., Koldehoff M., Lee D., Mager A., Marchesi F., Martino-Bufarull R., Nucci M., Oksi J., Pagano L., Phillips B., Prattes J., Pyrpasopoulou A., Rabitsch W., Schalk E., Schmidt-Hieber M., Sidharthan N., Soler-Palacín P., Stern A., Weinbergerová B., El Zakhem A., Cornely OA., Koehler P. Baseline Chest Computed Tomography as Standard of Care in High-Risk Hematology Patients. *J. Fungi*. 2020;6(1):36. doi: 10.3390/jof6010036. ISSN 2309-608X.

IF = 5,816 in 2020; MICROBIOLOGY Q1, MYCOLOGY Q1; 5 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

Article

Baseline Chest Computed Tomography as Standard of Care in High-Risk Hematology Patients

Jannik Stemler ^{1,2,3,*} , Caroline Bruns ^{1,2,3}, Sibylle C. Mellinghoff ^{1,2,3}, Nael Alakel ⁴ , Hamdi Akan ⁵, Michelle Ananda-Rajah ⁶ , Jutta Auberger ⁷, Peter Bojko ⁸, Pranatharthi H. Chandrasekar ⁹, Methée Chayakulkeeree ¹⁰ , José A. Cozzi ¹¹ , Elizabeth A. de Kort ¹² , Andreas H. Groll ¹³, Christopher H. Heath ^{14,15,16} , Larissa Henze ¹⁷ , Marcos Hernandez Jimenez ^{18,19}, Souha S. Kanj ²⁰, Nina Khanna ²¹, Michael Koldehoff ²² , Dong-Gun Lee ²³, Alina Mager ²⁴ , Francesco Marchesi ²⁵, Rodrigo Martino-Bufarull ²⁶, Marcio Nucci ²⁷ , Jarmo Oksi ²⁸, Livio Pagano ^{29,30} , Bob Phillips ^{31,32} , Juergen Prattes ³³ , Athina Pырpasopoulou ³⁴, Werner Rabitsch ³⁵, Enrico Schalk ³⁶ , Martin Schmidt-Hieber ³⁷, Neeraj Sidharthan ³⁸ , Pere Soler-Palacín ³⁹ , Anat Stern ⁴⁰ , Barbora Weinbergerová ⁴¹, Aline El Zakhem ⁴², Oliver A. Cornely ^{1,2,3,43,†}  and Philipp Koehler ^{1,2,†} 

- 1 Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseldorf (CIO ABCD), Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, 50937 Cologne, Germany; caroline.brun@uk-koeln.de (C.B.); sibylle.mellinghoff@uk-koeln.de (S.C.M.); oliver.cornely@uk-koeln.de (O.A.C.); philipp.koehler@uk-koeln.de (P.K.)
- 2 Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany
- 3 German Centre for Infection Research, Partner Site Bonn-Cologne, 50937 Cologne, Germany
- 4 Department of Internal Medicine I, University Hospital of Dresden, 01307 Dresden, Germany; nael.alakel@uniklinikum-dresden.de
- 5 Hematology Clinical Research Unit, Cebeci Hospital, Ankara University Faculty of Medicine, 06100 Ankara, Turkey; hamdiakan@gmail.com
- 6 Dept of Infectious Diseases and General Medical Unit, Alfred Health & Central Clinical School, Monash University, Melbourne 3004, Australia; michelle.ananda-rajah@monash.edu
- 7 Onkologische Schwerpunktpraxis Freilassing, 83395 Freilassing, Germany; auberger@onko-endo.de
- 8 Department of Hematology and Oncology, Red Cross Hospital Munich, 80634 Munich, Germany; peter.bojko@swmbrk.de
- 9 Division of Infectious Diseases, Wayne State University School of Medicine, Karmanos Cancer Center, Detroit, MI 48201, USA; pchandrasekar@med.wayne.edu
- 10 Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand; methée.cha@mahidol.ac.th
- 11 Hematology Department, Hospital Provincial Del Centenario, Rosario 2000, Argentina; joseacozzi@hotmail.com
- 12 Department of Hematology, Radboud University Medical Center, 6500 Nijmegen, The Netherlands; Elizabeth.Dekort@Radboudumc.nl
- 13 Infectious Disease Research Program, Center for Bone Marrow Transplantation and, Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Children's Hospital, 48149 Münster, Germany; grollan@ukmuenster.de
- 14 Department of Microbiology (PathWest Laboratory Medicine, WA, FSH Network), Perth 6000, Australia; chris.heath@health.wa.gov.au
- 15 Depts. of Infectious Diseases, Fiona Stanley Hospital & Royal Perth Hospital, Perth 6000, Australia
- 16 Faculty of Health & Medical Sciences, University of Western Australia, Murdoch/Perth, Murdoch 6150, Australia
- 17 Department of Medicine, Clinic III – Hematology, Oncology, Palliative Medicine, Rostock University Medical Center, 18057 Rostock, Germany; larissa.henze@med.uni-rostock.de
- 18 Head of the bone marrow unit, Hospital City Dr. Enrique Tejera, 2001 Valencia, Venezuela; mhernanj@gmail.com

3.1.1.2. Annex 13

Racil Z., Weinbergerova B., Kocmanova I., Muzik J., Kouba M., Drgona L., Masarova L., Guman T., Tothova E., Forsterova K., Haber J., Ziakova B., Bojtarova E., Vydra J., Mudry P., Foralova R., Sejnova D., Mallatova N., Kandrnl V., Cetkovsky P., Mayer J. Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics: Fungal InfectioN Database (FIND) analysis, 2005-2009. *Int J Infect Dis.* 2013;17:e101-e109. ISSN 1201-9712.

IF = 2,330 in 2013; INFECTIOUS DISEASES Q3; 19 citations according to WOS or Scopus, without self-citations



Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics: Fungal InfectioN Database (FIND) analysis, 2005–2009

Zdenek Racil^{a,b,*}, Barbora Weinbergerova^a, Iva Kocmanova^c, Jan Muzik^d, Michal Kouba^e, Lubos Drgona^f, Lucia Masarova^g, Tomas Guman^h, Elena Tothova^g, Kristina Forsterova^h, Jan Haber^h, Barbora Ziakovaⁱ, Eva Bojtarova^l, Jan Vydra^l, Peter Mudry^k, Renata Foralova^k, Daniela Sejnova^l, Nada Mallatova^m, Vit Kandrnal^d, Petr Cetkovsky^e, Jiri Mayer^{a,b}

^a Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

^b CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic

^c Department of Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

^d Institute of Biostatistics and Analyses at the Faculty of Medicine and the Faculty of Science of the Masaryk University, Brno, Czech Republic

^e Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

^f Second Department of Oncology, Comenius University and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia

^g Department of Hematology and Onco-hematology, Louis Pasteur University Hospital, Kosice, Slovakia

^h Department of Hemato-oncology, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

ⁱ Department of Hematology and Transfusiology, St. Cyril and Methodius Hospital – University Hospital Bratislava, Bratislava, Slovakia

^l Department of Hematology, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

^k Department of Pediatric Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

^m Department of Pediatric Hematology and Oncology, Pediatric University Hospital Bratislava, Bratislava, Slovakia

ⁿ Laboratory of Parasitology and Mycology, Ceske Budejovice Hospital, Ceske Budejovice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2012

Received in revised form 21 August 2012

Accepted 2 September 2012

Corresponding Editor: Meinolf Karthaus, Munich, Germany

Keywords:

Invasive aspergillosis

Hematological malignancy

Diagnosis

Antifungal treatment

SUMMARY

Objectives: To evaluate risk factors, diagnostic procedures, and treatment outcomes of invasive aspergillosis (IA) in patients with hematological malignancies.

Methods: A retrospective analysis of data from proven/probable IA cases that occurred from 2005 to 2009 at 10 hematology centers was performed.

Results: We identified 176 IA cases that mainly occurred in patients with acute leukemias (58.5%), mostly those on induction/re-induction treatments (39.8%). Prolonged neutropenia was the most frequent risk factor for IA (61.4%). The lungs were the most frequently affected site (93.8%) and computed tomography detected abnormalities in all episodes; however, only 53.7% of patients had findings suggestive of IA. Galactomannan (GM) detection in serum or bronchoalveolar lavage fluid (positive in 79.1% and 78.8% of episodes, respectively) played a crucial role in IA diagnosis. Neutrophil count and antifungal prophylaxis did not influence the GM positivity rate, but empirical therapy decreased this rate (in serum). Of the IA cases, 53.2% responded to initial antifungal therapy. The combination of voriconazole and echinocandin, even as initial or salvage therapy, did not perform better than voriconazole monotherapy ($p = 0.924$ for initial therapy and $p = 0.205$ for salvage therapy). Neutrophil recovery had a significant role in the response to initial (but not salvage) antifungal therapy.

Conclusions: Our retrospective analysis identified key diagnostic and treatment characteristics, and this understanding could improve the management of hematological malignancy patients with IA.

© 2012 Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases.

1. Introduction

Invasive fungal diseases (IFD) are an important cause of morbidity and mortality in patients with hematological diseases.^{1,2} The epidemiology of IFD in this group of severely immunocompromised patients has changed substantially during the last two

decades, with invasive aspergillosis (IA) being a predominant infection.¹ The incidence of this infection can vary and is mainly based on the underlying hematological malignancy; it can reach up to 10% among patients undergoing treatment for acute leukemia or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).³ However, there have been several key advancements over the past decade that have significantly improved not only the diagnosis (widespread availability of high-resolution computed tomography (HRCT) and non-culture based diagnostic tools, such as the detection of galactomannan (GM)), but also treatment

* Corresponding author. Tel.: +420 602 564011.
E-mail address: zracil@fnbrno.cz (Z. Racil).

options (availability of new antifungal drugs, e.g., voriconazole and echinocandins) of IA. These events have led to the recently reported improvement in the prognosis of patients with this life-threatening infection.^{2,4,5} Moreover, several observational registries in Europe, as well as worldwide, have been created with the goal of collecting real world data regarding incidence, risk factors, and treatment outcomes of patients with IA.^{1,2,4–6}

In this multicenter study, we report data from IA episodes that occurred in patients with hematological malignancies. These data were retrospectively collected from the Fungal InfectioN Database (FIND), which holds data from almost all hematology centers in the Czech and Slovak republics. The aim of this study was to analyze the risk factors, diagnostic procedures, and treatment outcomes from the largest cohort of IA episodes in Central Europe published to date.

2. Methods

2.1. Design

Thirteen hematology centers in the Czech and Slovak republics participate in the FIND project. The database consists of retrospectively collected data of proven and probable IA cases that occurred between 2001 and 2009, as well as a prospective collection of cases from 2010 onwards.

This study was conducted by performing an analysis of proven and probable IA cases that occurred between January 1, 2005 and December 31, 2009, which had been retrospectively entered as electronic case report forms by 10 of 13 participating centers (seven adult and three pediatric centers). The distribution of episodes during this time period was not uniform and was mainly dependent on the extension of non-culture-based diagnostic techniques (e.g., GM detection) among centers. Therefore, the number of episodes in individual time intervals does not reflect the real incidence of infection. Forty-one percent of cases entered into the database and analyzed occurred between 2005 and 2007, 59% between 2008 and 2009.

2.2. Case identification

Cases were identified in participating centers by reviewing the patient charts as well as laboratory, microbiology, and imaging results. Pathology reports from autopsies were also used. All identified episodes of IA during the observation period were included in the database.

The variables collected in the electronic case report forms included the subject's demographic characteristics, underlying hematological malignancy and treatment, clinical signs and symptoms, and the results of microbiological and histological investigations, as well as results of imaging studies, information regarding the use of mold-active antifungal prophylaxis and empirical antifungal treatment, targeted antifungal treatment and outcomes, neutrophil counts at the time of diagnosis as well as before and after each antifungal treatment, and finally patient survival. Due to the retrospective design of this study, a patient's informed consent was not required. The Institutional Review Board of the University Hospital Brno approved this study.

2.3. Definitions

Episodes of IA were defined according to the 2002 European Organisation for Research and Treatment of Cancer and Mycosis Study Group (EORTC/MSG) criteria.⁷ The day of diagnosis was defined as the day when criteria for proven or probable IA were fulfilled. Empirical antifungal therapy was defined as the administration of systemic antifungal treatment in patients with

persistent fever only, or in patients who did not fulfill criteria for proven or probable IFD at the time of treatment initiation. Targeted antifungal therapy was started when patients fulfilled criteria for proven or probable IA. The overall outcome of therapy, as well as the outcome of each line of antifungal treatment, was classified according to published EORTC/MSG recommendations.⁸ The effect of therapy was evaluated only if the targeted antifungal therapy lasted at least 5 days. An independent, blinded evaluation of all the entered data was performed by a review board at the main study center, with special consideration to the fulfillment of EORTC/MSG criteria for the diagnosis of proven or probable IA, as well as treatment outcome.

2.4. Statistical analysis

Frequency tables and standard descriptive statistics were used for summation of the patient characteristics. Proportions were compared with the maximum-likelihood Chi-square test or Fisher's exact test. Continuous variables were compared with the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis analysis of variance

Table 1
Baseline characteristics

Patients	
No. of patients	176
Age, years, median (range)	56 (3–77)
Sex, male/female, n (%)	104 (59.1%)/72 (40.9%)
Patient's disease at baseline, n (%)	
AML+MDS	73 (41.5%)
ALL	30 (17.0%)
NHL+HL	27 (15.3%)
CLL	20 (11.4%)
MM	12 (6.8%)
CML+CMPP	4 (2.3%)
Other	10 (5.7%)
Anticancer therapy during/before IA, n (%)	
Induction/reinduction therapy of acute leukemia	70 (39.8%)
Allogeneic HSCT	30 (17.0%)
Autologous HSCT	17 (9.7%)
Other	52 (29.5%)
None	7 (4.0%)
Presence of risk factors for development of IA, n (%)	
Neutropenia $<0.5 \times 10^9/l$ for >10 days	108 (61.4%)
Administration of corticosteroids for >21 days	50 (28.4%)
Pulmonary/respiratory tract disease in anamnesis (COPD, etc.)	22 (12.5%)
GVHD	20 (11.4%)
Other risk factors	41 (23.3%)
Number of risk factors present at diagnosis, n (%)	
0	29 (16.5%)
1	79 (44.9%)
2	44 (25.0%)
≥ 3	24 (13.6%)
IA episodes	
No. of episodes	176
Certainty of diagnosis according to EORTC/MSG 2002 criteria, n (%)	
Proven IA	27 (15.3%)
Probable IA	149 (84.7%)
Site of infection, n (%)	
Lung	165 (93.8%)
Sinuses	1 (0.6%)
Disseminated	7 (4.0%)
Other	3 (1.7%)

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; CMPP, chronic myeloproliferative disease; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; EORTC/MSG, European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group; GVHD, graft-versus-host disease; HL, Hodgkin lymphoma; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; IA, invasive aspergillosis; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, multiple myeloma; NHL, non-Hodgkin lymphoma.

(ANOVA) test, as appropriate. The probabilities of overall survival were estimated using the Kaplan–Meier method, and a comparison of survival in the groups of patients was performed using a log-rank test. The point estimates were supplied with 95% confidence intervals (CI). A level of statistical significance $\alpha = 0.05$ was used in all analyses. For the analysis of the role of neutrophil count at the defined time points in the efficacy of antifungal treatment, patients were divided into three groups: those with a neutrophil count ≤ 0.1 , $0.1–1.0$, and $\geq 1.0 \times 10^9/l$. Analyses were performed using statistical software SPSS 12.0.2 for Windows (SPSS Inc., 2003) and STATISTICA 9.0.1 for Windows (StatSoft, Inc. 2010).

3. Results

3.1. Characteristics of patients and episodes of IA

During the study period (2005–2009), 176 episodes of IA occurring in 176 patients were identified: 27 (15.3%) proven and 149 (84.7%) probable. Patient characteristics are shown in Table 1. Acute leukemias represented the majority of the underlying hematological diseases (58.5%), and induction or re-induction treatment for acute leukemia (but not allogeneic HSCT) represented the most frequent anticancer treatment (39.8%). Therefore, patients with active acute leukemia during the first induction or salvage therapy represented the typical population of hematological malignancy patients with the highest risk of IA. Based on these data, it is not surprising that the most common classical risk factor identified in 61.4% of IA episodes was profound and

prolonged neutropenia (Table 1). The lung was the most commonly affected site (93.8%), with 21 (12.0%) proven and 144 (81.8%) probable episodes. In addition, disseminated and isolated extrapulmonary infections were rare (4.0% and 2.3%, respectively).

3.2. Signs of infection

Out of the 176 patients with IA, 136 (77.3%) had fever at the time of diagnosis, with a median duration of 6 days before diagnosis (range 0–53 days before diagnosis; interquartile range (IQR) 3–11 days before diagnosis). Moreover, 54.0% of patients with IA fulfilled criteria for persistent fever despite the administration of broad-spectrum antibiotics for 5 days. Out of 165 patients with invasive pulmonary aspergillosis (IPA), 125 (75.8%) exhibited at least one sign that was suggestive of pulmonary disease, which developed within a median of 5 days before diagnosis (range 0–35 days; IQR 2–9 days). The spectrum of these signs is shown in Table 2.

3.3. Diagnostic procedures

3.3.1. Imaging studies

A chest X-ray was performed at the time of diagnosis in 152/165 (92.1%) patients with IPA. However, abnormalities were only identified in 73.0% of those patients. Moreover, the most commonly observed abnormality was a non-specific infiltrate (44.7%) (Table 2). In contrast, chest HRCT, which was performed

Table 2
Clinical manifestations and results of diagnostic tests at the time of diagnosis of invasive aspergillosis

Clinical manifestations at the time of diagnosis, all patients (N=176), n (%)	
Fever >38.0 °C	136 (77.3%)
Fever not responding to 5 days of antibiotics	95 (54.0%)
Presence of organ-specific clinical symptoms	134 (76.1%)
Clinical signs in patients with IPA (n=165), n (%)	
Any symptom	125 (75.8%)
Cough	69 (41.8%)
Dyspnea	37 (22.4%)
Chest pain	11 (6.7%)
Hemoptysis	2 (1.2%)
Other	6 (3.6%)
Chest X-ray abnormality in patients with IPA (n=152), ^a n (%)	
Any abnormality	111 (73.0%)
Non-specific infiltrate(s)	68 (44.7%)
Nodule(s)	36 (23.7%)
Interstitial process	1 (0.7%)
Pleural effusion	1 (0.7%)
Cavitation(s)	1 (0.7%)
Other	4 (2.6%)
Chest high-resolution CT abnormality in patients with IPA (n=149), ^a n (%)	
Any abnormality	149 (100%)
Predominant abnormality	
Non-specific infiltrate(s)	69 (46.3%)
Halo sign	40 (26.8%)
Macronodule(s) >1 cm	17 (11.4%)
Cavitation	9 (6.0%)
Micronodule(s) <1 cm	8 (5.4%)
Pleural effusion	5 (3.4%)
Air crescent sign	1 (0.7%)
Laboratory test results at the time of diagnosis, all patients, n (%)	
Serum galactomannan positive (consecutive index of positivity >0.5) (n=172) ^a	136 (79.1%)
Serum (1–3)- β -D-glucan positive (single value >80 pg/ml) (n=44) ^a	36 (81.8%)
Mycological examination, microscopy positive (all materials) (n=71) ^a	9 (12.7%)
Mycological examination, culture positive (all materials) (n=81) ^a	24 (29.6%)
Histology positive (all materials) (n=12) ^a	8 (66.7%)
BAL fluid examination in patients with IPA, n (%)	
Mycological examination, microscopy positive (n=49) ^a	5 (10.2%)
Mycological examination, culture positive (n=48) ^a	9 (18.8%)
BAL fluid galactomannan positive (index of positivity >0.5) (n=66) ^a	52 (78.8%)

BAL, bronchoalveolar lavage; CT, computed tomography; IPA, invasive pulmonary aspergillosis.

^a Calculated only for patients for whom the test was performed.

in 149/165 (90.3%) patients with IPA at the time of diagnosis (2005–2007, 87.8% vs. 2008–2009, 90.2%, $p = 0.620$), detected an abnormality in all of these patients. Interestingly, the most frequently observed abnormality on these early HRCT scans was a non-specific infiltrate (46.3%). Signs that are more specific for IFD, such as a halo sign, nodules, or cavitations, were seen substantially less frequently (Table 2). There was no statistically significant difference in the frequency of individual abnormalities on HRCT scans between patients with neutropenia (neutrophils $<1.0 \times 10^9/l$) and those without ($p = 0.378$).

3.3.2. Non-culture diagnostic techniques—serum

The GM test was performed at all centers for screening (2–3 times per week) in high-risk patients (e.g., patients receiving induction for acute leukemia or undergoing allogeneic HSCT) and on request in all other patients with abnormalities on imaging studies. GM assessment of at least two serum samples was performed in 172/176 (97.7%) patients with IA (2005–2007, 95.9% vs. 2008–2009, 99.0%, $p = 0.176$). Using the criterion of an index of positivity >0.5 from two consecutive serum samples as a positive test result, we found the test positive in 79.1% of tested episodes (Table 2), and a positive result of the GM assay (consecutive positivity) preceded the final diagnosis of IA by a median of 2 days (range 0–34 days; IQR 1–4 days). The rate of positive test results was not influenced by the neutrophil count at the time of diagnosis ($p = 0.426$) or by the administration of mold-active antifungal prophylaxis ($p = 0.854$). In contrast, empirical antifungal therapy using a mold-active antifungal drug at the time of diagnosis of IA significantly decreased the proportion of positive GM test results in serum compared to patients not receiving the treatment (67% vs. 88%, respectively; $p = 0.001$). The median serum GM index of positivity level at the time of IA diagnosis was 1.28 (range 0.11–11.46). The detection of 1– β -D-glucan (BG) was available at only one center, and therefore the test was performed in only 44/176 (25.0%) patients. A positive test result (BG concentration >80 pg/ml from a single serum sample as the cut-off) was recorded in 81.8% of these patients (Table 2).

3.3.3. Mycological examination

Histological examination, microscopic evaluation, and cultures of any relevant clinical specimens were performed in 12/176 (6.8%), 71/176 (40.3%), and 81/176 (46.0%) patients with IA, respectively. However, with the exception of the histological examination, which was positive in 66.7% of a very limited number of samples obtained by biopsy, the rate of positive results of the other two conventional techniques was very low (12.7% and 29.6%, respectively) (Table 2).

Aspergillus fumigatus represented 19/24 (79.2%) identified isolates, followed by *Aspergillus flavus* 1/24 (4.2%), *Aspergillus niger* 1/24 (4.2%), *Aspergillus terreus* 1/24 (4.2%), and other *Aspergillus* species 2/24 (8.3%).

3.3.4. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid analysis

Since IPA predominated in our patient group, BAL fluid was the most frequent mycologically evaluated material (Table 2). However, conventional mycological techniques with a very low frequency of positive results (10.2% microscopy and 18.8% culture) did not contribute substantially to the diagnosis of IPA in this group of patients. In contrast, the GM assay was positive in 52 out of 66 (78.8%) obtained BAL fluids using a cut-off value of 0.5. The rate of GM assay positivity in BAL fluid was not influenced by neutrophil count ($p = 0.580$) or the administration of mold-active antifungal prophylaxis ($p = 0.147$), and in contrast to serum was not influenced by empirical antifungal therapy (76% vs. 81%; $p = 0.607$).

3.4. Prophylaxis and empirical treatment

Of the 176 patients with IA, 44 (25.0%) had received mold-active antifungal prophylaxis, with a median treatment time of 24 days (range 4–227 days; IQR 16–42 days) (Table 3). More than half of these episodes developed under prophylaxis treatment with itraconazole (25/44, 56.8%); however, itraconazole was also the most frequently used anti-mold prophylaxis at the time our study was performed. Moreover, the azole plasma concentration before breakthrough infection was only available in two patients.

At the time of diagnosis of IA, 76/176 (43.2%) patients had already received mold-active empirical antifungal treatment, and the most frequently used was conventional amphotericin B (30.3% of empirically treated patients) (Table 3). The length of empirical treatment before the definitive diagnosis of IA was short (median 6 days, range 2–44 days, IQR 4–11 days). Therefore, this relatively high number of empirically treated patients reflects the suspicions of the clinician to IFD and early administration of systemic antifungals, rather than a high number of breakthrough IFD cases during prolonged antifungal therapy.

3.5. Antifungal therapy

Targeted antifungal therapy for proven and probable IA was administered in 156/176 (88.6%) patients. In addition, 71 (40.3%) patients received only one line of therapy, 61 (34.7%) patients received treatment with a second-line therapy for toxicity or failure of the previous therapy, and 24 (13.6%) patients received more than two lines of antifungal therapy. Neither the spectrum of antifungal drugs nor their combinations used for the treatment of IA differed between the two observed periods ($p = 0.252$, $p = 0.229$, and $p = 0.622$, for first line, second line, and further lines, respectively).

A complete or partial response to treatment was achieved in 83/156 (53.2%) patients treated with first-line therapy (median length of first-line therapy 15 days, range 5–139 days, IQR 10–25 days). There was no substantial difference in the response rate between the two most frequently used approaches: voriconazole monotherapy and a combination of voriconazole and echinocandin (61.9% vs. 61.0%, respectively; $p = 0.924$) (Table 4). Forty (25.6%) of the 156 patients treated with first-line therapy received salvage therapy for failure of this treatment (median duration 19 days, range 5–159 days, IQR 10–32 days). Although the number of these patients was limited, the combination of voriconazole and echinocandin did not provide a better therapeutic outcome in this setting compared to voriconazole monotherapy ($p = 0.205$) (Table 4).

Table 3
Antifungal prophylaxis and empirical antifungal therapy

Anti-mold prophylaxis at the time of IA diagnosis	
Present	44 (25.0%)
Antifungal drug used ^a	
Itraconazole	25 (56.8%)
Voriconazole	7 (15.9%)
Posaconazole	6 (13.6%)
Conventional amphotericin B	4 (9.1%)
Echinocandin	2 (4.5%)
Anti-mold empirical antifungal therapy at the time of IA diagnosis	
Present	76 (43.2%)
Antifungal drug used ^a	
Conventional amphotericin B	23 (30.3%)
Lipid formulation of amphotericin B	20 (26.3%)
Voriconazole	13 (17.1%)
Echinocandin	12 (15.8%)
Other	9 (11.8%)

IA, invasive aspergillosis.

^a Percentage calculated from patients receiving treatment.

Table 4
Targeted antifungal therapy—efficacy of first-line and salvage therapy

	n	Treatment response			
		Complete or partial response	Stable disease	Progression	Not known
First-line therapy	156	83 (53.2%)	20 (12.8%)	53 (34.0%)	–
Voriconazole	63	39 (61.9%)	8 (12.7%)	16 (25.4%)	–
Combination of echinocandin + voriconazole	41	25 (61.0%)	3 (7.3%)	13 (31.7%)	–
Conventional AMB	13	4 (30.8%)	3 (23.1%)	6 (46.2%)	–
Lipid formulation of AMB	13	7 (53.8%)	1 (7.7%)	5 (38.5%)	–
Echinocandin	9	2 (22.2%)	–	7 (77.8%)	–
Other	17	6 (35.3%)	5 (29.4%)	6 (35.3%)	–
Salvage therapy	40	15 (37.5%)	7 (17.5%)	17 (42.5%)	1 (2.5%)
Voriconazole	9	2 (22.2%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)	1 (11.1%)
Combination of echinocandin + voriconazole	7	4 (57.1%)	2 (28.6%)	1 (14.3%)	–
Lipid formulation of AMB	3	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	–
Other	21	8 (38.1%)	1 (4.8%)	12 (57.1%)	–

AMB, amphotericin B.

To shorten the period of neutropenia, 97/176 (55.1%) patients received granulocyte colony stimulating factors. Granulocyte transfusions were not used. Of the 176 patients, 10 (5.7%) underwent surgery in addition to chemotherapy.

At the end of all targeted treatment approaches efficacy was evaluated. The median length of treatment was 32.5 days (range 5–148 days, IQR 17–66 days), and 105 out of 156 (67.3%) patients responded; however, 50/156 (32.1%) patients failed and one patient was not evaluable. Secondary prophylaxis (mostly with voriconazole) was used in 71/176 (40.3%) patients with a median length of treatment of 48 days (range 10–512 days; IQR 21–78 days).

3.6. The role of neutrophils in the efficacy of antifungal treatment

There was no statistically significant difference in the percentage of patients with a successful treatment outcome (complete and partial response) at the end of all antifungal therapies based on neutrophil count at the start of antifungal treatment ($p = 0.423$). This lack of difference was also found when the role of neutrophils at the start of the first treatment and salvage therapy and the treatment outcome at the end of these therapies was evaluated separately (Table 5).

In contrast, there was a statistically significant increase in the percentage of patients who successfully responded (complete and partial response) at the end of all antifungal therapies with increasing neutrophil counts at the end of antifungal treatment ($p < 0.001$) (Table 5). A substantially higher response rate was identified in patients with neutrophil counts $>1.0 \times 10^9/l$ at the

end of the first-line treatment compared to patients with neutrophil counts of 0.1–1.0 ($p = 0.007$) and <0.1 ($p < 0.001$) $\times 10^9/l$. However, we did not find a role of neutrophil counts at the end of salvage therapy in patients receiving this treatment ($p = 0.432$) (Table 5).

Finally, the change in neutrophil count during IA therapy and treatment outcome was analyzed. During first-line treatment, patients with a successful treatment outcome (complete and partial response of IA) had a significant increase in neutrophil count ($p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively). Moreover, the median neutrophil count in patients with a complete or partial response increased during the treatment from neutropenic range ($<1.0 \times 10^9/l$) to non-neutropenic range (Figure 1A). In contrast, patients with treatment failure were persistently neutropenic (progression of IA) or did not reveal any significant increase in their neutrophil count during therapy (stable IA) (Figure 1A). A similar analysis was performed for patients receiving salvage therapy, and no significant increase in neutrophil count was observed in any treatment outcome group (Figure 1B); however, the number of patients was limited.

3.7. Survival

The median survival in our patient group was 28.1 (95% CI 15.6–40.7) weeks. The 3- and 12-month overall survival (OS) was 57.8% (95% CI 50.5–65.1%) and 43.0% (95% CI 35.4–50.5%), respectively. OS follows survival attributed to IA (OS_{IA}), thus IA was the predominant cause of death during the first 3 months after diagnosis, while other causes (mainly underlying diseases) were

Table 5
The role of neutrophil count at the start and at the end of antifungal therapy in treatment outcome

	Patients with successful treatment outcome (complete or partial response) at the end of therapy (%) ^a			p-Value ^b
	Neutrophils $<0.1 \times 10^9/l$	Neutrophils 0.1–1.0 $\times 10^9/l$	Neutrophils $>1.0 \times 10^9/l$	
Neutrophil count at the start of:				
Any therapy (n = 143)	63.8%	76.7%	70.5%	0.423
First-line therapy (n = 144)	50.7%	53.3%	64.4%	0.341
Salvage therapy ^c (n = 30)	37.5%	66.7%	25.0%	0.195
Neutrophil count at the end of:				
All therapies (n = 128)	21.1%	50.0%	80.9%	<0.001
First-line therapy (n = 129)	16.7%	35.0%	68.2%	<0.001
Salvage therapy ^c (n = 32)	20.0%	57.1%	40.0%	0.432

^a The treatment outcome was evaluated at the end of therapy given in the row (i.e., the end of all received therapies, the end of first-line therapy, or the end of salvage therapy, respectively).

^b Maximum-likelihood Chi-square test, difference between all three groups according to neutrophil count.

^c Salvage was defined as treatment after failure of first-line therapy.

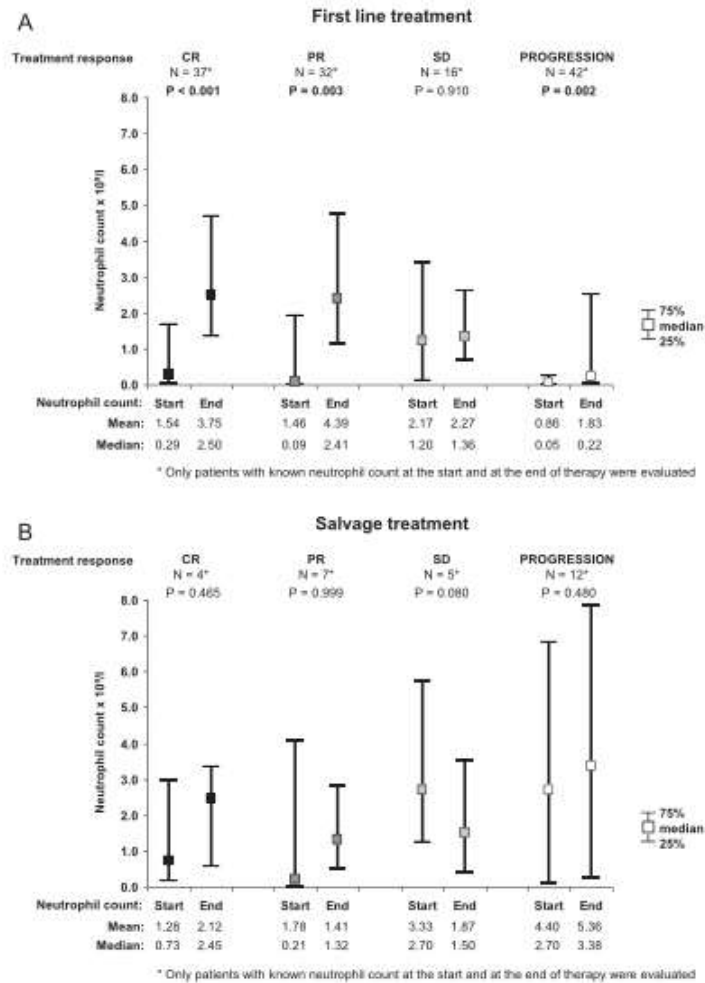


Figure 1. Change in neutrophil count during (A) first-line and (B) salvage therapy of invasive aspergillosis (CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease).

predominantly responsible for death in patients who survived longer than 3 months (Figure 2A). Patients with probable IA had significantly better OS as well as survival attributed to IA (OS_{IA}) (Figure 2B). OS as well as OS_{IA} did not differ between cases diagnosed during 2005–2007 compared to more recent episodes (2008–2009) (OS: $p = 0.173$, 63.4% (95% CI 52.4–74.4%) vs. 52.7% (95% CI 42.9–62.4%) at 3 months, respectively; OS_{IA} : $p = 0.366$, 70.7% (95% CI 60.1–81.3%) vs. 60.8% (95% CI 51.0–70.6%) at 3 months, respectively).

4. Discussion

This is the largest multicenter study published to date that has analyzed episodes of IA in hematological malignancy patients from Central Europe. FIND is a network of hematology centers that gather and share information to improve our understanding of epidemiology, diagnostics, therapy, and the outcome of IFD in

hematological malignancy patients from the Czech and Slovak republics.

Our analysis confirmed several published and generally accepted facts in the view of risk factors, diagnostics, and treatment of this infection among patients with hematological malignancies.^{2,4,6,9–16}

The significance of our study clearly lies in several unique findings, which should be noted. First, although we have shown the importance of using early lung HRCT for the diagnosis of pulmonary abnormalities (all patients with IPA had some detectable abnormality), only 53.7% had findings that were described as 'specific' for invasive mold infection based on EORTC/MSG 2008 criteria.¹⁷ Therefore, half of our IPA patients had non-specific infiltrates on early HRCT scans, of which the performance was generally driven by persistent fever or GM results. Recent studies have shown that the neutrophil count plays a role in the pattern of findings on imaging studies.^{11,18} However,

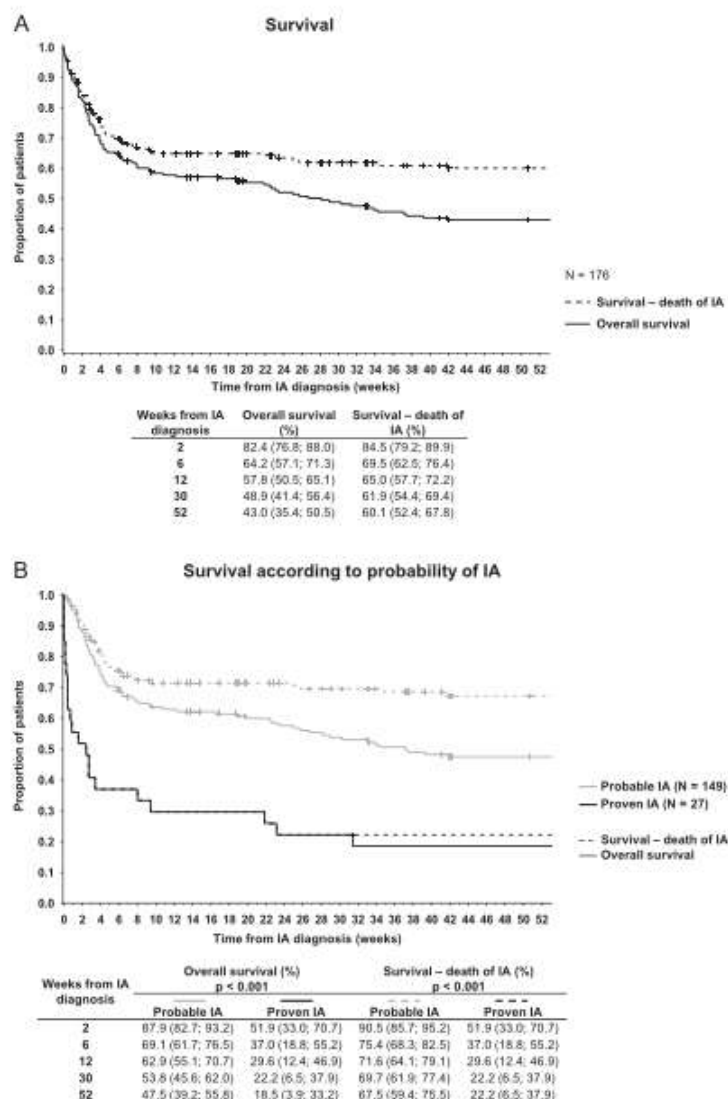


Figure 2. Overall survival and survival attributed to invasive aspergillosis (IA) for (A) all patients and (B) based on the probability of IA diagnosis.

this does not explain our results. In the study by Nicolle et al.,⁴ the patient population and percentage of patients with prolonged neutropenia was similar to our observations in this analysis. However, the authors of that study found a 'halo sign' in 81% of the patients, whereas only 26.8% of patients had the sign in our study. On the other hand, a recent study by Lortholary et al.⁶ examining a mixed patient population with 77.6% of patients suffering from a hematological malignancy found nodules in the majority of patients (81.3%) with IPA. However, nodules were again rarely found in our study (16.8%). Moreover, we did not observe any significant difference in the frequency of individual abnormalities, including the frequency of non-specific infiltrates in patients with

and without neutropenia. Therefore, despite the multicenter approach whereby CT evaluations were performed by local radiologists, one of the explanations for the significant proportion of non-specific findings could be the promptitude of HRCT usage in patients with persistent fever or GM positivity, which has been seen in the last few years due to better availability of this technique. The median time from an HRCT scan to diagnosis of IA in our study was 0 days. Thus, in daily clinical practice where early CT scans are commonly performed and non-specific infiltrates are more frequently seen, mycological examination of these non-specific lesions for a differential diagnosis becomes very important. This finding was very recently supported by others.^{19,20}

Our study also demonstrated the essential role of GM testing for the diagnosis of IA.²¹ Since the vast majority of cases represented probable IA and the sensitivity of culture and/or cytology was very limited, the diagnosis of probable IA was typically made using a combination of pulmonary abnormalities on lung HRCT and positivity of a GM assay with serum and/or BAL fluid. In addition, the high rate of positive results of the GM assay in serum (79.1%) and BAL fluid (78.8%) was similar or higher than in a recently published series of hematological patients.^{4,6,22}

This multicenter study also found that the routine use of regular and frequent (2–3/week) GM screening is widely used at all hematology centers in both countries and seems common in the countries of Europe,^{4,6} but is less frequent or limited in others countries,⁹ including the USA.⁵ Therefore, GM screening was often used in place of invasive procedures for the differential diagnosis of pulmonary infiltrates. In a study by Perkhofer et al.⁹ conducted in Austria, 34% of the patients with invasive mold infections had a biopsy performed, whereas only 9.6% of the patients in our study required a biopsy for final diagnosis. The authors of that study recommend performing biopsies in these patients due to the high frequency of invasive zygomycosis. However, the high rate of positive results of the GM assay (serum and/or BAL) in our study could limit biopsies to only GM-negative infiltrates that are very likely to be of IFD origin. Another reason for performing a biopsy given by Perkhofer et al. is the requirement for culture verification of the infection due to the high frequency of *A. terreus* cases; *A. terreus* is resistant to amphotericin B.^{9,23} However, in our study, *A. fumigatus* was still the predominant species, and non-fumigatus *Aspergillus* species were very rare, with *A. terreus* isolated in only one case from our large multicenter series. Finally, the importance of GM detection for the diagnosis of IA in daily clinical practice was demonstrated based on the investigator's questionnaire, which is part of our database (data not shown). In 60.2% of IA episodes, investigators subjectively marked the GM assay result as the criterion on which the IA diagnosis was mainly based, followed by HRCT in 18.8% of episodes and histology in 10.2% of episodes. However, when discussing GM assay results, the possible limitation of the test (extensively reviewed in the last European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3) recommendations²⁴) given by the risk of lower sensitivity (e.g., caused by administration of mold-active antifungal drugs) or by false-positive results must always be taken into account.

Regardless of recently published and generally accepted guidelines,²⁵ 26.3% of patients with IA in our database received a combination antifungal treatment, which was mainly a combination of voriconazole and echinocandin, as an initial therapy of IA. This finding, which has also been reported in other registries,^{9,26} reflects the real-life situation, where the treating physician intends to maximize the efficacy of antifungal treatment in this group of highly immunocompromised and frequently critically ill patients, not only at the time when the initial treatment fails, but ideally at the start of therapy. However, regardless of promising results from *in vitro*^{27,28} and animal studies,²⁹ there is limited evidence for such an approach in the salvage setting,^{30,31} and more in the initial treatment^{32,33} of IA in the literature. Although our study was retrospective and not randomized, we did not find any difference in the efficacy of voriconazole monotherapy compared to the combination of this azole with echinocandin when used as an initial or salvage therapy. The number of patients with neutropenia ($<1.0 \times 10^9/l$) and the length of therapy were not different between treatment groups. However, we did not collect information about performance status, and therefore we cannot exclude the possibility that patients with a severe clinical condition did not preferentially receive a combination therapy, at least during the initial treatment. Therefore, in order to finally resolve this issue, we should await

the results of randomized studies comparing both of these approaches that are currently being conducted.

Finally, even with the availability of new antifungal therapies, a large number of patients still fail. Therefore, the actual immunodeficiency status of each patient will play a crucial role in the treatment outcome. Although neutropenia was the most frequent risk factor found for the development of IA, the neutrophil level, in addition to the antifungal therapy used for treatment, would have an impact on patient prognosis.³⁴ Cordonnier et al. found no impact of neutropenia on patient prognosis at the time of IA diagnosis.³⁵ Similarly, in our analysis we did not find any significant role of neutrophil count at the start of antifungal therapy on the efficacy of antifungal treatment (primary as well as salvage). However, similar to data presented by Pagano et al.,² which showed that acute myeloid leukemia patients with IA had a higher response rate when they had neutropenic recovery, we found a statistically significant increase in the response rate when the neutrophil count measured at the end of antifungal therapy had increased, regardless of the antifungal drug used for treatment. However, our sub-analysis found this crucial role of neutrophil count at the end of treatment was significant for primary therapy, but was not significant for salvage treatment, which was most likely due to the limited number of patients undergoing salvage therapy. An increase in neutrophil count greater than $1.0 \times 10^9/l$ during initial therapy was related to a complete and partial response, while patients with progression remained neutropenic. However, we found that the outcome of therapy in patients receiving a second-line treatment may be dependent on factors other than the development of neutrophil count during or at the end of therapy, such as the presence of graft-versus-host disease, persistent corticosteroid use, or hepatic insufficiency.³⁴

In conclusion, IA is a life-threatening condition and the most frequent IFD in patients with hematological malignancies that requires rapid and specific diagnostics. Lung HRCT with high sensitivity allows for the detection of pulmonary abnormalities; however, these scans are often very non-specific. Therefore, the combination of HRCT with routine and regular screening of GM in serum and/or BAL fluid provides a better differential and rapid diagnosis of IA in this group of immunocompromised patients. While we do not have data that clearly support the benefit of combination antifungal treatment, we have clearly shown that the development of neutrophil count during IA treatment will be a key factor that will determine the treatment response regardless of the antifungal drug or strategy used.

Acknowledgements

We would like to thank all FIND database participating centers and colleagues: Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic: Zdenek Racil, Barbora Weinbergerova, Jiri Mayer; Department of Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic: Iva Kocmanova; Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic: Michal Kouba, Petr Cetkovsky; Second Department of Oncology, Comenius University and National Oncology Institute, Bratislava, Slovakia: Lubos Drgona, Lucia Masarova; Department of Hematology and Onco-hematology, Louis Pasteur University Hospital, Kosice, Slovakia: Elena Tothova, Tomas Guman; Department of Hemato-oncology, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic: Jan Haber, Kristina Forsterova; Department of Hematology and Transfusiology, St. Cyril and Methodius Hospital – University Hospital Bratislava, Bratislava, Slovakia: Eva Bojarova, Barbora Ziakova; Department of Hematology, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic: Jan Vydra, Tomáš Kozák; Department of Pediatric Oncology, Masaryk University and University

Hospital Brno, Brno, Czech Republic; Peter Mudry, Renata Foralova, Jaroslav Štěrba; Department of Pediatric Hematology and Oncology, Pediatric University Hospital Bratislava, Bratislava, Slovakia; Daniela Sejnova; Laboratory of Parasitology and Mycology, Ceske Budejovice Hospital, Ceske Budejovice, Czech Republic; Nada Mallatova; Department of Pediatrics, Ceske Budejovice Regional Hospital, Ceske Budejovice, Czech Republic; Alena Smrckova.

This work was supported by CELL – The Czech Leukemia Study Group for Life – and by a research grant from the Ministry of Health (IGA NS10442-3/2009 and IGA NS10441-3/2009) of the Czech Republic. CELL received unrestricted grants for the FIND database from Astellas, Teva-Cephalon, Pfizer, and Merck Sharp and Dohme.

Conflict of interest: ZR has served at the speakers' bureau of Pfizer and Astellas Pharma, and has been a consultant to Astellas Pharma. LD has served at the speakers' bureau of Pfizer and Merck Sharp and Dohme, and has been consultant to Pfizer, Astellas Pharma, Teva-Cephalon, and Merck Sharp and Dohme. JH has served at the speakers' bureau of Pfizer, Astellas Pharma, Merck Sharp and Dohme, and has received scientific grants from Pfizer, Astellas Pharma, and Merck Sharp and Dohme. JM has served at the speakers' bureau of Pfizer, Astellas Pharma, and Merck Sharp and Dohme, and has received scientific grants from Pfizer, Astellas Pharma, and Merck Sharp and Dohme. All other authors declare no competing financial interests.

References

- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) database. *Clin Infect Dis* 2010;**50**: 1091–100.
- Pagano L, Cairra M, Candoni A, Offidani M, Martino B, Specchia G, et al. Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. *Haematologica* 2010;**95**:644–50.
- Pagano L, Cairra M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006;**91**:1068–75.
- Nicoll MC, Benet T, Thiebaut A, Bienvenu AL, Voirin N, Duclos A, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica* 2011;**96**:1685–91.
- Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009;**48**:265–73.
- Lortholary O, Gangneux JP, Sibton K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). *Clin Microbiol Infect* 2011;**17**:1882–9.
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Croukaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;**34**:7–14.
- Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, Ostrosky-Zeichner L, Sobel J, Viscoli C, et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 2008;**47**:674–83.
- Perkhofer S, Lass-Flörl C, Hell M, Russ G, Krause R, Honigl M, et al. The Nationwide Austrian Aspergillus Registry: a prospective data collection on epidemiology, therapy and outcome of invasive mould infections in immunocompromised and/or immunosuppressed patients. *Int J Antimicrob Agents* 2011;**36**:531–6.
- Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984;**100**:345–51.
- Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leucocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood* 2012;**119**:1831–7.
- Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 1997;**15**:139–47.
- Nguyen MH, Leather H, Clancy CJ, Cline C, Jantz MA, Kulkarni V, et al. Galactomannan testing in bronchoalveolar lavage fluid facilitates the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies and stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;**17**: 1043–50.
- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;**347**:408–15.
- Jacobs F, Selleslag D, Aoun M, Sonet A, Gadsisseur A. An observational efficacy and safety analysis of the treatment of acute invasive aspergillosis using voriconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;**31**:1173–9.
- O'Brien SN, Blijlevens NM, Mahfouz TH, Anaissie EJ. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology* 2003;**2003**: 438–72.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, 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. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:1813–21.
- Park SY, Lim C, Lee SO, Choi SH, Kim YS, Woo JH, et al. Computed tomography findings in invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic transplant recipients and neutropenic patients, and their prognostic value. *J Infect* 2011;**63**:447–56.
- Nucci M, Nouer SA, Graziutti M, Kumar NS, Barlogie B, Anaissie E. Probable invasive aspergillosis without prespecified radiologic findings: proposal for inclusion of a new category of aspergillosis and implications for studying novel therapies. *Clin Infect Dis* 2010;**51**:1273–80.
- Girmenia C, Guerrisi P, Frustaci AM, Fama A, Finolezzi E, Perrone S, et al. New category of probable invasive pulmonary aspergillosis in hematological patients. *Clin Microbiol Infect* 2012;**18**:990–6.
- Hoenigl M, Salzer HJ, Raggam RB, Valentin T, Rohn A, Wolfner A, et al. Impact of galactomannan testing on the prevalence of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Med Mycol* 2011;**50**:266–9.
- Račič Z, Kocmanova I, Toskova M, Buresova L, Weinbergerova B, Lengerova M, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases—the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis* 2011;**15**: e874–81.
- Lass-Flörl C, Griffl K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, et al. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single center experience. *Br J Haematol* 2005;**131**:201–7.
- Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, et al. Recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2011;**47**:846–54.
- Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Fluckiger U, Frere P, et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 update. *Bone Marrow Transplant* 2011;**46**:709–18.
- Munoz P, Rojas L, Cervera C, Garrido G, Farinas MC, Valerio M, et al. Poor compliance with antifungal drug use guidelines by transplant physicians: a framework for educational guidelines and an international consensus on patient safety. *Clin Transplant* 2012;**26**:87–96.
- Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. In vitro interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**: 3039–41.
- Philip A, Odabasi Z, Rodriguez J, Pateznick VL, Chen E, Rex JH, et al. In vitro synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;**49**:3572–4.
- Kirkpatrick WR, Perea S, Coco BJ, Patterson TF. Efficacy of caspofungin alone and in combination with voriconazole in a guinea pig model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**:2564–8.
- Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2004;**39**:797–802.
- Maertens J, Glasmacher A, Herbrecht R, Thiebaut A, Cordonnier C, Segal BH, et al. Multicenter, noncomparative study of caspofungin in combination with other antifungals as salvage therapy in adults with invasive aspergillosis. *Cancer* 2006;**107**:2888–97.
- Singh N, Limaye AP, Forrest G, Safdar N, Munoz P, Pursell K, et al. Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study. *Transplantation* 2006;**81**:320–6.
- Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007;**44**:531–40.
- Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2010;**50**:1559–67.
- Cordonnier C, Ribaud P, Herbrecht R, Milpied N, Valteau-Couanet D, Morgan C, et al. Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin Infect Dis* 2006;**42**:955–63.

3.1.1.3. Annex 14

Racil Z., Winterova J., Kouba M., Zak P., Malaskova L., Buresova L., Toskova M., Lengerova M., Kocmanova I., Weinbergerova B., Timilsina S., Rolencova M., Cetkovsky P., Mayer J. Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience. *Mycoses*. 2012;55(6):483-492. ISSN 1439-0507.

IF = 1,278 in 2012; MYCOLOGY Q3, DERMATOLOGY Q3; 56 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)



Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience

Zdenek Racil,^{1,7*} Jana Winterova,^{1*} Michal Kouba,² Pavel Zak,³ Ludmila Malaskova,⁴ Lucie Buresova,⁵ Martina Toskova,¹ Martina Lengerova,¹ Iva Kocmanova,⁶ Barbora Weinbergerova,¹ Shira Timilsina,¹ Monika Rolencova,¹ Petr Cetkovsky⁷ and Jiri Mayer^{1,7}

¹Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ²Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic; ³Department of Medicine 2 – Clinical Hematology, Faculty of Medicine, University Hospital and Charles University, Hradec Králové, Czech Republic; ⁴Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ⁵Faculty of Medicine and Science, Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ⁶Department of Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic and ⁷CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Summary

The objective of this retrospective study was to evaluate results from voriconazole therapeutic drug monitoring (TDM) in haematological patients in routine clinical practice. Between 2005 and 2010, 1228 blood samples were obtained from 264 haematological patients (median 3 samples/patient; range 1–27) receiving voriconazole for targeted/preemptive treatment of invasive aspergillosis (IA) (46.3% of samples), empirical therapy (12.9%) or prophylaxis (40.8%). A high-pressure liquid chromatography assay was used to analyse voriconazole concentrations. Clinical and laboratory data were analysed retrospectively. The median of the detected voriconazole plasma concentration was 1.00 µg ml⁻¹ (range <0.20–13.47 µg ml⁻¹). Significant inter- and intra-patients variability of measured concentrations (81.9% and 50.5%) were identified. With the exception of omeprazole administration, there was no relevant relationship between measured voriconazole concentrations and drug dose, route administration, age, gender, CYP2C19*2 genotype, gastrointestinal tract abnormality, administration via nasogastric tube, serum creatinine, and liver enzymes. However, per patient analysis identified significant role of individual voriconazole dose and drug form change on measured plasma concentration. Measured voriconazole concentrations did not correlate with the treatment outcome of patients with IA. We only identified a limited number of adverse events related to voriconazole therapy; however, the median plasma concentration was not different from concentrations measured in samples without reported toxicity. Our retrospective study has suggested that routine monitoring of voriconazole plasma concentrations has probably only a limited role in daily haematological practice.

Key words: Voriconazole, plasma concentration, haematological malignancy.

Correspondence: Z. Racil, MD, PhD, Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic.
Tel.: +420 532233642. Fax: +420 532233603.
E-mail: zracil@fnbrno.cz

*ZR and JW contributed equally.

Submitted for publication 4 December 2011

Revised 5 February 2012

Accepted for publication 8 February 2012

Introduction

Invasive fungal diseases (IFD) are an important cause of morbidity and mortality in patients with haematological diseases.^{1,2} Voriconazole is a broad-spectrum triazole used for the treatment of proven and probable IFD (mainly invasive aspergillosis¹), as well as for prophylaxis of these diseases in high-risk haematological patients.^{4,5}

3.2. Glucan in Invasive Fungal Disease Diagnostics

Panfungal antigen, 1,3-beta-D-glucan (BDG), a cell wall polysaccharide of most fungi, excepting *Cryptococcus* spp. and Mucormycetes, is released into blood and tissues during IFD. The only BDG test approved by the FDA (Food and Drug Administration) is a commercially available assay (Fungitell, Associates of Cape Cod, Inc., Cape Cod, MA, USA) [15]. The high negative predictive value (NPV) predetermines the BDG test as an IFD serum screening method, which we confirmed in our original work as Annex 16 in Chapter 3.2.1.2. The prospective study analyzed BDG from a total of 1143 serum samples obtained from 91 patients and collected regularly twice a week during anticancer treatment. However, while GM detected in serum and BAL fluid is a well-established reliable marker for early IA detection [15, 25], study results and meta-analyses regarding the quality of the BDG test detected in serum for IFD prediction yielded markedly variable results [37-45]. Furthermore, literature data regarding BDG contribution detected in BAL fluid in the differential diagnosis of pulmonary infiltrates among immunocompromised patients do exist, but are quite limited and heterogeneous [26, 46-49]. Heterogeneity is caused by various factors. 1,3-beta-D-glucan is ubiquitous in the environment, and the test is therefore subject to a high rate of false positives owing to, for example, sample handling, cellulose membranes during hemodialysis, albumin, or immunoglobulins infusion [50, 51]. The role of these factors influencing test quality is obvious, however a comprehensive evaluation is lacking. Literature data are similarly insufficient in terms of the parallel serum and BAL fluid samples combination [26, 47-49]. Given the conflicting BDG role in IFD diagnosis, we published an original work presented as Annex 15 in Chapter 3.2.1.1., including prospective "single-center" study results evaluating BDG's function in comparison with GM in an IPA diagnosis during a total of 172 episodes of pulmonary infiltrates on CT among a cohort of immunocompromised hematology patients treated at our institution from 2006-2015. Test quality during early IPA detection was assessed along with a new optimal cut-off BDG test comparing a standard used cut-off of 80 pg/ml, the benefit of parallel detection in serum and BAL fluid samples, and how factors influence test performance. Although we identified an acceptable SEN, SPE, and diagnostic odds ratio (DOR), a low PPV of both the BAL fluid and serum BDG tests was revealed. The combination of both materials and a new optimal BDG cut-off did not generate significant test quality improvement regarding IPA prediction. As with GM, BDG test quality can be affected by a number of factors, including the degree and type of immune system involvement, concomitant bacterial, *Candida* sp. colonization, respiratory tract infection, or antifungal therapy [44, 47-49,

52-54]. With our study, higher absolute neutrophil counts at the time of BAL and higher aspirated BAL fluid volume significantly diminished BDG test performance. Other factors did not have a significant effect, yet the BDG test did not surpass GM test quality in predicting probable and proven IA.

Unlike other IFDs, serum BDG appears to be a very good marker for PCP diagnosis. Extensive meta-analysis has evidence high diagnostic accuracy of BDG determinations for PCP with an associated SEN of 96%, specificity of 84%, and DOR 102 [54, 55]. Attributable to the particularly high SEN, the BDG test can be used as a PCP screening tool.

BDG detection in serum and BAL fluid for IFD diagnosis in patients with hematological malignancies are discussed in further detail within the following journal publications where applicant is an author or co-author (sorted in ascending order). Two selected publications are part of Chapter 3.2.1. Annexes to Chapter 3.2. (Annexes 15 and 16 sorted thematically):

- Racil Z., Kocmanova I., Weinbergerova B., Winterova J., Lengerova M., Hrcirova K., Mayer J. Detekce 1,3- β -D glukanu v diagnostice invazivních mykotických infekcí u nemocných s hematologickou malignitou: přínos metody ve skríningu invazivních mykóz a v konfirmaci galaktomannan pozitivních. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2009;15(2):48-57. ISSN 1211-264X.
- Racil Z., Kocmanova I., Lengerova M., Weinbergerova B., Buresova L., Toskova M., Winterova J., Timilsina S., Rodriguez I., Mayer J. Difficulties in using 1,3- β -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol.* 2010;59:1016–1022. ISSN 0022-2615. (see Annex 16 in Chapter 3.2.1.2.)
- Weinbergerova B., Kabut T., Kocmanova I., Lengerova M., Pospisil Z., Kral Z., Mayer J. Bronchoalveolar lavage fluid and serum 1,3- β -D-glucan testing for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in hematological patients: the role of factors affecting assay performance. *Sci Rep.* 2020;10(1):17963. doi: 10.1038/s41598-020-75132-3. ISSN 2045-2322. (see Annex 15 in Chapter 3.2.1.1.)

3.2.1. Annexes to Chapter 3.2.

3.2.1.1. Annex 15

Weinbergerova B., Kabut T., Kocmanova I., Lengerova M., Pospisil Z., Kral Z., Mayer J. Bronchoalveolar lavage fluid and serum 1,3- β -D-glucan testing for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in hematological patients: the role of factors affecting assay performance. *Sci Rep.* 2020;10(1):17963. doi: 10.1038/s41598-020-75132-3. ISSN 2045-2322.

IF = 4,38 in 2020; MULTIDISCIPLINARY SCIENCES Q1; 1 citation according to WOS or



OPEN

Bronchoalveolar lavage fluid and serum 1,3- β -D-glucan testing for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in hematological patients: the role of factors affecting assay performance

Barbora Weinbergerova^{1✉}, Tomas Kabut¹, Iva Kocmanova², Martina Lengerova^{1,3}, Zdenek Pospisil⁴, Zdenek Kral^{1,3} & Jiri Mayer^{1,3}

Invasive fungal disease (IFD) early diagnosis improves hematological patient survival. Non-culture-based methods may reduce diagnostic time to identify IFD. As complex data on the value of 1,3- β -D-glucan (BDG) from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) compared to serum for the most frequent invasive pulmonary aspergillosis (IPA) diagnosis are scarce, particularly including evaluation of potential factors adversely affecting BDG assay, we provided prospective single-center analysis evaluating 172 episodes of pulmonary infiltrates with BDG detection in BALF and serum samples collected in parallel among hematological patients from 2006 to 2015. Proven and probable IPA were documented in 13.4% of the episodes. Sensitivity (SEN), specificity (SPE), positive and negative predictive value (PPV; NPV), and diagnostic odds ratio (DOR) of the BDG assay using standard (80 pg/ml) cut-off for BALF were: 56.5%; 83.2%; 34.2%; 92.5%, and 6.5, respectively, and for serum were: 56.5%; 82.6%; 33.3%; 92.5%, and 6.2, respectively. The same BDG assay parameters employing a calculated optimal cut-off for BALF (39 pg/ml) were: 78.3%; 72.5%; 30.5%; 95.6%, and 9.5, respectively; and for serum (40 pg/ml) were: 73.9%; 69.1%; 27.0%; 94.5%, and 6.3, respectively. While identifying acceptable SEN, SPE, and DOR, yet low PPV of both BALF and serum BDG assay for IPA diagnosis, neither the combination of both materials nor the new optimal BDG cut-off led to significant test quality improvement. Absolute neutrophil count and aspirated BALF volume with a significant trend affected BDG assay performance. The BDG test did not outperform galactomannan assay.

Invasive fungal diseases (IFD) are life-threatening infections in patients with hematological malignancies^{1–3}. Pulmonary infiltrates could represent an IFD warning sign, and differential diagnosis is crucial for the early start of preemptive antibiotic and antifungal therapy^{4–7}.

Non-culture-based methods with their high sensitivity (SEN) and specificity (SPE) reduce diagnostic time to identify IFD. 1,3- β -D-glucan (BDG), a major cell wall component of most fungal species, is released into blood and tissues during IFD (except mucormycetes and *Cryptococcus* spp.). The Fungitell test is the only BDG antigenemia assay recommended^{4,5,8–10}. Galactomannan (GM) is well established as a reliable BALF and serum marker in early detection of invasive aspergillosis^{4,5,9,11–13}.

Several studies and meta-analyses concerning serum BDG assay performance in IFD diagnosis with variable outcomes have been provided^{8,14–21}. Data regarding BDG from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) for

¹Department of Internal Medicine-Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital, Brno, Czech Republic. ²Department of Clinical Microbiology, University Hospital, Brno, Czech Republic. ³CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ⁴Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ✉email: Weinbergerova.Barbora@fnbrno.cz

differential diagnosis of pulmonary infiltrates exists although limited and heterogeneous^{22–26}. Heterogeneity is caused by various factors and lacks a complex analysis. Data is also insufficient regarding added value of a BDG combination from serum and BALF^{23–26}.

We therefore recognized the need to evaluate and reconsider the role of BDG from serum and BALF in detection of early invasive pulmonary aspergillosis (IPA) the most common IFD. Reassessing BDG detection accuracy regarding a commonly employed 80 pg/ml cut-off, we implemented superior measures to propose a new optimal BDG cut-off value in serum and BALF samples for IPA diagnosis. Our secondary goal was to analyze defined clinical factor impact on test accuracy with a standard of 80 pg/ml cut-off. Furthermore, we sought to identify and qualify increased IPA detection accuracy when serum and BALF samples were obtained in parallel.

Methods

Study population. Our prospective cohort study involved consecutive non-selected hematological patients treated at our department from 2006 to 2015. We reviewed database clinical and laboratory records concerning epidemiology, diagnosis, and therapy of patients who underwent bronchoscopy with BALF and serum testing for both BDG and GM at exactly the same time to evaluate pulmonary infiltrates on chest high resolution computed tomography (HRCT). Patients with repeated sampling were included in the analysis if the BAL was performed on a clearly new presentation of pulmonary infiltrate evaluated by an expert radiologist. Episodes with apparent false-positive results for GM in the serum caused by the administration of GM-positive tested lots of piperacillin-tazobactam or Plasma-Lyte solution (Baxter Healthcare) were excluded from the analysis. The sample collection and research were approved by the Local Ethics Committee of the University Hospital Brno, Czech Republic, Number 01-170920/EK. All research was performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all participants.

Fiberoptic bronchoscopy and sample investigation. The fiberoptic bronchoscopy site was guided by the HRCT pathological finding. Eight to 10 sequential, 20-ml aliquots of sterile saline solution were infused into the lower respiratory tract, and each aliquot was immediately aspirated. The first bronchial sample aliquot's return was processed separately from subsequent aliquot returns, which were pooled together and homogenized (BALF). BALF was subjected to cytology assessment, direct examination, bacterial, fungal, mycobacterial culture; galactomannan and BDG detection; polymerase chain reaction (PCR) testing for *Aspergillus fumigatus*, mucormycetes, *Pneumocystis jirovecii*, and viral pathogens. Serum samples obtained simultaneously with bronchoscopic material were examined for GM and BDG detection, bacterial and fungal culture.

1,3-β-D-glucan detection. For BDG detection, a commercial kit (Fungitell, Associates of Cape Cod, Inc., Cape Cod, MA, USA) was used according to manufacturer's instructions for sera samples and equally for BALF samples. BALF specimens were centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and supernatant was used for BDG detection. Thereafter, the BALF samples were equally treated as sera samples. Samples were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until BDG level determination. A positive test result was defined as a sample with cut-off level $\geq 80\text{ pg/ml}$ for both, serum and BALF. A detailed methodology of BDG assessment in serum and BALF has been previously described²⁷.

Case definition and important clinical parameters. Each case was classified as proven, probable, possible, or no IFD according to EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group) criteria⁴, however Fungitell test results were not included as one of the microbiological criteria. Cases classified as proven and probable IFD were considered true-positives; no IFD as true-negatives. Eighty-three episodes with possible IFD, 8 episodes with invasive mucormycosis, one episode caused by *Alternaria* sp., and 18 *Pneumocystis* pneumonia episodes were not included in our final analysis.

We not only assessed BDG detection accuracy in BALF and serum with 80 pg/ml cut-off, moreover we sought to set up new accurate IFD detection cut-off levels based on sensitivity (SEN) and specificity (SPE) optimal combination. Parameters possibly affecting BDG assay were analyzed from BALF: Antifungals administration and its duration prior to sampling, concomitant *Candida* spp. positive culture from BALF or oral cavity, positive bacterial culture from BALF, absolute neutrophil value, and aspirated BALF volume; and from serum: Antifungals administration and its duration prior to sampling, concomitant bacteremia, and absolute neutrophil value. Furthermore, we compared BDG to GM test accuracy in both, BALF and serum, for IFD diagnosis.

Statistical analysis. Continuous variables were compared using the Mann–Whitney U test and the Spearman correlation coefficient (R_s). Categorical parameters relation was evaluated using Pearson's Chi-squared and Kendall's tau tests. For all analyses, $\alpha = 0.05$ was used as a level of statistical significance. Sensitivity (SEN), specificity (SPE), negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV), diagnostic odds ratio (DOR), accuracy, were calculated for both serum and BALF BDG assay, and combination of both materials. A new BDG-max variable was evaluated based on the higher BDG value of the pair samples, BALF, and serum. A receiver operating characteristic (ROC) curve and area under the curve (AUC) were used to estimate BDG assay discriminatory capability performed in samples of BALF and serum for IFD detection. The influence of all monitored variables on IFD prediction was evaluated using a multidimensional logistic regression model. For statistical analysis, software R version 3.5.2 was used.

Total number of episodes	172
Total number of patients	152
Number of episodes per patient, median (range)	1 (1–3)
Age (years), median (range)	56 (18–78)
Sex, male, <i>n</i> (%)	96 (55.8)
Definitive probability of pulmonary IFD according to EORTC/MSG criteria from 2008, <i>n</i> (%)	
Proven IFD	8 (4.7)
Probable IFD	15 (8.7)
No IFD	149 (86.6)
Underlying disease and anticancer therapy at baseline, <i>n</i> (%)	
AML + MDS	76 (44.2)
Induction/reinduction of AL	47 (27.3)
Allogeneic SCT	34 (19.8)
Antifungals at the time of sampling, <i>n</i> (%)	145 (84.3)
Fluconazole	54 (37.2)
Other (echinocandins, itraconazole, posaconazole, voriconazole, conventional and lipid-based amphotericin, and their combination)	91 (62.8)
Duration of antifungal therapy prior to sampling, median of days (range)	4 (0–540)
<i>Candida</i> spp. isolated from oral cavity, <i>n</i> (%)	55 (32.0)
<i>Candida</i> spp. isolated from BALF, <i>n</i> (%)	11 (6.4)
<i>Candida</i> spp. bloodstream infection, <i>n</i> (%)	0 (0)
Bacteria isolated from BALF, <i>n</i> (%)	25 (14.5)
Bacteremia at the time of sampling, <i>n</i> (%)	6 (3.5)
Aspirated BALF volume, median of ml (range)	80 (32–160)
Absolute neutrophil count $\times 10^9/l$ at baseline, median (range)	0.4 (0.0–12.2)

Table 1. Baseline characteristics of episodes with BDG detected in BALF and serum. BDG, 1,3- β -D-glucan; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; IFD, invasive fungal disease; EORTC/MSG, European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; AL, acute leukemia; SCT, stem cell transplantation; BALF, bronchoalveolar lavage fluid.

Results

In total, 172 unique episodes (from 152 adult patients) were analyzed with characteristics described in Table 1. Proven, probable, and no IFDs were documented in 8 (5%), 15 (9%), and 149 (86%) episodes, respectively. Invasive aspergillosis was present in all eight proven and fifteen probable cases.

BDG assay evaluated by a standard cut-off of 80 pg/ml. BDG values median in BALF and serum was 16.0 pg/ml (min-0; max-1594) and 22.0 pg/ml (min-0; max-1138), respectively. GM values median in BALF and serum was 0.13 IP (index of positivity) (min-0.04; max-1.98) and 0.13 IP (min-0.03; max-0.52), respectively. The correlation between BDG and GM levels in BALF and serum is indicated in Fig. 1.

Median BDG levels in proven and probable episodes versus no IFD were in BALF 111 versus 13 pg/ml and in serum 113 versus 20 pg/ml. The correlation between BALF or serum BDG levels and IFD probabilities ($R_s = 0.255$; and $R_s = 0.255$, respectively) appears in Fig. 1.

Based on ROC analysis, BDG assay performance for BALF and serum indicated SEN (56.5%; and 56.5%), PPV (34.2%; and 33.3%), AUC (0.671; and 0.677), SPE (83.2%; and 82.6%), NPV (92.5%; and 92.5%), and IFD prediction accuracy 0.8 with a standard cut-off of 80 pg/ml (Table 2). BDG-max assay affirmed SEN (65.2%), SPE (73.2%), and 0.6 diagnostic accuracy (Table 2).

BDG assay evaluated by a new suggested optimal cut-off. Based on ROC analysis, our challenging task was to determine optimal BDG cut-off value in both serum and BALF. We identified new BDG cut-offs for both BALF (39 pg/ml) and serum (40 pg/ml). The new suggested BALF and serum value reached SEN (78.3% and 73.9%), SPE (72.5% and 69.1%), and DOR (9.5 and 6.3) (Table 2).

Clinical factors possibly influencing BDG performance accuracy. We did not verify any significant relationship between probability of final IFD diagnosis and concomitant *Candida* spp. positive culture of oral cavity or BALF at time of sampling ($p = 5.7$, and 2.0 ; $p > 0.05$; respectively) (Fig. 2).

Similarly, the positivity of BALF bacterial culture and bacteremia did not suggest any significant correlation with IFD probability ($p = 2.8$, and 1.5 , respectively; $p > 0.05$). (Fig. 2).

Significant correlation between lower absolute neutrophil value at the time of sampling and the higher degree of IFD probability was substantiated in our analysis ($R_s = -0.223$; $p < 0.01$) (Fig. 1).

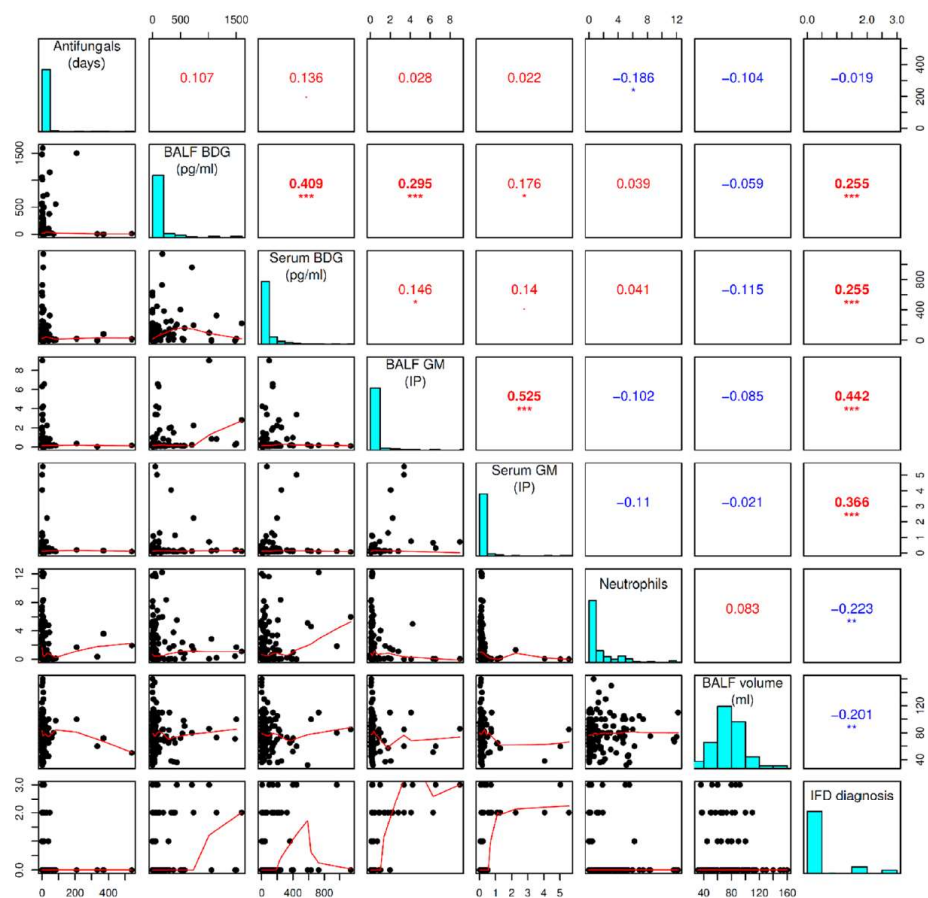


Figure 1. Correlation between continuous parameters possibly influencing the BDG assay quality in IFD diagnosing. In this figure shows Spearman correlation matrix representing the relation of continuous parameters evaluated by the Spearman coefficient. The diagonal from the upper left corner to the lower right corner contains frequency histograms of each variable. In the histogram “IFD diagnosis”, the episode numbers are divided according to the probability of IFD: 0—no IFD; 2—probable IFD; 3—proven IFD. On the bottom of the diagonal, there are the bivariate scatter dot plots with fitted lines displayed of the variable pairs. On the top of the diagonal, the pairwise correlations of variables (Spearman rank correlation coefficients; S) are with the significance level represented by stars: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. BDG, 1,3- β -D-glucan; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; IFD, invasive fungal disease; GM, galactomannan; BAL, bronchoalveolar lavage.

More effective agents with a broader antifungal spectrum were more frequently administered at the time of BALF among episodes finally defined as proven or probable IFD with statistical significance ($p < 0.01$) (Fig. 2). Prolonged antifungals administration prior to sampling correlated with higher serum BDG levels ($R_s = 0.136$) (Fig. 1).

Eventually, episodes with higher aspirated BALF volume > 80 ml had a lower median of BALF-BDG value compared to episodes with lower aspirated BALF volume ≤ 80 ml (10 pg/ml vs. 21 pg/ml). Moreover, lower BALF BDG levels corresponded to higher aspirated BALF volume in the Spearman correlation test, yet results were not statistically significant ($R_s = -0.059$; $p > 0.05$) (Fig. 1).

Logistic regression model evaluating clinical factors potentially influencing BDG and GM test accuracy. The model evaluating only BDG revealed an absolute number of neutrophils as a factor influencing BDG predictive value for IPA (Table 3). Higher absolute neutrophil count decreased BDG assay performance predictive value with statistical trend ($p = 0.099$). Additionally, we affirmed a trend in correlation between higher aspirated BALF volume and reduced opportunity to correctly predict IPA using BALF BDG ($p = 0.085$). No other factors significantly affected BDG assay prediction for IPA.

Finally, our multivariate analysis, most consistent with real clinical practice, evaluated the quality of both BDG and GM diagnostic tests together during IPA diagnosis. Despite both tests being statistically significant, the

Cut-off (pg/ml)	SEN	SPE	PPV	NPV	DOR	Accuracy
BALF BDG						
80	0.565	0.832	0.342	0.925	6.5	0.797
39	0.783	0.725	0.305	0.956	9.5	0.733
Serum BDG						
80	0.565	0.826	0.333	0.925	6.2	0.791
40	0.739	0.691	0.270	0.945	6.3	0.698
BDG-max						
80	0.652	0.732	0.273	0.932	5.1	0.721
39/40 ^a	0.870	0.567	0.235	0.966	7.9	0.607

Table 2. BDG performance assay for prediction of proven and probable IFD diagnosed according to EORTC/MSG criteria. BDG, 1,3- β -D-glucan; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; IFD, invasive fungal disease; EORTC/MSG, European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group; SEN, sensitivity; SPE, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; DOR, diagnostic odds ratio. ^a39 pg/ml cut-off for BALF and 40 pg/ml cut-off for serum.

GM test confirmed a 203-fold higher predictive value for serum and a 19-fold higher value for BALF compared to the BDG test (Table 4). Furthermore, there was correlation between higher BALF volume and reduced IPA predictive probability using the BDG test ($p = 0.069$) (Table 4).

Discussion

Our study substantiates efficacy of concomitantly obtained BALF and serum BDG samples from a large set of unselected consecutive hematological patients with pulmonary infiltrates for IFD diagnosis. BDG and GM values significantly correlated with each other in both serum and BALF (Fig. 1). We documented a substantially higher median of both BALF and serum BDG levels in episodes of proven and probable IFDs compared to no IFDs ($p < 0.001$). Moreover, the correlation between BALF or serum BDG levels and IFD probability was evidenced with statistical significance ($p < 0.001$; and $p < 0.05$; respectively) (Fig. 1). BDG displayed similar DOR in BALF compared to serum (6.5 vs. 6.2) at the same levels of SEN and SPE (57% and 83%). The BDG-max assay affirmed higher SEN (65%) but lower SPE (73%) and DOR (5.1).

BDG test quality is affected by a number of different factors. First, **IFD definition** may vary among studies. A vast majority of studies (including our investigation) did not include possible IFD in their analysis^{23–25}. The quality of the BALF and serum BDG test did not significantly differ in the cohort with versus without 83 possible IFD in our analysis (DOR—6.9 vs. 6.5; and 4.2 vs. 6.2).

Additionally, **degree and type of immunosuppression** may facilitate BDG test accuracy discrepancies among studies. Our results are consistent with published data of Rose et al. and Theel et al., who reported BALF and serum BDG sensitivity in the range of 50–53%, and 40–55%, with a similar spectrum of hematological patients, respectively^{23,25}. Most published studies used the same **Fungitell cut-off level** (≥ 80 pg/ml) for both serum and BALF as our study. He et al. in a large meta-analysis, reported serum BDG diagnostic accuracy and set the optimal cut-off level of 60 pg/ml as optimum for distinguishing patients with and without IFD¹⁶. Similar to He's study, we confirmed a lower optimal cut-off compared to the standard cut-off in both serum and BALF with better SEN and DOR, yet slightly lower SPE (Table 2).

Candida spp. colonization or infection. Concomitant *Candida* spp. colonization or non-invasive respiratory infections may influence BALF BDG specimen false positivity and assay accuracy. Therefore, BALF BDG test SPE differences between published studies (39–68%) and our data (83%) could be caused by the variable frequency of *Candida* spp. positive cultures from BALF in episodes with no IFD compared to our study (32–43% vs. 6%)^{23–25}. Furthermore, our study recognized a lower proportion of *Candida* spp. positive cultures from BALF in Fungitell positive episodes with no IFD compared to Theel's study (16–38%)²⁵. Nonetheless, based on a multivariate analysis and in accordance with Rose's study²³, we did not substantiate concomitant positive *Candida* spp. culture from BALF or oral cavity as a factor significantly affecting BALF BDG assay performance (Table 3).

Bacterial infection. In concordance with published data, we confirmed BDG test lower predictive value in episodes with positive bacterial culture from BALF (*Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Streptococcus* sp.) or concomitant bacteremia (*Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp.), although without statistical significance using the multivariate analysis (Table 3)^{28–30}. As with our data, Rose's BALF BDG assay performance was not significantly affected by concurrent pulmonary bacterial infection²³.

Neutropenia. Published studies analyzing a BALF or serum BDG test in non-neutropenic patients or in cohorts with a lower proportion of neutropenic patients determined a lower SPE (26–65%) compared to our study^{17–19,23–26}. Our analysis affirmed a higher neutrophil count during sampling as a factor adversely affecting BDG test performance within an IFD prediction with a statistical trend in significance (Table 3). To our knowl-

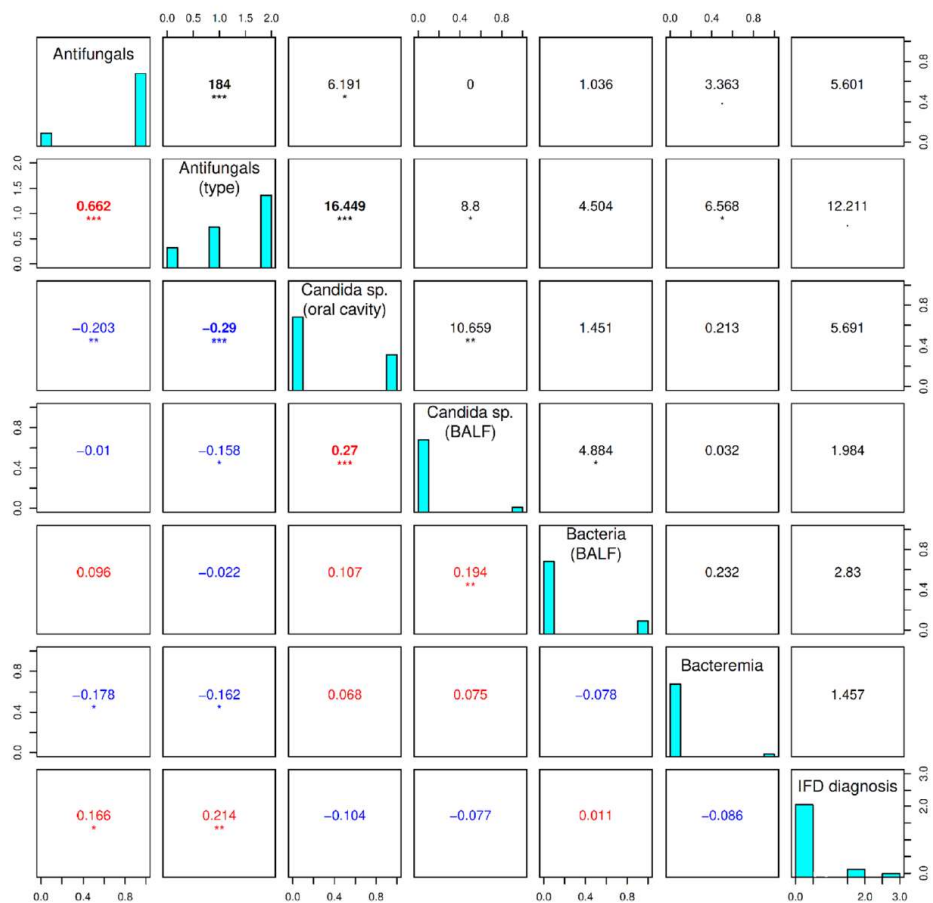


Figure 2. Correlation between categorical parameters evaluated by using the Pearson’s Chi-squared tests (upper right) and Kendall’s tau tests (lower left). In this figure represents the relation between categorical parameters. The diagonal from the upper left corner to the lower right corner contains frequency histograms of each variable. In the histogram “IFD diagnosis”, episode numbers are divided according to the probability of IFD: 0—no IFD; 2—probable IFD; 3—proven IFD. Concerning “Antifungals”: 0—no antifungals prior to sampling; 1—any antifungals prior to sampling; “Antifungals (type)”: 0—no antifungals; 1—fluconazole; 2—antifungals with broader spectrum; other histograms: 0—absent; 1—present. The Pearson’s Chi-squared tests (on the right top of the diagonal) measure the strength of a linear association between categorical variables presented by Pearson correlation coefficient (ρ) valued between +1 and -1, where 1 is a total positive linear correlation, 0 is no linear correlation, and -1 is total negative linear correlation. The Kendall’s tau tests (on the bottom left of the diagonal) represent the ordinal dependence between two measured quantities based on the τ coefficient. Each significance level is represented by stars: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. BDG, 1,3- β -D-glucan; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; IFD, invasive fungal disease; GM, galactomannan; BAL, bronchoalveolar lavage.

edge, such a comprehensive analysis evaluating BDG test accuracy within an IFD diagnosis according to degree of neutropenia has not yet been conducted.

Antifungal therapy. Antifungal therapy was significantly associated with false-negative BDG results in both BALF and serum in Rose’s analysis and with serum in Ostrosky-Zeichner’s study^{20,23}. In contrast to published studies, we did not determine any significant relationship between antifungal administration or antifungal treatment duration and BALF or serum BDG assay performance in the multivariate analysis (Table 3). However, we are aware of our high proportion of episodes treated with antifungals at the time of cohort sampling reflecting clinical practice. For this reason, stricter criteria are set for BDG diagnostic test performance with IFD diagnosis.

Sampling method and BAL standardization. Sampling method and timing could be another source of heterogeneity and affect fungal antigens detection accuracy in both BALF and serum. Theel et al. analyzed serum samples collected within 72 h of the BAL, which was at variance with our study sampling BALF and

	Estimate β_i	Std. error	p	e^{β_i}
Antifungals administration	-2.300	1.845	0.2125	0.10026
BALF BDG	0.0179	0.005820	0.0428	1.0181
Serum BDG	0.002836	0.001454	0.0511	1.0028
Bacteria in BALF	-0.4843	0.7061	0.4928	0.61613
Bacteremia	-15.67	1125	0.9889	1.57×10^{-7}
Absolute neutrophil count	-0.2840	0.1721	0.0990	0.75277
Aspirated BALF volume	-0.01266	0.01222	0.3002	0.98742
Interaction BALF BDG and BALF volume	-0.0001286	0.00007475	0.0854	0.99987

Table 3. Multidimensional logistic regression model evaluating BDG test quality and other possible influencing parameters in prediction of proven and probable IFD—galactomannan test excluded. BDG, 1,3- β -D-glucan; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; IFD, invasive fungal disease; β_i , regression coefficient; std. error, standard error; e^{β_i} , the chance that the episode will be closed as proven or probable IFD. AIC = 150.66; $\chi^2 = 31.38$; $R^2 = 0.19$. Bold value indicates statistical significance ($p < 0.05$).

	Estimate β_i	Std. error	p	e^{β_i}
BALF BDG	0.02207	0.01210	0.068	1.02232
Serum BDG	0.003608	0.001535	0.019	1.00361
BALF GM	2.965	1.056	0.005	19.39470
Serum GM	5.315	2.464	0.031	203.36451
Absolute neutrophil count	-0.2269	0.1725	0.188	0.797
Aspirated BALF volume	-0.009625	0.01526	0.528	0.99042
Interaction BALF BDG and BALF volume	-0.0003074	0.0001689	0.069	0.99969

Table 4. Multidimensional logistic regression model evaluating BDG test quality and other possible influencing parameters in prediction of proven and probable IFD—galactomannan test included. BDG, 1,3- β -D-glucan; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; GM, galactomannan; IFD, invasive fungal disease; β_i , regression coefficient; std. error, standard error; e^{β_i} , the chance that the episode will be closed as proven or probable IFD. AIC = 113.84; $\chi^2 = 63.533$; $R^2 = 0.40$. Bold values indicate statistical significance ($p < 0.05$).

serum at precisely the same time²⁵. Other investigations failed to note sampling time^{23,24}. As predicted, specificity increased up to 100% by using two serum BDG test sequential positivities^{31,32}.

BAL procedure standardization is a significant factor. Instilled solution during bronchoscopy ranging from 100 to 200 ml represents one of the crucial factors contributing to the final amount of aspirated BALF volume and consequently to BDG concentration and assay reactivity^{21,25}. Notably, specific published data concerning BDG assay is lacking. Comparable to Racil's study evaluating the BALF GM test, our analysis affirmed better BALF BDG performance in patients with lower aspirated BALF volume (Tables 3, 4)³³.

In our cohort, both BDG and GM antigens were simultaneously investigated from serum and BALF. In concordance with our results, a galactomannan test substantiated superiority to the BDG tested in both BALF and serum when diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in literature^{26,34}.

Our study highlights the advantage of BALF and serum BDG concomitant obtained samples including one of the largest published sets of non-selected consecutive hematological patients with pulmonary infiltrates relating to IFD diagnosis. Furthermore, our analysis precisely assesses predictable factors affecting BDG test accuracy.

Nonetheless, potential study limitations reflecting real clinical practice depict a low number of proven/probable IFDs, a high proportion of antifungal therapy at the time of sampling, and BALF specimen serum cut-off implementation without updated established criteria. Moreover, patients were only tested once with serum Fungitell assay. Although our study is a single-center analysis, it is a homogeneous, reproducible, and verifiable cohort.

Conclusions

In conclusion, we confirmed acceptable SEN, SPE, DOR, and a low PPV of both BALF and serum BDG assay for pulmonary IPA diagnosis. Furthermore, we recorded high NPV for both BALFs and sera, predisposing a basic BDG assay utility to exclude IFDs indicating serum value with patient IFD screenings. BDG test sensitivity and DOR were not substantially increased by BALF compared to sole serum testing, and their combination did not improve test quality. Dedicated efforts to determine optimal BDG limit value did not facilitate significant test quality improvement.

We confirmed that: (1) absolute neutrophil count at the time of sampling and (2) aspirated BALF volume both considerably affect assay performance.

Consequently, although BALF and serum GM and BDG values correlated with each other, BDG continued to reveal reduced test quality compared to GM in IPA diagnosis. Our study fully supports the recent Infectious

Diseases Society of America (IDSA) and EORTC/MSG recommendations to avoid using BDG for defining IFD and to restrict use to specific clinical settings in conjunction with other clinical findings.

Received: 19 July 2020; Accepted: 8 October 2020

Published online: 21 October 2020

References

- Herbrecht, R., Bories, P., Moulin, J.-C., Ledoux, M.-P. & Letscher-Bru, V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1272**, 23–30 (2012).
- Pagano, L. *et al.* Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**(Suppl 1), i5–14 (2011).
- Racil, Z. *et al.* Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics: fungal infection database (FIND) analysis, 2005–2009. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e101–109 (2013).
- De Pauw, B. *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. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1813–1821 (2008).
- Donnelly, J. P. *et al.* Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1008> (2019).
- Neofytos, D. *et al.* Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 265–273 (2009).
- Freifeld, A. G. *et al.* Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 427–431 (2011).
- White, S. K., Walker, B. S., Hanson, K. E. & Schmidt, R. L. Diagnostic accuracy of β -d-glucan (fungitell) testing among patients with hematologic malignancies or solid organ tumors: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* **151**, 275–285 (2019).
- Patterson, T. F. *et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **63**, e1–e60 (2016).
- Pappas, P. G. *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **62**, e1–50 (2016).
- D'Haese, J. *et al.* Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1258–1263 (2012).
- Leefflang, M. M. G. *et al.* Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007394.pub2> (2015).
- Mennink-Kersten, M. A. S. H., Donnelly, J. P. & Verweij, P. E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 349–357 (2004).
- Hou, T.-Y. *et al.* The screening performance of serum 1,3- β -D-glucan in patients with invasive fungal diseases: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS ONE* **10**, e0131602 (2015).
- Lamoth, F. *et al.* β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the third European conference on infections in leukemia (ECIL-3). *Clin. Infect. Dis.* **54**, 633–643 (2012).
- He, S. *et al.* A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for invasive fungal infection: focus on cutoff levels. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **48**, 351–361 (2015).
- Azoulay, E. *et al.* (1, 3)- β -D-glucan assay for diagnosing invasive fungal infections in critically ill patients with hematological malignancies. *Oncotarget* **7**, 21484–21495 (2016).
- Levesque, E. *et al.* Detection of (1,3)- β -D-glucan for the diagnosis of invasive fungal infection in liver transplant recipients. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 862 (2017).
- Prattes, J. *et al.* Novel tests for diagnosis of invasive aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 922–929 (2014).
- Ostrosky-Zeichner, L. *et al.* Multicenter clinical evaluation of the (1 \rightarrow 3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 654–659 (2005).
- Acosta, J. *et al.* A prospective comparison of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary invasive aspergillosis in medical patients under intensive care: comparison with the diagnostic performance of galactomannan and of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan chromogenic assay in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1053–1060 (2011).
- Shi, X.-Y. *et al.* Diagnostic value of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in bronchoalveolar lavage fluid for invasive fungal disease: a meta-analysis. *Respir. Med.* **117**, 48–53 (2016).
- Rose, S. R. *et al.* The utility of bronchoalveolar lavage beta-D-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections. *J. Infect.* **69**, 278–283 (2014).
- Mutschlechner, W. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid (1,3) β -D-glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in solid organ transplantation: a prospective multicenter study. *Transplantation* **99**, e140–144 (2015).
- Theel, E. S. *et al.* Detection of (1, 3)- β -D-glucan in bronchoalveolar lavage and serum samples collected from immunocompromised hosts. *Mycopathologia* **175**, 33–41 (2013).
- Boch, T. *et al.* Detection of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients by combined use of conventional culture, galactomannan, 1-3-beta-D-glucan and *Aspergillus* specific nested polymerase chain reaction in a prospective pilot study. *J. Crit. Care* **47**, 198–203 (2018).
- Weinbergerova, B., Kocmanova, I., Racil, Z. & Mayer, J. Serological approaches. *Methods Mol. Biol.* **1508**, 209–221 (2017).
- Pickering, J. W., Sant, H. W., Bowles, C. A. P., Roberts, W. L. & Woods, G. L. Evaluation of a (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5957–5962 (2005).
- Mennink-Kersten, M. A. S. H., Ruegebrink, D. & Verweij, P. E. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1930–1931 (2008).
- Albert, O. *et al.* Reactivity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 1453–1460 (2011).
- Ellis, M. *et al.* Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J. Med. Microbiol.* **57**, 287–295 (2008).
- Racil, Z. *et al.* Difficulties in using 1,3-(beta)-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies-high frequency of false-positive results and their analysis. *J. Med. Microbiol.* **59**, 1016–1022 (2010).
- Racil, Z. *et al.* Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int. J. Infect. Dis.* **15**, e874–881 (2011).

34. Hoenigl, M. *et al.* Performance of galactomannan, beta-D-glucan, *Aspergillus* lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2039–2045 (2014).

Acknowledgements

This work was supported by The Czech Leukemia Study Group—for Life (CELL), the Health Ministry [FNBr, 65269705], and the 2020 Czech Ministry of Education, Youth, and Sports [MUNI/A/1395/2019].

Author contributions

B.W.: contributed to the study conception and design; performed material preparation, data collection and analysis; wrote the manuscript. T.K., I.K., M.L., Z.P., Z.K., J.M.: contributed to the study conception and design; performed material preparation, data collection and analysis; commented on previous versions of the manuscript; read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.W.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

3.2.1.2. Annex 16

Racil Z., Kocmanova I., Lengerova M., Weinbergerova B., Buresova L., Toskova M., Winterova J., Timilsina S., Rodriguez I., Mayer J. Difficulties in using 1,3- β -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol.* 2010;59:1016–1022. ISSN 0022-2615.

IF = 2,830 in 2010; MICROBIOLOGY Q3; 93 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

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

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

Correspondence
Zdenek Racil
zracil@fnbrno.cz

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

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

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

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

Received 31 January 2010
Accepted 18 May 2010

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTS AND DISCUSSION

BG in the screening of IFI

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

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

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

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

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

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

sample with BG value >80 pg ml⁻¹ these frequencies were 35 and 26 %, respectively ($P=0.53$).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

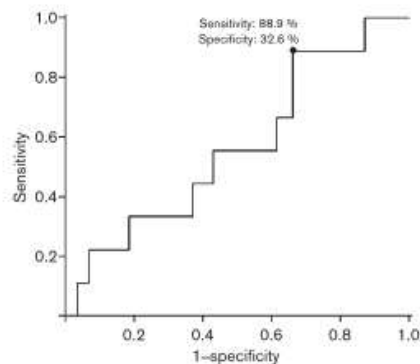


Fig. 1. ROC curve of sensitivity (true-positive results) versus 1-specificity (false-positive results) using different peak values of BG during the treatment cycle as cut-off values to define positivity. For a ROC curve with good discriminatory ability the value of the AUC should be ≥ 0.75 ; however,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

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

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

GvHD, Graft versus host disease.

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

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

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

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

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

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

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

Conclusions

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

The Ministry of Health (NS10442-3/2009 and NS10441-3/2009) and the Ministry of Education, Youth and Sports (MSM0021622430 and MSMT6198959223) of the Czech Republic supported this work.

REFERENCES

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

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

3.3. Galactomannan in Invasive Fungal Disease Diagnostics

Galactomannan is an *Aspergillus* cell wall polysaccharide detectable in serum and other body fluids during IA and represents the gold standard for IA diagnosis [15, 25, 27]. Our work analyzing cases diagnosed at Czech and Slovak hematology centers and published in the form of domestic and foreign abstracts definitively verifies GM's indispensable role of GM in probable IA diagnosis. An IA diagnosis became conclusive on the basis of GM combined with imaging findings in the vast majority of cases. A commercially available ELISA assay (Platelia *Aspergillus*, Bio-Rad) detects GM using a rat monoclonal antibody. This test affirms serum and BAL fluid, whereas BAL fluid detection more accurately predicts IPA than serum presence [26]. Circulating GM can be identified several days before the clinical manifestation of infection and its level corresponds to fungal load. Several published studies evaluating GM role concerning IPA diagnosis among hematological patients have confirmed high SEN and SPE [57]. However, in determining IPA probability degree based on the GM consequence, many factors potentially affecting test performance must be considered. False positivity, for example, has been substantiated in patients treated with particular penicillin antibiotics (eg piperacillin-tazobactam), Plazmalyte infusion solution [58, 59]. Ongoing antifungal therapy and neutropenia depth at the time of sampling may also affect test accuracy [56, 60-62]. Similarly, our team with the candidate co-authoring contributions published a manuscript evaluating the GM role, detected in BAL fluid regarding IPA diagnosis and identifying neutropenia, antifungal therapy, and aspirated BAL fluid volume as significant factors affecting GM test quality in IPA prediction. This work is listed as Annex 17 in Chapter 3.3.1.1. Conversely, prevailing mucositis as a possible cause of false positivity with a Platelia *Aspergillus* test where antigen passage through damaged mucosa of the gastrointestinal tract was not demonstrated and, hence, published as a manuscript listed in Annex 18 in Chapter 3.3.1.2.

The detection and predictive value of serum and BAL fluid GM within IFD diagnosis among patients with hematological malignancies are further detailed in journal publications co-authored by the candidate (in chronological order of ascending order). Two prime publications are part of Chapter 3.3.1. Annexes to Chapter 3.3. (Annexes 17 and 18 sorted thematically):

- Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Lengerová M., Moulis M., Mayer J. Využití detekce galaktomannanu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematologických nemocných. *Vnitř Léč.* 2008;54(1):45-52. ISSN 1801-7592.

- Racil Z., Kocmanova I., Weinbergerova B., Toskova M., Winterova J., Lengerova M., Buresova L., Timilsina S., Mayer J. Mucositis does not lead to false-positivity of the Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;7:851-855. ISSN 0934-9723. (see Annex 18 in Chapter 3.3.1.2.)
- Racil Z., Kocmanova I., Toskova M., Buresova L., Weinbergerova B., Lengerova M., Rolencova M., Winterova J., Hrnčirova K., Volfova P., Skrickova J., Mayer J. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis.* 2011;15:e874-e881. ISSN 1201-9712. (see Annex 17 in Chapter 3.3.1.1.)

3.3.1. Annexes to Chapter 3.3.

3.3.1.1. Annex 17

Racil Z., Kocmanova I., Toskova M., Buresova L., Weinbergerova B., Lengerova M., Rolencova M., Winterova J., Hrnckirova K., Volfova P., Skrickova J., Mayer J. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis.* 2011;15:e874-e881. ISSN 1201-9712.

IF = 1,938 in 2011; INFECTIOUS DISEASES Q3; 35 citations according to WOS or Scopus, without self-citations



Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases—the role of factors affecting assay performance

Zdenek Racil^{a,*}, Iva Kocmanova^b, Martina Toskova^a, Lucie Buresova^c, Barbora Weinbergerova^a, Martina Lengerova^d, Monika Rolencova^a, Jana Winterova^d, Kristyna Hrcirova^a, Pavlina Volfova^d, Jana Skrickova^d, Jiri Mayer^{a,e}

^a Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Jihlavská 20, 602 00 Brno, Czech Republic

^b Department of Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

^c Institute of Biostatistics and Analyses at the Faculty of Medicine and the Faculty of Science of the Masaryk University, Brno, Czech Republic

^d Department of Respiratory Disease and Tuberculosis, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

^e CETEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2011

Received in revised form 2 September 2011

Accepted 17 September 2011

Corresponding Editor: Meinolf Karthaus, Munich, Germany

Keywords:

Galactomannan

BAL

Invasive pulmonary aspergillosis

Hematological malignancy

SUMMARY

Background: We evaluated the performance of a galactomannan (GM) assay in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid compared to serum samples for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in patients with hematological diseases.

Methods: Two hundred and fifty-five bronchoscopies were performed on 230 patients. Bronchial and alveolar samples from BAL fluid as well as serum samples were analyzed in the GM assay.

Results: Twenty-eight cases of IPA (11%) were diagnosed. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the GM assay using a cut-off of 0.5 were 57.1%, 99.3%, 94.1%, and 92.5%, respectively, for the alveolar sample; 44.0%, 99.3%, 91.7%, and 91.4%, respectively, for the bronchial sample; and 60.7%, 100%, 100%, and 92.9%, respectively, for serum. The highest sensitivity (78.6%) with good specificity (98.6%) was obtained with a 'triple detection' of GM in bronchial, alveolar, and serum samples. Neutropenia and antifungal therapy for only 24 h increased the sensitivity, while antifungal treatment for ≥ 2 days decreased assay performance. Moreover, a trend towards a higher volume of aspirated fluid in GM-negative BAL ($p = 0.092$) was observed.

Conclusions: In contrast to recently published data, we found only moderate sensitivity, but high specificity and high positive predictive value of the detection of GM in BAL fluid. In addition, neutropenia, antifungal therapy, and BAL standardization affected GM assay performance.

© 2011 International Society for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Invasive aspergillosis (IA) represents the most frequent invasive fungal disease occurring in patients with hematological malignancies, especially those with acute leukemia and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).^{1,2} The lungs comprise the primary site of IA in the vast majority of cases, and therefore invasive pulmonary aspergillosis (IPA) represents the most frequently occurring form of this disease.³ The high morbidity and mortality rates of this infection, as well as difficulty in obtaining an early diagnosis by conventional diagnostic procedures, has led to the development of new non-culture based techniques.⁴

The detection of *Aspergillus* galactomannan (GM) in serum using the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay (EIA) (Bio-Rad, France) has been studied extensively and represents a sensitive, non-culture-based tool for the early diagnosis of IA in patients with hematological malignancies.⁵ Moreover, GM can also be detected in body fluids other than serum, since a water-soluble carbohydrate is released during hyphal tip growth.⁶ Recently, *in vitro* studies⁷ and animal models⁸ have shown that during IPA, GM is released at an earlier time and at a higher concentration in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid than in serum. Therefore, in an attempt to improve the sensitivity of the GM assay in patients with IPA and to shorten the amount of time to final diagnosis, several groups have investigated the utility of GM detection in BAL fluid⁹ in non-hematological or mixed populations,^{10–15} as well as in patients with hematological malignancies.^{10,20–27}

* Corresponding author. Tel.: +420 53 2233642; fax: +420 53 2233603.
E-mail address: zracil@fnbrno.cz (Z. Racil).

However, the clinical utility and benefit of the GM EIA assay compared to regular serum GM screening methods remains a matter of debate, primarily due to substantial inconsistencies in the reported sensitivity, which ranges from 57%²⁴ to 100%,²⁰ even in samples from patients with hematological malignancies.

The heterogeneity may be related to several factors that can influence the results, including patient characteristics,²⁸ variability in the definitions of IPA,^{29,30} and different cut-off optical density (OD) values of GM used in BAL fluid.⁹ Moreover, there are several covariates that may markedly influence the assay performance. First, the administration of mold-active antifungal drugs (including prophylactic treatment) that can influence the hyphal growth and antigen release into body fluids may affect the assay performance.^{31,32} Second, neutropenia can lead to higher fungal burden.^{32,33} Finally, there is a lack of BAL standardization among studies that have analyzed the presence of GM in BAL fluid, and therefore the role of pre-analytical variables has not been assessed. It is well-known that the return from the first infused aliquot during lavage is enriched for bronchial components, and should be analyzed separately from the returns from subsequent aliquots, which are of alveolar origin.^{34,35} In addition, the total volume of BAL fluid varies substantially among studies, and this can influence the fungal antigen concentration, and consequently the sensitivity of the GM assay. To date, no study has analyzed these pre-analytic factors.

The purpose of this study was to evaluate the performance and clinical usefulness of GM detection in BAL fluid compared to serum samples for the diagnosis of IPA in a large cohort of patients with hematological malignancies. Moreover, we compared assay performance using bronchial and alveolar samples from BAL fluid, and analyzed the effect of the total BAL fluid volume on the GM assay. Finally, we investigated the role of neutropenia and mold-active antifungal treatment on the sensitivity of the GM assay in our study population.

2. Methods

2.1. Study population

We retrospectively reviewed the data obtained from patients treated at the Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology of Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, from July 2003 to September 2009, who underwent a bronchoscopy with BAL for the evaluation of new pulmonary infiltrates and who had BAL fluid tested for GM. A patient who underwent repeated sampling could be included in the analysis if BAL had been performed on pulmonary infiltrate that was clearly a new presentation. All patients gave informed consent before the procedure and the Institutional Review Board approved the study.

Twenty-six BAL samples obtained from patients who had a clear false-positive result for GM in the serum, which was caused by the administration of GM-positive lots of piperacillin–tazobactam and amoxicillin–clavulanate or infusion of Plasma-Lyte solution (Baxter Healthcare), were excluded from the analysis.

Patients were hospitalized in standard air controlled rooms or in high-efficiency particulate air-filtered single rooms. Patients with neutropenia less than $1.0 \times 10^9/l$ (48.2% of episodes) received antifungal prophylaxis at the time of the bronchoscopy; however, only 5.9% of the patients received mold-active drugs.

Regular monitoring of serum GM was performed twice a week in all patients with acute leukemia and in patients who received an allogeneic HSCT. For all other patients, the serum GM was tested only in cases of pulmonary infiltrate or febrile neutropenia. If febrile neutropenia did not respond to antibiotic treatment, the patients received empirical antifungal treatment, which predominantly consisted of conventional amphotericin B or echinocandin.

This treatment was followed by a routine full diagnostic work-up for invasive fungal disease, including a high-resolution lung computed tomography (CT) and BAL in the case of pulmonary infiltrates.

2.2. Fiberoptic bronchoscopy and sample investigation

The site of the fiberoptic bronchoscopy was guided by a high-resolution lung CT. Eight to 10 sequential, 20-ml aliquots of sterile saline solution were infused into the lower respiratory tract, and each aliquot was immediately aspirated. The return from the first aliquot (bronchial sample) was processed separately from the returns from the subsequent aliquots, which were pooled together and homogenized (alveolar sample). Both portions of BAL fluid were submitted for cytology assessment, direct examination, bacterial, fungal, and mycobacterial culture, and GM detection. Viral and *Pneumocystis jirovecii* screening by PCR was performed on the alveolar samples only.

2.3. GM detection

GM detection was performed for both samples of BAL fluid separately (i.e., bronchial and alveolar samples). Moreover, the Platelia Aspergillus GM EIA (Bio-Rad, France) test was used to detect GM in serum samples taken immediately prior to the bronchoscopy. The BAL specimens were centrifuged at 1000 rpm for 10 min and the supernatant was used for GM detection. The Platelia Aspergillus GM EIA test was performed according to the manufacturer's recommendations for testing serum samples. The assay was performed three times a week in a routine microbiology laboratory. Samples were stored at -20°C until used for testing. All tests with an OD index ≥ 0.5 were repeated on the same specimen.

2.4. Case definition and statistical analysis

The medical records of all patients were reviewed, and each case of pulmonary infiltrate for which BAL was performed was classified as proven, probable, possible, or no IPA based on the revised 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) case definition.³⁰ The detection of GM in BAL fluid and serum samples obtained during bronchoscopy was not included as one of the microbiological criteria.

The Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis analysis of variance (ANOVA) was used to compare independent subgroups of bronchoscopies in continuous variables, and the Wilcoxon test was used for a pair-wise comparison. A two-sided p -value of < 0.05 was considered statistically significant. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated when bronchoscopies without IPA were considered as being true-negatives and episodes with proven and probable IPA were considered as true-positives. A receiver operating characteristic (ROC) curve and area under the curve (AUC) were used to estimate the discriminatory capability of the GM assay performed in both samples of BAL fluid and of the serum sample obtained during bronchoscopy for IPA detection. For statistical analysis, the software Statistica version 9.0 (StatSoft) and R (R Development Core Team) were used.

3. Results

During the study period, the bronchial and alveolar samples of BAL fluid obtained from 255 bronchoscopies in 230 patients were tested for GM. The baseline characteristics are shown in Table 1. IPA was documented in 105 (41.2%) of the bronchoscopies

Table 1

Baseline characteristics

Number of patients	230
Number of BAL	255
Number of BAL/patient, median (range)	1 (1–3)
Men, n (%)	151 (65.7%)
Women, n (%)	79 (34.3%)
Age (years), median (range)	54 (18–79)
Diagnosis, n (%)	
AML/MDS	83 (36.1%)
NHL	46 (20%)
CLL	23 (10%)
MM	16 (7.0%)
ALL	15 (6.5%)
CML	13 (5.7%)
Other	34 (14.8%)
Probability of IPA at the time of BAL, n (%)	
Proven IPA	7 (2.7%)
Probable IPA	21 (8.2%)
Possible IPA	77 (30.2%)
No IPA (control)	150 (58.8%)
Neutropenia ($<1.0 \times 10^9/l$) at the time of BAL, n (%)	
All samples	
Yes	123 (48.2%)
No	125 (49.0%)
NA	7 (2.7%)
Proven and probable IPA	
Yes	18 (64.3%)
No	9 (32.1%)
NA	1 (3.6%)
No IPA	
Yes	48 (32%)
No	98 (65.3%)
NA	4 (2.7%)
Mold-active antifungals at the time of BAL, n (%)	
All samples	
Yes	125 (49.0%)
No	123 (48.2%)
NA	7 (2.7%)
Proven and probable IPA	
Yes	20 (71.4%)
No	8 (28.6%)
NA	0 (0%)
No IPA	
Yes	40 (26.7%)
No	103 (68.7%)
NA	7 (4.7%)

BAL, bronchoalveolar lavage; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; NHL, non-Hodgkin lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; MM, multiple myeloma; ALL, acute lymphoblastic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; IPA, invasive pulmonary aspergillosis; NA, not available.

according to EORTC/MSG criteria; however, the criteria for proven and probable IPA were fulfilled in only 28 episodes (11%). Neutropenia less than $1.0 \times 10^9/l$ and treatment (including prophylaxis) with mold-active drugs occurred during 48.2% and 49.0% of the BAL, respectively.

3.1. Assay performance with the bronchial and alveolar samples from BAL fluid

The GM OD index values for all patients according to the probability of IPA, as well as for both analyzed samples of BAL fluid, are presented in Figure 1. The median GM OD index values for bronchial and alveolar samples from BAL fluid were significantly higher in the proven and probable IPA episodes compared to the possible IPA episodes and control BAL (no IPA) ($p < 0.001$). However, there was no difference in the median GM values between the bronchial and alveolar samples from BAL fluid among the proven/probable IPA episodes (OD index of 0.3 for the bronchial samples vs. 0.86 for the alveolar samples, $p = 0.904$).

The GM assay performance for both samples of BAL fluid separately or in the combined analysis for different cut-off OD indexes is shown in Table 2. ROC curves for bronchial and alveolar

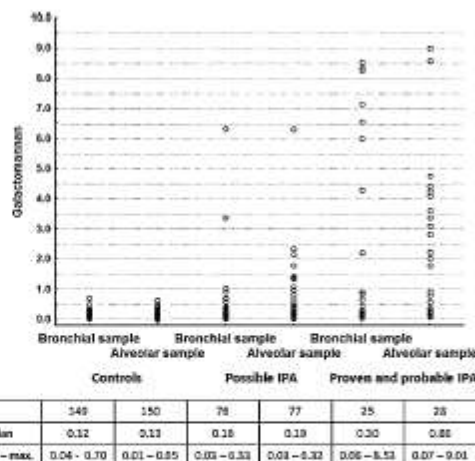


Figure 1. Distribution of the GM OD index values in the bronchial and alveolar samples from BAL fluid according to the EORTC/MSG definition for IPA (GM, galactomannan; OD, optical density; BAL, bronchoalveolar lavage; EORTC/MSG, European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group; IPA, invasive pulmonary aspergillosis).

samples are shown in Figure 2. A GM cut-off OD index of 0.5 revealed the best sensitivity for all analyses with only a limited decrease in specificity or PPV. The detection of GM in the alveolar sample exhibited better sensitivity compared to the bronchial sample of BAL fluid. However, in two (7.1%) of the bronchoscopies performed for proven/probable IPA, the alveolar sample of BAL fluid had a GM OD index of < 0.5 , while the bronchial sample was positive at this cut-off value. Thus, the highest sensitivity was achieved when a combined detection was performed on both samples of BAL fluid, and if any of the samples achieved the GM OD index cut-off value, the patient's BAL fluid was marked as GM-positive.

3.2. Assay performance – serum

A serum sample obtained at the time of the BAL, which was not included in the microbiological criteria for stratification of IPA probability, had the best performance parameters at a cut-off OD index of 0.5 (Table 2 and Figure 2). Interestingly, GM detection in this single serum sample and at a cut-off OD index of 0.5 had better sensitivity, specificity, PPV, and NPV compared to the bronchial or alveolar samples of BAL fluid alone (Table 2). However, five of 11 (45.5%) patients with a negative GM test in the serum (for a cut-off of 0.5) had positive bronchial or alveolar samples of BAL fluid at the same cut-off OD value. Therefore, not surprisingly, the best performance of the Platelia Aspergillus test was achieved when the 'triple testing' (a GM OD index of > 0.5 in the bronchial or alveolar samples of BAL fluid or serum sample obtained during bronchoscopy) was performed, which showed a sensitivity of 78.6% (Table 2).

3.3. BAL fluid culture and microscopy

Only three out of 28 BAL fluid samples obtained during episodes of proven/probable IPA were culture-positive for *Aspergillus sp* (three *Aspergillus fumigatus*). However, none of these samples were positive for fungal hyphae by microscopic analysis. Thus, the combined sensitivity of these conventional microbiological methods was only 10.7%. Moreover, two out of three samples had a GM

Table 2

The sensitivities, specificities, positive predictive values, and negative predictive values, and their 95% confidence intervals for galactomannan detected in different sample types and evaluated at different cut-off galactomannan optical density indexes. Only samples from bronchoscopies with probable and proven invasive pulmonary aspergillosis were used for the analysis

	Cut-off OD		
	0.5	1.0	1.5
BAL – bronchial sample only			
Sensitivity	44.0% (24.4–63.1%)	32.0% (14.9–53.5%)	32.0% (14.9–53.5%)
Specificity	99.3% (96.3–99.9%)	100% (96.3–100%)	100% (96.3–100%)
PPV	91.7% (61.5–99.8%)	100% (51.8–100%)	100% (51.8–100%)
NPV	91.4% (85.9–95.2%)	89.8% (84.1–93.9%)	89.8% (84.1–93.9%)
BAL – alveolar sample only			
Sensitivity	57.1% (37.2–75.5%)	46.4% (27.5–66.1%)	46.4% (27.5–66.1%)
Specificity	99.3% (96.3–99.9%)	100% (96.4–100%)	100% (96.4–100%)
PPV	94.1% (71.3–99.9%)	100% (66.1–100%)	100% (66.1–100%)
NPV	92.5% (87.3–96.1%)	90.9% (85.4–94.8%)	90.9% (85.4–94.8%)
Bronchial and alveolar sample^a			
Sensitivity	36.0% (18.0–57.5%)	28.0% (12.1–49.4%)	28.0% (12.1–49.4%)
Specificity	100% (96.3–100%)	100% (96.3–100%)	100% (96.3–100%)
PPV	100% (55.5–100%)	100% (47.3–100%)	100% (47.3–100%)
NPV	90.3 (84.7–94.4%)	89.2% (83.5–93.5%)	89.2% (83.5–93.5%)
Bronchial or alveolar sample			
Sensitivity	64.3% (44.1–81.4%)	51.9% (31.9–71.3%)	51.9% (31.9–71.3%)
Specificity	98.7% (95.2–99.8%)	100% (96.3–100%)	100% (96.3–100%)
PPV	90.0% (68.3–98.8%)	100% (68.1–100%)	100% (68.1–100%)
NPV	93.6% (88.6–96.9%)	92.0 (86.7–95.7%)	92.0 (86.7–95.7%)
Serum on the day of BAL^b			
Sensitivity	60.7% (40.6–78.5%)	39.3% (21.5–59.4%)	21.4% (8.3–41.0%)
Specificity	100% (96.2–100%)	100% (96.2–100%)	100% (96.2–100%)
PPV	100% (72.7–100%)	100% (61.5–100%)	100% (42.1–100%)
NPV	92.9% (87.7–96.4%)	89.5% (83.7–93.8%)	86.8% (80.7–91.6%)
Serum at BAL^b or bronchial or alveolar sample			
Sensitivity	78.6% (59.0–91.7%)	63.0% (42.4–80.6%)	55.6% (35.3–74.5%)
Specificity	98.6% (95.1–99.8%)	100% (96.2–100%)	100% (96.2–100%)
PPV	91.7% (73.0–99.0%)	100% (72.7–100%)	100% (69.8–100%)
NPV	96.0% (91.4–98.5%)	93.5% (88.5–96.9%)	92.4% (87.0–96.0%)

OD, optical density; BAL, bronchoalveolar lavage; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

^a Both samples must be positive at the selected cut-off OD index to mark the result as positive.

^b For serum samples – the test is positive if one sample already revealed the pre-specified cut-off OD.

OD of >0.5 in the bronchial or alveolar samples from BAL fluid. The only GM-negative patient, who presented with pulmonary interstitial fibrosis after an allogeneic HSCT, had a borderline positive GM test in a bronchial sample of the BAL fluid (GM OD index of 0.46). The serum GM test in this patient was negative (GM OD index of 0.07).

3.4. Parameters that affect the GM assay sensitivity in BAL fluid

We analyzed the effects of neutropenia, mold-active antifungal treatment, and the volume of administered fluid during BAL on assay performance. Two-thirds of the patients with proven/probable IPA had a neutrophil count of $<1.0 \times 10^9/l$ at the time of bronchoscopy. The sensitivity of the GM test performed on any

of the BAL fluid samples from neutropenic patients was approximately two times higher than from non-neutropenic patients (Table 3). Although less significant, the sensitivity of the assay for serum samples obtained during bronchoscopy was higher in neutropenic patients than in non-neutropenic patients (66.7% vs. 55.6%, respectively).

For the majority (71.4%) of proven/probable IPA episodes, patients received mold-active antifungal therapy. However, the length of antifungal treatment at the time of the BAL procedure differed significantly, with a range of 1–25 days and a median duration of 2.5 days. The sensitivity of GM detection in the bronchial and alveolar samples from BAL fluid, as well as in serum, decreased significantly when the treatment had lasted ≥ 2 days at the time of the bronchoscopy (Table 3). However, in patients who

Table 3

The sensitivity of the galactomannan assay in proven and probable invasive pulmonary aspergillosis cases using a cut-off galactomannan optical density index of 0.5, and the influence of neutropenia and mold-active antifungal treatment at the time of bronchoscopy

	BAL – bronchial sample	BAL – alveolar sample	Bronchial or alveolar sample	Bronchial and alveolar sample	Serum at the day of BAL only ^a
Neutropenia $<1.0 \times 10^9/l$^b					
Yes (n = 18)	50.0%	66.7%	72.2%	43.8%	66.7%
No (n = 9)	25.0%	33.3%	44.4%	12.5%	55.6%
Antifungals 1 day only					
Yes (n = 6)	83.3%	100%	100%	83.3%	100%
No (n = 8)	28.6%	50.0%	62.5%	14.3%	37.5%
Antifungals ≥ 2 days					
Yes (n = 14)	33.3%	42.9%	50.0%	25.0%	57.1%
No (n = 14)	53.8%	71.4%	78.6%	46.2%	64.3%

BAL, bronchoalveolar lavage; OD, optical density.

^a For serum samples – the test is positive if one sample already revealed the cut-off OD.

^b Neutrophil count was not known for one patient with proven/probable invasive aspergillosis.

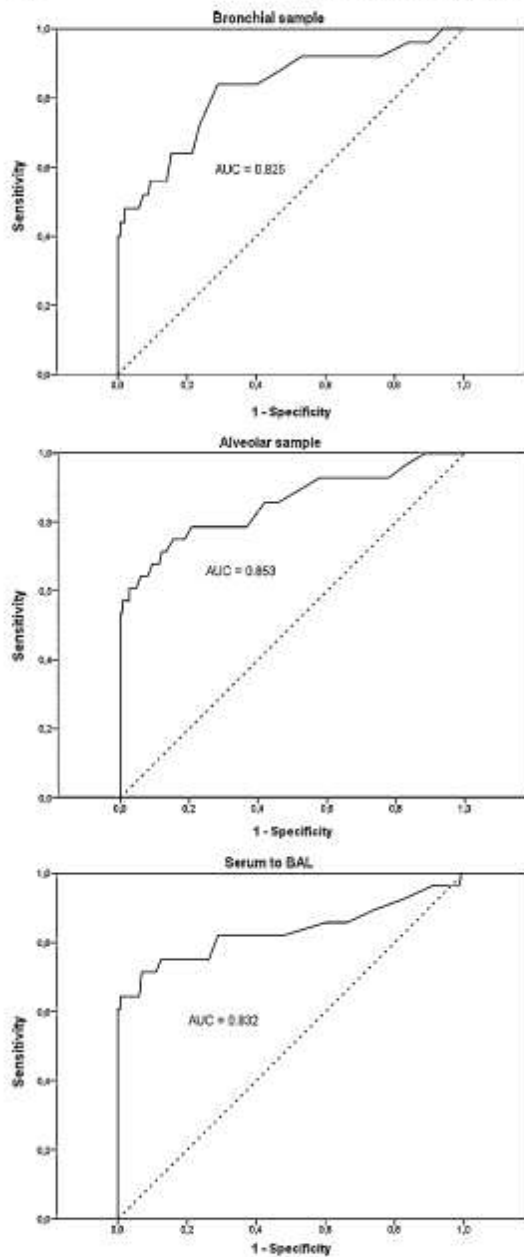


Figure 2. ROC curves for GM detection in bronchial and alveolar samples of BAL fluid and serum obtained during the bronchoscopy. The AUC for GM detection in the bronchial sample = 0.825, alveolar sample = 0.853, and in serum obtained at the time of BAL = 0.832 (ROC, receiver operating characteristic; GM, galactomannan; BAL, bronchoalveolar lavage; AUC, area under the curve).

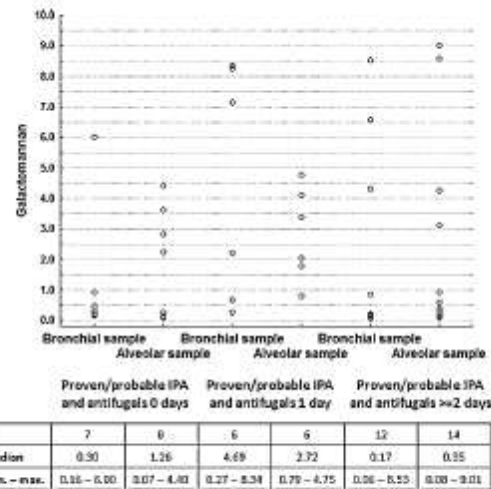


Figure 3. Distribution of the GM OD index values in the bronchial and alveolar samples of BAL fluid in proven/probable IPA episodes according to the length of treatment with mold-active antifungal drugs (GM, galactomannan; OD, optical density; BAL, bronchoalveolar lavage; IPA, invasive pulmonary aspergillosis).

had started antifungal treatment within 24 h prior to the bronchoscopy, the sensitivity dramatically increased to 83.3% in the bronchial sample and 100% in the alveolar sample of BAL fluid and 100% in the serum sample, compared to patients who did not receive antifungal treatment (Table 3). Similarly, the median GM OD index in both samples of BAL fluid was highest in patients with episodes of proven/probable IPA who had been treated with mold-active antifungals for only 1 day (Figure 3), compared to patients who had received a longer treatment period of antifungals or no treatment at all.

Finally, we analyzed the relationship between the volume of administered solution used for the BAL or the volume of aspirated BAL fluid and the positivity of the GM assay from the alveolar sample. Although there was no significant relationship between the amount of administered solution and the GM assay ($p = 0.171$), there was a trend towards a higher volume of aspirated fluid in GM-negative BAL ($p = 0.092$) (Figure 4).

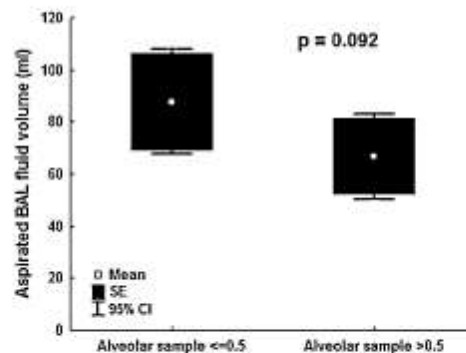


Figure 4. The mean, SE, and 95% CI of aspirated BAL fluid volume in proven/probable IPA episodes according to the GM OD index (SE, standard error; CI, confidence interval; BAL, bronchoalveolar lavage; IPA, invasive pulmonary aspergillosis; GM, galactomannan; OD, optical density).

4. Discussion

In this study, which represents the largest cohort of patients with hematological diseases published to date, we found moderate sensitivity as well as excellent specificity and PPV for the detection of GM in BAL fluid when a cut-off OD index of 0.5 was used.

The sensitivity for the detection of GM in BAL fluid (alveolar sample; 57.1%) determined in this study was lower than that published in the majority of recent studies on hematological patients, which have reported a sensitivity with the same cut-off OD index ranging from 73% to 100%,^{10,22,23,25–27} The only exception to these previous findings is the study by Bergeron et al., which showed a sensitivity of 57.6%, very close to the one determined in our study.²⁴

There are several potential reasons for the sensitivity differences in the detection of GM in BAL fluid between published studies and our data. First, the definition of patients with IPA could differ among the studies (i.e., differences in diagnostic criteria of IA, the use of serum GM as part of the criteria, or the inclusion of possible IA cases for the calculation of the test sensitivity). However, this is most likely not the reason for the difference, since the vast majority of recent studies, including our study, used EORTC/MSG 2008 criteria³⁰ and did not include the possibility of IA in the analysis.

Second, the composition of the analyzed hematological population, as well as the degree and type of immunodeficiency, varied among studies. For example, 88% of the patients in the study by Musher et al. underwent HSCT,¹⁰ while in the study by Hsu et al., only 20% were treated with an HSCT; however, 90% of the patients had neutropenia.²³ It is well-known that the GM assay has a better performance on serum samples from patients with neutropenia.³⁶ However, the only study that has analyzed the effect of neutropenia on the sensitivity of GM detection in BAL fluid in hematological patients did not find any difference in the sensitivity between patients with or without a decreased neutrophil count.²⁴ Nevertheless, contrary to published data, that study also did not find any difference in the sensitivity of the GM assay in serum samples.²⁴ In our study, we found significantly better sensitivity in the assay for patients with neutropenia. The sensitivity was almost two times greater in neutropenic patients compared to non-neutropenic patients in all analyzed samples of lavage fluid. These findings are in agreement with the recognized differences in pathogenesis and disease progression of aspergillosis in animal studies.^{37,38} In neutropenic animals, intensive hyphal growth, high pulmonary fungal burden, and angioinvasion results in high GM concentrations in both the lungs and serum. In contrast, pulmonary inflammation is the main cause of disease progression in non-neutropenic, steroid-immunosuppressed animals. Moreover, the fungal burden is low with little angioinvasion in these animals, which results in GM levels close to the detection threshold.³⁹

Third, prophylactic or empirical administration of mold-active antifungal therapies may be another possible cause of the variability seen in the test sensitivity among published studies. However, the data in the literature are controversial. While some studies report no impact of antifungal therapies on assay sensitivity for BAL fluid,^{22,24} other studies describe a decreased sensitivity in patients with antifungal treatment lasting ≥ 3 days,²⁰ and still others have shown that the administration of antifungal agents seems to increase the sensitivity of GM detection in BAL fluid.^{10,26} Our study results represent a combination of both of these concepts and provide an explanation for these discrepancies (Table 3). We confirmed the conclusions of the study by Luong et al.,²⁶ which showed that in clinical practice, empirical antifungal treatment reflects a physician's suspicion of fungal disease and may serve as a surrogate marker for the infection. Thus, the assay

sensitivity in our patient group was significantly higher in individuals who had just started empirical treatment with antifungal drugs and who had received only one or two doses. However, treatment with antifungal therapy for ≥ 2 days promptly decreased fungal load and concomitantly decreased the assay sensitivity for both samples of BAL fluid, as well as serum. These results also confirm the findings of Becker et al.²⁰ and Marr et al.³¹ Finally, we hypothesize that the studies that did not find any effect of antifungal therapy on assay performance^{22,24} may indeed identify an effect if the two groups of patients with different lengths of fungal treatment described in our study were analyzed together.

Finally, the most crucial factor that affects the sensitivity of GM detection in BAL fluid is most likely the standardization of BAL performance. The volume of collected BAL fluid can influence the GM concentration and consequently the assay reactivity.^{25,26} Our data have for the first time proven this hypothesis, as we have found a trend towards a higher volume of aspirated fluid in GM-negative BAL (Figure 4). Since the volume of collected BAL fluid is dependent (besides other factors) on the volume of instilled sterile saline during the bronchoscopy, it is a critical factor for differences in GM assay performance, and there is significant variability in the amount of instilled solution among studies in the literature, ranging from 40 to 200 ml.^{23,26} Moreover, while the majority of studies performed GM detection in the homogenized alveolar sample of the BAL fluid (as recommended³⁵), there are some instances where GM was detected in the first obtained aliquot of BAL fluid (bronchial sample).²⁵ This could be an additional factor affecting the variability in assay performance among the published studies to date, since our study has shown a significantly lower sensitivity of GM detection in the bronchial sample of BAL fluid compared to the alveolar sample. Nevertheless, combining the GM assay results from both samples of the BAL fluid could lead to further improvements in assay sensitivity, because in some of our IPA cases, only the bronchial and not the alveolar sample was positive (Table 2).

Several studies have reported low specificity and PPV of GM detection in BAL fluid using a GM cut-off OD index of 0.5^{21,25–27} due to the high frequency of false-positive results that were mainly caused by the administration of β -lactam antibiotics.²⁶ These authors recommended using a higher cut-off OD index than 0.5 in order to improve the assay performance. In our large study population, patients with explicit false-positive results from the detection of GM in serum caused by β -lactam antibiotics or Plasma-Lyte solution^{40,41} were excluded from the analysis. After exclusion of these patients, we found that the specificity and PPV of the assay were very high (99.3% and 94.1%, respectively) when a cut-off OD of 0.5 was used, which was not significantly improved by increasing the cut-off value (Table 2).

There are only a few studies to date comparing the sensitivity of GM detected in BAL fluid and serum samples. There are two important limitations to this type of analysis. First, serum GM detection is generally used as a criterion for the diagnosis of probable IA, and therefore an analysis that evaluates assay performance in IA cannot be performed. Second, the samples used for GM detection are usually not obtained at the same time or even same day as when the BAL is performed. Becker et al.²⁰ published the only study that did not use serum GM as a criterion for IA, and found significantly higher sensitivity of GM detection in BAL fluid compared to serum (100% vs. 47%, respectively). However, the serum GM was not obtained at the same time as the BAL procedure, and a cut-off OD index of 1.0 was used for both serum and BAL fluid. In our study, the serum samples were obtained immediately prior to the BAL procedure, and the result of this sampling was not used as a criterion for IA diagnosis. Using a cut-off OD index of 0.5 resulted in a sensitivity of 60.7%, which was

similar to the results obtained from the alveolar sample of BAL fluid (57.1%) and the combined analysis of bronchial and alveolar samples from BAL fluid (64.3%) (Table 2). However, it must be noted that some patients had negative alveolar or bronchial samples from the BAL fluid while exhibiting a positive GM test result from the serum sample taken prior to the BAL procedure. Thus, the highest sensitivity of 78.6% with high specificity and an acceptable PPV was achieved when 'triple testing' was performed, which included a GM OD greater than 0.5 in the alveolar or bronchial samples from the BAL fluid or in serum (Table 2).

The limitations of our study could be the retrospective design and the exclusion of patients who had clear false-positive assay results from serum analysis. However, since there is over 10 years of experience with this assay, virtually all major factors that could cause a false-positive in serum are well described and known. Therefore, in our opinion, patients with false-positive results caused by a known interference factor should be excluded from a retrospective study. This approach will more closely reflect what occurs in current daily clinical practice rather than repeatedly reporting the occurrence of false-positive results caused by β -lactam antibiotics or gluconate-containing solutions,^{40,41} even though at present, these drugs and solutions would not be given to patients where GM is monitored.

In conclusion, our retrospective study, which is the largest published study on hematological patients to date, found moderate sensitivity as well as high specificity and PPV of the GM assay in BAL fluid (alveolar sample) when a cut-off OD of 0.5 was used. Importantly, the moderate sensitivity of the GM test in BAL fluid found in the present study is in contrast to the vast majority of published reports and meta-analyses performed to date. In addition, the moderate sensitivity of the GM test in BAL fluid was close to that found in serum samples obtained at the same time as the BAL procedure. Therefore, in this study, we have clearly identified three major factors that affect assay performance: (1) the need for BAL standardization, including the sample of BAL fluid used for analysis and the volume of instilled solution; (2) the role of antifungal therapy and the treatment duration prior to the BAL procedure; and (3) the higher utility of the assay in neutropenic patients. Moreover, we have demonstrated the advantage of combining the assay results from the BAL fluid and serum samples obtained at the same time for the detection of GM. Thus, the best assay performance for detection of IPA is obtained when a 'triple' GM detection method is used, including the simultaneous detection of GM in the bronchial and alveolar samples from BAL fluid as well as serum from neutropenic patients who have just initiated empirical antifungal therapy due to a clinical suspicion of disease.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health (IGA NS10442-3/2009 and IGA NS10441-3/2009) of the Czech Republic and the Ministry of Education, Youth, and Sports (MSM619895223) of the Czech Republic.

Conflict of interest: All authors – nothing to disclose.

References

- Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Hematologica* 2006;**91**:1068–75.
- Kontoyannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010;**50**:1091–100.
- Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2010;**50**:1559–67.
- Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Račič Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* 2011;**66**(Suppl 1):i15–24.
- Leeflang MM, Debets-Ossenkopp VJ, Visser CE, Scholten RJ, Hoofst L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(4):CD007394.
- Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verwoj PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004;**39**:1467–74.
- Hope WW, Kuhlak MJ, Lyman CA, Petraitiene R, Petraitis V, Francesconi A, et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J Infect Dis* 2007;**195**:455–66.
- Francesconi A, Kasai M, Petraitiene R, Petraitis V, Kelahe AM, Schaufele R, et al. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:2475–80.
- Guo YL, Chen YQ, Wang K, Qin SM, Wu C, Kong JL. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate meta-analysis and systematic review. *Chest* 2010;**138**:817–24.
- Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajev SA, Smith C, Marr KA. *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:5517–22.
- Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation* 2007;**83**:1330–6.
- Nguyen MH, Jaber R, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ, et al. Use of bronchoalveolar lavage to detect galactomannan for diagnosis of pulmonary aspergillosis among nonimmunocompromised hosts. *J Clin Microbiol* 2007;**45**:2787–92.
- Clancy CJ, Jaber RA, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ, et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis among solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2007;**45**:1759–65.
- Husain S, Clancy CJ, Nguyen MH, Swartzentruber S, Leather H, LeMonte AM, et al. Performance characteristics of the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Vaccine Immunol* 2008;**15**:1760–3.
- Khan ZU, Ahmad S, Theyyathel AM. Detection of *Aspergillus fumigatus*-specific DNA (1–3)- β -D-glucan and galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage specimens of experimentally infected rats. *Mycoses* 2008;**51**:129–35.
- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**177**:27–34.
- Desai R, Ross LA, Hoffman JA. The role of bronchoalveolar lavage galactomannan in the diagnosis of pediatric invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* 2009;**28**:283–6.
- Pasqualotto AC, Xavier MO, Sanchez LB, de Oliveira Costa CD, Schio SM, Camargo SM, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients by detection of galactomannan in the bronchoalveolar lavage fluid. *Transplantation* 2010;**90**:306–11.
- Park SY, Lee SO, Choi SH, Sung H, Kim MN, Choi CM, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen assay in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect* 2010;**61**:492–8.
- Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in hematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003;**121**:448–57.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:3922–5.
- Pensack O, Rempfl P, Graf B, Blau JW, Thiel E. *Aspergillus* galactomannan testing in patients with long-term neutropenia: implications for clinical management. *Ann Oncol* 2008;**19**:984–9.
- Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis* 2009;**49**:1688–93.
- Bergeron A, Belle A, Sulahian A, Lacroix C, Chevret S, Raffoux E, et al. Contribution of galactomannan antigen detection in BAL to the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Chest* 2010;**137**:410–5.
- Hsu LY, Ding Y, Phua J, Koh LP, Chan DS, Khoo KL, et al. Galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid is useful for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients. *BMC Infect Dis* 2010;**10**:44.
- Luong ML, Filion C, Labbe AC, Roy J, Pepin J, Cadrin-Tourigny J, et al. Clinical utility and prognostic value of bronchoalveolar lavage galactomannan in patients with hematologic malignancies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;**68**:132–9.
- Nguyen MH, Leather H, Clancy CJ, Cline C, Jantz MA, Kulkarni V, et al. Galactomannan Testing in Bronchoalveolar Lavage Fluid Facilitates the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Hematologic Malignancies

- and Stem Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;17:1043–50.
28. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006;42:1417–27.
 29. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7–14.
 30. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, 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. *Clin Infect Dis* 2008;46:1813–21.
 31. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004;190:641–9.
 32. Becker MJ, de Marie S, Willemsse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol* 2000;38:1434–8.
 33. Vallor AC, Kirkpatrick WR, Najvar LK, Bocanegra R, Kinney MC, Fothergill AW, et al. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2593–8.
 34. Rennard SI, Ghafouri M, Thompson AB, Linder J, Vaughan W, Jones K, et al. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:208–17.
 35. Meduri GU, Chastre J. The standardization of bronchoscopic techniques for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1992;102:5575–645.
 36. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, Pautas C, Maury S, Kuentz M, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:81–6.
 37. Stephens-Romero SD, Mednick AJ, Feldmesser M. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect Immun* 2005;73:114–25.
 38. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 2005;73:494–503.
 39. Maertens J, Theunissen K, Lagrou K. Galactomannan testing. In: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. 1st ed. Dordrecht: Springer; 2010. p. 1046.
 40. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, et al. False-positive galactomannan Platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* 2004;38:913–6.
 41. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of Platelia Aspergillus test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol* 2007;45:3141–2.

3.3.1.2. Annex 18

Racil Z., Kocmanova I., Weinbergerova B., Toskova M., Winterova J., Lengerova M., Buresova L., Timilsina S., Mayer J. Mucositis does not lead to false-positivity of the Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;7:851-855. ISSN 0934-9723.

IF = 2,631 in 2010; INFECTIOUS DISEASES Q2, MICROBIOLOGY Q2; 3 citations according to

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

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

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

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

Introduction

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

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

Patients and methods

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

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

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

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

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

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

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

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

Results

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

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

Table 1 Demographic data

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

HSCT = haematopoietic stem cell transplantation

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

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

Discussion

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

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

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

IP = index of positivity

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

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

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

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

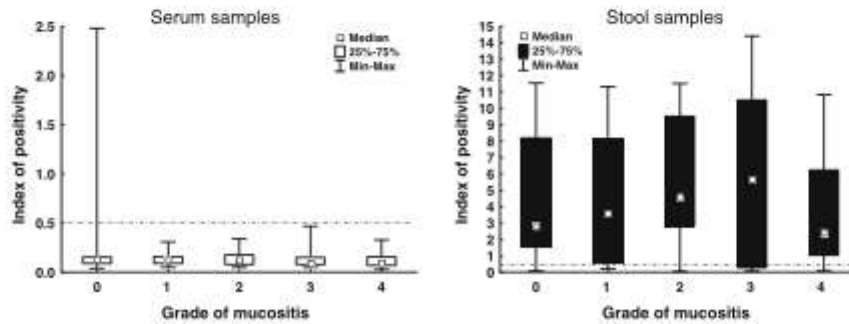


Fig. 1 Median, 25–75% interquartile range, minimal and maximal index of positivity (IP) of *Platelia Aspergillus* (PA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serum and stool samples during

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Potential conflicts of interest All authors: no conflict.

References

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

3.4. PCR in Invasive Fungal Disease Diagnostics

A second group of "non-culture-based" procedures for early IFD diagnosis, which has come to the fore in recent years, stems from the detection of fungal nucleic acids, most often using target sequences of mitochondrial and ribosomal genes by polymerase chain reaction (PCR). Based on significant progress relating to *Aspergillus* PCR validation and standardization by the International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) working group Fungal PCR Initiative (FPCRI; www.fpcri.eu), of which our workplace has been an active collaborator, PCR techniques were incorporated into recently published EORTC / MSG diagnostic criteria for IFD [15, 63]. With cases of proven diagnosis, when mycosis is detected by conventional tissue procedures, fungal deoxyribonucleic acid (DNA) amplification by PCR in combination with DNA sequencing is a tool for identifying species of filamentous fungus and yeast. In probable IA situations, PCR techniques serve as a mosaic stone to confirm a diagnosis from serum, plasma, whole blood, or BAL fluid samples [15]. Commercial PCR tests are relatively few, so most researchers have developed their own "in-house" methods. The FPCRI program establishes validity and standardization criteria for these various *Aspergillus* PCR procedures. Despite the great variability of technological approaches, PCR test quality is currently comparable to GM and BDG IFD identification options [64]. Similarly, molecular diagnostics using quantitative real-time PCR is useful for determining probable PCP from BAL fluid or sputum [65]. In cooperation with the FPCRI group, we published via an impact journal a systematic meta-analysis evaluating antifungal prophylaxis effect on PCR test parameters in IA detection (Appendix 19 in Chapter 3.4.1.1.). Antifungal therapy did not affect the SEN of the PCR test, contrasted with the described GM test effect, where the rate of false negative GM is likely a result of antifungals limiting IA clinical progression. On the other hand, prevailing antifungal therapy significantly reduces the *Aspergillus* PCR SPE.

Since 2005, our team has been systematically dealing with IFD diagnostics issues using molecular methods. In 2011, our own "in-house" quantitative real-time PCR for specific detection and quantification of *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, and *A. niger* DNA was patented [66]. Subsequently, this technique has been successfully tested on animal samples IA model [67].

A serological method is lacking for the detection of rare invasive mucormycosis characterized by rapid progression and high lethality, hence its diagnosis is difficult in clinical practice. A PCR method amplifying a conserved region of the mucormycetes genome using specific

primers in the presence of an intercalating dye was introduced at our workplace. Obtained PCR products are subsequently subjected to controlled melting with the release of bound fluorescent dye, thus modifying sample fluorescence. This change is plotted by software as a melting curve with a unique shape for each type of mucormycetes. This procedure has since been published in impact journals, which are part of Annex 20 in Chapter 3.4.1.2. and Annex 21 in Chapter 3.4.1.3.

Efficaciously, for rapid identification of a broad IFD spectrum in BAL fluid samples, including other rare agents (*Fusarium* sp., *Scedosporium* sp., etc.), we introduced a rapid panfungal PCR procedure followed by a high-resolution melting analysis (Process noted within Annex 22 in Chapter 3.4.1.4). These diagnostics can be used to distinguish infection (predominantly *Aspergillus* spp.) from colonization or contamination (especially *Candida* spp.). Moreover, another published manuscript coauthored by applicant with the Working Group for Opportunistic Infections at IHOK outlined the panfungal PCR approach with subsequent classical product sequencing, analyzing a total of 108 BAL fluid samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. The original paper is listed within Annex 23 in Chapter 3.4.1.5. This study confirmed the time-consuming and ambiguous results of high-sensitivity testing of primarily non-sterile BAL fluid material compared to the aforementioned panfungal PCR procedure followed by melting curve analysis.

IFD diagnosis among immunocompromised patients using molecular biological methods is further detailed in the following journal publications, where the aspirant is a co-author (sorted chronologically in ascending order). Five selected publications are part of Chapter 3.4.1. Annexes to Chapter 3.4. (Annexes 19 to 23 sorted thematically):

- Weinbergerová B., Hrnčířová K., Lengerová M., Ráčil Z., Kocmanová I., Bohatá Š., Moulis M., Jedlička V., Mayer J. Využití molekulárně biologické diagnostiky v detekci invazivních zygomycóz – kazuistiky. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2009;11(11):60-62. ISSN 1212-4184.
- Hrnčířová K., Lengerová M., Kocmanová I., Ráčil Z., Volfová P., Paloušová D., Moulis M., Weinbergerová B., Winterová J., Tosková M., Pospíšilová S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3392-3394. ISSN 0095-1137. (see Annex 23 in Chapter 3.4.1.5.)

- Lengerova M., Racil Z., Hrcirova K., Kocmanova I., Volfova P., Ricna D., Bejda P., Moulis M., Pavlovsky Z., Weinbergerova B., Toskova M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):2824-2828. ISSN 0095-1137. (see Annex 22 in Chapter 3.4.1.4.)
- Ricna D., Lengerova M., Palackova M., Hadrabova M., Kocmanova I., Weinbergerova B., Pavlovsky Z., Volfova P., Bouchnerova J., Mayer J., Racil Z. Disseminated fusariosis by *Fusarium proliferatum* in a patient with aplastic anaemia receiving primary posaconazole prophylaxis - case report and review of the literature. *Mycoses.* 2016;59(1):48-55. ISSN 1439-0507.
- Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol.* 2016;54(7):714-724. ISSN 2185-6486. (see Annex 20 in Chapter 3.4.1.2.)
- Ricna D., Lengerova M., Bezdicek M., Kocmanova I., Drgona L., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR. *Folia microbiol.* 2019;64(3):421-428. ISSN 0015-5632. (see Annex 21 in Chapter 3.4.1.3.)
- Cruciani M., White PL., Mengoli C., Löffler J., Morton CO., Klingspor L., Buchheidt D., Maertens J., Heinz WJ., Rogers TR., Weinbergerova B., Warris A., Lockhart DEA., Jones B., Cordonnier C., Donnelly JP., Barnes RA., Fungal PCR Initiative. The impact of anti-mould prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 76(3):635-638. doi: 10.1093/jac/dkaa498. ISSN 0305-7453. (see Annex 19 in Chapter 3.4.1.1.)

3.4.1. Annexes to Chapter 3.4.

3.4.1.1. Annex 19

Cruciani M., White PL., Mengoli C., Löffler J., Morton CO., Klingspor L., Buchheidt D., Maertens J., Heinz WJ., Rogers TR., Weinbergerova B., Warris A., Lockhart DEA., Jones B., Cordonnier C., Donnelly JP., Barnes RA., Fungal PCR Initiative. The impact of anti-mould prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76(3):635-638. doi: 10.1093/jac/dkaa498. ISSN 0305-7453.

IF = 5,79 in 2020; INFECTIOUS DISEASES Q1, MICROBIOLOGY Q1, PHARMACOLOGY & PHARMACY Q1; 2 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

The impact of anti-mould prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis

M. Cruciani¹, P. L. White^{2*}, C. Mengoli³, J. Löffler⁴, C. O. Morton⁵, L. Klingspor⁶, D. Buchheidt⁷, J. Maertens⁸, W. J. Heinz⁹, T. R. Rogers⁹, B. Weinbergerova¹⁰, A. Warris¹¹, D. E. A. Lockhart¹², B. Jones¹³, C. Cordonnier¹⁴, J. P. Donnelly¹⁵ and R. A. Barnes¹⁶ on behalf of the Fungal PCR Initiative†

¹Azienda ULSS 9 Scaligera, Verona, Italy; ²Public Health Wales, Cardiff, UK; ³University of Padua, Padua, Italy; ⁴University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany; ⁵Western Sydney University, Sydney, Australia; ⁶Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; ⁷Heidelberg University, Mannheim, Germany; ⁸Department of Microbiology, Immunology, and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium; ⁹Trinity College Dublin, St James's Hospital Campus, Dublin, Ireland; ¹⁰Department of Internal Medicine – Haematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ¹¹MRC Centre for Medical Mycology, University of Exeter, UK; ¹²University of Aberdeen, Aberdeen, UK; ¹³Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, UK; ¹⁴Hopital Henri Mondor, Creteil, France; ¹⁵University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands; ¹⁶Cardiff University School of Medicine, Cardiff, UK

*Corresponding author. E-mail: lewis.white@wales.nhs.uk
†Members are listed in the Acknowledgements section.

Received 18 September 2020; accepted 29 October 2020

Background: The performance of the galactomannan enzyme immunoassay (GM-EIA) is impaired in patients receiving mould-active antifungal therapy. The impact of mould-active antifungal therapy on *Aspergillus* PCR testing needs to be determined.

Objectives: To determine the influence of anti-mould prophylaxis (AMP) on the performance of PCR blood testing to aid the diagnosis of proven/probable invasive aspergillosis (IA).

Methods: As part of the systematic review and meta-analysis of 22 cohort studies investigating *Aspergillus* PCR blood testing in 2912 patients at risk of IA, subgroup analysis was performed to determine the impact of AMP on the accuracy of *Aspergillus* PCR. The incidence of IA was calculated in patients receiving and not receiving AMP. The impact of two different positivity thresholds (requiring either a single PCR positive test result or ≥ 2 consecutive PCR positive test results) on accuracy was evaluated. Meta-analytical pooling of sensitivity and specificity was performed by logistic mixed-model regression.

Results: In total, 1661 (57%) patients received prophylaxis. The incidence of IA was 14.2%, significantly lower in the prophylaxis group (11%–12%) compared with the non-prophylaxis group (18%–19%) ($P < 0.001$). The use of AMP did not affect sensitivity, but significantly decreased specificity [single PCR positive result threshold: 26% reduction ($P = 0.005$); ≥ 2 consecutive PCR positive results threshold: 12% reduction ($P = 0.019$)].

Conclusions: Contrary to its influence on GM-EIA, AMP significantly decreases *Aspergillus* PCR specificity, without affecting sensitivity, possibly as a consequence of AMP limiting the clinical progression of IA and/or leading to false-negative GM-EIA results, preventing the classification of probable IA using the EORTC/MSGERC definitions.

Introduction

There is convincing evidence showing that both the sensitivity and specificity of the galactomannan enzyme immunoassay (GM-EIA) are impaired in patients receiving mould-active antifungal therapy (AFT).^{1,2} Previous exposure to AFT also needs to be considered when interpreting *Aspergillus* PCR results, as animal studies and clinical trials both indicate that AFT may adversely affect test performance.^{3,4} Recently, a systematic review and meta-analysis investigating *Aspergillus* PCR blood testing to aid the diagnosis of

invasive aspergillosis (IA) in immunocompromised patients was performed.⁵ Most patients had a haematological malignancy, had undergone HSCT or were solid organ transplant (SOT) recipients. The mean prevalence of proven or probable IA was 16.3% (769/4718 patients).⁴ Pooled data showed that PCR has moderate diagnostic accuracy when used as a screening test for IA in high-risk patient groups.⁵ The sensitivity and specificity of PCR for the diagnosis of IA varied according to the interpretative criteria used to define a test as positive. Considering a single positive test result as significant, the sensitivity and specificity were 79.2% and

3.4.1.2. Annex 20

Hrncirova K., Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Volfova P., Palousova D., Moulis M., Weinbergerova B., Winterova J., Toskova M., Pospisilova S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3392-3394. ISSN 0095-1137.

IF = 4,220 in 2010; MICROBIOLOGY Q1; 38 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples by Use of High-Resolution Melt Analysis[†]

Kristyna Hrnčirova,^{1*} Martina Lengerova,¹ Iva Kocmanova,² Zdenek Racil,³ Pavlina Volfova,¹
Dita Palousova,¹ Mojmir Moulis,⁴ Barbora Weinbergerova,³ Jana Winterova,³
Martina Toskova,³ Sarka Pospisilova,¹ and Jiri Mayer³

Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic¹;
Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic²; Department of
Internal Medicine—Hematology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno,
Czech Republic³; and Department of Pathology, Masaryk University and
University Hospital Brno, Brno, Czech Republic⁴

Received 2 June 2010/Accepted 21 June 2010

We present a method for rapid and simple detection of clinically relevant mucormycetes of the *Mucorales* order in cultures and clinical samples. This seminested real-time PCR uses mucormycete-specific primers and is followed by species identification using high-resolution melt (HRM) analysis. The method is highly suitable for routine clinical diagnostics.

Invasive infections caused by mucormycetes started to occur more frequently in the last decade and are connected with rapid progression and high mortality rates. Early diagnostics and targeted treatment are crucial. Most mucormycosis cases (over 90%) are caused by *Rhizopus* spp., followed by *Mucor* spp., *Lichtheimia* spp., *Rhizomucor pusillus*, and, rarely, some other species (2, 9, 11, 16).

Definitive diagnosis of mucormycosis is usually made after histopathological proof of mucormycete-like hyphae in involved tissue; the causative agent can be determined only by culture (13). So far, no serological test is available and radiological methods are nonspecific.

Molecular detection of mucormycetes is complicated by several factors, and we still do not have any standard protocol. Few methods for the detection of mucormycetes have been published, and only some have been evaluated using clinical samples (1, 5, 10, 14, 15, 17) or samples from animal models (6, 7).

The aim of this study was to develop a rapid and sensitive technique for the detection and identification of clinically important mucormycetes. We adopted primers from a qualitative method previously published by Bialek et al. (1) that is specific for members of the order *Mucorales* targeting 18S ribosomal DNA (rDNA). We modified it to seminested real-time PCR with EvaGreen dye, followed by species distinction by high-resolution melt (HRM) analysis. HRM analysis uses amplification of DNA in the presence of intercalation dye. Fluorescence is measured during a controlled melting of PCR product that results in a melt curve that depends mainly on GC content, length, and sequence of the PCR product. This simple method

can be used for genotyping or mutation scanning without the need for time-consuming sequencing (4, 12).

DNA was isolated from 50 μ l of fungal culture (inoculum was prepared by covering sporulating colonies with approximately 2 ml of sterile 0.85% saline) or a piece of fresh tissue (2 by 1 mm) using the ZR fungal/bacterial DNA kit (Zymo Research). Tissue samples were incubated in lysis buffer overnight, and cultures were immediately processed according to the manufacturer's protocol. Disruption was extended to 15 min (Disruptor Genie; Scientific Industries). DNA from formalin-fixed, paraffin wax-embedded (FFPE) tissue samples was isolated from 2 or 3 scrolls (5 to 10 μ m each) of paraffin block using a DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). Paraffin was dissolved in 1 ml of xylene, and then the tissue was washed two times using 1 ml of 96% ethanol and incubated in 180 μ l of ATL buffer (Qiagen) and 20 μ l of proteinase K (600 mAU/ml solution, where one mAU represents the activity of proteinase K that releases folin-positive amino acids and peptides corresponding to 1 μ mol of tyrosine per min) at 55°C overnight and then at 90°C for 1 h. The next steps were done in accordance with the manufacturer's protocol. DNA isolation from clinical samples was done in a biological safety cabinet. An aliquot of sterile water was processed with each set of samples as a control of potential contamination during the isolation process.

Five microliters of DNA was amplified in 25 μ l of amplification mixture that contained a 0.2 μ M concentration each of primers ZM1 and ZM2 (1), 120 μ M deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; Roche, Germany), 2.5 mM MgCl₂, 1 \times GeneAmp PCR Gold buffer, and 1.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The cycling conditions were 10 min at 95°C, 16 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50°C, and 60 s at 72°C, and 7 min at 72°C. One microliter of PCR product from the external round was then amplified in duplicate using RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Twenty-five microliters of the amplification mixture contained a 0.4 μ M concentration each of primers ZM1 and ZM3 (1), 12.5 μ l of SensiMix HRM, and 1 μ l of EvaGreen (both from a SensiMix HRM kit; Quantace, United Kingdom). The cycling conditions

* Corresponding author. Mailing address: Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine—Hematology, University Hospital Brno, Cernopolni 9, 613 00 Brno, Czech Republic. Phone: 420532234641. Fax: 420532234623. E-mail: khrncirova@fnbrno.cz.

[†] Published ahead of print on 30 June 2010.

3.4.1.3. Annex 21

Lengerova M., Racil Z., Hrcirova K., Kocmanova I., Volfova P., Ricna D., Bejdak P., Moulis M., Pavlovsky Z., Weinbergerova B., Toskova M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):2824-2828. ISSN 0095-1137.

IF = 3,993 in 2014; MICROBIOLOGY Q1; 34 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

Rapid Detection and Identification of Mucormycetes in Bronchoalveolar Lavage Samples from Immunocompromised Patients with Pulmonary Infiltrates by Use of High-Resolution Melt Analysis

Martina Lengerova,^{a,b,c} Zdenek Racil,^{a,b,c} Kristyna Hrcirova,^a Iva Kocmanova,^d Pavlina Volfova,^a Dita Ricna,^a Petr Bejda,^a Mojmir Moulis,^e Zdenek Pavlovsky,^e Barbora Weinbergerova,^a Martina Toskova,^a Jiri Mayer^{a,b,c}

Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic^a; Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic^b; CEITEC—Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic^c; Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic^d; Department of Pathology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic^e

Rapid differential diagnostics of pulmonary infiltrates suspected of invasive fungal disease in an immunocompromised host and early initiation of effective antifungal therapy are crucial for patient outcomes. There are no serological tests available to detect mucormycetes; therefore, PCR-based methods are highly suitable. We validated our previously published PCR followed by high-resolution melt analysis (PCR/HRMA) to detect *Rhizopus* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Lichtheimia corymbifera*, and *Mucor* spp. in bronchoalveolar lavage (BAL) samples from immunocompromised patients who were at risk of invasive fungal disease. All PCR/HRMA-positive samples were retested using novel real-time quantitative PCR (RQ PCR) assays specific to the species identified. In total, between January 2009 and December 2012 we analyzed 99 BAL samples from 86 patients with pulmonary abnormalities using PCR/HRMA. Ninety (91%) BAL samples were negative, and 9 (9%) samples were positive. The sensitivity and specificity of PCR/HRMA were 100% and 93%, respectively. By combining the positive results of PCR/HRMA with positive RQ PCR results, the specificity was raised to 98%. PCR/HRMA, due to its high negative predictive value (99%), represents a fast and reliable tool for routine BAL sample screening for the differential diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients for the four most clinically important mucormycetes.

Invasive mucormycosis (IM), characterized by rapid progression, high morbidity, and mortality, is a serious infectious complication in patients with a hematological malignancy (1). More than 90% of cases are caused by *Rhizopus oryzae* (or *Rhizopus microsporus*), followed by *Mucor* species, *Lichtheimia corymbifera*, and *Rhizomucor pusillus* and rarely by some other mucormycetes (2, 3).

Early diagnosis and a prompt start of targeted IM antifungal therapy are crucial for successful patient outcomes. However, definitive diagnosis of these infections in routine clinical practice is very difficult, and the diagnosis is often not confirmed until there is histological proof of mucormycete-like elements in affected tissues or positive cultures (4, 5).

Contrary to invasive aspergillosis diagnosis, where a large number of attempts were made to detect galactomannan, both in serum and bronchoalveolar lavage (BAL) samples, no such serological test is available for mucormycetes. Even β -D-glucan, when used as a panfungal antigen, is negative in IM.

Therefore, one of the most promising tools for early mucormycete detection is the use of molecular methods, mainly various PCR modifications. Until now, only a limited number of mucormycete-specific PCR methods have been published. Moreover, only some of them allow the quantification of the fungal DNA load in samples (6–10), which can be important to differentiate between a real infection and contamination/colonization of the sample/patient.

We recently introduced a semiquantitative method for the specific detection of mucormycetes in tissue samples using high-resolution melt analysis (HRMA) (11). This method is based on amplification of DNA with specific primers in the presence of an intercalating dye. After PCR, the change in fluorescence is mea-

sured during controlled melting of the PCR product. The shape of the melting curve depends mainly on the GC content, length, and sequence of the PCR product. The ability of this method to detect and identify the most common pathogenic species has been proven in both cultures and tissue samples. Since this technique is very fast and suitable for routine testing, it might be an ideal tool for screening clinical samples from immunocompromised patients who are at risk of IM.

The most frequent manifestation of IM in this patient group is pulmonary disease; however, obtaining lung tissue samples (e.g., by fine-needle biopsy) can be accompanied by serious complications (bleeding and pneumothorax). Therefore, bronchoscopy with BAL is routinely used for the differential diagnosis of pulmonary abnormalities.

The aim of this study was to validate PCR/HRMA for the screening of BAL samples from hematological malignancy patients with pulmonary infiltrates and assess the clinical relevance of mucormycete detection in BAL. Moreover, we designed new species-specific real-time quantitative PCR (RQ PCR) assays for the most clinically relevant mucormycetes (*R. oryzae*, *R. microspo-*

Received 4 March 2014 Returned for modification 16 April 2014

Accepted 15 May 2014

Published ahead of print 21 May 2014

Editor: G. A. Lard

Address correspondence to Martina Lengerova, mlengerova@fnbrno.cz.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00637-14

3.4.1.4. Annex 22

Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol.* 2016;54(7):714-724. ISSN 2185-6486.

IF = 2,377 in 2016; INFECTIOUS DISEASES Q1, MYCOLOGY Q1, VETERINARY SCIENCES Q1; 24 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)



Original Article

Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis

Matej Bezdicek^{1,2}, Martina Lengerova^{1,2,3,*}, Dita Ricna^{1,2},
Barbora Weinbergerova^{1,2}, Iva Kocmanova⁴, Pavlina Volfova¹,
Lubos Drgona⁵, Miroslava Poczova⁶, Jiri Mayer^{1,2,3} and Zdenek Racil^{1,2,3}

¹Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ²Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ³CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ⁴Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ⁵Department of Oncohematology, Comenius University in Bratislava and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia and ⁶Department of Mycology, HPL Ltd., Bratislava, Slovakia

*To whom correspondence should be addressed. Martina Lengerova, Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Cernopolni 9, 613 00, Brno, Czech Republic, Tel: +420532234629; Fax: +420532234623; E-mail: mlengerova@fnbrno.cz

Received 25 January 2016; Revised 24 March 2016; Accepted 29 March 2016

Abstract

Despite advances in the treatment of invasive fungal diseases (IFD), mortality rates remain high. Moreover, due to the expanding spectrum of causative agents, fast and accurate pathogen identification is necessary. We designed a panfungal polymerase chain reaction (PCR), which targets the highly variable ITS2 region of rDNA genes and uses high resolution melting analysis (HRM) for subsequent species identification. The sensitivity and specificity of this method was tested on a broad spectrum of the most clinically important fungal pathogens including *Aspergillus* spp., *Candida* spp. and mucormycetes. Despite the fact that fluid from bronchoalveolar lavage (BAL) is one of the most frequently tested materials there is a lack of literature sources aimed at panfungal PCR as an IFD diagnostic tool from BAL samples. The applicability of this method in routine practice was evaluated on 104 BAL samples from immunocompromised patients. Due to high ITS region variability, we obtained divergent melting peaks for different fungal species. Thirteen out of 18 patients with proven or probable IFD were positive. Therefore, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of our method were 67%, 100%, 100%, and 94%, respectively. In our assay, fungal pathogens identification is based on HRM, therefore omitting the expensive and time consuming sequencing step. With the high specificity, positive and negative predictive values, short

3.3.1.5. Annex 23

Ricna D., Lengerova M., Bezdicek M., Kocmanova I., Drgona L., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR. *Folia microbiol.* 2019;64(3):421-428. ISSN 0015-5632.

IF = 1,730 in 2019; MICROBIOLOGY Q4, BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY Q4; 3 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)



Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR

Dita Ricna^{1,2} · Martina Lengerova^{1,2,3} · Matej Bezdicek^{1,2} · Iva Kocmanova⁴ · Lubos Drgona⁵ · Barbora Weinbergerova^{1,2} · Jiri Mayer^{1,2} · Zdenek Racil^{1,2}

Received: 26 June 2018 / Accepted: 29 November 2018 / Published online: 8 December 2018
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2018

Abstract

Rapid diagnostics of fungal pneumonia and initiation of appropriate therapy are still challenging. In this study, we used two panfungal assays to test bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples to prove their ability to confirm invasive fungal disease diagnosis and identify causative agents. Two methods targeting different fungal rDNA regions were used, and the obtained PCR products were sequenced directly or after cloning. In total, 106 BALF samples from 104 patients were tested. After sequencing, we obtained 578 sequences. Four hundred thirty-seven sequences were excluded from further analysis due to duplication ($n = 335$) or similarity with sequences detected in the extraction control sample ($n = 102$); 141 unique sequences were analyzed. Altogether, 23/141 (16%) of the fungi detected belonged to pathogenic species, and 63/141 (45%) were identified as various yeasts; a variety of environmental or very rare fungal human pathogens represented 29/141 (21%) of the total and 26/141 (18%) were described as uncultured fungus. Panfungal PCR detected fungal species that would be missed by specific methods in only one case (probable cryptococcosis). Panfungal PCR followed by sequencing has limited use for testing BALF samples due to frequent commensal or environmental fungal species pickup.

Introduction

The incidence of invasive fungal diseases (IFD) is increasing in immunocompromised hosts, especially in oncology patients and transplant recipients. Despite the expanding range of available antifungal drugs, these infections cause

considerable morbidity and mortality (Cordonnier et al. 2014). The fungal pathogens' timely detection is a prerequisite for successful therapy and for the clinical outcome in patients with IFD (Landlinger et al. 2010). The vast majority of IFD events are still caused by the genera *Candida* and *Aspergillus*; however, over the past decades, more cases caused by previously uncommon fungal genera (for example *Mucormycetes*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Trichosporon* spp.) have been reported (Richardson and Lass-Flörl 2008; Landlinger et al. 2010; Trubiano et al. 2016). Identification to the species level is essential to determine therapy, given the differences in antifungal agent susceptibility (Buitrago et al. 2013).

Conventional diagnostic tests such as radiological imaging, culture-based testing, and histological analyses have limitations in terms of sensitivity, specificity, and time to diagnosis. Moreover, serological assays for the galactomannan antigen (GM) and (1–3)- β -D-glucan (BG) cannot detect all fungal pathogens and have variable specificity, and negative results do not completely exclude an ongoing fungal infection (Pfeiffer et al. 2006; Alanio and Bretagne 2014).

Using polymerase chain reaction (PCR) to detect fungal DNA proved to be a promising tool for the rapid, sensitive, and accurate detection and identification of causative agents,

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12223-018-00669-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Martina Lengerova
Lengerova.Martina@fnbrno.cz

- ¹ Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic
- ² Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic
- ³ Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine - Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Cernoplni 9, 613 00 Brno, Czech Republic
- ⁴ Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic
- ⁵ Department of Oncohematology, Comenius University in Bratislava and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia

4. COVID-19 Among Immunocompromised Patients

COVID-19 Among General Population

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), stemming from the coronavirus SARS-CoV-2, was termed a pandemic after spreading from China to virtually the entire world in early 2020 [33]. This unprecedented disease has seriously affected global health, the social system, and the world economy. During the onset of the Czech Republic's first coronavirus pandemic wave, the head of the aspirant's department, Prof. MUDr. Jiří Mayer, initiated a prospective detailed telemonitoring cohort study questionnaire aimed at detailing COVID 19's clinical course in relation to viral load during early detection of complicating events among the general population. Generally, during that period, Czech outpatient care was significantly reduced, and no systematic care procedure was introduced for infected outpatients not requiring hospitalization. In accordance with government quarantine requirements, patients were divided into a "cohort with two negative tests" and a "cohort with a new algorithm" mandating a fortnightly quarantine without need for a negative test. The study did not show any definitive COVID-19 symptoms excepting anosmia or ageusia. Comorbidities and disparate characteristics did not significantly affect the disease course. Patients not requiring double PCR negativity possibly reported fewer symptoms. Our study emphasized the urgent need for routine telemonitoring to detect early complications, intensive widespread education, and notably the need to review and adjust quarantine regulations to better control the spread of SARS-CoV-2. Findings were published as an original article with applicant being primary author in a journal with IF listed in Annex 24 in Chapter 4.1.1.

COVID-19 Among Hematological Patients

Up to half of all immunocompromised patients with hematological malignancies are at high risk of developing severe COVID-19, and their risk of death is more than 20 times higher than the general population [34, 68, 69]. Furthermore, age, comorbidities, hematological disease status, prior treatment, and, last but not least, a high risk of secondary bacterial and fungal infections, including IFDs with high mortality, contribute to a severe progression among immunocompromised patients [70].

The applicant's workplace, coordinating with CELL, actively conveyed COVID-19 cases among patients with hematological malignancies to the international database EPICOVIDEHA, a worldwide project sponsored by EHA. In 2021, an extensive analysis of almost 4,000 episodes was published, describing infection course and prognosis depending on hematological

malignancy type and other modalities. Nearly two-thirds of patients developed severe / critical COVID-19, and a third of the patients died, mostly from COVID-19. However, mortality dropped significantly during the third wave compared to the second pandemic wave. The aspirant as co-author has contributed to a relevant publication listed in Annex 27 of Chapter 4.1.4.

A group of hematologic patients at high risk for the development of severe COVID-19 also includes patients treated with CAR-T owing to significant B-cell aplasia and late cytopenias without humoral response recourse to viral infections [71]. The EPICOVIDEHA study aim was to evaluate COVID-19 course in more than 450 patients treated with CAR-T in European centers. Severe infection occurred in two-thirds of patients and one-third died. Applicant has contributed as co-author to the publication listed in Annex 28 of Chapter 4.1.5.

SARS-CoV-2 infection can usually develop in a vaccinated individual without a sufficient immune response [72, 73]. Among hematological patients, those with chronic lymphocytic leukemia and lymphomas are at high risk. Aspirant participated in the EPICOVIDEHA prospective study reported worldwide evaluating COVID-19 in more than 100 fully or partially vaccinated patients with hematological malignancies. Overall mortality was nearly one-third that of the pre-vaccination era. Study results were published in an IF journal, where the applicant was a co-author (see Annex 29 in Chapter 4.1.6.).

COVID-19 Treatment Among Hematological Patients

Randomized trials have indicated a shorter recovery time among COVID-19 patients treated with remdesivir compared to placebo or standard therapy within the general population [74, 75]; death probability being higher in the placebo arm compared to remdesivir [74]; and patients with severe infection having a lower mortality rate with a 10 day vs. 5-day remdesivir course [76]. SARS-CoV-2 virus persistence with prolonged viable virus shedding and reinfection has been reported frequently in immunocompromised hematology patients [76-79]. Early administration of convalescent plasma (CP) with a high titer of virus neutralizing antibodies has also demonstrated efficacy in the general COVID-19 infected population [80]. Remdesivir treatment, including retreatment, possibly in combination with CP, has been substantiated as effective in immunocompromised hematology patients with prolonged COVID-19 pneumonia [81-82]. A particularly important aspect is the early initiation of remdesivir treatment, as significantly demonstrated by actual clinical practice in a retrospective study with a lower probability of death in patients treated within 9 days of the first COVID-19 onset [83].

In a retrospective study, we evaluated a total of 32 hematological patients managed at our department infected with SARS-CoV-2 and treated with a combination of remdesivir and CP with a high titer of virus-neutralizing antibodies. Early administration of combination therapy resulted in a two-thirds reduction in mortality compared to published data in hematology patients regardless of baseline COVID-19 pneumonia. Results were published crediting the aspirant as primary author within an impact journal (see Annex 25 in Chapter 4.1.2.).

At the beginning of 2021, randomized trial results evaluating the use of monoclonal antibodies neutralizing SARS-CoV-2 spike protein (NmAb) compared to placebo in outpatients in the general population detailed a significant reduction in viral load, outpatient visits, hospitalizations, and deaths related to COVID-19, with an excellent safety profile [84, 85]. Similar findings were obtained from retrospective case studies, including solid organ transplant patients and hematology patients [86-90]. During the time when administering the first NmAbs -- bamlanivimab and casirivimab / imdevimab – was possible in the Czech Republic, we initiated a prospective multicenter project analyzing early administration effectiveness in 88 COVID-19 infected hematological patients. Mortality rate was compared to a control cohort of 575 SARS-CoV-2-positive hematology patients untreated with any specific anti-COVID-19 therapy. Treatment results were quite positive - 80% of baseline asymptomatic patients remained asymptomatic throughout follow-up. Progression to severe / critical COVID-19 occurred in only 17% of cases. Mortality attributed to COVID-19 was significantly lower in NmAb-treated patients compared to a control cohort of untreated patients (6% vs. 16%, $p = 0.020$). The candidate's singularly-authored original report paper was published in an IF journal (Annex 26 in Chapter 4.1.3.).

The epidemiology, diagnosis, treatment, and prognosis of COVID-19 infection in immunocompromised patients are further detailed and discussed in the following journal publications with the applicant as an author or co-author (in chronological order), which are part of Chapter 4.1. Annexes to Chapter 4 (Annexes 24 to 29 arranged thematically):

- Weinbergerova B., Mayer J., Hrabovsky S., Novakova Z., Pospisil Z., Martykanova L., Hortova K., Mandelova L., Hejduk K., Chloupková R., Pospisil M., Doubkova M., Marek V., Novotna R., Dolecek M., Kubesova HM., Brat K., Parizkova R., Husa P., Mechl M., Kral Z., Lengerova M. COVID-19's natural course among ambulatory monitored outpatients. *Sci Rep.* 2021;11(1):10124. doi: 10.1038/s41598-021-89545-1. . ISSN 2045-2322. (see Annex 24 in Chapter 4.1.1.)

- Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Verga L., Víšek B., Ilhan O., Nadali G., Weinbergerová B., Córdoba-Mascuñano R., Marchetti M., Collins GP., Farina F., Cattaneo C., Cabirta A., Gomes-Silva M., Itri F., van Doesum J., Ledoux MP., Čerňan M., Jakšić O., Duarte RF., Magliano G., Omrani AS., Fracchiolla NS., Kulasekararaj A., Valković T., Poulsen CB., Machado M., Glenthøj A., Stoma I., Ráčil Z., Piukovics K., Navrátil M., Emarah Z., Sili U., Maertens J., Blennow O., Bergantim R., García-Vidal C., Prezioso L., Guidetti A., Del Principe MI., Popova M., de Jonge N., Ormazabal-Vélez I., Fernández N., Falces-Romero I., Cuccaro A., Meers S., Buquicchio C., Antić D., Al-Khabori M., García-Sanz R., Biernat MM., Tisi MC., Sal E., Rahimli L., Čolović N., Schönlein M., Calbacho M., Tascini C., Miranda-Castillo C., Khanna N., Méndez GA., Petzer V., Novák J., Besson C., Duléry R., Lamure S., Nucci M., Zambrotta G., Žák P., Seval GC., Bonuomo V., Mayer J., López-García A., Sacchi MV., Booth S., Ciceri F., Oberti M., Salvini M., Izuzquiza M., Nunes-Rodrigues R., Ammatuna E., Obr A., Herbrecht R., Núñez-Martín-Buitrago L., Mancini V., Shwaylia H., Sciumè M., Essame J., Nygaard M., Batinić J., Gonzaga Y., Regalado-Artamendi I., Karlsson LK., Shapetska M., Hanakova M., El-Ashwah S., Borbényi Z., Çolak GM., Nordlander A., Dragonetti G., Maraglino AME., Rinaldi A., De Ramón-Sánchez C., Cornely OA.; EPICOVIDEHA working group. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):168. doi: 10.1186/s13045-021-01177-0. ISSN 17568722. (see Annex 27 in Chapter 4.1.4.)
- Busca A., Salmanton-García J., Corradini P., Marchesi F., Cabirta A., Di Blasi R., Dulery R., Lamure S., Farina F., Weinbergerová B., Batinić J., Nordlander A., Lopez-Garcia A., Drgona L., Espigado I., Falces-Romero I., Garcia-Sanz R., Garcia-Vidal C., Guidetti A., Khanna N., Kulesekararaj A., Maertens J., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O., Pagano L. COVID-19 and CAR-T cells: current challenges and future directions-a report from the EPICOVIDEHA survey by EHA-IDWP. *Blood Adv.* 2022; 12;6(7):2427-2433. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005616. ISSN 2473-9537. (see Annex 28 in Chapter 4.1.5.)
- Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Lopez-Garcia A., Lamure S., Itri F., Gomes da Silva M., Dragonetti G., Falces-Romero I., van Doesum J., Sili U., Labrador

- J., Calbacho M., Bilgin Y., Weinbergerová B., Serrano Gomez LM., Ribera JM., Malak S., Loureiro-Amigo J., Glenthøj A., Cordoba R., Nunes Rodrigues R., Gonzalez-Lopez TJ., Karlsson LK., Jimenez MJ., Hernández-Rivas JÁ., Jaksic O., Racil Z., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O. COVID-19 in vaccinated adult patients with hematological malignancies. Preliminary results from EPICOVIDEHA. *Blood* 2022; 139(10):1588-1592. doi: 10.1182/blood.2021014124. ISSN 1528-0020. (see Annex 29 in Chapter 4.1.6.)
- Weinbergerova B., Mayer J., Kabut T., Hrabovsky S., Prochazkova J., Kral Z., Herout V., Pacasova R., Zdrzilova-Dubská L., Husa P., Bednar P., Ruzek D., Lengerova M. Successful early treatment combining remdesivir with high-titer convalescent plasma among COVID-19-infected hematological patients. *Hematol Oncol.* 2021; 39(5):715-720. doi: 10.1002/hon.2908. ISSN 1099-1069. (see Annex 25 in Chapter 4.1.2.)
 - Weinbergerová B., Demel I., Víšek B., Válka J., Čerňan M., Jindra P., Novák J., Stejskal L., Kováčsová F., Kabut T., Szotkowski T., Hájek R., Žák P., Cetkovský P., Král Z., Mayer J. Successful Early Use of Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Infected Hematological Patients – A Czech Multicenter Experience. *Hematol Oncol.* 2022; 40(2):280-286. doi: 10.1002/hon.2974. (see Annex 26 in Chapter 4.1.3.)

4.1. Annexes to Chapter 4

4.1.1. Annex 24

Weinbergerova B., Mayer J., Hrabovsky S., Novakova Z., Pospisil Z., Martykanova L., Hortova K., Mandelova L., Hejduk K., Chloupková R., Pospisil M., Doubkova M., Marek V., Novotna R., Dolecek M., Kubesova HM., Brat K., Parizkova R., Husa P., Mechl M., Kral Z., Lengerova M. COVID-19's natural course among ambulatory monitored outpatients. *Sci Rep.* 2021;11(1):10124. doi: 10.1038/s41598-021-89545-1. ISSN 2045-2322.

IF = 4,38 in 2020; MULTIDISCIPLINARY SCIENCES Q1; 1 citation according to WOS or Scopus, without self-citation



OPEN COVID-19's natural course among ambulatory monitored outpatients

Barbora Weinbergerova^{1,12}, Jiri Mayer^{1,12}, Stepan Hrabovsky¹, Zuzana Novakova¹, Zdenek Pospisil², Lucie Martykanova^{3,4}, Katerina Hortova³, Lucie Mandelova³, Karel Hejduk^{3,4}, Renata Chloupkova^{3,4}, Michal Pospisil⁵, Martina Doubkova⁶, Vladimir Marek⁷, Renata Novotna⁸, Martin Dolecek⁹, Hana Matejovska Kubesova⁷, Kristian Brat⁵, Radana Parizkova¹⁰, Petr Husa¹⁰, Marek Mech¹¹, Zdenek Kral¹ & Martina Lengerova¹

Research objective was to detail COVID-19's natural trajectory in relation to the Czech population's viral load. Our prospective detailed daily questionnaire-based telemonitoring study evaluated COVID-19's impact among 105 outpatients. In accordance with government quarantine requirements, outpatients were divided into a cohort with two negative tests at the end of the disease (40 patients) and a cohort with a new algorithm (65 patients) following a 14-day quarantine. Median follow-up differed significantly between the 2 groups (23 days vs. 16 days). Only 6% of patients were asymptomatic during the entire telemonitoring period. Another 13% of patients were diagnosed asymptomatic, as suspected contacts, yet later developed symptoms, while the remaining 81% were diagnosed as symptomatic on average 6 days following symptom onset. Telemonitoring enabled precise symptom status chronicling. The most frequently reported complaints were fevers, respiratory issues, and anosmia. Six patients were eventually hospitalized for complications detected early after routine telemonitoring. During the extended follow-up (median 181 days), anosmia persisted in 26% of patients. 79% of patients in the new quarantine algorithm cohort reported no symptoms on day 11 compared to just 56% of patients in the two negative test cohort upon first testing negative (median–19 days). The highest viral load occurred within 0–2 days of initial symptom onset. Both the PCR viral load and two consecutive PCR negative sample realizations indicated high interindividual variability with a surprisingly fluctuating pattern among 43% of patients. No definitive COVID-19 symptoms or set of symptoms excepting anosmia (59%) and/or ageusia (47%) were identified. No preexisting medical conditions specifically foreshadowed disease trajectory in a given patient. Without a PCR negativity requirement for quarantine cessation, patients could exhibit fewer symptoms. Our study therefore highlights the urgent need for routine ambulatory patient telemedicine monitoring, early complication detection, intensive mass education connecting disease demeanor with subsequent swift diagnostics, and, notably, the need to reevaluate and modify quarantine regulations for better control of SARS-CoV-2 proliferation.

¹Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ²Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ³Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. ⁴Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ⁵Department of Nursing and Midwifery, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ⁶Department of Respiratory Diseases, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ⁷Department of Internal Medicine, Geriatrics and Practical Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ⁸General Practitioner's Office, Berkova 2390/107, 61200 Brno, Czech Republic. ⁹Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ¹⁰Department of Infectious Diseases, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ¹¹Department of Radiology and Nuclear Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ¹²These authors contributed equally: Barbora Weinbergerova and Jiri Mayer. ✉email: Weinbergerova.Barbora@fnbrno.cz

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), triggered by coronavirus SARS-CoV-2, is a novel disease that spread from China to virtually the entire world in early 2020^{1,2}. This unprecedented disease has seriously impacted global health, social dictums, and worldwide economics, resulting in a great number of articles being published describing pathogenesis, diagnostics, clinical course, treatment, and vaccine development^{3–12}. Despite the degree of knowledge, many concerns remain, especially in the area targeting the natural course of the disease. An exact description of individual symptoms and their duration is still lacking^{3–7,12–13}. Concurrently, working with imprecise data has led to article retractions, even from prestigious journals¹⁴.

Initial clinical trials from China and Italy recorded an alarmingly high rate of severe pneumonia caused by SARS-CoV-2^{17,18}. Additional studies describe pulmonary infiltrates in asymptomatic patients^{19–22}. It seems probable that the disease may have a dissimilar course among divergent races²³. Autopsy investigations indicate evidence of the virus affecting a wide range of different organs, causing a number of serious complications²⁴. Certain risk factors increasing the likelihood of a serious disease course have recently been identified²⁵.

Our prospective cohort study was developed during the first wave of the coronavirus pandemic in the Czech Republic when there was a demand to delineate the clinical picture of a disease decimating the Czech population. Czech outpatient care had generally been significantly reduced, and no systematic care procedure was established for COVID-19 positive outpatients not requiring hospitalization. Patients had been advised to call an emergency service if and when their health was deteriorating.

In an emergency situation, sophisticated telemedicine is of great importance for healthcare²⁶. During the coronavirus pandemic, its significance became clearly evident. Moreover, for successful pandemic management, goals must include effective education and citizen cooperation coordinated by supportive state governing bodies.

Our objectives were as follows:

1. To map in detail the natural course of the disease in selected Czech patients who were primarily ambulatory monitored in-home care, not requiring admission to the hospital at the time of diagnosis. Telemedicine and protocol-based management with the guidance of professional healthcare specialists were employed.
2. To detect early imminent disease complications with a specific focus on pneumonia, which could be underestimated by patients without regular telemonitoring and implementation of rapid diagnostics and treatment.
3. To describe viral load kinetics in relation to the spectrum of clinical symptoms.
4. To develop a simple model algorithm for telemedicine monitoring, which could become a national standard for general practitioners.

Methods

Study population. Our prospective observational standardized study "COVID-IMK-20" recruitment period was ongoing from April 20, 2020 to September 2, 2020. Participation was offered to all adults who encountered our mobile testing location at the University Hospital. Study project was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Brno (Number 01-130520/EK). All research was undertaken in accordance with relevant guidelines and regulations. All patients signed an informed consent form.

Monitoring schedule. All outpatients were monitored daily, immediately following their first SARS-CoV-2 positivity, via a predefined questionnaire (see Supplementary Appendix 1 in Supplementary Information). Later, if conditions stabilized, monitoring intervals could be prolonged. In total, incidence and duration of 18 disease symptoms were recorded. Importantly, we also included symptoms present prior to patient's diagnostic polymerase chain reaction (PCR) test. Phone interviews were conducted by two workers with medical education backgrounds. If health conditions deteriorated during our follow-up (e.g. respiratory distress with suspicion of COVID-19 pneumonia), patients would be contacted by one of the University Hospital Brno study team's three physicians, who evaluated severity status and potential need for further examination and/or hospitalization.

Although our comprehensive project was designed for one year of inclusive patient clinical and immunological follow-up, primary analysis focused on acute symptom initial phase evaluations. Nonetheless, patient telemonitoring continued until quarantine was completed in accordance with Ministry of Health regulations. During the initial period from 20 April 2020 to 7 July 2020, a 14-day quarantine was required after the first positive PCR test and consequently terminated after patients exhibited no symptoms for at least 3 consecutive days and twice tested negative with PCR tests performed minimally 24 h apart²⁷. During study enrollment, government regulations were revised on July 8, 2020, when patients, following a minimum 14-day quarantine including at least 4 asymptomatic days prior to quarantine termination would be considered non-infectious without the need for PCR test negativity²⁸.

A descriptive analysis was initially performed on all outpatients ($n = 105$) and then separately for 2 divided cohorts: "Cohort with Two Negative Tests" enrolled through 7 July 2020 vs. "Cohort with New Algorithm" participating from 8 July 2020. During our initial study phase, symptom length was evaluated only among the first cohort with two negative tests, whereas symptom duration assessment in the new algorithm cohort was deemed immaterial owing to limited monitoring capacity. Subsequently, we recorded symptom duration throughout extended monitoring. Regarding time classification of patient symptoms, day 0 was determined either as the day of initial symptom onset or the time of first positive sample, whichever came first. Our patient selection algorithm is summarized in Fig. 1.

SARS-CoV-2 detection. Viral RNA was extracted from 300 μ l of a nasopharyngeal swab sample in a viral transport medium using the LabTurbo Viral DNA/RNA Mini Kit (Taigen Bioscience, Taiwan). Reverse transcription PCR was conducted with gb SARS-CoV-2 Multiplex (Generi Biotech, Czech Republic) according to manufacturers' instructions. Result was considered valid only when cycle threshold (Ct) value of the reference

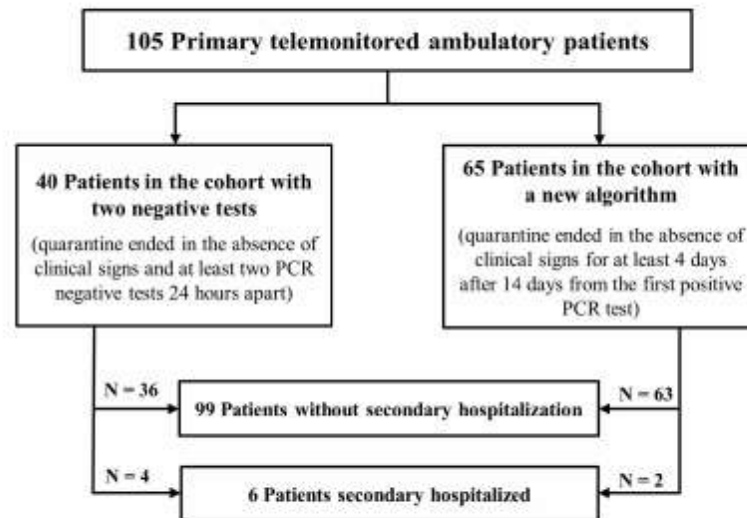


Figure 1. Diagram of patient selection algorithm for the analysis, which aims to describe symptoms in ambulatory monitored outpatients. PCR polymerase chain reaction.

gene was ≤ 38.0 . Result was considered positive when both target genes (E and RdRP) were detected. If only one of the target genes was positive, the sample was reanalyzed. Samples with a Ct value ≥ 50.0 were interpreted as negative. The viral elimination course was evaluated only in the cohort with two negative tests, and for this particular analysis, each patient's day 0 was determined as the day of the first positive sample.

Statistical analysis. Basic statistical methods describing absolute and relative frequency for categorical variables, mean and median, supplemented by minimum and maximum for continuous variables, respectively, were used. Categorical parameters relation was evaluated using Pearson's Chi-squared and Fisher's exact tests. Continuous variables were compared using Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis rank sum test. For all analyses, $\alpha = 0.05$ was used as a level of statistical significance, unless otherwise stated. For statistical analysis, software R version 3.5.2 was used. Non-linear dependencies of variables were visualized by the nonparametric regression curves obtained using the Gaussian kernel. For the circular visualization of symptoms' co-occurrence, the package "Circlize version 0.4.11" was used.

Results

In the Czech Republic, a total of 558,650 unique patients were tested via nasopharyngeal swab during our study, and 19,004 (3%) were deemed COVID-19 positive, engendering a 5.9% hospitalization rate and 1.3% fatality rate²⁹. Initially, our study recruitment was very successful with significant participation. Enrollment dropped dramatically, however, as the first wave of infections subsided in the Czech Republic, and fewer medical students were available at mobile sampling points to explain study principles and advantages. Study involvement later accelerated in the second half of August 2020, when numbers of infected people notably increased. At the University Hospital, during the study period, SARS-CoV-2 positivity was detected in 5% ($n = 594$) of 11,469 examined patients, and 87% ($n = 517$) were COVID-19 positive outpatients. In total, 105 outpatients (20% of University Hospital's COVID-19 positive outpatients) agreed to participate in our study. A total of 1223 phone interviews were conducted (mean 12; median 11; min 1, max 25).

Demography and comorbidities. Among 105 cohort outpatients, the mean age was 40 years with slightly more women (52%). Eighty-four (80%) patients had some comorbidity with the following frequency breakdown: $n = 1$, 37%; $n = 2$, 24%; $n = 3$, 8%; $n = 4$, 5%; $n = 5$, 5%; $n = 6$, 1%, with the most frequent being allergy (43%) and hypertension (24%), (Tables 1, 2). No significant difference was recorded between the two negative test cohort (40 patients; 38%) and the new algorithm cohort (65 patients; 62%) with regard to baseline characteristics and comorbidities (Table 1).

Secondary hospitalized outpatients. A telephone interview conducted by a doctor was necessary for 10 (10%) outpatients, from which 7 (7%) required examination and six (6%) were eventually hospitalized with a 7 day median following diagnostic test and a 4 day median hospital stay (Table 3). The male majority (83%) of hospitalized patients were admitted to the hospital with a median age of 56 years and a median of 2 comor-

N (%)		Total	Cohort		p-value
			Two negative tests	New algorithm	
Number of patients		105 (100)	40 (38.1)	65 (61.9)	NA
Gender	Male	50 (47.6)	20 (50.0)	30 (46.2)	0.841
	Female	55 (52.4)	20 (50.0)	35 (53.8)	
Age	Mean; median (min-max)	40; 37 (18-78)	39; 39 (18-64)	41; 37 (18-78)	0.078
	< 30	30 (28.6)	14 (35.0)	16 (24.6)	
	30-40	28 (26.7)	7 (17.5)	21 (32.3)	
	40-50	18 (17.1)	8 (20.0)	10 (15.4)	
	50-60	16 (15.2)	9 (22.5)	7 (10.8)	
	≥ 60	13 (12.4)	2 (5.0)	11 (16.9)	
Weight (kg)	Mean; median (min-max)	79; 77 (42-140)	78; 80 (46-130)	79; 76 (42-140)	0.908
Height (cm)	Mean; median (min-max)	173; 175 (150-198)	172; 174 (156-192)	174; 175 (150-198)	0.385
Body mass index	Mean; median (min-max)	26.1; 24.9 (17.5-52.1)	26.3; 24.8 (18.4-38.9)	25.9; 25.0 (17.5-52.1)	0.644
Comorbidities	Diabetes mellitus	7 (6.7)	2 (5.0)	5 (7.7)	0.706
	Hypertension	25 (23.8)	9 (22.5)	16 (24.6)	0.999
	Smoking	13 (12.4)	8 (20.0)	5 (7.7)	0.074
	Oncological disease	11 (10.5)	6 (15.0)	5 (7.7)	0.326
	Autoimmune disease	6 (5.7)	4 (10.0)	2 (3.1)	0.198
	Allergy	45 (42.9)	14 (35.0)	31 (47.7)	0.228
	Other	45 (42.9)	16 (40.0)	29 (44.6)	0.688
	Time from the first positive symptom to the first positive sampling (days)*	Mean; median (min; max)	6.1; 4.0 (0.0; 36.0)	6.8; 4.0 (0.0; 36.0)	5.7; 4.0 (0.0; 32.0)
Thermometer type used	Mercury	27 (42.9)	13 (52.0)	14 (36.8)	0.254
	Digital	23 (36.5)	7 (28.0)	16 (42.1)	
	Not specified	13 (20.6)	5 (20.0)	8 (21.1)	
Length of telemonitoring	Mean; median (min; max)	18.4; 14.0 (0.0; 54.0)	22.7; 19.5 (7.0; 54.0)	15.7; 12.0 (0.0; 44.0)	0.001

Table 1. Characteristics of outpatients enrolled in the study. *Only patients with any symptom at the time of sampling included (i.e. without 14 asymptomatic patients at the time of sampling).

bidities. Symptom frequency and median duration were as follows: Fever (83%; 9 days), dyspnea (67%; 2 days), cough (67%; 6 days), and diarrhea (33%; 1 day). In relation to COVID-19, pneumonia mandated hospitalization in 2 patients, diarrhea in 2 patients, atypical thoracalgia in 1 patient, and dyspnea with fever in 1 patient. We evaluated the disease course as mild in 4 patients and moderate in 2 patients. One patient was treated with remdesivir and one patient with a combination of hydroxychloroquine and azithromycin. No patient died. Table 3 provides a detailed description of secondary hospitalized outpatients.

For suspected pneumonia, a 50-year-old obese woman with dyspnea and cough from the two negative test cohort underwent chest computer tomography. There was no pulmonary pathological finding apart from solitary cervical lymphadenopathy. After symptoms persisted for 38 days and PCR test result was negative, further diagnostic procedures were performed. Eventually, Castleman disease turned out to be the reason for persistent clinical symptoms.

COVID-19 outpatient symptomatology. Among 99 (94%) of symptomatic outpatients, symptom median number was 7 (mean 7.0; min 0, max 17). During diagnostic test sampling, 14 (13%) patients were pre-symptomatic and developed some symptoms during disease progression. Only 6 (6%) of outpatients were completely asymptomatic throughout the episode. All evaluated symptoms are shown in Table 4. Time distribution of symptoms is detailed in Table 5.

COVID-19 symptom frequency. Regarding symptom incidence, most common reported symptoms were: General symptoms of respiratory tract infection (RTI) (71%), fatigue (65%), fever (60%) with a median of 37.6 °C, anosmia (59%), headache (58%), musculoskeletal pain (55%), ageusia (47%), and dry cough (43%) (Table 4). Females reported a higher frequency of anosmia (66% vs. 52%; $p=0.172$) as well as younger patients (median age of patients with anosmia vs. without anosmia was 34 vs. 47 years; $p=0.016$). Other less frequent symptoms were noted in Table 6.

Length of COVID-19 symptoms. Evaluated only in the two negative tests cohort, the shortest duration of symptoms with a median of up to 5 days included fever, headache, musculoskeletal pain, diarrhea, anorexia, tachypnea, thoracalgia, and abdominal pain. Conversely, breathing difficulties, general RTI symptoms, dry and wet cough, dyspnea, shortness of breath, anosmia, and ageusia had a longer median duration exceeding 10 days (Table 4). During telemonitoring termination owing to double PCR negativity, certain symptoms still persisted

Other comorbidities*	N	%
Hypercholesterolemia	6	5.7
Arrhythmias, tachycardia, carditis	5	4.8
Mental illness	5	4.8
Thyroid hypofunction	4	3.8
Asthma bronchiale	3	2.9
Gastroesophageal reflux	2	1.9
Acute gouty arthritis	2	1.9
Unspecified venous disorders	2	1.9
Leg ulcers	1	1.0
Spinal dysraphism	1	1.0
Epilepsy	1	1.0
Chronic pancreatitis	1	1.0
Anemia	1	1.0
Intermittent hepatopathy	1	1.0
Oesophageal hernia	1	1.0
Mononucleosis	1	1.0
Colostomy	1	1.0
Nephrostomy	1	1.0
Migraine	1	1.0
Obesity	1	1.0
Molds (feet, hands)	1	1.0
Chronic rhinitis	1	1.0
Polycystic ovaries	1	1.0
Coagulopathy	1	1.0
Raynaud's phenomenon	1	1.0
Neuropathy	1	1.0
Duodenal ulcer	1	1.0
Hemicolectomy	1	1.0
Hepatitis B	1	1.0
Gluten intolerance	1	1.0
Prostate disease	1	1.0
Leukopenia	1	1.0
Pulmonary embolism	1	1.0
Artificial heart valve	1	1.0
Other	4	3.8

Table 2. Fifty-nine other comorbidities in 45 outpatients. *One patient may have had multiple comorbidities.

in 41% of patients. Regarding comparison of the length of anosmia and ageusia between the two outpatient cohorts, we observed a longer median duration of both symptoms in the cohort with two negative tests (anosmia 26 days vs. 9 days; $p = 0.039$; ageusia 26 days vs. 8 days; $p = 0.242$, respectively) (Fig. 2).

Time distribution of COVID-19 symptoms. In terms of symptom time distribution related to disease onset, fever, headache and musculoskeletal pain, practically appeared at median day zero from disease onset. Subsequent symptoms comprising dry and wet cough, general RTI symptoms, diarrhea, anorexia, breathing difficulties, and tachypnea were later reported with a median of 1–2 days following disease onset. Finally, late symptoms with a median onset of more than 2 days involved anosmia, ageusia, abdominal pain, dyspnea, and shortness of breath (Table 5). Symptom termination time also varied. Certain symptoms disappeared median 10 days after disease onset (fever, headache, musculoskeletal pain, diarrhea, anorexia, tachypnea), while most symptoms lasted more than median 11 days following disease onset (anosmia, ageusia, dry and wet cough, general RTI symptoms, abdominal pain, dyspnea, breathing difficulties, and shortness of breath).

Co-occurrence of clinical symptoms. We recognized a statistically significant ($p < 0.001$) link between anosmia and ageusia, fever and wet cough, musculoskeletal pain and wet cough, general RTI symptoms and ageusia, diarrhea and abdominal pain, and breathing difficulties with dyspnea. The co-occurrence of clinical signs is recorded in Figs. 3 and 4.

ID no	Sex	Age (years)	Days to admission from 1st positivity	Length of hospitalization (days)	Comorbidity	Reason of hospitalization	No of febrile days	Pneumonia	COVID-19 severity	Comment
2	M	65	6	4	Metabolic syndrome	Thoracalgia	13	No	Mild	Therapy: HCQ + AZM
16	F	27	4	4	Bronchial asthma	Fever, diarrhea	1	No	Mild	-
23	M	34	5	2	GERD	Dyspnea, epigastric pain, diarrhea	NA	No	Mild	-
57	M	52	14	13	Metabolic syndrome, CRC, sigmoidoscopy, bilateral nephrostomy for nephrolithiasis	Dyspnea, fever, nephrostomy obstruction	1	No	Mild	Therapy: ATB
65	M	60	7	4	AHT, HLP	Fever, dyspnea, cough	9	Yes	Moderate	
120	M	66	10	9	AHT, PE, hyperuricemia	Fever, dyspnea, cough	10	Yes	Moderate	Therapy: RDV + DEX + ATB

Table 3. Baseline characteristics of 6 outpatients with SARS-CoV-2 positivity during secondary hospitalization. SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, ID no identification number, COVID-19 coronavirus disease-19, GERD gastroesophageal reflux disease, AHT arterial hypertension, NA not applicable, DEX dexamethasone, ATB antibiotics, RDV remdesivir, HCQ hydroxychloroquine, AZM azithromycin, CRC colorectal carcinoma, HLP hyperlipidemia, PE pulmonary embolism.

Type of symptom	All outpatients	Cohort with two negative tests		Cohort with new algorithm	p-value
	N (%)	N (%)	Duration (days) mean; median (min-max)	N (%)	
Any clinical symptom	99 (94.3)	37 (92.5)	NA	56 (95.4)	0.672
Fever ≥ 37 °C	63 (60.0)	25 (62.5)	8.0; 5.0 (1.0-42.0)	38 (58.5)	0.838
Dry cough	45 (42.9)	19 (47.5)	16.4; 12.0 (1.0-55.0)*	26 (40.0)	0.543
Wet cough	42 (40.0)	15 (37.5)	13.5; 14.0 (2.0-26.0)*	27 (41.5)	0.838
Respiratory tract infection signs	74 (70.5)	27 (67.5)	15.8; 10.0 (2.0-56.0)*	47 (72.3)	0.662
Agexia	49 (46.7)	19 (47.5)	23.4; 28.0 (2.0-55.0)*	30 (46.2)	1.0
Anosmia	62 (59.0)	23 (57.5)	24.2; 26.0 (2.0-55.0)*	39 (60.0)	0.840
Headache	61 (58.1)	22 (55.0)	8.1; 5.0 (1.0-31.0)*	39 (60.0)	0.686
Musculoskeletal pain	58 (55.2)	18 (45.0)	9.7; 5.0 (1.0-54.0)	40 (61.5)	0.110
Diarrhea	21 (20.0)	10 (25.0)	4.2; 2.0 (1.0-22.0)	11 (16.9)	0.327
Abdominal pain	12 (11.4)	7 (17.5)	2.9; 2.0 (1.0-7.0)	5 (7.7)	0.205
Anorexia	40 (38.1)	14 (35.0)	7.8; 5.0 (1.0-37.0)	26 (40.0)	0.682
Vomiting	1 (1.0)	0 (0.0)	NA	1 (1.5)	NA
Breath difficulties	14 (13.3)	8 (20.0)	13.9; 7.0 (2.0-55.0)*	6 (9.2)	0.143
Dyspnea	10 (9.5)	4 (10.0)	23.0; 16.0 (5.0-55.0)*	6 (9.2)	1.0
Shortness of breath	3 (2.9)	1 (2.5)	17.0; 17.0 (17.0-17.0)*	2 (3.1)	1.0
Tachypnea	3 (2.9)	2 (5.0)	3.5; 3.5 (2.0-5.0)	1 (1.5)	0.556
Thoracalgia	13 (12.4)	8 (20.0)	12.3; 5.0 (2.0-52.0)*	5 (7.7)	0.074
Dry skin	1 (1.0)	1 (2.5)	19; 19 (19.0-19.0)*	0 (0)	0.381
Other symptoms	76 (72.4)	24 (60.0)	NA	52 (80.0)	0.042

Table 4. Incidence and duration of COVID-19 symptoms in outpatients. COVID-19 coronavirus disease-19, NA not applicable. *Symptom continued on the last phone call at least in one patient. Telemonitoring was ended due to double PCR negative testing.

Association between symptoms and comorbidities. We analyzed the relationship between patients' characteristics and comorbidities with the number of symptoms. In general, a linear relationship appeared between a higher number of comorbidities and a higher number of symptoms ($p=0.209$) (Fig. 5). However, neither an older age ($p=0.077$), female gender ($p=0.254$), diabetes mellitus ($p=0.129$), cancer ($p=0.699$), nor allergies ($p=0.171$) were determined statistically significantly correlated with the number of disease symptoms. Patients exhibiting fewer symptoms were those with a higher BMI ($p=0.370$) and, surprisingly, smokers ($p=0.096$), although this relationship was statistically insignificant. Hypertension did not affect the symptom number ($p=0.548$), but

Type of symptom	All outpatients		Cohort with two negative tests	
	Start (days) Mean; median (min-max)	Stop (days) Mean; median (min-max)	Start (days) Mean; median (min-max)	Stop (days) Mean; median (min-max)
Fever ≥ 37 °C	2.4; 0.0 (0.0–39.0)	9.4; 5.0 (1.0–42.0)	1.7; 0.0 (0.0–23.0)	9.7; 6.0 (1.0–42.0)
Dry cough	3.2; 1.0 (0.0–29.0)	16.5; 13.0 (2.0–56.0)*	1.5; 0.0 (0.0–11.0)	18.0; 14.0 (2.0–56.0)*
Wet cough	5.6; 2.0 (0.0–35.0)	15.9; 16.0 (3.0–44.0)*	6.1; 1.0 (0.0–35.0)	19.6; 20.0 (6.0–37.0)*
Respiratory tract infection signs	3.0; 1.0 (0.0–26.0)	14.5; 11.0 (3.0–56.0)*	3.4; 1.0 (0.0–26.0)	19.3; 16.0 (4.0–56.0)*
Agonia	4.6; 4.0 (0.0–27.0)	19.2; 15.0 (4.0–56.0)*	3.0; 2.0 (0.0–14.0)	26.4; 26.0 (6.0–56.0)*
Anosmia	4.5; 4.0 (0.0–27.0)	20; 17.0 (3.0–56.0)*	3.1; 4.0 (0.0–14.0)	27.3; 26.0 (8.0–56.0)*
Headache	3.3; 0.0 (0.0–48.0)	10.7; 9.0 (2.0–56.0)*	5.8; 1.0 (0.0–48.0)	13.9; 11.0 (2.0–56.0)*
Musculoskeletal pain	2.1; 0.0 (0.0–22.0)	10.2; 7.0 (2.0–55.0)	2.2; 0.0 (0.0–16.0)	11.8; 9.0 (2.0–55.0)
Diarrhea	4.7; 2.0 (0.0–24.0)	9.3; 5.0 (2.0–32.0)	6.5; 2.5 (0.0–24.0)	10.7; 5.0 (2.0–32.0)
Abdominal pain	9.0; 9.5 (0.0–24.0)	14.7; 14.0 (4.0–33.0)	8.7; 9.0 (1.0–24.0)	11.6; 11.0 (4.0–27.0)
Anorexia	4.4; 1.0 (0.0–30.0)	11.9; 10.0 (3.0–38.0)	3.9; 0.5 (0.0–24.0)	11.7; 9.0 (3.0–38.0)
Vomiting	1.0; 1.0 (1.0–1.0)	3.0; 3.0 (3.0–3.0)	NA	NA
Breath difficulties	5.1; 1.5 (0.0–22.0)	16.1; 13.5 (5.0–56.0)*	3.4; 1.0 (0.0–14.0)	17.3; 13.5 (6.0–56.0)*
Dyspnea	8.3; 5.5 (0.0–29.0)	20.8; 15.0 (7.0–56.0)*	0.75; 0.5 (0.0–2.0)	23.8; 16.0 (7.0–56.0)*
Shortness of breath	10.7; 10.0 (0.0–22.0)	19.0; 17.0 (15.0–25.0)*	0.0; 0.0 (0.0–0.0)	17.0; 17.0 (17.0–17.0)*
Tachypnea	8.7; 2.0 (2.0–22.0)	12.0; 7.0 (4.0–25.0)	2.0; 2.0 (2.0–2.0)	5.5; 5.5 (4.0–7.0)
Thoracalgia	7.2; 6.0 (0.0–28.0)	16.1; 11.0 (6.0–53.0)*	6.3; 1.5 (0.0–28.0)	18.5; 12.5 (6.0–53.0)*
Dry skin	37; 37 (37.0–37.0)	56; 56 (56.0–56.0)*	37; 37 (37.0–37.0)	56; 56 (56.0–56.0)*

Table 5. Symptoms' onset during COVID-19. For each patient, day 0 was determined either as the day of first symptom onset, or the day of the first positive sample, whichever came first, although the majority of patients generally had symptoms before the first positive test (see Fig. 6). Six completely asymptomatic patients are not included in this Table. COVID-19 coronavirus disease-19, NA not applicable. *Symptom continued on the last phone call at least in one patient. Telemonitoring was ended due to double PCR negative testing.

Symptom	N ^o	% from all outpatients
Fatigue	68	64.8
Eye pain	14	13.3
Nausea	12	11.4
Excessive sweating	11	10.5
Dizziness	8	7.6
Chills	8	7.6
Stuffy nose	6	5.7
Bad taste in the mouth	4	3.8
Burning nose	4	3.8
Conjunctivitis	4	3.8
Sneezing	3	2.9
Dry mouth	3	2.9
Burning eyes	2	1.9
Pruritus	2	1.9
Stomach pain	1	1.0
Swollen nodes	1	1.0
Herpes	1	1.0
Sparse stools	1	1.0
Head pressure	1	1.0
Tremor	1	1.0

Table 6. Incidence of other COVID-19 symptoms in 76 outpatients. COVID-19 coronavirus disease-19. *One patient may have had multiple symptoms.

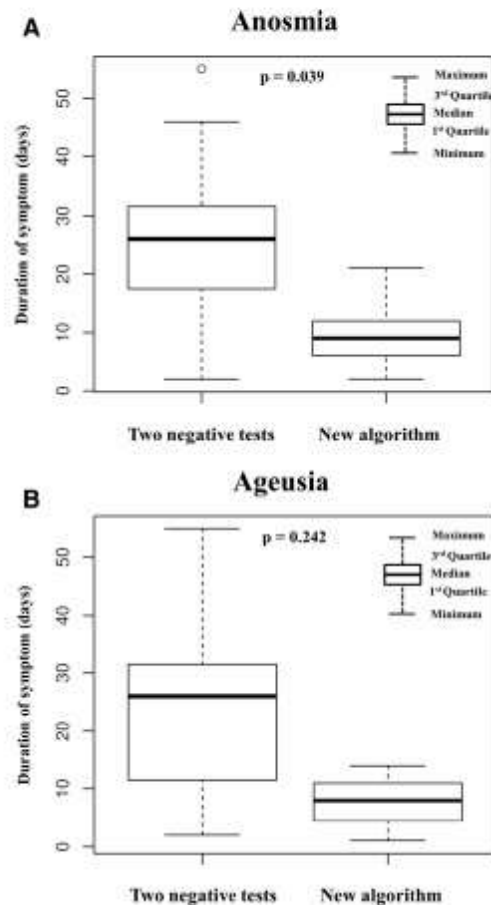


Figure 2. (A) Anosmia duration in the cohort with two negative tests and the cohort with new algorithm. The box plots show anosmia duration in 23 patients in the cohort with two negative tests vs. 36 patients in the cohort with new algorithm. Three patients with a more severe disease course and longer follow-up for other objective complications were excluded from the new algorithm cohort. The small circle at the top of the graph marks an outlier. (B) Ageusia duration in the cohort with two negative tests and the cohort with new algorithm. The box plots show ageusia duration among 19 patients in the cohort with two negative tests vs. 27 patients in the cohort with new algorithm. Three patients with a more severe disease course and longer follow-up for objective complications were excluded from the new algorithm cohort.

anosmia incidence was higher in patients without arterial hypertension compared to patients having this comorbidity (40% vs. 65%; $p = 0.036$). There was no link between hypertension and ageusia presence. Neither anosmia nor ageusia were influenced by diabetes mellitus presence.

Sensory disorders with extended follow-up. By October 31, 2020, we had completed a detailed reassessment of sensory disorder incidence over time in our two negative test cohort with a median follow-up of 181 days (Table 7). Total median for anosmia and ageusia length was 32 days and 21 days, with persisting symptoms in 26% and 5% of outpatients, respectively. At the time of second negative SARS-CoV-2 PCR testing, anosmia and ageusia were present in almost half (48%) and a quarter of the outpatients (21%), respectively.

Incidence of COVID-19 symptoms during extended follow-up. Although our analysis primarily focused on the initial phase of evaluating acute symptoms, we assessed the incidence of COVID-19 symptoms in outpatients during an extended monitoring study phase with a median follow-up of 219 days, which is detailed in Table 8.

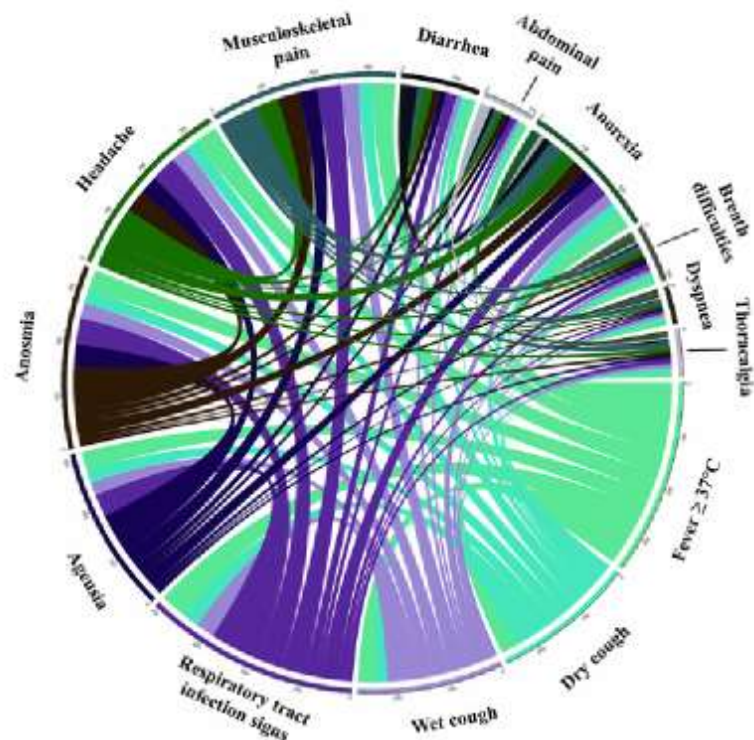


Figure 3. The frequency and co-occurrence of COVID-19 symptoms in outpatients. Circular visualization showing the frequency of symptoms' co-occurrence. Arc length corresponds to the frequency of symptoms, whereas the width of the ribbons between 2 symptoms shows the frequency of co-occurrence. Only symptoms co-occurring in more than three patients were included.

SARS-CoV-2 viral load. A total of 105 diagnostic (i.e. the first positive specimen in a unique patient) nasopharyngeal swabs were analyzed. Among the two negative tests cohort, a total of 148 follow up samples were examined (median 3; mean 3.7; min 2, max 9). Median diagnostic viral load was 25.1 Ct (mean 25.6; min 9.8, max 45.5) with viral load similar in both patient cohorts. In the group of 6 asymptomatic patients, median diagnostic viral load was 32.9 Ct (mean 32.4; min 18.9, max 41.7).

Correlation of viral load with symptoms during diagnosis. We evaluated the correlation between diagnostic Ct value in relation to the time between sampling and first symptom onset (six patients with completely asymptomatic disease course were excluded from the analysis, while another four patients with unknown absolute positive Ct value were marginalized), see Fig. 6. Fourteen patients were affirmed as contacts up to 5 days before symptoms' onset (i.e. symptoms appeared after sampling—the graph's right portion). The remaining 81 patients, with known Ct value, were symptomatic at the time of their first positive PCR test, and they had already been symptomatic for an average of 6 days (i.e. symptoms appearing before sampling, left side of the graph). The maximum sampling time was 36 days after symptoms' onset. Correlation curve plotted U-shape between diagnostic Ct values and sampling time in relation to the symptoms' onset. Highest viral load was detected in diagnostic samples analyzed 0–2 days after initial symptom onset. Albeit not precisely recorded in numbers, patients rationalized during telemonitoring that delays between the symptom onset and sampling resulted from either being scared of COVID-19 positive diagnosis or by an insufficient testing capacity.

SARS-CoV-2 elimination course. Among 40 patients from the two negative test cohort, median time from diagnostic sample to the first and the second negativity was 19 days (mean 21.9; min 5, max 53), and 26 days (mean 25.3; min 7, max 56), respectively. Median time from first to second negative sample was 2 days (mean 3.4; min 1, max 18). The virus elimination curve was steadily increasing (57%) or fluctuating (43%), see Fig. 7.

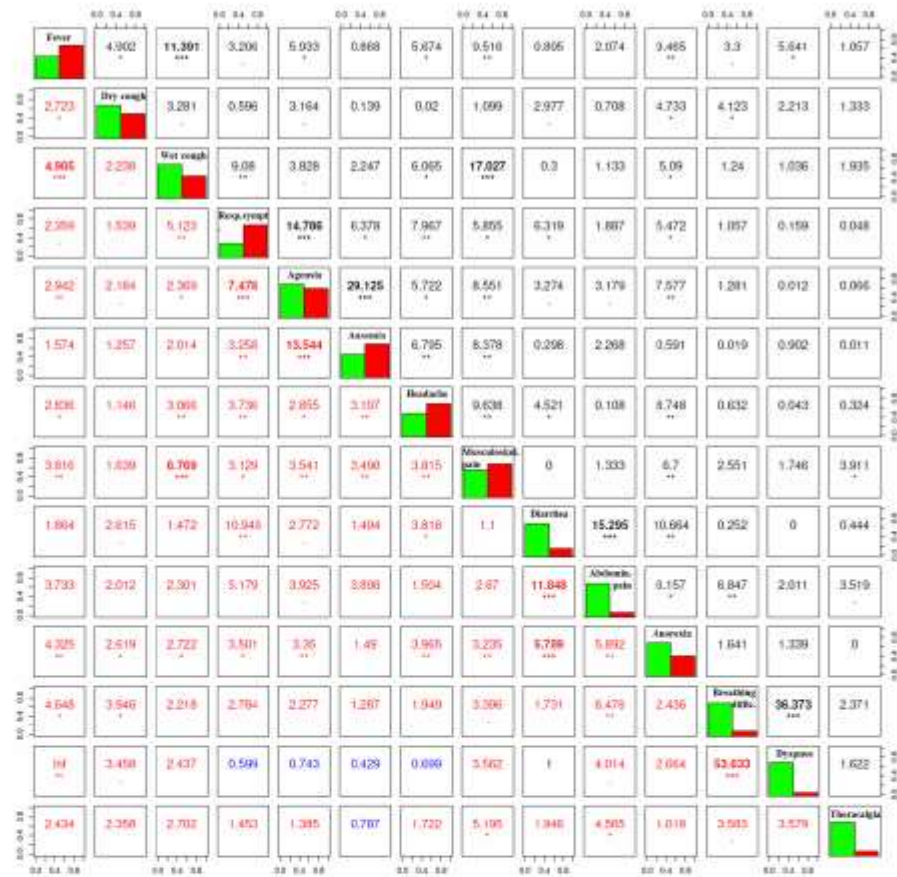


Figure 4. The correlation between COVID-19-symptoms' co-occurrence in outpatients evaluated by using the Pearson's Chi-squared tests (upper right) and Fisher's odds ratio exact tests (lower left). Figure represents the relation between symptoms' co-occurrence. The diagonal from the upper left corner to the lower right corner contains frequency histograms of each variable (green—symptom absent; red—symptom present). The Pearson's Chi-squared tests (on the right top of the diagonal) measure the strength of a linear association between categorical variables presented by the Pearson correlation coefficient. The Fisher's odds ratio exact tests (on the bottom left of the diagonal; red and blue numbers indicate positive and negative associations, respectively) represent the ordinal dependence between two measured quantities. Each significance level is depicted by stars: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Only symptoms co-occurring in more than three patients were included. COVID-19 Coronavirus Disease 2019.

With this patient cohort, a total of 44% and 31% still exhibited symptoms at the time of the first and the second negative test, respectively. Yet, in the new algorithm cohort, only 21% of patients reported any symptom 11 days after the first positive test.

Discussion

Despite organizing our study early in 2020, when there was far less knowledge about COVID-19, we feel our findings, nonetheless, are still quite relevant and important. Recruitment was intended to last for a few weeks. However, when disease incidence dramatically decreased following the "first wave", cohort recruitment significantly subsided, allowing us an opportunity to specifically monitor and evaluate various symptoms during a longer follow-up period.

Within the Czech population, there was no significant difference in the frequency of symptoms compared to published data^{3,4,12–15}. Regarding olfactory disorders, a pooled frequency differed between detection via smell testing (76%) and survey/questionnaire report (53%), which corresponds to our data (59%)¹³. In concordance

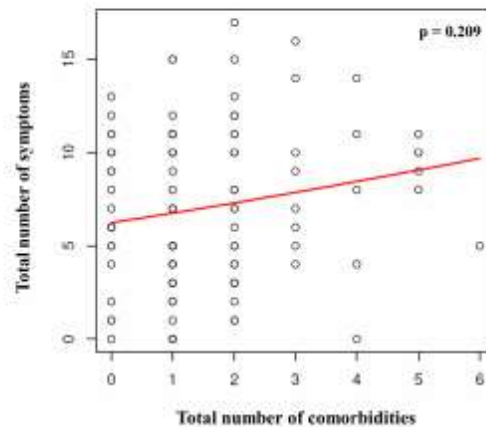


Figure 5. The relationship between comorbidities and the number of symptoms in outpatients. Figure represents the relationship between the total number of comorbidities and the total number of symptoms in outpatients (Spearman's rank correlation $r = 0.12$, $p = 0.21$). One circle corresponds to a unique patient, however, the circles of some patients may overlap in the graph. The red line represents a non-parametric regression function.

Total evaluated patients, N (%)	40 (100)
Agesia	
No of patients with agesia, n (%)	19 (47.5)
No of patients with agesia at the time of the 2nd negative test, n (%)	4 (21.1)
Duration of agesia (days), median (mean, min-max)	21 (37; 2-159) ^a
Duration of agesia after the 1st negative test (days), median (mean, min-max)	0 (12; 0-131)
Duration of agesia after the 2nd negative test (days), median (mean, min-max)	0 (12; 0-128)
Anosmia	
No of patients with anosmia, n (%)	23 (57.5)
No of patients with anosmia at the time of the 2nd negative test, n (%)	11 (47.8)
Duration of anosmia (days), median (mean, min-max)	32 (67; 2-194) ^b
Duration of anosmia after the 1st negative test (days), median (mean, min-max)	0 (44; 0-171)
Duration of anosmia after the 2nd negative test (days), median (mean, min-max)	0 (43; 0-169)

Table 7. Sensory disorders with extended follow-up in the cohort with two negative tests. ^a1 patient still had agesia at the time of follow-up (data adjusted to the date of the last follow-up—October, 31th, 2020). ^b6 patients still had anosmia at the time of follow-up (data adjusted to the date of last follow-up—October, 31th, 2020).

with literature, we indicated an anosmia incidence higher in women and in younger patients⁷. However, our detailed monitoring subsequently revealed a spectrum of less frequent symptoms actually related to COVID-19 which should not be underestimated in practice (Table 6). These symptoms should now be included within the already published set of symptoms¹.

In our study, precise mapping of symptom length represents a unique design, resulting from back tracing before the first PCR sampling. Notwithstanding our effort, we were unable to determine exact symptom duration in many patients owing to monitoring termination for double PCR negativity in the first cohort. Moreover, the second cohort of patients with the new algorithm of quarantine cessation probably shortened the symptoms deliberately. Despite no statistically significant differences in demographic parameters and comorbidities between these two cohorts, patients in our second cohort reported fewer symptoms, and much earlier, than the patients in the first cohort. For example, the differences in anosmia duration were striking. We may speculate that the motivation was to dissimulate non-severe symptoms in order to be released from quarantine as early as possible, since there was no requirement for PCR negativity at the end of quarantine. However, these unfit patients still, in fact, could represent a further source of virus spreading. To the best of our knowledge, such data detailing patient behavioral modification responding to COVID-19 quarantine regulations has not yet been published. On the other hand, the relative success of governmental measures depends heavily on a population's willingness

All outpatients (N = 66)				
Type of symptom	N (%)			
	M1	M2	M3	M6
Fatigue	8 (12)	2 (3)	1 (2)	1 (2)*
Fever ≥ 37 °C	4 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Dry cough	8 (12)	6 (9)	5 (8)	3 (5)*
Wet cough	6 (9)	2 (3)	2 (3)	2 (3)*
Respiratory tract infection signs	5 (8)	2 (3)	1 (2)	0 (0)
Ageusia	11 (17)	5 (8)	4 (6)	3 (5)*
Anosmia	19 (29)	14 (21)	11 (17)	11 (17)*
Headache	3 (5)	2 (3)	1 (2)	1 (2)*
Musculoskeletal pain	3 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Diarrhea	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Abdominal pain	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Anorexia	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Vomiting	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Breath difficulties	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)
Dyspnea	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)
Shortness of breath	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tachypnea	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Thoracalgia	2 (3)	1 (2)	1 (2)	1 (2)*
Dry skin	1 (2)	1 (2)	1 (2)	0 (0)

Table 8. Incidence of COVID-19 symptoms among 66 outpatients during follow-up phase. Although our analysis primarily focused on acute symptomatology during the study's initial phase, incidence of symptoms during an extended monitoring study phase with a median follow-up of 219 days (mean-222; min-32, max-486) is presented in Table 8. We evaluated in total 23 (58%) of the patients from our Cohort with 2 Negative Tests, and 43 (66%) of the patients from our Cohort with New Algorithm, respectively. During the first month following COVID-19 diagnosis, certain symptoms persisting with a frequency greater than 10% in outpatients were: anosmia (29%), ageusia (17%), fatigue (12%) and dry cough (12%), respectively. However, at the 6 month follow-up, only anosmia was detected with a higher frequency (17%). Assuming that patients no longer had a reason to deny symptoms after quarantine release, we conducted evaluations jointly for both cohorts. Only patients who agreed to enter the extended follow-up phase were included in our analysis. COVID-19 coronavirus disease-19, M1, M2, M3, M6 number of months after COVID-19 diagnosis during follow-up phase. *Certain patients continuing to evince symptoms at the time of follow-up.

to actively participate. One report investigated perceived usefulness, adherence, and predictors of behavioral measures in eight countries and recognized significant differences. Some people felt particularly isolated and not well supported when certain regional governments postured ambivalent attitudes toward the measures, while in other countries, people deemed governmental communication quite positive³⁰. With symptom duration definitely prolonged well beyond our telemonitoring capacity, further study of COVID-19 became justified. Nonetheless, specific symptoms definitely persisted even during double PCR negativity and/or monitoring termination, which we precisely documented. In our first cohort, a significant total of 44% and 31% of patients still exhibited some symptoms at the time of both first and second negative test, respectively. Along with anosmia and/or ageusia, symptoms included dry or wet cough, general RTI symptoms, headache, breathing difficulties, dyspnea, shortness of breath, thoracalgia, dry skin, and additional complications that developed during the disease. Furthermore, certain symptoms, particularly anosmia and ageusia, persisted during our extended phase for more than half a year after COVID-19 diagnosis. In literature, this topic is one of the most discussed issues regarding COVID-19. Persisting sensory dysfunction was observed in up to a quarter of patients³¹. The mechanism of COVID-19 related olfactory dysfunction differed from those observed with an acute cold and may reflect a specific central nervous system impairment in some COVID-19 patients³². We believe, therefore, that government and health authority quarantine cessation guidelines need to reflect our factual findings. Current Czech Republic regulations mandate an early quarantine termination after just 10 days and without a negative test, when the patient is asymptomatic for the last 3 days³³. Yet, specific mandatory guidelines regarding asymptomatic patient detection do not, however, presently exist. Moreover, recent emphasis seems to focus on discussing long-term consequences affecting particular patients^{6,8,11,34}.

Based on contemporary data, no COVID-19 specific symptoms beyond smell and taste loss have been recorded^{6,13}. In our study, 59%, 47%, and 65% of patients reported anosmia, ageusia, or both, respectively, while symptoms appeared on average 4.5 and 4.6 days, respectively, following disease onset. Thus, nearly two-thirds of patients are clinically detectable, albeit at the expense of regrettable delay, during which time the virus could spread unabated following disease onset.

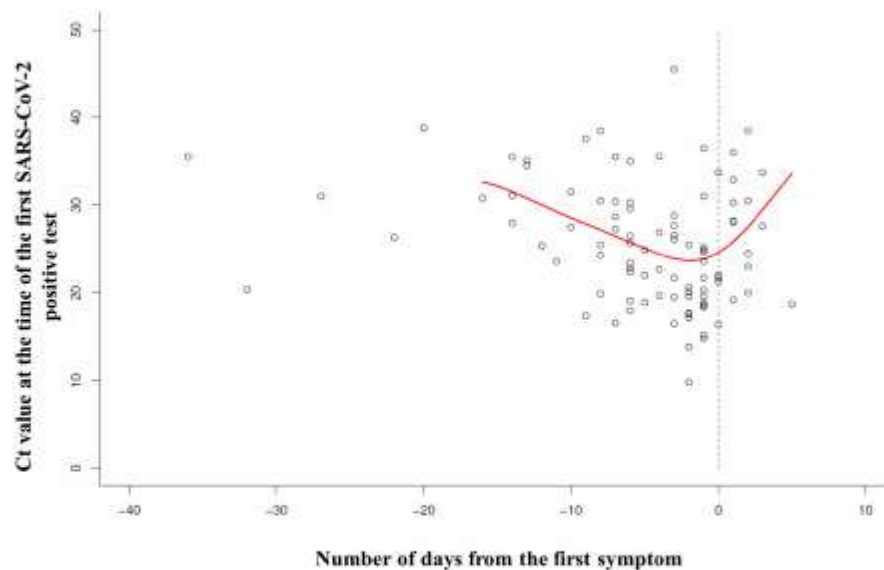


Figure 6. The correlation between Ct value of the first positive test and the time of initial symptom onset. Figure shows the correlation between diagnostic Ct value (performed on day 0) and the day of initial symptoms' onset. Each small circle represents one unique symptomatic patient (the six completely asymptomatic patients were excluded from the analysis; additionally, another four patients with unknown absolute positive Ct value were excluded). To the right of the dashed line, a total of fourteen patients detected as contacts are shown (e.g. symptoms appeared after sampling). Patients already symptomatic at the time of the first positive PCR test sampling ($N = 81$) are displayed directly on the dashed line and to the left side of the dashed line. The correlation red curve between diagnostic Ct values and sampling time in relation to the symptoms' onset is plotted U-shape. Ct cycle threshold, PCR polymerase chain reaction, SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

Considering the co-occurrence of symptoms, we have confirmed a significant link between anosmia and ageusia¹⁸. Unlike large published data sets²⁰, we have not, with our 105 patient cohort, established statistical significance in the correlation between particular symptoms and comorbidities, which emphasizes, in fact, that a given patient's disease course is not dependably predictable in advance, which emphasizes the advantage of recommending an individualized telemedicine approach. This similarly holds true for predicting complications and the need for hospitalization. While certain risk factors have been detailed^{25,26,37}, we concur that focused routine telemonitoring is a preferable option. Furthermore, our research has substantiated that COVID-19 symptoms can overlap with another disease, which emphasizes advantages of careful monitoring. The telemonitoring questionnaire we have designed is timely, applicable, and can be employed by paramedics as well as experienced professionals.

Severe documented pneumonia did not occur in our study with a high frequency (2%), which is reassuring. On the other hand, we quite often observed certain respiratory symptoms, which were not easily explainable (dyspnea, 10%; breathing difficulties, 13%; shortness of breath, 3%; tachypnea, 3%). Patients were not examined by auscultation, and monitoring staff did not consider symptoms severe enough to require a CT scan. Theoretically, we could have missed clinically mild COVID-19 pneumonias. In literature, pneumonia with a CT pathological determination was described in up to 100% of asymptomatic and pre-symptomatic patients^{5,19–22}. Moreover, these patients exhibited longer virus shedding which might facilitate disease transmission²¹. Hence, we advocate the need for a well-designed study concerning chest CT examination in all newly diagnosed COVID-19 patients, which is highly important with respect to ethical and irradiation issues. Clearly corresponding with data for the Czech Republic (5.9%) during the observed period, only a small representative proportion of outpatients (5.7%) in our study required secondary hospitalization during their course of COVID-19.

Only a few people in our study (13%) were detected as contacts on average 2 days before the onset of symptoms, with only 6% of other patients being completely asymptomatic thru the course of the disease. Conversely, most patients (81%) were already symptomatic at the time of sampling, performed on day 0 up to day 36—on average day 6—which is relatively late in terms of disease onset. With the highest viral load at the time of initial symptom onset, as affirmed in our analysis (see Fig. 6), these patients exemplified massive SARS-CoV-2 spreaders. Our data places maximum emphasis on hygiene measures, wearing face masks, educating masses regarding symptoms, transmission and spread, and the imperative for early testing as quickly as possible⁴⁸. According to

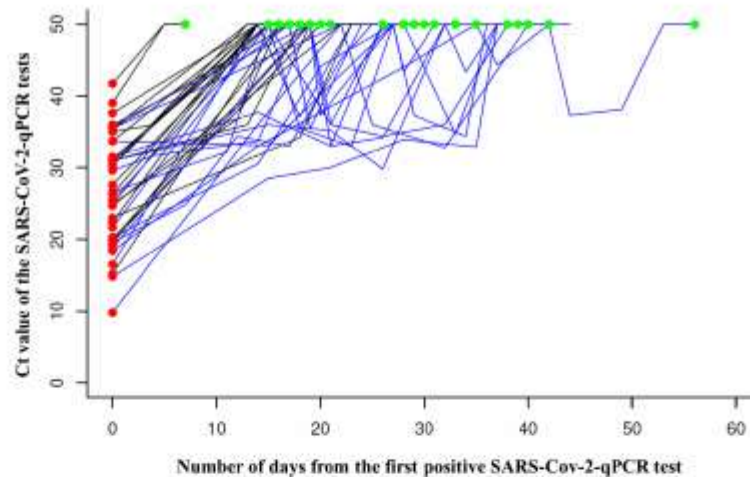


Figure 7. Viral load dynamics in the cohort with two negative tests. Figure illustrates the viral load dynamics of a total of 40 diagnostic (red points on the left side of the graph) and 148 follow-up samples evaluated in 40 patients from the cohort with two negative tests. The second negative tests are highlighted as green points at the top of the graph. Constantly increasing virus elimination curves are colored black, while fluctuating ones are blue. SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Ct cycle threshold, qPCR quantitative polymerase chain reaction.

interviews, patient delays resulted from fear of testing, fear of a COVID diagnosis, and/or insufficient testing capacity.

Recently, quite controversial yet very important topics have emerged regarding the relationship between PCR positivity duration, viral shedding, and the potential for infectivity, and possible reinfection, which is crucial for preventing virus spread and effective vaccine development^{39–41}. A prospective extensive French study analyzing 3790 SARS-CoV-2 qPCR-positive nasopharyngeal samples and 1941 cell culture isolates has enriched knowledge about duration and frequency of live virus shedding⁴². Samples with Ct = 25 up to 70% positivity in virus culture were recognized. However, for samples with Ct 30, this ratio decreased to 20%, and at Ct 35, less than 3% of cultures were positive.

In addition, another prospective analysis evaluated potential infectivity not only in the correlation between Ct values and virus growth capacity in the cell culture but also by determining neutralizing antibodies in healthcare professionals with prolonged virus shedding up to 55 days⁴³. Positive Ct values above 30 corresponded to non-viable particles. In the case of Ct-values below 30 and the simultaneous detection of neutralizing antibodies, authors also assumed non-infectivity. Literature review indicated that patients with severe-to-critical illness or those immunocompromised could shed the infectious virus for a significantly longer period than 1 month^{44–46}.

The minimal viral load to be infected is unknown in humans and will probably vary among different people owing to many inherited and acquired factors. Moreover, culturable or non-culturable sample may not necessarily equal the real infectious capacity^{43,46}. Nevertheless, as we determined, Ct values can vary during follow-up, which is an intriguing, previously reported phenomenon^{45,46} that has not yet been exactly explained. Usually, the presence of viral RNA without sample cultivability is interpreted as a non-vital virus shedding⁴⁶. Keeping in mind potential serious social, emotional, and economic consequences of a longer quarantine along with rationale noted above, we would be very cautious regarding a fixed time interval quarantine for all patients. Moreover, we agree with Fontana et al.⁴⁶, that further data is needed to understand the correlation between transmission risk, culture positivity, and Ct thresholds. In the Czech Republic, a second wave of the epidemic began upon the easing of very strict initial measures, which included quarantine up until a double negative PCR test.

Conclusions

Our timely study has detailed COVID-19's natural course among outpatients in terms of PCR-measured viral load kinetics. Disease course apparently is significantly variable, although with certain individuals, on the basis of comorbidities and other characteristics, trajectory may not be reliably predicted, emphasizing necessity for individualized patient monitoring and management. Double PCR negativity will not necessarily ensure simultaneous symptom disappearance.

Government regulations including prospective short fixed quarantine without a need for definitive PCR negativity might modulate patient behavior, influence individual reporting of non-serious symptoms, and eventually lead to inappropriate premature patient release from quarantine, thus contributing to further infection spread.

Only a minority of patients were expeditiously identified as COVID-19 contacts. Others, although symptomatic, were often detected following significant delays, which contributed to the virus spread. Individual viral kinetics displayed immense variability and fluctuated in nearly half of the patients.

Based on these findings, we recommend: (1) a wide-ranging intensive sophisticated precise, and long-term educational campaign focused on the entire population in order to diagnose the disease as early as possible, maximize tracing, and facilitate strict adherence to hygiene measures; (2) considering a more individualized model for quarantine termination; (3) improving communications between patients, general practitioners, and/or healthcare workers with follow-up telemonitoring in accordance with a predefined questionnaire aimed at early detection of potential complications and disparate serious diseases relating to acute COVID-19.

Received: 16 January 2021; Accepted: 27 April 2021

Published online: 12 May 2021

References

1. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Accessed 20 Dec 2020.
2. Borges do Nascimento, I. J. *et al.* Clinical, laboratory and radiological characteristics and outcomes of novel coronavirus (SARS-CoV-2) infection in humans: A systematic review and series of meta-analyses. *PLoS One* **15**, e0239235 (2020).
3. Struyf, T. *et al.* Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **7**, CD013665 (2020).
4. Tenforde, M. W. *et al.* Symptom duration and risk factors for delayed return to usual health among outpatients with COVID-19 in a multistate health care systems network—United States, March–June 2020. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* **69**, 993–998 (2020).
5. Jung, C.-Y. *et al.* Clinical characteristics of asymptomatic patients with COVID-19: A Nationwide Cohort Study in South Korea. *Int. J. Infect. Dis.* **99**, 266–268 (2020).
6. Paderno, A. *et al.* Olfactory and gustatory outcomes in COVID-19: A prospective evaluation in nonhospitalized subjects. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **163**, 1144–1149 (2020).
7. Speth, M. M. *et al.* Olfactory dysfunction and sinonasal symptomatology in COVID-19: Prevalence, severity, timing, and associated characteristics. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **163**, 114–120 (2020).
8. Beigel, J. H. *et al.* Remdesivir for the treatment of Covid-19—Final report. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1813–1826 (2020).
9. Gupta, S. *et al.* Association between early treatment with tocilizumab and mortality among critically ill patients with COVID-19. *JAMA Intern. Med.* <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6252> (2020).
10. Polack, F. P. *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577> (2020).
11. Kalil, A. C. *et al.* Baricitinib plus remdesivir for hospitalized adults with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031994> (2020).
12. Lechien, J. R., Barillari, M. R., Joulfa, L. & Saussez, S. Anosmia is a key symptom of COVID-19 infection and should be used as a diagnostic tool. *Ear Nose Throat J.* **99**, 577–578 (2020).
13. Pang, K. W., Chee, J., Subramaniam, S. & Ng, C. L. Frequency and clinical utility of olfactory dysfunction in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **20**, 76 (2020).
14. Cheng, A., Caruso, D. & McDougall, C. Outpatient management of COVID-19: Rapid evidence review. *Am. Fam. Phys.* **102**, 478–486 (2020).
15. Dixon, B. E. *et al.* Symptoms and symptom clusters associated with SARS-CoV-2 infection in community-based populations: Results from a statewide epidemiological study. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.10.11.20210922> (2020).
16. Mehra, M. R., Desai, S. S., Kuy, S., Henry, T. D. & Patel, A. N. Cardiovascular disease, drug therapy, and mortality in Covid-19. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007621> (2020).
17. Grasselli, G. *et al.* Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Italy. *JAMA* **323**, 1574–1581 (2020).
18. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
19. Chang, M. C., Lee, W., Hsu, J. & Park, D. Chest computed tomography findings in asymptomatic patients with COVID-19. *Respirology* **99**, 748–754 (2020).
20. Meng, H. *et al.* CT imaging and clinical course of asymptomatic cases with COVID-19 pneumonia at admission in Wuhan, China. *J. Infect.* **81**, e33–e39 (2020).
21. Pan, Y. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 26 asymptomatic severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 carriers. *J. Infect. Dis.* **221**, 1946–1947 (2020).
22. Buñtrago-García, D. *et al.* Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* **17**, e1003346 (2020).
23. Price-Haywood, E. G., Burton, J., Fort, D. & Seoane, L. Hospitalization and mortality among black patients and white patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2534–2543 (2020).
24. Falasca, L. *et al.* Postmortem findings in Italian patients with COVID-19: A descriptive full autopsy study of cases with and without comorbidities. *J. Infect. Dis.* **222**, 1807–1815 (2020).
25. Guan, W.-J. *et al.* Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: A nationwide analysis. *Eur. Respir. J.* **55**, 2001227 (2020).
26. Keshvardoust, S., Bahaadinbeigy, K. & Fatehi, F. Role of telehealth in the management of COVID-19: Lessons learned from previous SARS, MERS, and ebola outbreaks. *Telemed. J. E Health* **26**, 850–852 (2020).
27. http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Coronavirus/26032020_mz/Kriteria_pro_propusteni_pacienta_x_izolace_25032020_final_.pdf. Accessed 20 Dec 2020.
28. <https://koronavirus.mzcr.cz/ministerstvo-dravotnictvi-aktualizovano-algoritmus-k-ukonceni-karanteny/>. Accessed 15 Jan 2021.
29. Komenda, M. *et al.* Complex reporting of the COVID-19 epidemic in the Czech Republic: Use of an interactive web-based app in practice. *J. Med. Internet Res.* **22**, e19567 (2020).
30. Margraf, J., Brailovskaia, J. & Schneider, S. Behavioral measures to fight COVID-19: An 8-country study of perceived usefulness, adherence and their predictors. *PLoS ONE* **15**, e0243523 (2020).
31. Niklassen, A. S. *et al.* COVID-19: Recovery from chemosensory dysfunction. A multicentre study on smell and taste. *Laryngoscope* **131**, 1095–1100 (2021).
32. Huat, C. *et al.* Comparison of COVID-19 and common cold chemosensory dysfunction. *Rhinology* **58**, 623–625 (2020).
33. http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Coronavirus/MZ_CR/Mimoradne_opatreni_izolace_a_karantena_s_ucinnosti_od_25_9_2020_do_odvolani.pdf.
34. Marshall, M. The lasting misery of coronavirus long-haulers. *Nature* **585**, 339–341 (2020).

35. Izcovich, A. et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS ONE* **15**, e0241935 (2020).
36. Zhang, X. et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature* **583**, 437–440 (2020).
37. Ko, J. Y. et al. Risk factors for COVID-19-associated hospitalization: COVID-19-associated hospitalization surveillance network and behavioral risk factor surveillance system. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1419> (2020).
38. Chu, D. K. et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* **395**, 1973–1987 (2020).
39. Hu, F. et al. A compromised specific humoral immune response against the SARS-CoV-2 receptor-binding domain is related to viral persistence and periodic shedding in the gastrointestinal tract. *Cell Mol. Immunol.* **17**, 1119–1125 (2020).
40. Pletsch, H. et al. Proof of SARS-CoV-2 genomes in endomyocardial biopsy with latency after acute infection. *Int. J. Infect. Dis.* **102**, 70–72 (2020).
41. Akinosoglou, K. et al. SARS-CoV-2 persistence and non-protective immunity in infected haematological patients. *Br. J. Haematol.* <https://doi.org/10.1111/bjh.17212> (2020).
42. Jaafar, R. et al. Correlation between 3790 qPCR positives samples and positive cell cultures including 1941 SARS-CoV-2 isolates. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491> (2020).
43. Lafel, H. et al. An approach to lifting self-isolation for health care workers with prolonged shedding of SARS-CoV-2 RNA. *Infection* <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01530-4> (2020).
44. He, S. et al. Clinical characteristics of 're-positive' discharged COVID-19 pneumonia patients in Wuhan, China. *Sci. Rep.* **10**, 17365 (2020).
45. Walsh, K. A. et al. The duration of infectiousness of individuals infected with SARS-CoV-2. *J. Infect.* **81**, 847–856 (2020).
46. Fontana, L. M., Villamagna, A. H., Sikka, M. K. & McGregor, J. C. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1273> (2020).

Acknowledgements

This work was supported by MH CZ—DRO (FNBr, 65269705).

Author contributions

B.W. and J.M.—contributed to study's conception and design; implemented material preparation, data collection and analysis; wrote and revised manuscript. S.H., Z.N., M.L., Z.P., L.MAR., K.HO., L.MAN., K.HE., R.C., M.P., M.DO., V.M., R.N., M.DOL., H.M.K., K.B., R.P., P.H., M.M., Z.K.—contributed to study conception and design; effected material preparation, data collection and analysis; commented on previous versions of the manuscript; read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89545-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.W.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

4.1.2. Annex 25

Weinbergerova B., Mayer J., Kabut T., Hrabovsky S., Prochazkova J., Kral Z., Herout V., Pacasova R., Zdrzilova-Dubska L., Husa P., Bednar P., Ruzek D., Lengerova M. Successful early treatment combining remdesivir with high-titer convalescent plasma among COVID-19-infected hematological patients. *Hematol Oncol.* 2021; 39(5):715-720. doi: 10.1002/hon.2908. ISSN 1099-1069.

IF = 5,271 in 2020; ONCOLOGY Q2, HEMATOLOGY Q2; 0 citation according to WOS or Scopus, without self-citations

Successful early treatment combining remdesivir with high-titer convalescent plasma among COVID-19-infected hematological patients

1 | INTRODUCTION

Immunocompromised patients with hematological malignancies are at high risk for a severe course of COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) with a deadly outcome.^{1,2} With remdesivir use, several randomized trials have recorded abbreviated recovery periods, lower mortality, and positive consequences of early treatment initiation.^{3,4} Based on randomized trial results, the FDA has approved remdesivir for the treatment of COVID-19. Regarding convalescent plasma (CP), evidence from recently published large trials implies that early administration of high-titer CP is most efficacious.⁵

However, no published studies assessing the effect of remdesivir or CP in COVID-19 have included a substantial proportion of hematocology patients, and available data are limited to case reports.^{6,7} In view of this dearth of data, we decided to analyze the efficacy of early combination therapy of remdesivir and high-titer CP among hematological patients. This treatment strategy was implemented after observing several grim COVID-19 outcomes among these patients.

2 | METHODS

Our retrospective study from 30 December 2020 through 29 March 2021 included unselected consecutive hematological patients diagnosed with COVID-19 (presence of SARS-CoV-2 verified by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR, or antigen from nasopharyngeal swab) and subsequently treated with a remdesivir and high-titer CP combination at our hospital. Disease severity was assessed according to adapted definitions.⁸ Data were obtained from source medical documentation covering comorbidities, pulmonary imaging, COVID-19 diagnostics, therapy, and outcome. High-titer CP was manufactured from plasma of convalescent male donors with SARS-CoV-2 anti-S antibody levels at least 200 U/ml (Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S) at the time of plasma collection.

All patients received intravenous remdesivir 200 mg on day 1, followed by 100 mg daily for a total of 5 days. Two units of high-titer CP (SARS-CoV-2 neutralizing antibodies at a titer 1:160 and higher)

were administered per one treatment cycle. Several underwent retreatment due to either prolonged SARS-CoV-2 positivity or repositivity, eventually supported by culture virus viability, or as a secondary prophylaxis during ongoing oncological treatment. A descriptive analysis was conducted separately for two divided cohorts: "Pneumonia Cohort" versus "No Pneumonia Cohort" at the onset of combination therapy. Pneumonia was diagnosed based on chest x-ray pulmonary infiltrates or high-resolution computer tomography. Our research was undertaken in accordance with relevant guidelines and regulations. All patients involved signed an informed consent form.

Basic statistical methods describing absolute and relative frequency for categorical variables, mean, median, minimum and maximum for continuous variables, respectively, were employed. Categorical parameter relations were evaluated using Fisher's exact tests; continuous variables were compared using the Mann-Whitney *U* test with $\alpha = 0.05$ as a level of statistical significance.

3 | RESULTS

A total of 32 hematological patients (75% not in remission), with acute leukemias, lymphomas, and myeloma as the most frequent underlying diagnoses (81%), were evaluated with a median follow-up of 36 days (min–15, max–92). Baseline characteristics are described in Table 1. In both cohorts, median time from SARS-CoV-2 positivity to treatment onset was 1 day. When initiating remdesivir, 56% of patients already had evidence of pneumonia. The SARS-CoV-2 diagnosis was primarily determined by RT-PCR test (72%). While not substantial, our "Pneumonia Cohort" exhibited more comorbidities and worse white blood cell parameters than the "No Pneumonia Cohort." When COVID-19 was diagnosed, our "Pneumonia Cohort" had a remarkably higher stage of disease severity (moderate–severe–critical) compared to the "No Pneumonia Cohort" (83% vs. 14%; $p < 0.001$) (Table 1). Corticosteroids and low-molecular-weight heparins were employed among 47% and 91% of study patients, respectively, without a considerable difference between cohorts. During the first treatment cycle,

TABLE 1 Characteristics of patients enrolled in the study stratified according to the presence of pneumonia at the time of COVID-19 diagnosis

	Total	Pneumonia cohort	No pneumonia cohort	p-value
Number of patients, n (%)	32 (100)	18 (56)	14 (44)	NA
Age at the time of COVID-19 diagnosis, years, median; mean (range)	60; 57.7 (25-86)	62; 61.1 (44-86)	56; 53.6 (25-77)	0.303
Sex, male, n (%)	19 (59)	10 (56)	9 (64)	0.725
SARS-CoV-2 RT-PCR positive test, n (%)	23 (72)	15 (83)	8 (57)	0.132
SARS-CoV-2 antigen positive test, n (%)	9 (28)	3 (17)	6 (43)	0.132
Underlying disease at baseline, n (%)				
Acute leukemia	10 (31)	3 (17)	7 (50)	0.062
Lymphoma	10 (31)	5 (28)	5 (36)	0.712
Multiple myeloma	6 (19)	4 (22)	2 (14)	0.672
Chronic lymphocytic leukemia	3 (9)	3 (17)	0 (0)	NA
Chronic myelogenous leukemia	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
Polycythemia vera	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
Autoimmune leukopenia	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
Active hematological disease, n (%)	24 (75)	14 (78)	10 (71)	0.704
Last hematological therapy 2 years prior to COVID-19, n (%)				
Induction of acute leukemia	8 (25)	3 (17)	5 (36)	0.252
First cycle of chemotherapy	6 (19)	4 (22)	2 (14)	0.672
>1 cycle of chemotherapy	9 (28)	4 (22)	5 (36)	0.453
Daratumumab in myeloma	3 (9)	2 (11)	1 (7)	1.0
Cyclosporin A after allo HSCT	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
Corticosteroids	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
Hydroxyurea	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
No therapy	3 (9)	2 (11)	1 (7)	1.0
Number of days between last hematological therapy and COVID-19 diagnosis, median; mean (range)	4; 18 (0-287)	6; 8 (0-32)	2; 31 (0-287)	0.617
Serious comorbidities, n (%)				
Hypertension	19 (59)	12 (67)	7 (50)	0.473
Diabetes	13 (41)	7 (39)	6 (43)	1.0
	8 (25)	6 (33)	2 (14)	0.412

TABLE 1 (Continued)

	Total	Pneumonia cohort	No pneumonia cohort	p-value
Coronary heart disease	3 (9)	3 (17)	0 (0)	NA
Hyperlipidemia	5 (16)	3 (17)	2 (14)	1.0
Pulmonary disease	3 (9)	2 (11)	1 (7)	1.0
Chronic renal failure	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
COVID-19 severity at the time of the start of therapy, n (%)				
Asymptomatic	5 (16)	1 (6)	4 (29)	<0.001
Mild	10 (31)	2 (11)	8 (57)	
Moderate	1 (3)	0 (0)	1 (7)	
Severe	16 (50)	15 (83)	1 (7)	
Critical	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Blood count parameters at the time of remdesivir start, × 10⁹/L, median (range)				
White blood cell count	3.8 (0.08–139)	3.6 (0.08–139)	5.54 (0.69–21.81)	0.992
Absolute lymphocyte count	0.7 (0.03–127)	0.6 (0.03–127)	0.9 (0.3–4.4)	0.689
Absolute neutrophil count	2.4 (0.0–17.4)	2.1 (0.0–11.0)	4.0 (0.1–17.4)	0.459
Platelet count	99 (5–392)	116 (5–284)	83 (12–392)	0.849

Note: The significance level $p < 0.05$ is depicted in bold.

Abbreviations: allo HSCT, allogeneic human stem cell transplantation; ; COVID-19, coronavirus disease 2019; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2.

significantly, a higher number of patients in our "Pneumonia Cohort" developed severe or critical COVID-19 compared to the "No Pneumonia Cohort" (89% vs. 29%; $p < 0.001$). Nine patients (28%) received, in total, 12 retreatment cycles either for prolonged SARS-CoV-2 positivity (66%), eventually supported by viral culture positivity (63%), as a secondary prophylaxis (17%), or for SARS-

CoV-2 re-positivity (17%). No patient developed direct adverse reactions requiring treatment reduction. Final evaluation recorded three deaths (9%), all in the "Pneumonia Cohort" and attributed to critical COVID-19. No further significant differences were noted between the two cohorts. Data concerning therapy and outcome are available in Tables 2 and S1.

TABLE 2 Characteristics of treatment combination and outcome in patients stratified according to the presence of pneumonia at the time of COVID-19 diagnosis

	Total	Pneumonia cohort	No pneumonia cohort	p-value
First treatment cycle in COVID-19 positive patients, n (%)	32 (100)	18 (56)	14 (44)	NA
Total length of remdesivir treatment, days, median; mean (range)	5; 5.0 (NA)	5; 5.0 (NA)	5; 5.0 (NA)	1.0
Number of days between COVID-19 diagnosis and remdesivir start, median; mean (range)	1; 2.3 (0-11)	1; 2.4 (0-10)	1; 2.1 (0-11)	0.912
Total number of high-titer CP administration, median; mean (range)	2; 2.0 (2-3)	2; 2.0 (NA)	2; 2.1 (2-3)	1.0
Number of days between high-titer CP administration and remdesivir start, median; mean (range)	0; -0.25 (-5-1)	0; -0.30 (-5-0)	0; -0.20 (-4-1)	0.803
Concomitant corticosteroids use, n (%)	15 (47)	10 (56)	5 (36)	0.308
Concomitant LMWH use, n (%)	29 (91)	18 (100)	11 (79)	0.073
COVID-19 highest degree of severity on treatment during first treatment cycle, n (%)				
Asymptomatic	2 (6)	0 (0)	2 (14)	<0.001
Mild	8 (25)	0 (0)	8 (57)	
Moderate	2 (6)	2 (11)	0 (0)	
Severe	15 (47)	11 (61)	4 (29)	
Critical	5 (16)	5 (28)	0 (0)	
Total length of hospitalization during first treatment cycle, median (range)	13 (5-91)	15 (6-91)	12 (5-26)	0.574
Total number of treatment cycles, n	44	27	17	NA
Number of cycles per patient, median; mean (range)	1; 1.4 (1-4)	1; 1.5 (1-4)	1; 1.2 (1-2)	0.337
Number of patients with 2nd cycle, n (%)	9 (28)	6 (33) ^a	3 (21)	0.694
Number of patients with 3rd cycle, n (%)	2 (6)	2 (11)	0 (0)	NA
Number of patients with 4th cycle, n (%)	1 (3)	1 (6)	0 (0)	NA
Reason for retreatment, n (%)				
SARS-CoV-2 prolonged positivity	8 (66)	7 (78)	1 (33)	0.236
Secondary prophylaxis	2 (17)	1 (11)	1 (33)	0.455
SARS-CoV-2 re-positivity (new positivity after negativity)	2 (17)	1 (11)	1 (33)	0.455
SARS-CoV-2 culture performed during all treatment cycles, n (%)	8 (18)	4 (15)	4 (24)	0.690
Time from remdesivir start to sampling, days, median (range)	6 (0-30)	6 (0-18)	7 (0-30)	NA
Positive SARS-CoV-2 culture, n (%)	5 (63)	4 (100)	1 (25)	NA
Alive at the time of data cutoff, n (%)	29 (91)	15 (83)	14 (100)	0.238
Death attributed to COVID-19, n (%)	3 (100)	3 (100)	NA	NA

Note: The significance level $p < 0.05$ is depicted in bold.

Abbreviations: COVID-19, coronavirus disease 2019; CP, convalescent plasma, LMWH, low molecular weight heparin; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2.

^aOne patient received 10-day remdesivir treatment.

4 | DISCUSSION

Our study highlighted efficacy of early concomitant use of remdesivir and high-titer CP in hematological patients with newly diagnosed COVID-19, irrespective of incidental pneumonia.

In literature, a number of multicenter analyzes are published, including meta-analyses, describing high mortality attributed to COVID-19 in patients with hematological malignancies.^{1,2,9,10} A meta-analysis evaluating more than 3000 hematology patients with COVID-19 augmented mortality evidence of 34%, 53%, 41%, 34%, 33%, 32%, and 31% among the entire cohort evaluated, in acquired bone marrow failure syndromes, acute leukemias, myeloproliferative neoplasias, plasma cell dyscrasias, lymphomas, and chronic lymphocytic leukemias, respectively.¹ Similarly, an extensive retrospective study indicated a high probability of death (34%) from COVID-19 in 650 patients with plasma cell disorders.² Moreover, large retrospective studies evaluating infection course in a total of 327 patients with chronic myeloid leukemia recorded high mortality of up to 14%.^{9,10}

Remdesivir and preferably high-titer CP affected, in general, benefit related to shortened recovery periods among hospitalized patients with lower respiratory tract infection and mortality reduction, with early treatment initiation being the most important attribute.^{3–5} Prolonged remdesivir administration did not manifest significant benefit among the general population. Nevertheless, these determinations could not be extrapolated to immunocompromised patients with a high risk of persistent viral replication among patients with severe SARS-CoV-2 infection.^{6,7}

Regarding hematological patients, no large clinical trial reports detailing effects of both remdesivir and CP therapy upon COVID-19 have been recorded. However, several case reports affirmed severe protracted courses of SARS-CoV-2 infections resulting from inability to produce virus neutralizing immunity, with prolonged shedding of viable virus up to 2 months following symptom onset and SARS-CoV-2 reinfection.^{6,7} Similar to our data, prolonged remdesivir therapy, including retreatment, and, ultimately, in combination with CP, evidenced effectiveness, in vivo, among immunocompromised hematological patients.^{6,7}

Our study's major strength is its focus on a uniform single-center cohort comprised exclusively of hematological patients and limited only in terms of sample size and control group participation.

5 | CONCLUSION

COVID-19 infections notably pose a high risk of morbidity and mortality for immunocompromised hematooncology patients in comparison with the general population. While robust data on remdesivir and CP treatment in this specific group of patients are not yet available in literature, published case reports and our substantial actual clinical records indicate remarkable efficacy of a high-titer CP/remdesivir combination initiated immediately following COVID-19 diagnosis. We believe that this treatment strategy is especially effective in patients who have not yet developed pneumonia.

ACKNOWLEDGMENT

This study was carried out as part of our routine work and supported by Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of research organization (FNBr, 65269705).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing or conflicting interests.

FUNDING STATEMENT

Ministry of Health, Czech Republic; FNBr, 65269705.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Barbora Weinbergerova and Jiri Mayer contributed to study conception and design; implemented material preparation, data collection and analysis; composed and revised manuscript. Tomas Kabut, Stepan Hrabovsky, Jirina Prochazkova, Zdenek Kral, Vladimir Herout, Rita Pacasova, Lenka Zdrzilova-Dubska, Petr Husa, Petr Bednar, Daniel Ruzek, and Martina Lengerova contributed to study conception and design; effected material preparation, data collection and analysis; commented on previous manuscript versions; reviewed and approved the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Research data are not shared.

Barbora Weinbergerova^{1,2} 

Jiri Mayer^{1,2}

Tomas Kabut^{1,2}

Stepan Hrabovsky^{1,2}

Jirina Prochazkova^{1,2}

Zdenek Kral^{1,2}

Vladimir Herout^{3,4}

Rita Pacasova^{5,6}

Lenka Zdrzilova-Dubska⁷

Petr Husa^{8,9}

Petr Bednar^{10,11}

Daniel Ruzek^{10,12}

Martina Lengerova^{1,2}

¹Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

³Department of Respiratory Diseases, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴Department of Respiratory Diseases, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁵Transfusion and Tissue Department, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁶Transfusion and Tissue Department, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁷Department of Clinical Microbiology and Immunology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁸Department of Infectious Diseases, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁹Department of Infectious Diseases, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

¹⁰Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

¹¹Faculty of Science, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic

¹²Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, Czech Republic

Correspondence

Barbora Weinbergerova, Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Jihlavská 20, 62500 Brno, Czech Republic.
Email: Weinbergerova.Barbora@fnbrno.cz

Barbora Weinbergerova and Jiri Mayer contributed equally to this work.

ORCID

Barbora Weinbergerova  <https://orcid.org/0000-0001-6460-2471>

TRANSPARENT PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/hon.2908>.

REFERENCES

1. Vijenthira A, Gong IY, Fox TA, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic

review and meta-analysis of 3377 patients. *Blood*. 2020;136(25):2881-2892.

2. Chari A, Samur MK, Martinez-Lopez J, et al. Clinical features associated with COVID-19 outcome in multiple myeloma: first results from the International Myeloma Society data set. *Blood*. 2020;136(26):3033-3040.
3. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al. Remdesivir for the treatment of Covid-19 – final report. *N Engl J Med*. 2020;383(19):1813-1826.
4. Mehta RM, Bansal S, Bysani S, Kalpakam H. A shorter symptom onset to remdesivir treatment (SORT) interval is associated with a lower mortality in moderate-to-severe COVID-19: a real-world analysis. *Int J Infect Dis*. 2021;106:71-77.
5. Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, et al. Early high-titer plasma therapy to prevent severe Covid-19 in older adults. *N Engl J Med*. 2021;384(7):610-618.
6. Baang JH, Smith C, Mirabelli C, et al. Prolonged severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 replication in an immunocompromised patient. *J Infect Dis*. 2021;223(1):23-27.
7. Camprubi D, Gaya A, Marcos MA, et al. Persistent replication of SARS-CoV-2 in a severely immunocompromised patient treated with several courses of remdesivir. *Int J Infect Dis*. 2020;104:379-381.
8. Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or moderate Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1757-1766.
9. Rea D, Mauro MJ, Cortes JE, et al. COVID-19 in patients (pts) with chronic myeloid leukemia (CML): results from the International CML Foundation (iCMLf) CML and COVID-19 (CANDID) study. *Blood*. 2020;136(51):46-47.
10. Breccia M, Abruzzese E, Accurso V, et al. COVID-19 infection in chronic myeloid leukemia after 1 year of the pandemic in Italy. A CAMPUS CML analysis. *Hemasphere*. 2021;5(52):32.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

4.1.3. Annex 26

Weinbergerová B., Demel I., Víšek B., Válka J., Čerňan M., Jindra P., Novák J., Stejskal L., Kováčsová F., Kabut T., Szotkowski T., Hájek R., Žák P., Cetkovský P., Král Z., Mayer J. Successful Early Use of Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Infected Hematological Patients – A Czech Multicenter Experience. *Hematol Oncol.* 2022; 40(2):280-286. doi: 10.1002/hon.2974. ISSN 1099-1069.

IF = 5,271 in 2020; ONCOLOGY Q2, HEMATOLOGY Q2; 0 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

Successful early use of anti-SARS-CoV-2 monoclonal neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 infected hematological patients – A Czech multicenter experience

Abstract

COVID-19 significantly impairs survival rates among hematological patients when compared to the general population. Our prospective multicenter project analyzed early administration of anti-SARS-CoV-2 spike protein neutralizing monoclonal antibodies (NmAbs) – bamlanivimab (72%) and casirivimab/imdevimab (28%) – efficacy among hematological patients with early-stage COVID-19. Mortality rate was compared to a control cohort of 575 SARS-CoV-2 positive hematological patients untreated with any specific anti-COVID-19 therapy. 88 hematological patients with lymphomas, acute leukemias, and myeloma as their most frequent underlying diagnoses (72%) were evaluated with a 97 days median follow-up after NmAb administration. One third of patients (32%) were treated with an anti-CD20 monoclonal antibody before COVID-19 diagnosis. Median time between first COVID-19 symptom and NmAb administration was 2 days. When administering NmAb, 29%, 57%, 11%, 2%, and 1% of our patients had asymptomatic, mild, moderate, severe, and critical degrees of COVID-19, respectively. 80% of baseline asymptomatic patients remained asymptomatic following NmAb administration. Median duration of COVID-19 symptoms after NmAb administration was 2.5 days. Progression to severe/critical COVID-19 occurred among a total of 17% (15/88) of our cases and numerically higher with bamlanivimab versus casirivimab/imdevimab (21% vs. 8%; $p = 0.215$), and myelomas (29%), lymphomas (17%) and acute leukemias (18%), respectively. During final follow-up, nine deaths (10%) were recorded – all after bamlanivimab ($p = 0.056$) with 8% attributed to COVID-19. Regarding “remdesivir/convalescent plasma naïve” patients, COVID-19 mortality rates were significantly lower in our NmAbs treated cohort compared to the control cohort of untreated SARS-CoV-2

positive hematological patients (6% vs. 16%, $p = 0.020$), respectively. Our study validated the safety and efficacy of NmAbs early use among hematological patients with newly diagnosed early-stage COVID-19 in terms of alleviating infection course and decreasing mortality. Results confirmed a more positive effect of a casirivimab/imdevimab combination versus bamlanivimab monotherapy.

1 | INTRODUCTION

During randomized trials involving general outpatients, neutralizing spike receptor-binding protein monoclonal antibodies (NmAbs) against SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus-2) compared to placebos have affirmed effect related to a significant decrease in viral load, outpatient visits, hospitalizations, and COVID-19-related deaths (Coronavirus Disease 2019), with an excellent current safety profile.^{1,2} Similar results were obtained via retrospective case-control studies regarding frequency reduction of hospitalizations.^{3,4}

Immunocompromized patients are generally more susceptible to COVID-19 with higher mortality reported than the general population.^{5,6} To date, only a limited number of retrospective case studies chronicling SARS-CoV-2-positive solid organ transplant patients with no worsening of symptoms and further hospitalization after NmAbs administration have been published.^{7,8}

In literature, robust data on NmAbs effectivity in COVID-19 positive hematological patients are still lacking.^{9,10} As a result, we resolved to analyze results of what at the time was dominantly the largest cohort of COVID-19 immunocompromized hematology patients treated with NmAbs-bamlanivimab or casirivimab/imdevimab.

2 | METHODS

Our prospective study included random successive patients with hematological disease diagnosed with COVID-19, verified with Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) or antigen testing, and subsequently treated with a neutralizing spike

receptor-binding protein monoclonal antibody – bamlanivimab or a casirivimab/imdevimab combination – against SARS-CoV-2, administered from 01 March 2021 through 13 May 2021 at eight Czech Republic hematological centers. The project was initiated and implemented on behalf of the Czech Leukemia Study Group for Life. Medicines were administered following temporary regulatory authorization by the Czech Republic Ministry of Health. Disease severity was assessed according to adapted definitions.¹¹ Data were obtained from source medical documentation covering comorbidities, COVID-19 diagnostics, therapy, and outcome.

After COVID-19 antigen or RT-PCR diagnosis, all patients received a single dose of either 700 mg of bamlanivimab (72%) or 1200 mg of casirivimab/1200 mg of imdevimab (28%).

Research was respective of relevant guidelines and regulations with project approval by the Multicentric Ethics Committee of the Brno University Hospital (Number 01-290321/EK). All patients involved signed an informed consent form.

Basic statistical methods describing absolute and relative frequency for categorical variables, mean, median, minimum and maximum for continuous variables, respectively, were employed. Categorical parameter relations were evaluated using Fisher's exact tests with $p = 0.05$ as a statistical significance level. COVID-19 mortality data were compared with a control cohort of SARS-CoV-2 positive hematology patients from participating centers who were not treated with NmAbs or any COVID-19 specific treatment.

3 | RESULTS

A total of 88 hematological patients, with lymphomas, acute leukemias, and myeloma as the most frequent underlying diagnoses (72%; 64/88) were evaluated with a 97 days median follow-up (mean: 89, range: 8–138) after NmAb administration. One third of patients (32%; 28/88) were treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab in all cases) during the 2 years prior to COVID-19 diagnosis. Around a third of patients (36%; 29/81) received at least one dose of SARS-CoV-2 vaccine before their COVID-19 diagnosis. 15% (12/82) of patients had a second COVID-19 episode when NmAb was administrated. Baseline characteristics are described in Table 1. Among 81 evaluable cases, median time between the first COVID-19 symptom and NmAb administration was 2 days (mean: 3, range: 0–16). Median time between SARS-CoV-2 positivity and NmAb treatment was 1 day. While administering NmAb, 25 (29%), 50 (57%), 10 (11%), 2 (2%), and one (1%) of our patients had an asymptomatic, mild, moderate, severe, or critical degree of COVID-19, respectively (Figure 1). Following NmAb administration, a total of 11/80 (14%) patients were treated with remdesivir, and 7 (7/80%; 9%) received (CP) together with remdesivir, respectively.

Regarding extent of infection during follow-up, 35%, 33%, 12%, 10%, and 10% of the entire group of patients had asymptomatic, mild, moderate, severe, and critical COVID-19, respectively. Among all

baseline asymptomatic patients, 80% (20/25) remained asymptomatic following NmAb administration. With 78 case evaluations, median duration of COVID-19 symptoms after NmAb administration was 2.5 days (mean: 11, range: 0–101). Progression to severe/critical COVID-19 occurred among 17% (15/88) of our patients – numerically more frequently yet not significantly in the bamlanivimab versus casirivimab/imdevimab cohort (21% vs. 8%; $p = 0.215$). Among the entire patient group, COVID-19's course indicating baseline severity and the specific extent of infection during follow-up is detailed in Figure 1.

Furthermore, the highest rates of COVID-19 progression to severe/critical degrees and death were observed among myelomas (29% and 12%), lymphomas (17% and 7%), acute leukemias (18% and 6%), and chronic lymphocytic leukemias (8% and 8%), respectively. Regarding concluding oncological treatment modality, COVID-19 progression to severe or critical degree and death during follow-up were most often recorded among patients after induction/reinduction of AL (60% and 20%), autologous stem cell transplantation (SCT; 25% and 13%), and in patients treated with anti-CD20 monoclonal antibody (14% and 11%), respectively. The data are summarized in Table 2.

The proportion of anti-SARS-CoV-2 vaccinated patients was approximately the same in both groups of patients with moderate/severe/critical (Mo/S/C) COVID-19 when compared to asymptomatic/mild (A/Mi) COVID-19 at follow-up (8/28%, 29% vs. 21/60%, 35%; $p = 0.631$). The median number of days from first vaccination to COVID-19 diagnosis was yet not significantly but numerically longer in the Mo/S/C group compared to the A/Mi group (21 vs. 14 days; $p = 0.542$). Prior to COVID-19 diagnosis, 4% of patients with Mo/S/C worst degree of infection versus 5% of patients with A/Mi worst degree of infection received a second vaccination.

Final evaluation during the last follow-up affirmed 89% (78/88) asymptomatic patients, one patient (1%; 1/88) with an abiding symptom (dyspnea), and nine deaths (10%; 9/88). All deaths involved patients administered bamlanivimab, with seven fatalities (8%) resulting from COVID-19. The number of deaths was markedly higher with the cohort given bamlanivimab compared to the group dispensed casirivimab/imdevimab (14% vs. 0%; $p = 0.056$). Data concerning COVID-19-related cohort fatalities are available in Table S1. All three patients with severe or critical COVID-19 at baseline were still surviving at the time of their last follow-up.

When comparing COVID-19-related mortality in our group of NmAbs-treated "remdesivir/CP-naïve" patients ($n = 69$) with a control cohort of SARS-CoV-2 positive hematology patients without any COVID-19-specific treatment managed by participating centers ($n = 575$), significantly fewer patients died in our NmAbs treated group than in the untreated control group (16% vs. 6%, $p = 0.020$; Table 2).

Adverse side effects were reported in 1 patient (1/63%; 2%) after bamlanivimab (syncope, nausea, fever) and with 1 patient (1/25%; 4%) after casirivimab/imdevimab (burning and eye pain).

TABLE 1 Characteristics of COVID-19 hematological patients enrolled in the study

Number of patients, n (%)	88 (100)
Age at the time of COVID-19 diagnosis, years, median; mean (range)	63; 58 (19–84)
Sex, male, n (%)	48 (55)
Comorbidities, n (%)	
Hypertension	32 (36)
Diabetes mellitus	18 (21)
Dyslipidemia	14 (16)
Coronary heart disease	11 (13)
Smoking	8/79 (10)
Allergy	38/82 (46)
Pulmonary disease	7 (8)
Obesity	6 (7)
Other	32 (36)
None	21 (24)
Unknown	4 (5)
Underlying disease at baseline, n (%)	
Lymphoma	30 (34)
Acute leukemia	17 (19)
Multiple myeloma	17 (19)
Chronic lymphocytic leukemia	12 (14)
Myeloproliferative neoplasias	4 (5)
Chronic myeloid leukemia	2 (2)
Myelodysplastic syndrome	2 (2)
Other hematological diseases	4 (5)
Number of days between diagnosis of hematological disease and COVID-19, median; mean (range)	406; 1462 (5–16,367)
Last hematological therapy 2 years prior to COVID-19, n (%)	
Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab in all cases)	28 (32)
Another chemotherapy	27 (31)
Autologous SCT	8 (9)
Allogeneic SCT	6 (7)
Corticosteroids	4 (5)
None	14 (16)
Number of days between last hematological therapy and COVID-19 diagnosis, median; mean (range)	19; 74 (0–721)
SARS-CoV-2 vaccination before COVID-19 diagnosis, n (%)	
Total number of vaccinated patients	29/81 (36)
Number of patients only after 1 st dosage of vaccination	25 (31)
Number of days between 1 st dosage of vaccination and COVID-19 diagnosis, median; mean (range)	15; 19 (6–53)
Number of patients after 2 nd dosage of vaccination	4 (5)
Number of days between 2 nd dosage of vaccination and COVID-19 diagnosis, median; mean (range)	22; 33 (5–83)

TABLE 1 (Continued)

COVID-19 second episode, n (%)	12/82 (15)
Type of anti-SARS-CoV-2 monoclonal neutralizing antibody, n (%)	
Bamlanivimab	63 (72)
Casirivimab/imdevimab	25 (28)
Number of days between COVID-19 diagnosis and NmAb administration, median; mean (range)	1; 1.4 (0–6)

Abbreviations: COVID-19, coronavirus disease 2019; NmAbs, neutralizing monoclonal antibodies; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2; SCT, stem cell transplantation.

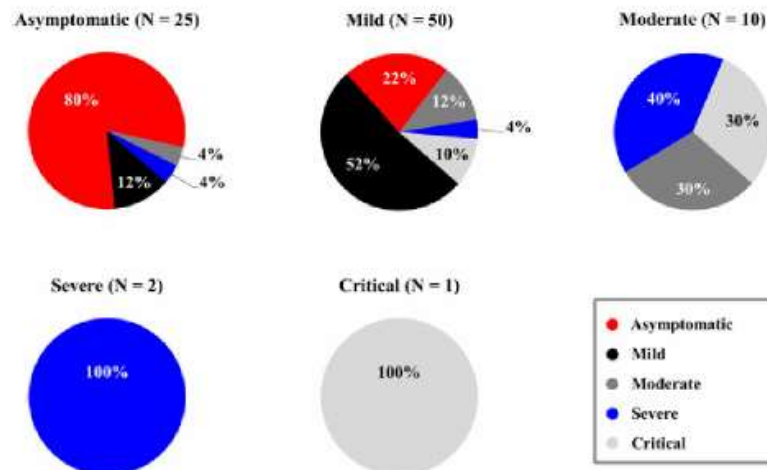


FIGURE 1 COVID-19 development overview from initial disease severity to the highest degree during NmAbs administration follow-up. Figure 1 presents a total of five pie charts divided according to COVID-19 baseline degree at the time of NmAbs administration. Percentage of COVID-19's worst degree at follow-up is indicated in pie chart colors (asymptomatic in red, mild in black, moderate in dark gray, severe in blue, and critical in light gray). COVID-19, corona virus disease 2019; NmAbs, neutralizing 344 monoclonal antibodies

4 | DISCUSSION

Our study highlights the importance of early administration of anti-SARS-CoV-2 neutralizing NmAbs, bamlanivimab or casirivimab/imdevimab, among hematological patients with freshly diagnosed COVID-19.

In literature, a number of extensive analyzes have been published detailing substantially higher mortality attributed to COVID-19 in hematological patients compared to the general population.^{5,6} As an example, one large meta-analysis study recorded more than a 30% mortality among individuals with hematological malignancies compared to the 8% mortality in our cohort.⁵

Anti-SARS-CoV-2 spike protein NmAbs might generally be effective in substantively decreasing viral load, along with reducing outpatient visits, hospitalizations, and COVID-19-related deaths with mild to moderate disease.^{one to four} Of major importance is timely treatment administration from the onset of COVID-19 symptoms, as

our research revealed a shorter median when compared with randomized studies (2.5 days vs. 3–4 days).^{1,2}

Similar results were obtained by a large retrospective case-control study noting all-cause mortality reduction at day 21 among a group of high-risk general patients who received bamlanivimab compared to a control group with mild to moderate COVID-19 (0.05% vs. 0.4%; Risk Ratio-RR, 0.13).³ Furthermore, another real-life clinical setting confirmed that NmAb (bamlanivimab or casirivimab/imdevimab) treatment significantly decreased hospital in-patient status among a general population cohort with mild to moderate COVID-19, especially when treatment was initiated ≤ 4 days after symptom onset.⁴

Regarding immunocompromized patients with a high risk of persistent viral replication and severe infection course, a case study analyzing 25 solid organ transplant patients with mild to moderate COVID-19 treated with casirivimab/imdevimab and another study from the same center evaluating a total of 10 solid organ transplant

TABLE 2 COVID-19 progression to severe or critical degree and deaths during follow-up compared to the control NmAbs untreated cohort

	Cohort of patients treated with NmAbs (n = 88)		Control cohort without NmAbs treatment (n = 575)
	Progression to severe/critical COVID-19	Deaths attributed to COVID-19	Deaths attributed to COVID-19
Total patients, n (%)	15/88 (17)	7/88 (8)	ND
Total "remdesivir/CP-naïve" patients, n (%)	6/69 (9)	4/69 (6)	93/575 (16)
Underlying disease at baseline, n (%)			
Lymphoma	5/30 (17)	2/30 (7)	22/114 (19)
Acute leukemia	3/17 (18)	1/17 (6)	14/87 (16)
Multiple myeloma	5/17 (29)	2/17 (12)	16/88 (18)
Chronic lymphocytic leukemia	1/12 (8)	1/12 (8)	21/88 (24)
Myeloproliferative neoplasias	0/4 (0)	0/4 (0)	6/57 (11)
Chronic myeloid leukemia	0/2 (0)	0/2 (0)	1/53 (2)
Myelodysplastic syndrome	0/2 (0)	0/2 (0)	9/34 (27)
Other hematological diseases	1/4 (25)	1/4 (25)	4/54 (7)
Last hematological therapy prior to COVID-19, n (%)			
Anti-CD20 monoclonal antibody	4/28 (14)	3/28 (11)	ND
Induction/reinduction of AL	3/5 (60)	1/5 (20)	ND
Autologous SCT	2/8 (25)	1/8 (13)	ND
Allogeneic SCT	0/6 (0)	0/6 (0)	ND
RD	1/1 (100)	0/1 (0)	ND
DRD	1/4 (25)	1/4 (25)	ND
Corticosteroids	2/4 (50)	1/4 (25)	ND
BV-CHP	1/1 (100)	0/1 (0)	ND
VTD	1/2 (50)	0/2 (0)	ND
Another chemotherapy	0/15 (0)	0/15 (0)	ND
None	0/14 (0)	0/14 (0)	ND
Number of days between last hematological therapy and COVID-19 diagnosis in patients with progression, median; mean (range)	11; 17 (0-98)		ND

Abbreviations: AL, acute leukemia; BV-CHP, Brentuximab Vedotin + Cyclophosphamide + Doxorubicin + Prednisone; COVID-19, coronavirus disease 2019; CP, convalescent plasma; DRD, Daratumumab + Revlimid + Dexamethasone; ND, not done; NmAbs, neutralizing monoclonal antibodies; RD, Revlimid + Dexamethasone; SCT, stem cell transplantation; VTD, Bortezomib + Thalidomide + Dexamethasone.

patients treated with bamlanivimab were published.^{7,8} In both studies, no patient experienced progression of symptoms or required hospitalization owing to COVID-19.

Concerning hematological patients, no extensive cohort studies of COVID-19 positive hematological patients treated with NmAbs have been published. A single-center experience of 42 cancer patients in total has been described (76% with hematological malignancy) where mild to moderate COVID-19 was treated with either bamlanivimab (83%) or casirivimab/imdevimab (17%).⁹ The median time to NmAb infusion - 5 days from symptom onset - was longer than in our study. Only 12% of these patients had COVID-19 deterioration requiring hospitalization -- all after bamlanivimab -- from

which one died (2%). Similarly by comparison, in our study only 17% of cases progressed to severe/critical COVID-19 - numerically more frequently in the bamlanivimab versus casirivimab/imdevimab (21% vs. 8%; $p = 0.215$). Analogous to published data, the highest rates of COVID-19 progression to a severe/critical degree and death were recorded with myeloma, lymphoma, AL, chronic lymphocytic leukemia, and in patients treated with anti-CD20 monoclonal antibody, induction/reinduction of AL, and autologous SCT, respectively (Table 2).^{5,6} Patients with progression of COVID-19 to severe/critical grade compared with patients without progression received their last oncology treatment at a numerically yet not significantly shorter median of 11 versus 21 days ($p = 0.142$). Furthermore, 80% of our

baseline asymptomatic patients remained asymptomatic throughout follow-up. Our cohort's COVID-19 symptoms median duration was only 2.5 days following NmAbs treatment.

Analogous to Puing's study, all deaths in our cohort occurred after bamlanivimab infusion ($p = 0.056$). All seven patient fatalities attributed to COVID-19 had either concomitant advanced hematological malignancy, numerous severe comorbidities, or received treatment prior to COVID-19 with a profound and long-lasting immunosuppressive effect as indicated in Table S1. The control cohort of SARS-CoV-2 positive hematology patients without specific COVID-19 treatment managed by participating centers exhibited a significantly higher COVID-19-related death rate than our analyzed "remdesivir/CP-naive" cohort of NmAbs-treated patients (16% vs. 6%, $p = 0.020$; Table 2). The highest mortality in the control cohort of patients with lymphoma, AL, high-risk myelodysplastic syndrome, multiple myeloma, and chronic lymphocytic leukemia correlated with published data.^{5,6}

Significantly, among the 36% of our cohort patients becoming infected with COVID-19 following vaccination, only 5% were infected after their second dose. Nonetheless, the median time between the first dose of vaccine and COVID-19 symptom onset was only 15 days among the single-dose group. Anti-SARS-CoV-2 vaccination before COVID-19 diagnosis had no effect on the course of infection after NmAbs administration; proportion of vaccinated versus unvaccinated patients was similar in both A/Mi and Mo/S/C groups (35% vs. 29%, $p = 0.631$) with a longer median time from the first dose in the Mo/S/C group (21 vs. 14 days), respectively. In addition, antibody testing for determining SARS-CoV-2 serostatus was not undertaken before the COVID-19 diagnosis.

Unfortunately, SARS-CoV-2 variants are emerging with potential to reduce NmAbs efficacy. Extensive recent analysis has detailed efficacy against many variants of infection with low prophylactic doses of NmAbs in animal models, without the development of resistance, albeit with the exception of bamlanivimab monotherapy and bamlanivimab/etesevimab combination therapy.¹² Therefore, bamlanivimab monotherapy was no longer permitted during the time of Delta variant predominance. Although all patients had not been genotyped at the time of our study, the Alpha variant prevailed in the Czech Republic with potentially preserved susceptibility to bamlanivimab.

Our study's major strength is its focus on a uniform robust multi-center cohort comprised of hematological patients compared to a control cohort without any COVID-19 specific treatment. Study constraints concern the regulatory authorization for administration of only the lowest dose of bamlanivimab with a lower efficacy.

5 | CONCLUSIONS

Patients with hematological malignancies are at high risk for severe and life-threatening COVID-19 exposure. Based on our analysis results, early-administered anti-SARS-CoV-2 spike protein monoclonal neutralizing antibodies appear to be safe and effective in alleviating infection course and improving prognosis among

hematological patients with early-stage COVID-19. COVID-19-related mortality was substantially 3-fold lower compared to the control cohort of COVID-19 untreated hematological patients and was notably associated with advanced hematological disease and comorbidities. Our results should validate the enhanced effect of a casirivimab/imdevimab combination compared to bamlanivimab monotherapy.

KEYWORDS

anti-SARS-CoV-2 monoclonal neutralizing antibodies, bamlanivimab, casirivimab, COVID-19, hematological malignancy, imdevimab, SARS-CoV-2

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by Czech Republic Ministry of Health - conceptual development of research organization (FNBr, 65269705). This study was undertaken as part of our routine work.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing or conflicting interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Barbora Weinbergerová, and Jiří Mayer - contributed to study conception and design, implemented material preparation, data collection and analysis; composed and revised manuscript.

Ivo Demel, Benjamin Višek, Jan Válka, Martin Čerňan, Pavel Jindra, Jan Novák, Lukáš Stejskal, Flóra Kováčová, Tomáš Kabut, Tomáš Szotkowski, Roman Hájek, Pavel Žák, Petr Cetkovský, Zdeněk Král - contributed to study conception and design; data collection; comments on previous manuscript versions; reviewed and approved the final manuscript.

Barbora Weinbergerová^{1,2} 

Ivo Demel^{3,4}

Benjamin Višek⁵

Jan Válka⁶

Martin Čerňan⁷

Pavel Jindra⁸

Jan Novák⁹

Lukáš Stejskal¹⁰

Flóra Kováčová^{1,2}

Tomáš Kabut^{1,2}

Tomáš Szotkowski⁷

Roman Hájek^{3,4}

Pavel Žák⁵

Petr Cetkovský⁶

Zdeněk Král^{1,2}

Jiří Mayer^{1,2}

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

²Department of Internal Medicine - Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

³Department of Haemato-oncology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

⁴Department of Haemato-oncology, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

⁵4th Department of Internal Medicine-Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

⁶Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁷Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc and University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

⁸Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic

⁹Department of Internal Medicine and Haematology, University Hospital Královské Vinohrady and Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

¹⁰Department of Hematology, Silesian Hospital in Opava, Opava, Czech Republic

Correspondence

Barbora Weinbergerová, Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno, Czech Republic.
Email: Weinbergerova.Barbora@fnbrno.cz

Barbora Weinbergerová and Jiří Mayer authors contributed equally to this work.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Research data are not shared.

ORCID

Barbora Weinbergerová  <https://orcid.org/0000-0001-6460-2471>

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/hon.2974>.

REFERENCES

- Chen P, Nirula A, Heller B, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384(3):229-237.
- Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(3):238-251.
- Ganesh R, Pawlowski CF, O'Horo JC, et al. Intravenous bamlanivimab use associates with reduced hospitalization in high-risk patients with mild to moderate COVID-19. *J Clin Invest*. 2021;131(19): e151697.
- Verderese JP, Stepanova M, Lam B, et al. Neutralizing monoclonal antibody treatment reduces hospitalization for mild and moderate COVID-19: a real-world experience. *Clin Infect Dis*. 2021:ciab579.
- Vijenthira A, Gong IY, Fox TA, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 3377 patients. *Blood*. 2020;136(25):2881-2892.
- Pagano L, Salmanton-García J, Marchesi F, et al. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European hematology association survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):168.
- Dhand A, Lobo SA, Wolfe K, Feola N, Nabors C. Bamlanivimab for treatment of COVID-19 in solid organ transplant recipients: early single-center experience. *Clin Transpl*. 2021;35(4):e14245.
- Dhand A, Lobo SA, Wolfe K, et al. Casirivimab-imdevimab for treatment of COVID-19 in solid organ transplant recipients: an early experience. *Transplantation*. 2021;105(7):e68-e69.
- Puing AG, Ho S, Frankel P, et al. SARS-CoV-2 specific monoclonal antibody for the treatment of mild-to-moderate COVID-19 in cancer patients: a single-center experience. *J Infect Dis*. 2021: jjab406.
- Saultier P, Ninove L, Szeptowski S, et al. Monoclonal antibodies for the treatment of COVID-19 in a patient with high-risk acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2021;196. <https://doi.org/10.1111/bjh.17756>
- Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or moderate Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1757-1766.
- Chen RE, Winkler ES, Case JB, et al. In vivo monoclonal antibody efficacy against SARS-CoV-2 variant strains. *Nature*. 2021; 596(7870):103-108.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

4.1.4. Annex 27

Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Verga L., Višek B., Ilhan O., Nadali G., Weinbergerová B., Córdoba-Mascuñano R., Marchetti M., Collins GP., Farina F., Cattaneo C., Cabirta A., Gomes-Silva M., Itri F., van Doesum J., Ledoux MP., Čerňan M., Jakšić O., Duarte RF., Magliano G., Omrani AS., Fracchiolla NS., Kulasekararaj A., Valković T., Poulsen CB., Machado M., Glenthøj A., Stoma I., Ráčil Z., Piukovics K., Navrátil M., Emarah Z., Sili U., Maertens J., Blennow O., Bergantim R., García-Vidal C., Prezioso L., Guidetti A., Del Principe MI., Popova M., de Jonge N., Ormazabal-Vélez I., Fernández N., Falces-Romero I., Cuccaro A., Meers S., Buquicchio C., Antić D., Al-Khabori M., García-Sanz R., Biernat MM., Tisi MC., Sal E., Rahimli L., Čolović N., Schönlein M., Calbacho M., Tascini C., Miranda-Castillo C., Khanna N., Méndez GA., Petzer V., Novák J., Besson C., Duléry R., Lamure S., Nucci M., Zambrotta G., Žák P., Seval GC., Bonuomo V., Mayer J., López-García A., Sacchi MV., Booth S., Ciceri F., Oberti M., Salvini M., Izuzquiza M., Nunes-Rodrigues R., Ammatuna E., Obr A., Herbrecht R., Núñez-Martín-Buitrago L., Mancini V., Shwaylia H., Sciumè M., Essame J., Nygaard M., Batinić J., Gonzaga Y., Regalado-Artamendi I., Karlsson LK., Shapetska M., Hanakova M., El-Ashwah S., Borbényi Z., Çolak GM., Nordlander A., Dragonetti G., Maraglino AME., Rinaldi A., De Ramón-Sánchez C., Cornely OA.; EPICOVIDEHA working group. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):168. doi: 10.1186/s13045-021-01177-0. ISSN 17568722.

IF = 17,388 in 2020; ONCOLOGY Q1, HEMATOLOGY Q1; 5 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

Abstract

Background: Patients with hematological malignancies (HM) are at high risk of mortality from SARS-CoV-2 disease 2019 (COVID-19). A better understanding of risk factors for adverse outcomes may improve clinical management in these patients. We therefore studied baseline characteristics of HM patients developing COVID-19 and analyzed predictors of mortality.

Methods: The survey was supported by the Scientific Working Group Infection in Hematology of the European Hematology Association (EHA). Eligible for the analysis were adult patients with HM and laboratory-confirmed COVID-19 observed between March and December 2020.

Results: The study sample includes 3801 cases, represented by lymphoproliferative (mainly non-Hodgkin lymphoma $n = 1084$, myeloma $n = 684$ and chronic lymphoid leukemia $n = 474$) and myeloproliferative malignancies (mainly acute myeloid leukemia $n = 497$ and myelodysplastic syndromes $n = 279$). Severe/critical COVID-19 was observed in 63.8% of patients ($n = 2425$). Overall, 2778 (73.1%) of the patients were hospitalized, 689 (18.1%) of whom were admitted to intensive care units (ICUs). Overall, 1185 patients (31.2%) died. The primary cause of death was COVID-19 in 688 patients (58.1%), HM in 173 patients (14.6%), and a combination of both COVID-19 and progressing HM in 155 patients (13.1%). Highest mortality was observed in acute myeloid leukemia (199/497, 40%) and myelodysplastic syndromes (118/279, 42.3%). The mortality rate significantly decreased between the first COVID-19 wave (March–May 2020) and the second wave (October–December 2020) (581/1427, 40.7% vs. 439/1773, 24.8%, p value < 0.0001). In the multivariable analysis, age, active malignancy, chronic cardiac disease, liver disease, renal impairment, smoking history, and ICU stay correlated with mortality. Acute myeloid leukemia was a higher mortality risk than lymphoproliferative diseases.

Conclusions: This survey confirms that COVID-19 patients with HM are at high risk of lethal complications. However, improved COVID-19 prevention has reduced mortality despite an increase in the number of reported cases.

Keywords: COVID-19, Pandemic, Hematological malignancies, Epidemiology, EHA

Background

Coronavirus disease 19 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) in March 2020 [1]. During that year, COVID-19 spread worldwide, causing over 1.5 million deaths. Patients with hematological malignancies (HM) are considered at high risk of developing severe and life-threatening infections, because of immune deficiency and immunosuppressive treatments. Severe infections in HM patients can determine a worsening of the clinical outcome, potentially affecting life expectancy. SARS-CoV-2 affects HM patients disproportionately, leading often to severe COVID-19 with a high mortality rate [2]. So far, various reports have been published on COVID-19 HM patients, but in most cases on small patient cohorts [3–8], specific HM [9–12], or larger reports from single countries [13–16]. In June 2021, an ongoing worldwide registry of the American Society of Hematology (ASH) reported a total of 1013 cases of COVID-19 infections in HM [17]. Altogether, these data show a significant mortality rate, ranging between 13.8 and 39%, and highlighting the major relevance of COVID-19 management in this frail patient population [3–17]. Advanced disease, one or more co-morbidities, older age, type of

malignancy, in particular acute myeloid leukemia (AML), and several laboratory parameters, for example high C-reactive protein, lymphopenia, and neutropenia, were found to be risk factors for COVID-19 in HM patients [14–16]. A possible role of some antineoplastic drugs has been reported to be protective in patients with myeloproliferative disorders [18, 19]. Despite the current spread of vaccination programs among HM patients in several countries, the future trajectory of this pandemic seems still to be uncertain. Collecting further data and gaining a better knowledge about COVID-19 in HM is therefore relevant for hematologists around the world.

The EPICOVIDEHA, Epidemiology of COVID-19 Infection in Patients with Hematological Malignancies: A European Hematology Association Survey, multinational project aimed to collect COVID-19 cases occurring in HM patients in 2020, and was performed on behalf of the Scientific Working Group Infection in Hematology of the European Hematology Association (EHA). The objective was to assess epidemiology and outcomes of COVID-19 in HM patients.

Methods**Study design and patients**

EPICOVIDEHA is an international open web-based registry for patients with HM infected with SARS-CoV-2

4.1.5. Annex 28

Busca A., Salmanton-García J., Corradini P., Marchesi F., Cabirta A., Di Blasi R., Dulery R., Lamure S., Farina F., Weinbergerová B., Batinić J., Nordlander A., Lopez-Garcia A., Drgona L., Espigado I., Falces-Romero I., Garcia-Sanz R., Garcia-Vidal C., Guidetti A., Khanna N., Kulesekararaj A., Maertens J., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O., Pagano L. COVID-19 and CAR-T cells: current challenges and future directions-a report from the EPICOVIDEHA survey by EHA-IDWP. *Blood Adv.* 2022; 12;6(7):2427-2433. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005616. ISSN 2473-9537.

IF = 6,799 in 2020; HEMATOLOGY Q1; 0 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

COVID-19 and CAR T cells: a report on current challenges and future directions from the EPICOVIDEHA survey by EHA-IDWP

Alessandro Busca,^{1,*} Jon Salmanton-García,^{2,3,*} Paolo Corradini,⁴ Francesco Marchesi,⁵ Alba Cabrita,^{6,7} Roberta Di Blasi,⁸ Remy Dulery,⁹ Sylvain Lamure,¹⁰ Francesca Farina,¹¹ Barbora Weinbergerová,¹² Josip Batinić,¹³⁻¹⁵ Anna Nordlander,¹⁶ Alberto López-García,¹⁷ L'uboš Drgoňa,¹⁸ Ildefonso Espigado-Tocino,¹⁹ Iker Falces-Romero,²⁰ Ramón García-Sanz,²¹ Carolina García-Vidal,²² Anna Guidetti,²³ Nina Khanna,²⁴ Austin Kulasekararaj,²⁵ Johan Maertens,²⁶ Martin Hoenig,²⁷⁻²⁹ Nikolai Klimko,³⁰ Philipp Koehler,^{2,3} Antonio Pagliuca,³¹ Francesco Passamonti,³² Oliver A. Cornely,^{2,3,33,34} and Livio Pagano^{35,36}

¹Stem Cell Transplant Center, Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza, Turin, Italy; ²Department I of Internal Medicine, Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany; ³Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases, University Hospital Cologne, Cologne, Germany; ⁴University of Milan and Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; ⁵Hematology and Stem Cell Transplant Unit, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy; ⁶Department of Hematology, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain; ⁷Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ⁸Hôpital Saint Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France; ⁹Service d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Unité Mixte de Recherche (UMR) 938, Sorbonne Université, Paris, France; ¹⁰Department of Clinical Hematology, Montpellier University Hospital, IGMM UMR1535 CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France; ¹¹IRCCS Ospedale San Raffaele, Milan, Italy; ¹²Department of Internal Medicine-Hematology and Oncology, Masaryk University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ¹³University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia; ¹⁴Croatian Cooperative Group for Hematological Diseases (CROHEM), Zagreb, Croatia; ¹⁵Faculty of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia; ¹⁶Department of Infectious Diseases, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden; ¹⁷Fundacion Jimenez-Diaz, Madrid, Spain; ¹⁸Comenius University and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia; ¹⁹Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain; ²⁰La Paz University Hospital, Madrid, Spain; ²¹Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ²²Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ²³Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, University of Milan, Milan, Italy; ²⁴Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, Department of Clinical Research, University and University Hospital of Basel, Basel, Switzerland; ²⁵King's College Hospital, London, United Kingdom; ²⁶Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium; ²⁷Division of Infectious Diseases and Global Public Health, Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA; ²⁸Clinical and Translational Fungal Working Group, University of California San Diego, La Jolla, CA; ²⁹Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria; ³⁰Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, North Western State Medical University, St Petersburg, Russia; ³¹Department of Hematological Medicine, Kings College Hospital, National Health Service Foundation Trust, London, United Kingdom; ³²Department of Medicine and Surgery, University of Insubria and Azienda Socio Sanitaria Territoriale Sette Laghi, Ospedale di Circolo di Varese, Varese, Italy; ³³University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Clinical Trials Centre Cologne, Cologne, Germany; ³⁴German Centre for Infection Research, Partner Site Bonn-Cologne, Cologne, Germany; ³⁵Hematology, IRCCS Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rome, Italy; and ³⁶Hematology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy

Key Points

- The EHA-IDWP developed an observational registry collecting data on COVID-19 infection in patients who received CAR T-cell therapy.
- Prevalence of COVID-19 was 4.8%, and overall mortality was 50%, highlighting the need for prevention of infection in these patients.

Introduction

Since it was first reported in China, coronavirus disease 2019 (COVID-19) has spread rapidly around the world, and the number of cases has increased exponentially.¹ Initial reports suggested that patients with cancer have an estimated twofold increased risk of contracting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) compared with the general population.² More importantly, it is expected that COVID-19 will be particularly life threatening in patients with hematological malignancies because of their immune dysfunction. Recent studies have reported an overall COVID-19-related mortality of 29% to 42%³⁻⁸ in patients with hematological disease, depending on the type of malignancy, in contrast to the 2% to 7% observed in the general population. Regrettably, there remains a lack of studies about COVID-19 in patients receiving cellular therapies, including chimeric antigen receptor (CAR) T cells.^{9,10} CAR T cells are genetically modified autologous T cells, which have shown great promise in the treatment of advanced malignant hematological disorders, including non-Hodgkin lymphoma, acute lymphoblastic leukemia, and multiple myeloma.¹¹ CAR T-cell recipients have significant B-cell aplasia requiring immunoglobulin G replacement therapy and may also develop delayed cytopenias, leaving them unable to mount any humoral response to viral infections.¹² Shah et al¹⁰ demonstrated that the seroconversion rate in a small cohort of patients treated with hemopoietic stem cell transplantation (HSCT) and CAR T-cell therapy did not exceed 66%.

Submitted 25 June 2021; accepted 24 October 2021; prepublished online on *Blood Advances* First Edition 8 November 2021; final version published online 11 April 2022.
DOI 10.1182/bloodadvances.2021005616.

*A.B. and J.S.-G. contributed equally to this study.

Requests for data sharing may be submitted to Alessandro Busca (abusca@cittadellasalute.to.it).

© 2022 by The American Society of Hematology. Licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0), permitting only noncommercial, nonderivative use with attribution. All other rights reserved.

4.1.6. Annex 29

Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Lopez-Garcia A., Lamure S., Itri F., Gomes da Silva M., Dragonetti G., Falces-Romero I., van Doesum J., Sili U., Labrador J., Calbacho M., Bilgin Y., Weinbergerová B., Serrano Gomez LM., Ribera JM., Malak S., Loureiro-Amigo J., Glenthøj A., Cordoba R., Nunes Rodrigues R., Gonzalez-Lopez TJ., Karlsson LK., Jimenez MJ., Hernández-Rivas JÁ., Jaksic O., Racil Z., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O. COVID-19 in vaccinated adult patients with hematological malignancies. Preliminary results from EPICOVIDEHA. *Blood* 2022; 139(10):1588-1592. doi: 10.1182/blood.2021014124. ISSN 1528-0020.

IF = 23,629 in 2020; HEMATOLOGY Q1; 0 citations according to WOS or Scopus, without self-citations

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)



TO THE EDITOR:

COVID-19 in vaccinated adult patients with hematological malignancies: preliminary results from EPICOVIDEHA

Livio Pagano,^{1,2,4} Jon Salmanton-García,^{3,4,*} Francesco Marchesi,^{5,*} Alberto López-García,⁶ Sylvain Lamure,⁷ Federico Itri,⁸ Maria Gomes-Silva,⁹ Giulia Dragonetti,^{1,2} Iker Falces-Romero,¹⁰ Jaap van Doesum,¹¹ Uluhan Sili,¹² Jorge Labrador,¹³ Maria Calbacho,¹⁴ Yavuz M. Bilgin,¹⁵ Barbora Weinbergerová,¹⁶ Laura Serrano,¹⁷ José-María Ribera-Santa Susana,¹⁸ Sandra Malak,¹⁹ José Loureiro-Amigo,²⁰ Andreas Glenthøj,²¹ Raúl Córdoba-Masculano,⁶ Raquel Nunes-Rodrigues,²² Tomás-José González-López,¹³ Linda Katharina Karlsson,²³ María-Josefa Jiménez-Lorenzo,²⁴ José-Ángel Hernández-Rivas,²⁵ Ozren Jaksic,²⁶ Zdeněk Ráčil,²⁷ Alessandro Busca,²⁸ Paolo Corradini,²⁹ Martin Hoenigl,³⁰⁻³² Nikolai Klimko,³³ Philipp Koehler,^{3,4} Antonio Pagliuca,³⁴ Francesco Passamonti,³⁵ and Oliver A. Cornely,^{3,4,36-38} on behalf of the EPICOVIDEHA working group

¹Department of Hematology, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli–Institute for Cancer Research and Care (IRCCS), Rome, Italy; ²Department of Hematology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy; ³Department I of Internal Medicine, University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), Cologne, Germany; ⁴University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), Cologne, Germany; ⁵Hematology and Stem Cell Transplant Unit, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy; ⁶Fundación Jimenez Diaz University Hospital, Health Research Institute, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez-Díaz (IS-FJD), Madrid, Spain; ⁷Département d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier, Unité Mixte de Recherche–Centre National de la Recherche Scientifique (UMR-CNRS) 5535, Université de Montpellier, Montpellier, France; ⁸San Luigi Gonzaga Hospital–Orbassano, Orbassano, Italy; ⁹Portuguese Institute of Oncology, Lisbon, Portugal; ¹⁰La Paz University Hospital, Madrid, Spain; ¹¹Department of Hematology, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands; ¹²Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Marmara University, Istanbul, Turkey; ¹³Department of Hematology, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain; ¹⁴Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ¹⁵Admiraal de Ruijter Hospital, Goes, The Netherlands; ¹⁶Department of Internal Medicine–Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ¹⁷Hospital Universitario de Cabueñes, Gijón, Spain; ¹⁸Hospital Germans Trias i Pujol–Institut Català d'Oncologia Badalona Servicio de Hematología Clínica, Barcelona, Spain; ¹⁹Département d'Oncologie Médicale, Hématologie, Institut Curie, Saint Cloud, France; ²⁰Hospital de Sant Joan Despi Moisés Broggi, Sant Joan Despi, Spain; ²¹Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; ²²Departamento de Hematología, Instituto Português de Oncologia, Lisboa, Portugal; ²³Department of Hematology, Center for Hemoglobinopathies, Herlev and Gentofte Hospital, Herlev, Denmark; ²⁴Hospital Germans Trias i Pujol–Institut Català d'Oncologia Badalona Servicio de Hematología Clínica, Barcelona, Spain; ²⁵Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain; ²⁶Department of Hematology, Dubrava University Hospital, Zagreb, Croatia; ²⁷Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic; ²⁸Stem Cell Transplant Center, Azienda Ospedaliera-Universitaria (AOU) Città della Salute e della Scienza, Turin, Italy; ²⁹University of Milan and Fondazione, IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; ³⁰Division of Infectious Diseases and Global Public Health, Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA; ³¹Clinical and Translational Fungal-Working Group, University of California San Diego, La Jolla, CA; ³²Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria; ³³North-Western State Medical University (named after) Iliá Ilich Méchnikov, Saint-Petersburg, Russia; ³⁴Department of Hematological Medicine, King's College Hospital National Health Service (NHS) Foundation Trust, London, United Kingdom; ³⁵Department of Medicine, Surgery, University of Insubria and Azienda socio sanitaria territoriale (ASST) Sette Laghi, Ospedale di Circolo of Varese, Varese, Italy; ³⁶University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Clinical Trials Centre Cologne (Zentrum für Klinische Studien [ZKS] Köln), Cologne, Germany; ³⁷University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), Cologne, Germany; and ³⁸German Centre for Infection Research (DZIF), Partner Site Bonn-Cologne, Cologne, Germany

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a life-threatening condition of high relevance for comorbid patients, such as those with baseline hematological malignancies (HM).¹⁻³ In April 2020, the European Hematology Association - Infectious Diseases Working Party opened an open web-based registry to collect all cases of HM adult patients that developed COVID-19 infections (EPICOVIDEHA survey).⁴ This registry aimed to describe the epidemiology, risk factors, and mortality rates of HM patients. Overall, we collected 3801 valid cases, and we observed an overall mortality rate of 31%.⁵

Nearly 1 year after the first described COVID-19 case, in December 2020, the first vaccines against the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) were available,^{6,7} and administration to the highest risk populations including HM patients started.^{8,9} From 1 January 2021, we prospectively collected registry data on adult fully or partially vaccinated HM patients that developed COVID-19 to assess the vaccine efficacy and potentially

identify categories of patients that may be less protected by vaccines. With this report, we share our findings of the first 113 patients included in the registry.

EPICOVIDEHA survey has been approved centrally by the Institutional Review Board and Ethics Committee of Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli – IRCCS – Università Cattolica del Sacro Cuore (Rome, Italy) and by the respective local partners as appropriate. EPICOVIDEHA has been registered at www.clinicaltrials.gov with the identifier NCT04733729.⁴ From 1 January 2021 until 31 December 2021, all participating institutions document episodes of COVID-19 in their patients with baseline HM that received a vaccination against SARS-CoV-2. Data are collected via the EPICOVIDEHA electronic case report form, available at www.clinicalsurveys.net. This online survey is provided by Enterprise Feedback Suite Fall 2018 (Questback, Cologne, Germany). Clinical and epidemiological data from

Downloaded from <https://pubs.ascp.net/doi/10.1182/blood.2021.11124> by guest on 19 April 2022

5. Conclusions and Perspectives

This habilitation thesis represented in the form of an annotated set of publications reflects the aspirant's more than 15 years of scientific experience in the field of infectious complications among immunocompromised patients. Focus is on opportunistic pathogens, specifically invasive fungal diseases, and, most recently, the pandemic SARS-CoV-2 infection. Habilitation thesis provisions assuage all set goals with fundamental contributions to diagnostic and treatment optimization of infectious complications in patients with hematological malignancies both at the national and international levels. Quality data and analyzes were based on the sophisticated FIND database prescribed for IFD cases coordinated by the applicant within Czech and Slovak hematology centers. Based on our data, the importance of both fungal cell wall antigen determination - galactomannan and 1,3-beta-D-glucan - and fungal nucleic acids using PCR methods in serum, BAL fluid, and other body materials for IFD diagnostics was evaluated among factors influencing test performance. Moreover, new methodological procedures have been introduced into routine clinical practice in the field of IFD molecular biological diagnostics. Achievements were embodied by a number of publications within impact journals. Recent COVID-19 pandemic issues and related comprehensive assessment concerning hematological patients, including clinical course and treatment effectiveness, were analogously published in prestigious impact journals.

Infections, concurrently with progressive hematological malignancy, are the principal causes of mortality among hematological patients. Consequently, systematic collection of robust data with applicable timely analysis epitomizes an inviolable cornerstone for optimizing care and improving the prognosis of hematological patients to whom the aspirant, through her scientific endeavors, continuously devotes herself.

5.1. Habilitation Thesis Conclusions at Key Points

1,3-beta-D-glucan in Invasive Fungal Disease

1,3-beta-D-glucan is exposed to low PPV from both BAL and serum fluid in IPA prediction, owing to the high rate of false positive results within the environment's ubiquitous marker.

Neither the combination of both materials nor our new optimal cut-off, led to a significant test quality improvement for IPA prediction. Higher absolute neutrophil counts at the time of BAL and higher aspirated BAL fluid volume significantly reduced BDG assay performance. Other factors (current colonization or bacterial or *Candida* sp. respiratory tract infection or colonization, antifungal treatment) did not have a significant effect. The BDG test in predicting probable and proven IPA did not exceed the GM test quality.

High negative predictive value predetermines the BDG test as a serum screening method for IFD.

Galactomannan in Invasive Fungal Disease

Galactomannan, in contrast to 1,3-beta-D-glucan, is the gold standard for IA diagnosis.

However, test quality with predicting IA may be hampered by false positives (eg concomitant treatment with beta-lactam antibiotics, Plazmalyte infusion solution). Conversely, we have not demonstrated current mucositis as a possible cause of false positivity.

Significant factors affecting the quality of the GM BAL fluid and serum test in the prediction of IPA were neutropenia, antifungal therapy, and aspirated BAL volume.

PCR Methods in Invasive Fungal Disease

At our workplace, we introduced the PCR method with subsequent high-resolution melting analysis for rapid detection of invasive mucormycosis, which is otherwise difficult to diagnose in clinical practice.

To detect a wide range of IFD, a panfungal PCR procedure followed by high-resolution melting curve analysis has been incorporated into real clinical practice, which can consequently distinguish infection from colonization or contamination.

Current antifungal treatment did not affect the SEN of the PCR test, contrary to the described GM test effect.

COVID-19 Among General Population

To effectively control the spread of SARS-CoV-2 infection among the general population during Czech Republic's first wave of the COVID-19 pandemic, the need for routine telemonitoring was acknowledged with the aim of early complication detection, intensifying general education, and, significantly, focusing awareness on necessity to complying with effective government quarantine regulations.

COVID-19 Among Hematological Patients

Patients with hematological malignancies (particularly AML, patients after ALO-HSCT, and those treated with anti-CD20 monoclonal antibodies) are confirmed to be a high-risk group for severe COVID-19 development.

Early combination treatment with remdesivir and convalescent plasma resulted in COVID-19 course alleviating and low mortality among hematologic patients regardless of baseline pneumonia. Similarly, early administration of bamlanivimab or casirivimab / imdevimab led to both decreases in COVID-19 severity and mortality among patients with hematological malignancies in the Czech Republic. Studies were undertaken during the period before the Omicron variant emergence.

6. References

1. Taplitz RA, Kennedy EB, Bow EJ, Crews J, Gleason C, Hawley DK, et al. Antimicrobial Prophylaxis for Adult Patients With Cancer-Related Immunosuppression: ASCO and IDSA Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018 Oct 20;36(30):3043–54.
2. Trecarichi EM, Pagano L, Candoni A, et al. Current epidemiology and antimicrobial resistance data for bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies: an Italian multicentre prospective survey. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:337–43.
3. Averbuch D, Cordonnier C, Livermore DM, et al. Targeted therapy against multi-resistant bacteria in leukemic and hematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 4th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-4, 2011). *Haematologica*. 2013a;98:1836–47.
4. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clin Microbiol Infect*. 2021 Dec 16;S1198-743X(21)00679-0.
5. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis*. 2019 Aug;19(8):e260–72.6. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, de la Camara R, Cordonnier C, Ward KN, et al. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2009 May;43(10):757–70.
7. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, Engelhard D, de la Camara R, Cordonnier C, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica*. 2016 Jul;101(7):803–11.
8. Ward KN, Hill JA, Hubacek P, de la Camara R, Crocchiolo R, Einsele H, et al. Guidelines from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia for management of HHV-6

infection in patients with hematologic malignancies and after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2019 Nov;104(11):2155–63.

9. Engelhard D, Mohty B, de la Camara R, Cordonnier C, Ljungman P. European guidelines for prevention and management of influenza in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients: summary of ECIL-4 (2011), on behalf of ECIL, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. *Transpl Infect Dis*. 2013 Jun;15(3):219–32.

10. Matthes-Martin S, Feuchtinger T, Shaw PJ, Engelhard D, Hirsch HH, Cordonnier C, et al. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis*. 2012 Dec;14(6):555–63.

11. Hirsch HH, Martino R, Ward KN, Boeckh M, Einsele H, Ljungman P. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis*. 2013 Jan;56(2):258–66.

12. Saade A, Styczynski J, Cesaro S, Infectious Disease Working party of EBMT. BK virus infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation: An update on pathogenesis, immune responses, diagnosis and treatments. *J Infect*. 2020 Sep;81(3):372–82.

13. Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, et al. ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Sep;71(9):2397–404.

14. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJG, Helweg-Larsen J, Matos O, et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Sep;71(9):2386–96.

15. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367-1376.

16. Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, Robin C, Cordonnier C, Schellongowski P, et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Sep;71(9):2405–13.

17. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2011 Feb 15;52(4):e56-93.
18. Averbuch D, Orasch C, Cordonnier C, Livermore DM, Mikulska M, Viscoli C, et al. European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance: summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. *Haematologica*. 2013 Dec;98(12):1826–35.
19. Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006;91:1068-1075.
20. Pagano L, Dragonetti G, Cattaneo C, et al. Changes in the incidence of candidemia and related mortality in patients with hematologic malignancies in the last ten years. A SEIFEM 2015-B report. *Haematologica*. 2017;102(10):e407-e410.
21. Nicolle MC, Bénet T, Thiebaut A, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica*. 2011;96(11):1685-91.
22. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods Mol Biol*. 2017;1508:17-65.
23. Lewis RE, Cahyame-Zuniga L, Leventakos K, et al. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: A 20-year autopsy study. *Mycoses*. 2013;56:638-645. ISSN 1439-0507.
24. Alexander BD, Lamothe F, Heussel CP, Prokop CS, Desai SR, Morrissey CO, et al. Guidance on Imaging for Invasive Pulmonary Aspergillosis and Mucormycosis: From the Imaging Working Group for the Revision and Update of the Consensus Definitions of Fungal Disease from the EORTC/MSGERC. *Clin Infect Dis*. 2021 Mar 12;72(Suppl 2):S79–88.
25. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63:e1–e60.
26. Boch T, Reinwald M, Spiess B, et al. Detection of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients by combined use of conventional culture, galactomannan, 1-3-beta-D-

glucan and *Aspergillus* specific nested polymerase chain reaction in a prospective pilot study. *J Crit Care.* 2018; 47:198-203.

27. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018 May;24 Suppl 1:e1–38.

28. Maertens JA, Girmenia C, Brüggemann RJ, Duarte RF, Kibbler CC, Ljungman P, et al. European guidelines for primary antifungal prophylaxis in adult haematology patients: summary of the updated recommendations from the European Conference on Infections in Leukaemia. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Dec 1;73(12):3221–30.

29. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica.* 2017 Mar;102(3):433–44.

30. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis.* 2019 Dec;19(12):e405–21.

31. Hoenigl M, Salmanton-García J, Walsh TJ, et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare mould infections: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology and the American Society for Microbiology. *Lancet Infect Dis.* 2021 Aug;21(8):e246-e257.

32. Chen SC, Perfect J, Colombo AL, et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect Dis.* 2021 Dec;21(12):e375-e386.

33. “WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic“ <https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic> (Poslední přístup: 8. února 2022).

34. Vijenthira A, Gong IY, Fox TA, Booth S, Cook G, Fattizzo B, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 3377 patients. *Blood.* 2020 Dec 17;136(25):2881–92.

35. Heussel CP, Kauczor HU, Heussel GE, Fischer B, Begrich M, Mildenerger P, et al. Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem-cell transplant recipients: use of high-resolution computed tomography. *J Clin Oncol.* 1999 Mar;17(3):796–805.
36. Vehreschild JJ, Heussel CP, Groll AH, et al. Serial assessment of pulmonary lesion volume by computed tomography allows survival prediction in invasive pulmonary aspergillosis. *Eur Radiol.* 2017;27:3275-3282.
37. White SK, Walker BS, Hanson, KE, Schmidt RL. Diagnostic Accuracy of β -d-Glucan (Fungitell) Testing Among Patients With Hematologic Malignancies or Solid Organ Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Clin Pathol.* 2019;151:275-285.
38. Hou T-Y, Wang S-H, Liang S-X, et al. The Screening Performance of Serum 1,3-Beta-D-Glucan in Patients with Invasive Fungal Diseases: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS ONE* 2015;10:e0131602.
39. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, et al. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis.* 2012;54:633-643.
40. He S, Hang J-P, Zhang L, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48:351-361.
41. Azoulay E, Guigue N, Darmon M, et al. (1, 3)- β -D-glucan assay for diagnosing invasive fungal infections in critically ill patients with hematological malignancies. *Oncotarget.* 2016;7:21484-21495.
42. Levesque E, Rizk F, Noorah Z, et al. Detection of (1,3)- β -d-Glucan for the Diagnosis of Invasive Fungal Infection in Liver Transplant Recipients. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4):862.
43. Prattes J, Flick H, Prüller F, et al. Novel tests for diagnosis of invasive aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190:922-929.
44. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis.* 2005;41:654-659.

45. Acosta J, Catalan M, del Palacio-Peréz-Medel A, et al. A prospective comparison of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary invasive aspergillosis in medical patients under intensive care: comparison with the diagnostic performance of galactomannan and of (1→3)-β-d-glucan chromogenic assay in serum samples. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1053-1060.
46. Shi X-Y, Liu Y, Gu XM, et al. Diagnostic value of (1 → 3)-β-D-glucan in bronchoalveolar lavage fluid for invasive fungal disease: A meta-analysis. *Respir Med.* 2016;117:48-53.
47. Rose SR, Vallabhajosyula S, Velez MG, et al. The utility of bronchoalveolar lavage beta-D-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections. *J Infect.* 2014;69:278-283.
48. Mutschlechner W, Risslegger B, Willinger B, et al. Bronchoalveolar Lavage Fluid (1,3)β-D-Glucan for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Solid Organ Transplantation: A Prospective Multicenter Study. *Transplantation.* 2015;99:e140-144.
49. Theel ES, Jespersen DJ, Iqbal S, et al. Detection of (1, 3)-β-D-glucan in bronchoalveolar lavage and serum samples collected from immunocompromised hosts. *Mycopathologia.* 2013;175:33-41.
50. Usami M, Ohata A, Horiuchi T, Nagasawa K, Wakabayashi T, Tanaka S. Positive (1A3)-b-D-glucan in blood components and release of (1A3)-b-D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion.* 2002;42:1189-1195.
51. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1A3)-b-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1650-1659.
52. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5957-5962. ISSN 0095-1137.
53. Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, Verweij PE. Pseudomonas aeruginosa as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1930-1931.
54. Albert O, Toubas D, Strady C, et al. Reactivity of (1→3)-β-d-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:1453-1460.
55. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2012;50:7-15. ISSN 0095-1137.

56. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:81-86.
57. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;4:CD007394.
58. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False positive galactomannan Platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin–tazobactam. *Clin Infect Dis.* 2004;38:913-916.
59. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia Aspergillus test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):3141-3142. ISSN 0095-1137.
60. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis.* 2004;190:641-649.
61. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol.* 2003;121:448-457.
62. Becker MJ, de Marie S, Willemsse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1434-1438. ISSN 0095-1137.
63. White PL, Bretagne S, Klingspor L, et al. European Aspergillus PCR Initiative. Aspergillus PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1231-1240. ISSN 0095-1137.
64. White PL, Wingard JR, Bretagne S, et al. Aspergillus polymerase chain reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clin Infect Dis.* 2015;61:1293-1303.

65. Fan LC, Lu HW, Cheng KB, Li HP, Xu JF. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate metaanalysis and systematic review. *PLoS One*. 2013;8:e73099.
66. Lengerová M, Hrnčířová K, Ráčil Z, et al. Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu. 2011. Patent. Číslo: 302670. Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Masarykova univerzita Brno. Datum registrace: 21. 4. 2009. Datum přijetí: 13. 7. 2011.
67. Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, et al. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)-betaD-glucan detection. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):602-608. ISSN 0095-1137.
68. Sharma, A. et al. Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in haematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study. *Lancet Haematol* 8, e185–e193 (2021).
69. Passamonti, F. et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 severity in patients with haematological malignancies in Italy: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Haematol* 7, e737–e745 (2020).
70. Baddley JW, Thompson GR, Chen SC-A, White PL, Johnson MD, Nguyen MH, et al. Coronavirus Disease 2019-Associated Invasive Fungal Infection. *Open Forum Infect Dis*. 2021 Dec;8(12):ofab510.
71. Strati P, Varma A, Adkins S, Nastoupil LJ, Westin J, Hagemester FB, et al. Hematopoietic recovery and immune reconstitution after axicabtagene ciloleucel in patients with large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2021 Oct 1;106(10):2667–72.
72. Bergwerk M, Gonen T, Lustig Y, Amit S, Lipsitch M, Cohen C, et al. Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers. *N Engl J Med*. 2021 Oct 14;385(16):1474–84.
73. Juthani PV, Gupta A, Borges KA, Price CC, Lee AI, Won CH, et al. Hospitalisation among vaccine breakthrough COVID-19 infections. *Lancet Infect Dis*. 2021 Nov;21(11):1485–6.
74. Beigel, J. H. et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med* 383, 1813–1826 (2020).

75. Spinner, C. D. et al. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 324, 1048–1057 (2020).
76. Goldman, J. D. et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* 383, 1827–1837 (2020).
77. Spinner, C. D. et al. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 324, 1048–1057 (2020).
78. Aydillo, T. et al. Shedding of Viable SARS-CoV-2 after Immunosuppressive Therapy for Cancer. *N Engl J Med* 383, 2586–2588 (2020).
79. Reuken, P. A. et al. Severe clinical relapse in an immunocompromised host with persistent SARS-CoV-2 infection. *Leukemia* 35, 920–923 (2021).
80. Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, Coviello S, Bianchi A, Braem V, et al. Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. *N Engl J Med*. 2021 Feb 18;384(7):610–8.
81. Helleberg, M. et al. Persistent COVID-19 in an Immunocompromised Patient Temporarily Responsive to Two Courses of Remdesivir Therapy. *J Infect Dis* 222, 1103–1107 (2020).
82. Camprubí, D. et al. Persistent replication of SARS-CoV-2 in a severely immunocompromised patient treated with several courses of remdesivir. *Int J Infect Dis* 104, 379–381 (2020).
83. Mehta, R. M., Bansal, S., Bysani, S. & Kalpakam, H. A shorter symptom-onset to remdesivir treatment (SORT) interval is associated with a lower mortality in moderate-to-severe COVID-19: a real-world analysis. *Int J Infect Dis* (2021) doi:10.1016/j.ijid.2021.02.092.
84. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021 Jan 21;384(3):229–37.
85. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021 Jan 21;384(3):238–51.

86. Ganesh R, Pawlowski CF, O'Horo JC, Arndt LL, Arndt RF, Bell SJ, et al. Intravenous bamlanivimab use associates with reduced hospitalization in high-risk patients with mild to moderate COVID-19. *J Clin Invest*. 2021 Oct 1;131(19):e151697.
87. Verderese JP, Stepanova M, Lam B, Racila A, Kolacevski A, Allen D, et al. Neutralizing Monoclonal Antibody Treatment Reduces Hospitalization for Mild and Moderate COVID-19: A Real-World Experience. *Clin Infect Dis*. 2021 Jun 24;ciab579.
88. Dhand A, Lobo SA, Wolfe K, Feola N, Nabors C. Bamlanivimab for treatment of COVID-19 in solid organ transplant recipients: Early single-center experience. *Clin Transplant*. 2021 Apr;35(4):e14245.
89. Dhand A, Lobo SA, Wolfe K, Feola N, Lee L, Nog R, et al. Casirivimab-imdevimab for Treatment of COVID-19 in Solid Organ Transplant Recipients: An Early Experience. *Transplantation*. 2021 Jul 1;105(7):e68–9.
90. Puing AG, Ho S, Frankel P, Tegtmeier B, Martin A, Ross J, et al. SARS-CoV-2 Specific Monoclonal Antibody for the Treatment of Mild-to-Moderate COVID-19 in Cancer Patients: A Single-center Experience. *J Infect Dis*. 2021 Aug 11;jiab406.

7. List of Abbreviations

ALO-HSCT	Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation
AML	Acute Myeloid Leukemia
BAL	Bronchoalveolar Lavage
BDG	1,3-Beta-D-Glucan
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T cells
CELL	Czech Leukemia Study Group for Life
CLADE-IS	Clinical Data Warehousing Information System
CMBG	Center of Molecular Biology and Genetics
COVID-19	Coronavirus Disease 19
CP	Convalescent Plasma
CT	Computed Tomography
DATool-AML	Database of Acute Leukemia Tool – Acute Myeloid Leukemia
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOR	Diagnostic Odds Ratio
EDC	Electronic Data Capture
EHA	European Hematology Association
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EORTC/MSG	European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group
EPICOVIDEHA	Epidemiology of COVID-19 Infection in Patients with Hematological Malignancies
FDA	Food and Drug Administration
FIND	Fungal Infection Database
FPCRI	Fungal PCR Initiative

FUO	Fever of Unknown Origin
G+	Gram-positive
G-	Gram-negative
GM	Galactomannan
HRM	High Resolution Melt
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
IA	Invasive Aspergillosis
IBA	Institut of Biostatistics and Analyses
IF	Impact Factor
IFD	Invasive Fungal Diseases
IGA	Internal Grant Agency
IHOK	Interní Hematologická a Onkologická Klinika (Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology)
IPA	Invasive Pulmonary Aspergillosis
ISHAM	International Society of Human and Animal Mycology
IT	Information Technology
MIND	Myeloproliferative Neoplasia Database
MU	Masaryk University
NmAb	Neutralizing Monoclonal Antibodies
NPV	Negative Predictive Value
PCP	Pneumocystis Pneumonia
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPV	Positive Predictive Value
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrom-CoronaVirus-2
SEN	Sensitivity

SPE	Specificity
WHO	World Health Organization
WOS	Web of Science

8. List of Figures, Tables, and Annexes

8.1. List of Figures

Figure 1. Geographical Distribution of Patients Reported to EPICOVIDEHA 22

Figure 2. Czech and Slovak Hematooncology Centers Participating in the FIND Database
..... 82

8.2. List of Tables

Table 1. European Experts Societies Recommendations for First-line Targeted Antifungal IFD
Treatment 18

8.3. List of Annexes

1.4.1. Annex 1 23

(Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I. a Mayer J. Bakteriální infekce. In: Cetkovský P.,
ed. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. 1. vyd. Praha: Galén,
2016, s. 129-131. ISBN 978-80-749-2267-1.)

1.4.2. Annex 2 28

(Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Virové infekce. In: Adam Z., ed. *Obecná
onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 363-364. ISBN 978-80-726-2715-8.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.3. Annex 3 28

(Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Pneumonie způsobená *Pneumocystis
jiroveci* (carinii). In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 361-363.
ISBN 978-80-726-2715-8.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.4. Annex 4 28

(Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Febrilní neutropenie. In: Adam Z., ed.
Obecná onkologie. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 349-359. ISBN 978-80-726-2715-8.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.5. Annex 5 29

(Weinbergerová B., Ráčil Z., Kocmanová I., Mayer J. Horečka nejasného původu, systémové infekce. In: Cetkovský P., ed. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. 1. vyd. Praha: Galén, 2016, s. 122-128. ISBN 978-80-749-2267-1.)

1.4.6. Annex 6 38

(Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Křen L., Křikavová L., Mayer J. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2007;9(3):240-252. ISSN 1212-4184.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.7. Annex 7 40

(Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Mykotické infekce. In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 359-362. ISBN 978-80-726-2715-8.)

1.4.8. Annex 8 47

(Weinbergerová B., Kabut T., Kocmanová I., Drgoňa L., Kouba M., Hričinová M., Gabzdilová J., Guman T., Petečuková V., Novák J., Forsterová K., Haber J., Žiaková B., Bojtárová E., Zavřelová A., Karas M., Chrenková V., Sedláček P., Tkáčiková B., Múdry P., Mallátová N., Timr P., Kolenová A., Tanušková D., Horáková J., Navrátil M., Chudej J., Sokol J., Rolencová M., Žák P., Cetkovský P., Mayer J., Ráčil Z. Změny v epidemiologii invazivních mykotických infekcí v českých a slovenských hematoonkologických centrech v letech 2005–2017: analýza dat FIND. *Transfúze Hematol. dnes*. 2019;25(2):186–196. ISSN 1805-4587.)

1.4.9. Annex 9 59

(Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Lengerová M., Mayer J. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék*. 2007;53(9):990-999. ISSN 1801–7592.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.10. Annex 10 61

(Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J. Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2007;13(5):176-183. ISSN 1211-264X.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

1.4.11. Annex 11 63

(Weinbergerova B., Kocmanova I., Racil Z., Mayer J. Serological Approaches. In: Lion T., ed. *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1. vyd. New York: Springer Science+Business Media New York; 2017;1508:209-221. ISBN 978-1-4939-6513-7.)

3.1.1.1. Annex 12 85

(Stemler J., Bruns C., Mellinghoff SC., Alakel N., Akan H., Ananda-Rajah M., Auberger J., Bojko P., Chandrasekar PH., Chayakulkeeree M., Cozzi JA., de Kort EA., Groll AH., Heath CH., Henze L., Jimenez MH., Kanj SS., Khanna N., Koldehoff M., Lee D., Mager A., Marchesi F., Martino-Bufarull R., Nucci M., Oksi J., Pagano L., Phillips B., Prattes J., Pырpasopoulou A., Rabitsch W., Schalk E., Schmidt-Hieber M., Sidharthan N., Soler-Palacín P., Stern A., Weinbergerová B., El Zakhem A., Cornely OA., Koehler P. Baseline Chest Computed Tomography as Standard of Care in High-Risk Hematology Patients. *J. Fungi*. 2020;6(1):36. doi: 10.3390/jof6010036. ISSN 2309-608X.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

3.1.1.2. Annex 13 87

(Racil Z., Weinbergerova B., Kocmanova I., Muzik J., Kouba M., Drgona L., Masarova L., Guman T., Tothova E., Forsterova K., Haber J., Ziakova B., Bojtarova E., Vydra J., Mudry P., Foralova R., Sejnova D., Mallatova N., Kandrnal V., Cetkovsky P., Mayer J. Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics: Fungal InfectioN Database (FIND) analysis, 2005-2009. *Int J Infect Dis*. 2013;17:e101-e109. ISSN 1201-9712.)

3.1.1.3. Annex 14 97

(Racil Z., Winterova J., Kouba M., Zak P., Malaskova L., Buresova L., Toskova M., Lengerova M., Kocmanova I., Weinbergerova B., Timilsina S., Rolencova M., Cetkovsky P., Mayer J.

Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience. *Mycoses*. 2012;55(6):483-492. ISSN 1439-0507.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

3.2.1.1. Annex 15..... 101

(Weinbergerova B., Kabut T., Kocmanova I., Lengerova M., Pospisil Z., Kral Z., Mayer J. Bronchoalveolar lavage fluid and serum 1,3- β -D-glucan testing for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in hematological patients: the role of factors affecting assay performance. *Sci Rep*. 2020;10(1):17963. doi: 10.1038/s41598-020-75132-3. ISSN 2045-2322.)

3.2.1.2. Annex 16 111

(Racil Z., Kocmanova I., Lengerova M., Weinbergerova B., Buresova L., Toskova M., Winterova J., Timilsina S., Rodriguez I., Mayer J. Difficulties in using 1,3- β -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol*. 2010;59:1016–1022. ISSN 0022-2615.)

3.3.1.1. Annex 17 121

(Racil Z., Kocmanova I., Toskova M., Buresova L., Weinbergerova B., Lengerova M., Rolencova M., Winterova J., Hrnčirova K., Volfova P., Skrickova J., Mayer J. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis*. 2011;15:e874-e881. ISSN 1201-9712.)

3.2.1.2. Annex 18 130

(Racil Z., Kocmanova I., Weinbergerova B., Toskova M., Winterova J., Lengerova M., Buresova L., Timilsina S., Mayer J. Mucositis does not lead to false-positivity of the Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;7:851-855. ISSN 0934-9723.)

3.4.1.1. Annex 19 139

(Cruciani M., White PL., Mengoli C., Löffler J., Morton CO., Klingspor L., Buchheidt D., Maertens J., Heinz WJ., Rogers TR., Weinbergerova B., Warris A., Lockhart DEA., Jones B.,

Cordonnier C., Donnelly JP., Barnes RA., Fungal PCR Initiative. The impact of anti-mould prophylaxis on Aspergillus PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 76(3):635-638. doi: 10.1093/jac/dkaa498. ISSN 0305-7453.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

3.4.1.2. Annex 20 141

(Hrncirova K., Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Volfova P., Palousova D., Moulis M., Weinbergerova B., Winterova J., Toskova M., Pospisilova S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3392-3394. ISSN 0095-1137.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

3.4.1.3. Annex 21 143

(Lengerova M., Racil Z., Hrncirova K., Kocmanova I., Volfova P., Ricna D., Bejdak P., Moulis M., Pavlovsky Z., Weinbergerova B., Toskova M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):2824-2828. ISSN 0095-1137.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

3.4.1.4. Annex 22 145

(Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol.* 2016;54(7):714-724. ISSN 2185-6486.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

3.4.1.5. Annex 23 147

(Ricna D., Lengerova M., Bezdicek M., Kocmanova I., Drgona L., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR. *Folia microbiol.* 2019;64(3):421-428. ISSN 0015-5632.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

4.1.1. Annex 24	154
(Weinbergerova B., Mayer J., Hrabovsky S., Novakova Z., Pospisil Z., Martykanova L., Hortova K., Mandelova L., Hejduk K., Chloupková R., Pospisil M., Doubkova M., Marek V., Novotna R., Dolecek M., Kubesova HM., Brat K., Parizkova R., Husa P., Mechl M., Kral Z., Lengerova M. COVID-19's natural course among ambulatory monitored outpatients. <i>Sci Rep.</i> 2021;11(1):10124. doi: 10.1038/s41598-021-89545-1. ISSN 2045-2322.)	
4.1.2. Annex 25	171
(Weinbergerova B., Mayer J., Kabut T., Hrabovsky S., Prochazkova J., Kral Z., Herout V., Pacasova R., Zdrzilova-Dubska L., Husa P., Bednar P., Ruzek D., Lengerova M. Successful early treatment combining remdesivir with high-titer convalescent plasma among COVID-19-infected hematological patients. <i>Hematol Oncol.</i> 2021; 39(5):715-720. doi: 10.1002/hon.2908. ISSN 1099-1069.)	
4.1.3. Annex 26	178
(Weinbergerová B., Demel I., Višek B., Válka J., Čerňan M., Jindra P., Novák J., Stejskal L., Kováčsová F., Kabut T., Szotkowski T., Hájek R., Žák P., Cetkovský P., Král Z., Mayer J. Successful Early Use of Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Infected Hematological Patients – A Czech Multicenter Experience. <i>Hematol Oncol.</i> 2022; 40(2):280-286. doi: 10.1002/hon.2974. ISSN 1099-1069.	
4.1.4. Annex 27	186
(Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Verga L., Višek B., Ilhan O., Nadali G., Weinbergerová B., Córdoba-Mascuñano R., Marchetti M., Collins GP., Farina F., Cattaneo C., Cabirta A., Gomes-Silva M., Itri F., van Doesum J., Ledoux MP., Čerňan M., Jakšić O., Duarte RF., Magliano G., Omrani AS., Fracchiolla NS., Kulasekararaj A., Valković T., Poulsen CB., Machado M., Glenthøj A., Stoma I., Ráčil Z., Piukovics K., Navrátil M., Emarah Z., Sili U., Maertens J., Blennow O., Bergantim R., García-Vidal C., Prezioso L., Guidetti A., Del Principe MI., Popova M., de Jonge N., Ormazabal-Vélez I., Fernández N., Falces-Romero I., Cuccaro A., Meers S., Buquicchio C., Antić D., Al-Khabori M., García-Sanz R., Biernat MM., Tisi MC., Sal E., Rahimli L., Čolović N., Schönlein M., Calbacho M., Tascini C., Miranda-Castillo C., Khanna N., Méndez GA., Petzer V., Novák J., Besson C., Duléry R., Lamure S., Nucci M., Zambrotta G., Žák P., Seval GC., Bonuomo V., Mayer J., López-García A., Sacchi MV., Booth	

S., Ciceri F., Oberti M., Salvini M., Izuzquiza M., Nunes-Rodrigues R., Ammatuna E., Obr A., Herbrecht R., Núñez-Martín-Buitrago L., Mancini V., Shwaylia H., Sciumè M., Essame J., Nygaard M., Batinić J., Gonzaga Y., Regalado-Artamendi I., Karlsson LK., Shapetska M., Hanakova M., El-Ashwah S., Borbényi Z., Çolak GM., Nordlander A., Dragonetti G., Maraglino AME., Rinaldi A., De Ramón-Sánchez C., Cornely OA.; EPICOVIDEHA working group. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):168. doi: 10.1186/s13045-021-01177-0. ISSN 17568722.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

4.1.5. Annex 28 188

(Busca A., Salmanton-García J., Corradini P., Marchesi F., Cabirta A., Di Blasi R., Dulery R., Lamure S., Farina F., Weinbergerová B., Batinić J., Nordlander A., Lopez-Garcia A., Drgona L., Espigado I., Falces-Romero I., Garcia-Sanz R., Garcia-Vidal C., Guidetti A., Khanna N., Kulesekararaj A., Maertens J., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O., Pagano L. COVID-19 and CAR-T cells: current challenges and future directions-a report from the EPICOVIDEHA survey by EHA-IDWP. *Blood Adv.* 2022; 12;6(7):2427-2433. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005616. ISSN 2473-9537.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)

4.1.6. Annex 29 190

(Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Lopez-Garcia A., Lamure S., Itri F., Gomes da Silva M., Dragonetti G., Falces-Romero I., van Doesum J., Sili U., Labrador J., Calbacho M., Bilgin Y., Weinbergerová B., Serrano Gomez LM., Ribera JM., Malak S., Loureiro-Amigo J., Glenthøj A., Cordoba R., Nunes Rodrigues R., Gonzalez-Lopez TJ., Karlsson LK., Jimenez MJ., Hernández-Rivas JÁ., Jaksic O., Racil Z., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O. COVID-19 in vaccinated adult patients with hematological malignancies. Preliminary results from EPICOVIDEHA. *Blood* 2022; 139(10):1588-1592. doi: 10.1182/blood.2021014124. ISSN 1528-0020.)

(Listed "in extenso" in a separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*)



**Masaryk University
Faculty of Medicine**

**INVASIVE FUNGAL DISEASES AND COVID-19 IN
HEMATOLOGICAL PATIENTS
– EARLY DIAGNOSTIC AND THERAPY**

APPENDICES „IN EXTENSO“ TO HABILITATION THESIS

Barbora Weinbergerová, M.D.

**Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology
University Hospital Brno**

Brno, 2022

Contents

1.4.2. Annex 2	218
1.4.3. Annex 3	223
1.4.4. Annex 4	229
1.4.6. Annex 6	243
1.4.9. Annex 9	256
1.4.10. Annex 10	267
3.1.1.1. Annex 12	276
3.1.1.3. Annex 14	290
3.4.1.1. Annex 19	301
3.4.1.2. Annex 20	307
3.1.1.3. Annex 21	311
3.4.1.4. Annex 22	317
3.4.1.5. Annex 23	329
4.1.4. Annex 27	338
4.1.5. Annex 28	354
4.1.6. Annex 29	362

In this work, certain candidate articles are provided for an overview "in extenso", and some only in the form of a first page and an abstract as a part of Habilitation Thesis, while "in extenso" are listed in this separate book: *Appendices "In Extenso" to Habilitation Thesis*.

1.4.2. Annex 2

Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Virové infekce. In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 363-364. ISBN 978-80-726-2715-8.

Zdeněk Adam, Marta Krejčí, Jiří Vorlíček et al.

OBEČNÁ ONKOLOGIE



28.2.2.	Patofyziologie sepsě a septického šoku.....	337
28.2.3.	Klinický a laboratorní obraz	341
28.2.4.	Diagnóza infekčního agens při sepsi a při febrilní neutropenii	342
28.2.5.	Léčba sepsě.....	344
28.3.	Febrilní neutropenie	349
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.3.1.	Definice.....	349
28.3.2.	Incidence.....	350
28.3.3.	Etiopatogeneze.....	351
28.3.4.	Klinický obraz	351
28.3.5.	Vyšetření nemocného s febrilní neutropenií.....	351
28.3.6.	Stanovení rizika rozvoje komplikací febrilní neutropenie.....	353
28.3.7.	Iniciální antibiotická terapie	353
28.3.8.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po třech dnech antimikrobiální terapie	356
28.3.9.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po 5–7 dnech antimikrobiální terapie.....	356
28.3.10.	Ukončení antimikrobiální léčby.....	358
28.3.11.	Další způsoby léčby febrilní neutropenie	358
28.3.12.	Antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných	359
28.4.	Mykotické infekce	359
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.5.	Pneumonie způsobená <i>Pneumocystis jiroveci</i> (carinii).....	361
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.6.	Virové infekce.....	363
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
29.	ALTERNATIVNÍ MEDICÍNA A ONKOLOGIE.....	365
	<i>(Vojtěch Mornstein)</i>	
	Nevědecký charakter alternativní medicíny.....	365
	Motivace pacientů.....	366
	Motivace lékařů.....	366
	Vybrané metody alternativní medicíny	366
	Alternativní a sporná medikace v onkologii	368
	Shrnutí rozporu vědeckého vývoje a rozvoje alternativní léčby	369
30.	STATISTICKÉ ÚDAJE O NOVOTVARECH V ČR.....	371
	<i>(Ladislav Dušek, Jan Mužík, Jana Koptíková)</i>	
30.1.	Souhrn onkologické statistiky	371
30.2.	Epidemiologické charakteristiky	371
30.3.	Evidence novotvarů v ČR a ve světě....	372
30.4.	Trendy nádorové incidence a prevalence v ČR.....	375
30.5.	Srovnání ČR a některých zemí u vybraných nádorů	375
30.6.	Výskyt novotvarů mizní a krevtovorné tkáně	376
31.	SÍŤ KOMPLEXNÍCH ONKOLOGICKÝCH CENTER ČR.....	377
	<i>(Jiří Vorlíček, Jiří Finek, Ladislav Dušek, Martin Komenda)</i>	
	Vznik a rozvoj sítě onkologických pracovišť v ČR	377
	Současný stav sítě.....	378
	Dostupné informační zdroje o síti KOC.....	379
	Seznam zkratk.....	381
	Rejstřík	387

Tab. 28.18. Nejvýznamnější viry zúčastněné v etiologii infekčních komplikací u onkologických pacientů

Herpesviry (HHV – human herpes viruses)	Ostatní viry
Alfa-herpesviry: <ul style="list-style-type: none"> herpes simplex 1 (HHV-1) (HSV-1) herpes simplex 2 (HHV-2) (HSV-2) varicella-zoster virus (HHV-3) (VZV) Beta-herpesviry: <ul style="list-style-type: none"> cytomegalovirus (HHV-5) lidský herpesvirus 6 (HHV-6) lidský herpesvirus 7 (HHV-7) Gama-herpesviry: <ul style="list-style-type: none"> virus Epstein-Barrův (HHV-4) (EBV) lidský herpesvirus 8 (HHV-8) 	Adenoviry Respirační viry: <ul style="list-style-type: none"> respirační syncytiální virus virus chřivky virus parainfluenzy rinovirus Polyomaviry: <ul style="list-style-type: none"> BK virus JC virus

Při alergii na co-trimoxazol lze použít **pentamidin** v inhalační formě 300 mg jedenkrát za 3–4 týdny, **dapson** p.o. 100 mg/den a nebo **atovaquone** 750 mg 2× denně.

Profylaxe se podává u rizikových nemocných po dobu trvání lymfopenie (především CD4 lymfocytů) a dalších rizikových faktorů (kortikosteroidy, stav po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně, GvHD).

Terapie pneumocystové pneumonie: vhodnými chemoterapeutiky jsou **vysokodávkovaný trimethoprim-sulfamethoxazol i.v. 90–120 mg/kg/den** (trimethoprim 15–20 mg/kg/den a sulfamethoxazol 75–100 mg/kg/den). Délka léčby je 21 dní a na intravenózní léčbu je pak vhodné navázat podáváním nižší dávky perorální formy přípravku po dobu dalších dvou týdnů.

Je-li přítomna celková respirační insuficience ($PaO_2 < 70$ mm Hg), je indikováno současné podání **methylprednisolonu p.o.** v dávce prvních 5 dnů 2× 40 mg, druhých 5 dnů 1× 40 mg a následně 20 mg do 21. dne.

Při alergii na co-trimoxazol lze použít parenterální **pentamidin i.v. 4 mg/kg 1× denně**, nebo kombinaci **klindamycinu 600–900 mg i.v. 3× denně** s **primachinem p.o. 15 mg 2× denně**. U lehčích formách lze zvolit **atovachon p.o. 750 mg 3× denně**.

28.6. Virové infekce

Virové infekce jsou častou komplikací onkologických onemocnění. Příčinou je porucha imunity, na-

Tab. 28.19. Léčba nejvýznamnějších virových infekcí u onkologických pacientů

Infekce vyvolané virem	Onemocnění	Léčba
HSV-1+2	lokalizované (herpes labialis, genitalis)	aciklovir 200–400 mg p.o. 5x D
	orgánové postižení (encefalitida, hepatitida)	aciklovir i.v. 10 mg/kg 3x D
VZV	lokalizované (pásový opar)	aciklovir 400 mg p.o. 5x D, závažnější formy – aciklovir i.v. 10 mg/kg 3x D
	generalizované (generalizovaný zoster, hepatitida)	aciklovir i.v. 10 mg/kg 3x D, event. ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D
CMV	preemptivní léčba	ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D
	léčba CMV choroby	ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D + IMG nebo CMV-Ig
HHV-6	porucha uchycení štěpu, pancytopenie, encefalitida	ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D
EBV	PTLD (potransplantační lymfoproliferativní choroba)	snížení imunosuprese, anti-CD20, DLI, cytostatika
Adenoviry	pneumonie, systémové postižení	cidofovir i.v. nebo ribavirin i.v.
	respirační syncytiální virus	ribavirin inh. nebo ribavirin i.v. event. + IMG nebo R5-Ig
	virus chřivky	oseltamivir inh., zanamivir inh.
Respirační viry	virus parainfluenzy, rinovirus	ribavirin inh. nebo ribavirin i.v.
	BK virus	závažná hematurie

vozená buď nádorovým onemocněním samotným, nebo protinádorovou léčbou.

Hlavní úlohu v obraně proti virovým infekcím hraje imunita zprostředkovaná T-lymfocyty. Proto stavy, které vedou k jejímu poškození, jsou spojeny s rizikem vzniku virových infekcí.

Nejčastěji se s virovými infekcemi můžeme setkat u hematologických pacientů, a to především u nemocných po transplantaci krvetvorných buněk, zejména alogenních. Zde mohou virové infekce nezdědka končit letálně.

Virové infekce u onkologických nemocných můžeme rozdělit na dvě skupiny (tab. 28.18.):

- infekce vyvolané herpesviry, které jsou zdaleka nejčastější. Společnou charakteristikou herpesvirů je vysoká promořenost v populaci, vznik latentní infekce po primoinfekci a z toho vyplývající možnost endogenní reaktivace viru v období imunodeficitu;
- infekce vyvolané ostatními (neherpetickými) viry, které jsou méně časté.

Pokud se tyto infekce podaří diagnostikovat, je nutno zvážit odpovídající léčbu, kterou stručně shrneme pro studenty (tab. 28.19.). Znalost těchto antivirotik však nebude předmětem zkoušky z onkologie.

LITERATURA

- Adam Z, Vorlíček J, Koptíková J. Obecná onkologie a podpůrná léčba. Praha: Grada Publishing 2003.
- Adam Z, Vorlíček J, Vaníček J, et al. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2. vyd. Praha: Grada Publishing 2004.
- Cornely OA, Bohme A, Buchheidt D, et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Oncology. *Haematologica* 2009; 94: 113-122.
- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. Využití galaktomannanu v diagnostice invazivní aspergilózy u hematologických nemocných. *Vnitř Lék* 2008; 54: 45-52.
- Ráčil Z, Mayer J, Kocmanová I, et al. Léčba invazivní aspergilózy – doporučení odborných společností. *Vnitř Lék* 2008; 54: 1187-1194.
- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgrad Med* 2007; 9: 240-252.
- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, Lengerová M, Mayer J. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék* 2007; 53: 645-654.
- Ráčil Z, Mayer J, (eds). Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky. *Vnitř Lék* 2007; 53(Suppl).

1.4.3. Annex 3

Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Pneumonie způsobená *Pneumocystis jirovecii* (carinii). In: Adam Z., ed. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 361-363. ISBN 978-80-726-2715-8.

Zdeněk Adam, Marta Krejčí, Jiří Vorlíček et al.

OBEČNÁ ONKOLOGIE



28.2.2.	Patofyziologie sepsě a septického šoku.....	337
28.2.3.	Klinický a laboratorní obraz	341
28.2.4.	Diagnóza infekčního agens při sepsi a při febrilní neutropenii	342
28.2.5.	Léčba sepsě.....	344
28.3.	Febrilní neutropenie	349
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.3.1.	Definice.....	349
28.3.2.	Incidence.....	350
28.3.3.	Etiopatogeneze.....	351
28.3.4.	Klinický obraz	351
28.3.5.	Vyšetření nemocného s febrilní neutropenií.....	351
28.3.6.	Stanovení rizika rozvoje komplikací febrilní neutropenie.....	353
28.3.7.	Iniciální antibiotická terapie	353
28.3.8.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po třech dnech antimikrobiální terapie	356
28.3.9.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po 5–7 dnech antimikrobiální terapie.....	356
28.3.10.	Ukončení antimikrobiální léčby.....	358
28.3.11.	Další způsoby léčby febrilní neutropenie	358
28.3.12.	Antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných	359
28.4.	Mykotické infekce	359
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.5.	Pneumonie způsobená <i>Pneumocystis jiroveci</i> (carinii).....	361
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.6.	Virové infekce.....	363
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
29.	ALTERNATIVNÍ MEDICÍNA A ONKOLOGIE.....	365
	<i>(Vojtěch Mornstein)</i>	
	Nevědecký charakter alternativní medicíny.....	365
	Motivace pacientů.....	366
	Motivace lékařů.....	366
	Vybrané metody alternativní medicíny	366
	Alternativní a sporná medikace v onkologii	368
	Shrnutí rozporu vědeckého vývoje a rozvoje alternativní léčby	369
30.	STATISTICKÉ ÚDAJE O NOVOTVARECH V ČR.....	371
	<i>(Ladislav Dušek, Jan Mužík, Jana Koptíková)</i>	
30.1.	Souhrn onkologické statistiky	371
30.2.	Epidemiologické charakteristiky	371
30.3.	Evidence novotvarů v ČR a ve světě....	372
30.4.	Trendy nádorové incidence a prevalence v ČR.....	375
30.5.	Srovnání ČR a některých zemí u vybraných nádorů	375
30.6.	Výskyt novotvarů mizní a krevtovorné tkáně	376
31.	SÍŤ KOMPLEXNÍCH ONKOLOGICKÝCH CENTER ČR.....	377
	<i>(Jiří Vorlíček, Jiří Finek, Ladislav Dušek, Martin Komenda)</i>	
	Vznik a rozvoj sítě onkologických pracovišť v ČR	377
	Současný stav sítě.....	378
	Dostupné informační zdroje o síti KOC.....	379
	Seznam zkratk.....	381
	Rejstřík	387

Tab. 28.16. Antimykotika a jejich účinnost *in vitro*

	Amfotericin B a jeho liposomální formy	Flukonazol	Itrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	Echinokandiny (kasprofungin, mikafungin, anidulafungin)	5-flucytosin
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	+	-	+/-	+	+/-	+	+
<i>Aspergillus</i> spp.	+	-	+	+	+	+	-
Zygomycetes (<i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.)	+	-	-	-	+	-	-
<i>Fusarium</i> spp.	+	-	-	+/-	+/-	-	-
<i>Cryptococcus</i> spp.	+	+	+	+	+/-	-	+

Diagnóza invazivních mykotických infekcí je často velice komplikovaná a stanoví se na základě kombinace klinického vyšetření, zobrazovacích metod, mikrobiologického vyšetření (kultivační i nekultivační metody) a/nebo histologického vyšetření u nemocného s rizikovými faktory.

Invazivní mykotickou infekcí pak můžeme označit jako jistou, pravděpodobnou nebo možnou. Kritéria shrnuje tab. 28.15.

Terapie: tab. 28.16. a 28.17. uvádějí antimykotika používaná v léčbě mykotických infekcí u onkologických nemocných a jejich spektra účinnosti.

28.5. Pneumonie způsobená *Pneumocystis jirovecii* (carinii)

Pneumocystis jirovecii je eukaryotický mikroorganismus, který byl až v poslední době, po prostudování jeho genomu, zařazen mezi houby. V roce 1999 byly lidské kmeny *Pneumocystis carinii* přejmenovány na počest českého parazitologa prof. Jirovce na *Pneumocystis jirovecii*. Je extracelulárním parazitem, jehož vývojový cyklus zahrnuje stadium trofické a cystické. Při infekci jeví významnou vazbu na alveolární epitelie, přičemž vyplňuje alveoly, aniž by došlo k bouřlivé zánětlivé reakci. Přenos se děje vzdušnou cestou, je však možné, že u dospělých jedinců jde o reaktivaci endogenní infekce, s níž se většina zdravých jedinců bez poruchy imunity setká již v dětském věku. Primární infekce proběhne buď asymptomaticky, nebo pod obrazem lehké respirační infekce, takže do tří let věku již má

velká většina dětí protilátky proti tomuto mikroorganismu.

Jde o typickou oportunní infekci. Hlavními rizikovými faktory jsou alogenní transplantace krvetvorné tkáně, reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), kortikoterapie a lymfopenie s inverzním poměrem lymfocytů CD4+/CD8+. Zavedení profylaxe trimethoprimem-sulfamethoxazolem snížilo incidenci pneumocystové pneumonie u nemocných po transplantaci krvetvorné tkáně z přibližně 10% na současnou hodnotu 0,3–0,5%. Mortalita však zůstává stále velmi vysoká – přibližně 30%.

Klinický obraz: dvě třetiny nemocných mají fulminantní začátek choroby s vysokou horečkou a rychlým rozvojem dušnosti, tachypnoe a těžké hypoxémie, ostatní mají subakutní začátek s nízkými teplotami, neproduktivním kašlem a pomalejším rozvojem dušnosti po dobu i několika dní. Nejčastějšími klinickými příznaky jsou dušnost (90%) a teplota (85%).

Diagnostika se opírá o kombinaci výše popsaného klinického obrazu, nálezu atypické pneumonie při klinickém vyšetření a obrazu na RTG snímku hrudníku a nebo CT. Při provedení těchto zobrazovacích metod se nejčastěji setkáme s intersticiálními plicními infiltráty.

Definitivní potvrzení etiologie však umožňuje pouze mikrobiologické vyšetření biologického materiálu – imunofluorescence a PCR, které má vyšší senzitivitu. Nejprůnosnějším materiálem je tekutina získaná bronchoalveolární laváží. Sputum a indukované sputum (sputum po inhalaci mukolytika nebo roztoku NaCl) je méně průnosné.

Profylaxe pneumocystové infekce: vhodnými chemoterapeutiky jsou trimethoprim-sulfamethoxazol p.o. 480 mg 1× denně nebo 960 mg 3× týdně.

Tab. 28.17. Informace o léčbě nejčastějších forem mykotických infekcí u onkologických nemocných

Typ infekce	Lék I. volby	Lék II. volby	Délka podávání	Poznámky
Kandidové infekce				
Orofaryngeální kandidóza	flukonazol tbl nebo soluce p.o. 100–200 mg/den	itrakonazol soluce p.o. 200 mg/den	7–14 dní po klinickém zlepšení	
Kandidová ezofagitida	flukonazol tbl nebo soluce p.o. nebo i.v. 100–200 mg/den, itrakonazol soluce p.o. 200 mg/den	amfotericin B i.v. 0,3–0,7 mg/kg/den, kaspofungin i.v. 50 mg/den, vorikonazol p.o./i.v. 4 mg/kg 2x D	14–21 dní po klinickém zlepšení	
Kandidémie bez neutropenie	amfotericin B i.v. 0,6–1,0 mg/kg/den, flukonazol i.v. 400–800 mg/den, kaspofungin 50 mg/den, mikafungin 100 mg/den, anidulafungin 100 mg/den	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	14 dní po poslední pozitivní hemokultuře a ukončení klinických příznaků	odstranit všechny žilní katétrů
Kandidémie s neutropenií	amfotericin B i.v. 0,7–1,0 mg/kg/den, kaspofungin 50 mg/den, mikafungin 100 mg/den, anidulafungin 100 mg/den	flukonazol 400–800 mg/den	14 dní po poslední pozitivní hemokultuře, ukončení klin. příznaků a ukončení neutropenie	odstranění žilních katétrů není imperativem (zdrojem často GIT)
Kandidémie způsobená <i>C. glabrata</i> a <i>C. krusei</i>	amfotericin B i.v. 0,7–1,0 mg/kg/den, kaspofungin 50 mg/den, mikafungin 100 mg/den, anidulafungin 100 mg/den	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	viz kandidémie u pacientů s neutropenií nebo bez neutropenie	
Aspergilové infekce				
Aspergilom	chirurgická léčba			
Invazivní aspergilóza	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	kaspofungin i.v. 50 mg/den, liposomální formy amfotericinu B i.v. 3–5 mg/kg/den, kombinace echinokandinu s vorikonazolem, posakonazol 800 mg/den	dlouhodobě	
Mukormykóza a ostatní zygomykózy				
Invazivní forma	liposomální formy amfotericinu B 3–5 mg/kg/den event. vyšší	posakonazol 800 mg/den p.o.	dlouhodobě	u lokalizovaných forem je doporučeno současně navíc provést chirurgickou resekci ložiska
Fusarióza				
Invazivní forma	liposomální formy amfotericinu B 3–5 mg/kg/den event. vyšší	vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg 2x D	dlouhodobě	
Kryptokoková infekce				
Invazivní forma	amfotericin B i.v. 0,7–1 mg/kg/den + 5-flucytosin i.v. 100 mg/kg/den 2 týdny, pak flukonazol 400 mg/den p.o.	amfotericin B i.v. 0,7–1 mg/kg/den i.v. + 5 flucytosin i.v. 100 mg/kg/den po celou dobu léčby, vorikonazol i.v. pak p.o. 4 mg/kg/den	celkem minimálně 12 týdnů	následuje dlouhodobě podávání flukonazolu 200 mg/den 6–12 měsíců

Tab. 28.18. Nejvýznamnější viry zúčastněné v etiologii infekčních komplikací u onkologických pacientů

Herpesviry (HHV – human herpes viruses)	Ostatní viry
Alfa-herpesviry: <ul style="list-style-type: none"> herpes simplex 1 (HHV-1) (HSV-1) herpes simplex 2 (HHV-2) (HSV-2) varicella-zoster virus (HHV-3) (VZV) Beta-herpesviry: <ul style="list-style-type: none"> cytomegalovirus (HHV-5) lidský herpesvirus 6 (HHV-6) lidský herpesvirus 7 (HHV-7) Gama-herpesviry: <ul style="list-style-type: none"> virus Epstein-Barrův (HHV-4) (EBV) lidský herpesvirus 8 (HHV-8) 	Adenoviry Respirační viry: <ul style="list-style-type: none"> respirační syncytiální virus virus chřipky virus parainfluenzy rinovirus Polyomaviry: <ul style="list-style-type: none"> BK virus JC virus

Při alergii na co-trimoxazol lze použít **pentamidin** v inhalační formě 300 mg jedenkrát za 3–4 týdny, **dapson** p.o. 100 mg/den a nebo **atovaquone** 750 mg 2× denně.

Profylaxe se podává u rizikových nemocných po dobu trvání lymfopenie (především CD4 lymfocytů) a dalších rizikových faktorů (kortikosteroidy, stav po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně, GvHD).

Terapie pneumocystové pneumonie: vhodnými chemoterapeutiky jsou **vyšokodávkovaný trimethoprim-sulfamethoxazol i.v. 90–120 mg/kg/den** (trimethoprim 15–20 mg/kg/den a sulfamethoxazol 75–100 mg/kg/den). Délka léčby je 21 dní a na intravenózní léčbu je pak vhodné navázat podáváním nižší dávky perorální formy přípravku po dobu dalších dvou týdnů.

Je-li přítomna celková respirační insuficience ($\text{PaO}_2 < 70 \text{ mm Hg}$), je indikováno současné podání **methylprednisolonu p.o.** v dávce prvních 5 dnů 2× 40 mg, druhých 5 dnů 1× 40 mg a následně 20 mg do 21. dne.

Při alergii na co-trimoxazol lze použít parenterální **pentamidin i.v. 4 mg/kg 1× denně**, nebo kombinaci **klindamycinu 600–900 mg i.v. 3× denně** s **primachinem p.o. 15 mg 2× denně**. U lehčích forem lze zvolit **atovachon p.o. 750 mg 3× denně**.

28.6. Virové infekce

Virové infekce jsou častou komplikací onkologických onemocnění. Příčinou je porucha imunity, na-

Tab. 28.19. Léčba nejvýznamnějších virových infekcí u onkologických pacientů

Infekce vyvolané virem	Onemocnění	Léčba
HSV-1+2	lokalizované (herpes labialis, genitalis)	aciklovir 200–400 mg p.o. 5x D
	orgánové postižení (encefalitida, hepatitida)	aciklovir i.v. 10 mg/kg 3x D
VZV	lokalizované (pásový opar)	aciklovir 400 mg p.o. 5x D, závažnější formy – aciklovir i.v. 10 mg/kg 3x D
	generalizované (generalizovaný zoster, hepatitida)	aciklovir i.v. 10 mg/kg 3x D, event. ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D
CMV	preemptivní léčba	ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D
	léčba CMV choroby	ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D + IMG nebo CMV-Ig
HHV-6	porucha uchycení štěpu, pancytopenie, encefalitida	ganciklovir i.v. 5 mg/kg 2x D nebo foskarnet i.v. 60 mg/kg 3x D
EBV	PTLD (potransplantační lymfoproliferativní choroba)	snížení imunosuprese, anti-CD20, DLI, cytostatika
Adenoviry	pneumonie, systémové postižení	cidofovir i.v. nebo ribavirin i.v.
	respirační syncytiální virus	ribavirin inh. nebo ribavirin i.v. event. + IMG nebo R5-Ig
	virus chřipky	oseltamivir inh., zanamivir inh.
Respirační viry	virus parainfluenzy, rinovirus	ribavirin inh. nebo ribavirin i.v.
	BK virus	závažná hematurie

1.4.4. Annex 4

Ráčil Z., Weinbergerová B., Kocmanová I., Mayer J. Febrilní neutropenie. In: Adam Z., ed. *Obečná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, s. 349-359. ISBN 978-80-726-2715-8.

Zdeněk Adam, Marta Krejčí, Jiří Vorlíček et al.

OBEČNÁ ONKOLOGIE



28.2.2.	Patofyziologie sepsě a septického šoku.....	337
28.2.3.	Klinický a laboratorní obraz	341
28.2.4.	Diagnóza infekčního agens při sepsi a při febrilní neutropenii	342
28.2.5.	Léčba sepsě.....	344
28.3.	Febrilní neutropenie	349
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.3.1.	Definice.....	349
28.3.2.	Incidence.....	350
28.3.3.	Etiopatogeneze.....	351
28.3.4.	Klinický obraz	351
28.3.5.	Vyšetření nemocného s febrilní neutropenií.....	351
28.3.6.	Stanovení rizika rozvoje komplikací febrilní neutropenie.....	353
28.3.7.	Iniciální antibiotická terapie	353
28.3.8.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po třech dnech antimikrobiální terapie	356
28.3.9.	Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po 5–7 dnech antimikrobiální terapie.....	356
28.3.10.	Ukončení antimikrobiální léčby.....	358
28.3.11.	Další způsoby léčby febrilní neutropenie	358
28.3.12.	Antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných	359
28.4.	Mykotické infekce	359
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.5.	Pneumonie způsobená <i>Pneumocystis jiroveci</i> (carinii).....	361
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
28.6.	Virové infekce.....	363
	<i>(Zdeněk Ráčil, Barbora Weinbergerová, Iva Kocmanová, Jiří Mayer)</i>	
29.	ALTERNATIVNÍ MEDICÍNA A ONKOLOGIE.....	365
	<i>(Vojtěch Mornstein)</i>	
	Nevědecký charakter alternativní medicíny.....	365
	Motivace pacientů.....	366
	Motivace lékařů.....	366
	Vybrané metody alternativní medicíny	366
	Alternativní a sporná medikace v onkologii	368
	Shrnutí rozporu vědeckého vývoje a rozvoje alternativní léčby	369
30.	STATISTICKÉ ÚDAJE O NOVOTVARECH V ČR.....	371
	<i>(Ladislav Dušek, Jan Mužík, Jana Koptíková)</i>	
30.1.	Souhrn onkologické statistiky	371
30.2.	Epidemiologické charakteristiky	371
30.3.	Evidence novotvarů v ČR a ve světě....	372
30.4.	Trendy nádorové incidence a prevalence v ČR.....	375
30.5.	Srovnání ČR a některých zemí u vybraných nádorů	375
30.6.	Výskyt novotvarů mizní a krevetvorné tkáně	376
31.	SÍŤ KOMPLEXNÍCH ONKOLOGICKÝCH CENTER ČR.....	377
	<i>(Jiří Vorlíček, Jiří Finek, Ladislav Dušek, Martin Komenda)</i>	
	Vznik a rozvoj sítě onkologických pracovišť v ČR	377
	Současný stav sítě.....	378
	Dostupné informační zdroje o síti KOC.....	379
	Seznam zkratk.....	381
	Rejstřík	387

Tab. 28.7. Doporučené složení klinické výživy u kriticky nemocných se sepsí
Americká společnost pro parenterální a enterální výživu, ASPEN 1997

Složka výživy	Doporučené denní množství
energie	105–125 kJ/kg tělesné hmotnosti (25–30 kcal/kg)
bílkoviny nebo aminokyseliny	1,3–2,0 g/kg tělesné hmotnosti
nebílkovinná energie : 1gN	400–300 np-kJ : 1gN (100–75 np-kcal : 1gN)
sacharidy	70–85 % nebílkovinné energie
tuky	15–30 % nebílkovinné energie snížené množství n-6 polynenasycených mastných kyselin

np-kJ – neproteinové kilojouly; np-kcal – neproteinové kilokalorie

kriticky nemocných. Nutriční podpora nemocných v sepsi je proto všeobecně přijata jako standardní léčebný postup.

V iničiální fázi sepse v období oběhové nestability není nutriční podpora pro nemocného zásadní a může představovat neúčelnou metabolickou zátěž. Zahájení plné nutriční podpory přichází v úvahu až po úpravě krevního tlaku a obnovení tkáňové perfúze. I potom však u septických nemocných pozorujeme sníženou odpověď na umělou klinickou výživu. Dáváme přednost enterální výživě, a v případech, kdy ji nelze použít, podáváme výživu parenterální (viz kap. Výživa).

Zásadní charakteristikou složení umělé klinické výživy nemocných v sepsi je relativně omezený přívod energie a vysoký přívod bílkovin (aminokyselin). Jedná se o stresový poměr hlavních živin, kdy je na každý gram přijatého dusku dodáváno relativně menší množství nebílkovinné energie (300–400 np-kJ/1gN, proti obvyklému poměru 625 np-kJ/1gN) (tab. 28.7.). Cílem nutriční podpory v iničiální fázi sepse je co nejvíce zbrzdřit katabolismus endogenních bílkovin, nikoli však za každou cenu vyrovnat bilanci energie či dusíku.

Nadměrný přívod energie v období stresu představuje metabolickou zátěž s vysokým rizikem komplikací, zejména při parenterální výživě. Zvláště vysoký přívod tuků ve fázi aktivity volných forem kyslíku je rizikem vzniku lipoperoxidace a dalšího poškození tkání. Metabolickou přeměnou nadbytečně přiváděných n-6 polynenasycených mastných kyselin vzniká imunosupresivní prostaglandin E2 s nárůstem výskytu infekčních komplikací, opět především při parenterální výživě.

V průběhu nutriční podpory je nezbytná důsledná kontrola glykemického profilu u všech nemocných nezávisle na tom, zda mají diabetes, nebo nikoli. Hyperglykémie přináší riziko narušení leukocytárních imunitních funkcí, což je možno dokumentovat zhoršením fagocytózy. Intenzivní léčba inzulinem s cílem udržení glykémie v rozmezí normálních hodnot (4,4–6,1 mmol/l) vede u kriticky nemocných pacientů k nižší morbiditě i mortalitě proti tradičnímu přístupu kontroly glykémie do

11 mmol/l. Dochází k významné redukci septických epizod, přičemž nemocní s bakteriemií mají nižší mortalitu s obrazem multiorganové dysfunkce.

Imunoglobuliny

Výjimečnou indikací pro intravenózní podání polyvalentních imunoglobulinů se stávají pouze onemocnění pravidelně provázená nízkými hladinami funkčních protilátek, jako jsou mnohočetný myelom a chronická lymfatická leukémie nebo i jiné lymfoproliferativní choroby. V takovém případě je při vzniku sepse léčba vhodná u nemocných se sérovou hladinou IgG pod 5 g/l, a to v substituční dávce 0,4 g nativní kompletní molekuly imunoglobulinu na kilogram tělesné hmotnosti. U nemocných se sérovým monoklonálním proteinem ve třídě IgG odhadujeme nedostatek funkčních IgG spíše podle nálezu nízkých hladin IgA či IgM. Leukocytární růstové faktory mohou být přínosem pouze pro nemocné se sepsi při neutropenii.

Profylaxe vředové choroby gastroduodena

Obecně je dnes profylaxe stresových vředů doporučena u kriticky nemocných, u nichž vede k významnému snížení epizod krvácení. Velkou část nemocných sledovaných v klinických studiích přitom tvoří pacienti v sepsi. Rizikovou podskupinou jsou především nemocní s umělou plicní ventilací, s dlouhodobou hypotenzí a pacienti s koagulopatií. Standardně jsou dnes používány inhibitory protonové pumpy. Nezdá se, že by zvýšení žaludečního pH představovalo vyšší riziko mikrobiální kolonizace žaludku a následné komplikující pneumonie.

28.3. Febrilní neutropenie

28.3.1. Definice

Neutropenie – pokles neutrofilních granulocytů pod $0,5 \cdot 10^9/l$ nebo pokles neutrofilních granulocytů

tů pod $1,0 \cdot 10^9/l$ s předpokládaným poklesem pod $0,5 \cdot 10^9/l$ v následujících dnech.

Mírná neutropenie – počet neutrofilů $< 1,0 \cdot 10^9/l$.

Středně závažná neutropenie – počet neutrofilů $< 0,5 \cdot 10^9/l$.

Velmi závažná neutropenie – počet neutrofilů $< 0,1 \cdot 10^9/l$.

Horečka

Horečka v rámci definice febrilní neutropenie znamená:

- jednorázově naměřenou teplotu převyšující $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$;
- teplotu vyšší než $38 \text{ }^\circ\text{C}$, přetrvávající déle než 1 h;
- vzestup teploty na nejméně $38 \text{ }^\circ\text{C}$ dvakrát během 24 h.

Hodnoty jsou uvedeny pro měření v axilární jamce. V anglosaské literatuře je za horečku považována tělesná teplota vyšší než $38,3 \text{ }^\circ\text{C}$ měřená v dutině ústní pod jazykem.

Febrilní neutropenie. Jakékoliv spojení horečky s neutropenií označujeme jako febrilní neutropenie, i když horečka nemusí být vždy způsobena infekcí. Termín febrilní neutropenie je popisný název pro život ohrožující komplikaci, která vyžaduje okamžitě zahájení účinné antibiotické léčby, bez vyčkávání výsledků kulturačních vyšetření.

Rozdělení horečky podle úrovně průkazu infekce

Uvedené rozdělení má význam jak pro klinické studie, tak i pro praxi.

Horečka neznámého původu

Horečka neznámého původu (*fever of unknown origin*) je nově vzniklá horečka bez jasných klinických, zobrazovacích či mikrobiologických průkazů infekční choroby. Popis postupu u pacientů s horečkou neznámého původu při neutropenii je uveden v podkapitole o febrilní neutropenii. Pro studenty je dostačující, když si uvědomí, že v případě prokazatelné infekce se léčba liší od postupů při léčbě horečky neznámého původu provázející neutropenii.

Prokázané infekce

Termín **klinicky prokázaná infekce** (*clinically documented infection*) označuje situaci, kdy je horečka přítomna u pacienta s jednoznačným diagnostickým nálezem potvrzujícím infekci, jejíž mikrobiologický původ však nebyl zjištěn nebo není přístupný vyšetření. Jako příklad uvedeme horečku s RTG či CT nálezem pneumonie, horečku s nálezem osteomyelitidy či spondylodiscitidy na rentgenovém či

MR zobrazení, průjmové onemocnění nebo zjevný kožní zánět.

Pro některé klinicky prokázané infekce je doporučena léčba odlišná (jak z hlediska volby antibiotik, tak délky jejich podávání) od postupů při febrilní neutropenii s horečkou neznámého původu. Pro lékaře v praxi uvádíme doporučení pro léčbu katérové horečky, léčbu plicních infiltrátů a neutropenické enterokolity aj. v samostatných kapitolách knihy *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob* (2004) a *Obecná onkologie a podpůrná léčba* (2003).

Termín **mikrobiologicky prokázaná infekce** (*microbiologically documented infection*) označuje situaci, kdy je mikrobiologickým vyšetřením identifikován původce horečky, a to odběrem buď z ložiska infekce, nebo při nelokalizované infekci z hemokultury. Definice přesně specifikuje, kdy lze považovat mikrobiologický nález za signifikantní a kdy by se mohlo jednat o kontaminaci či fyziologickou flóru, takže jsou nutné opakované záchyty stejného mikroba pro jeho prohlášení za signifikantní patogen (podrobně uvádějí citované knihy).

Pro mikrobiologicky definovanou infekci pak lze najít specifická doporučení jak pro volbu antibiotika, tak i pro délku trvání léčby.

V rámci skript uvedeme v následujících podkapitolách stručně doporučení pro léčbu mykotické, pneumocystové a virové infekce.

Infekce u pacienta s neutropenií bez horečky

Na druhé straně mohou mít někteří neutropeničtí nemocní příznaky infekce (například bolest břicha nebo okolí konečníku, bolestivé kožní infiltráty, těžkou mukozitidu) i bez doprovodného zvýšení teploty. Horečka může chybět také při současné léčbě kortikosteroidy. I tyto osoby by měly být považovány za nemocné s aktivní infekcí a měly by být léčeny dle zásad pro febrilní neutropenii.

28.3.2. Incidence

Četnost a závažnost infekčních komplikací je závislá na hloubce neutropenie a na délce neutropenického intervalu.

Incidence a závažnost se začíná zvyšovat při poklesu neutrofilů pod $1,0 \cdot 10^9/l$. Frekvence infekcí pak prudce narůstá při poklesu počtu neutrofilů z $0,5 \cdot 10^9/l$ na $0,1 \cdot 10^9/l$ a nižší hodnoty. Stejně tak četnost febrilní neutropenie narůstá s prodlužující se délkou neutropenie.

U pacientů s těžkou neutropenií (s počtem leukocytů pod $0,1 \cdot 10^9/l$), která trvá déle než 10 dní, se v 80 % objeví horečka a také infekční komplikace.

Tab. 28.8. Nejčastější patogeny při febrilní neutropenii

Bakterie	Viry	Kvasinky a plísně
G+: stafylokoky koaguláza negativní <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus</i> spp. viridující streptokoky <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Herpes simplex virus 1+2 Lidský herpetický virus 6 (HHV-6) Cytomegalovirus Respirační viry (respirační syncytiální virus, virus parainfluenzy, viry influenzy, adenoviry)	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Zygomycetes</i> (<i>Mucor</i> spp.) <i>Fusarium</i> spp.
G-: <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella</i> spp. jiné enterobakterie		

U 50–60 % neutropenických pacientů, u nichž se objeví horečka, je přítomno skryté infekční ložisko.

Incidence febrilní neutropenie tedy závisí na základem nádorové chorobě, respektive na typu protinádorové léčby, která má často za následek granulocytopenii různého stupně a různé délky trvání. Z těchto důvodů se febrilní neutropenie vyskytuje nejčastěji u nemocných léčených pro hematologickou malignitu.

28.3.3. Etiopatogeneze

Místo vzniku infekce

Primárním anatomickým místem vzniku infekce je nejčastěji trávicí ústrojí, vedlejší nosní dutiny, plíce nebo kůže. Souvisí to jistě s tím, že protinádorové léčebné postupy (chemoterapie, radioterapie) vedle toho, že vedou k neutropenii, také narušují mukózu, a tím slizniční bariéru, což umožní invazi mikroorganismů s nízkou patogenitou kolonizujících tělesné povrchy. Další branou pro vstup infekce do těla jsou invazivní výkony narušující přirozené bariéry (zavádění nitrožilních, nazogastričních, tracheálních kanyl a močových katétrů).

Původci

U většiny nemocných s neutropenií jsou původcem infekce kolonizující mikroorganismy. Méně často pak jde o mikroorganismy získané z okolí, jako je tomu například u nozokomiální infekcí.

Hlavními původci infekcí u febrilní neutropenie jsou bakterie, méně častější jsou infekce mykotické, virové a jiné (například pneumocystová infekce) (tab. 28.8.).

V nejvýznamnější skupině bakteriálních infekcí u pacientů s neutropenií od 80. let minulého století výrazně převažují infekce gram pozitivní nad gram negativními, zatímco do té doby převažovaly naopak infekce gram negativní. Gram pozitivní bakterie dnes tvoří 70–80 % všech případů ze skupiny bakteriálních infekcí u mikrobiologicky dokumentované infekce u nemocných s neutropenií.

28.3.4. Klinický obraz

Horečka je velmi často jediným projevem přítomné infekce u neutropenických nemocných, neboť na vytvoření dalších typických známek zánětu (infiltrátů a jejich klinických projevů) chybějí neutrofilní leukocyty. Jestliže není jasný zdroj infekce, je vždy nutno brát samotnou horečku jako známku potenciálně letální infekce.

Je-li zřejmé ložisko infekce, potom klinický obraz odpovídá zánětlivému poškození v dané lokalizaci (stomatitida, enterokolitida, perianální flegmóna, pneumonie, katérová infekce a další). Vždy je však nutno mít na paměti, že v době neutropenie může být klinický obraz značně modifikován, protože se nemožou tvořit zánětlivé infiltráty (plicní infekce bez zřejmých infiltrátů na RTG, meningitida bez pleocytózy v likvoru, močová infekce bez pyurie).

V nejzávažnějších případech a bez okamžité antibiotické léčby pak může velmi rychle dojít k rozvoji klinického obrazu sepse a septického šoku.

28.3.5. Vyšetření nemocného s febrilní neutropenií

Nutná vyšetření u nemocného s febrilní neutropenií ukazuje tab. 28.9.

Vedle výše zmíněných vyšetření, prováděných v případě rozvoje febrilní neutropenie, se doporučuje monitorování mikrobiologické flóry u neutropenického (a to i afebrilního) nemocného bez známek lokalizované infekce.

V minimálně týdenních intervalech se provádí:

- kultivace moči;
- kultivace z rektu;
- kultivace z dutiny ústní;
- kultivace z nosního vstupu.

Tyto monitorovací kultivace pravděpodobně nepřinesou informaci o původci infekce, mohou však pomoci při volbě iniciálních antibiotik a mohou být důvodem ke zvýšení epidemiologické bdělosti na pracovišti (meticilin-rezistentní stafylokok,

Tab. 28.9. Nutná vyšetření u nemocného s febrilní neutropenií

	Vyšetření	Cíl	Indikace
Anamnéza a fyzikální vyšetření		zjistit známky a příznaky infekce v lokalizacích, které bývají nejčastěji postiženy (dutina ústní, nazofarynx, jícen, perianální oblast, plíce, kůže, místa vstupu žilních katétrů)	vždy
Laboratorní vyšetření	krevní obraz s diferenciálním rozpočtem leu	určení stupně neutropenie, počtu PLT, Hb	vždy
	biochemické vyšetření	zánětlivé markery (CRP, prokalcitonin)	vždy
		poškození orgánových funkcí (jaterní enzymy, urea, reatinin)	
	rozšířená koagulace	známky DIC	vždy
	biochemické a mikroskopické vyšetření moči a močového sedimentu	známky močové infekce	vždy
Mikrobiologické vyšetření	aerobní a anaerobní hemokultura z periferní žíly	průkaz bakteriálních a mykotických patogenů v krevním řečišti	vždy
	aerobní a anaerobní hemokultura z každého konce žilního katétru	průkaz karyotové infekce vyvolané bakteriemi a mykotickými patogeny	vždy
	kultivace moči	průkaz bakteriálních a mykotických patogenů	vždy
	kultivační vyšetření běžně dostupných materiálů dle místa suspektní infekce (stolice, sputum, stěr dutina ústní)	průkaz bakteriálních, mykotických, virových i jiných patogenů	dle příznaků
Zobrazovací metody	RTG srdce a plic	průkaz pneumonie	vždy
	vysoce rozlišovací CT plic (HRCT plic)	senzitivnější než RTG pro průkaz pneumonie, určení charakteru infekce, lokalizace	<ul style="list-style-type: none"> téměř vždy při patologii na RTG S+P vždy 5–7 dny trvající horečka bez průkazu zdroje (vyloučení invazivní aspergíózy plic)
	RTG paranazálních dutin (CT paranazálních dutin)	průkaz infekce paranazálních dutin	při symptomatologii
	ultrasonografické (event. CT) vyšetření orgánů dutiny břišní	průkaz infekce či patologie orgánů dutiny břišní	při symptomatologii
	echokardiografické vyšetření srdce	průkaz endokarditidy	<ul style="list-style-type: none"> při symptomatologii při katérové infekci vyvolané <i>S. aureus</i>
Vyšetření materiálů získaných z místa infekčního ložiska	bronchoalveolární laváž	<ul style="list-style-type: none"> mikrobiologické vyšetření (průkaz bakterií, kvasinek a plísní, virů, chlamydií a mykoplazmat, <i>Pneumocystis jirovecii</i>) cytologické vyšetření (průkaz mykotické infekce, průkaz základní choroby) biochemické vyšetření (průkaz ARDS) 	při nálezů patologie na RTG S+P a/nebo HRCT
	plicní biopsie (tenkojehlová nebo otevřená)	histologické a mikrobiologické vyšetření (průkaz mykotických patogenů)	výjimečně při podezření na invazivní mykotickou infekci, která nelze jiným vyšetřením verifikovat

Tab. 28.9. Pokračování

	Vyšetření	Cíl	Indikace
Vyšetření materiálů získaných z místa infekčního ložiska – pokračování	punkce pleurálního výpotku	<ul style="list-style-type: none"> • mikrobiologické (průkaz bakterií, kvasinek a plísní) • cytologické (průkaz základní choroby) • biochemické vyšetření (charakter výpotku – exsudát vs transsudát) 	při průkazu pleurálního výpotku
	vyšetření mozkomíšního moku	<ul style="list-style-type: none"> • cytologické vyšetření (rozpočet buněk pro určení charakteru event. pleocytózy, průkaz základní choroby) • mikrobiologické vyšetření (průkaz bakterií, kvasinek a plísní, virů) 	při klinickém obraze postižení CNS nebo mening
	punkce paranazálních dutin	mikrobiologické vyšetření (průkaz bakterií, kvasinek a plísní, virů)	při klinickém obraze infekce paranazálních dutin
	punkce nebo biopsie kožních lézí	<ul style="list-style-type: none"> • mikrobiologické vyšetření (průkaz bakterií, kvasinek a plísní) • histologické vyšetření (průkaz základní choroby, průkaz mykotické infekce) 	při klinickém obraze postižení kůže

penicilin-rezistentní pneumokok, multirezistentní gram-negativní bakterie (např. produkující ESBL), enterokoky rezistentní na vankomycin (VRE), *Candida tropicalis*.

28.3.6. Stanovení rizika rozvoje komplikací febrilní neutropenie

Před zahájením antimikrobiální léčby a v jejím průběhu je nutno provést zhodnocení stupně rizikovitosti nemocného pro rozvoj komplikací, které nám slouží k volbě vlastních antibiotik a rozhodnutí o ambulantní léčbě nebo naopak léčbě za hospitalizace.

Tab. 28.10. uvádí rozdělení nemocných s febrilní neutropenií do dvou prognostických skupin dle rizika rozvoje komplikací. Nejdůležitější body při rozhodování jsou zvýrazněny tučně.

28.3.7. Iniciální antibiotická terapie

Infekce při neutropenii se může dramaticky vyvíjet během hodin až do obrazu sepse, septického šoku a smrti, proto je nezbytné okamžité zahájení účinné antimikrobiální léčby ještě před definitivním průkazem infekce. Při takovém postupu je infekce jako nejzávažnější příčina horečky pouze předpokládána a antimikrobiální léčba a volba antibiotik je tedy empirická. Výsledky hemokultur odebraných

před nasazením antibiotik a výsledky kulturačního vyšetření z ložiska suspektní infekce pak slouží k eventuální úpravě antibiotické léčby v následujících dnech.

Volba antibiotik a způsob iniciální léčby febrilní neutropenie

Volba antibiotik a rozhodnutí o ambulantní nebo hospitalizační léčbě febrilní neutropenie závisí na:

- určení stupně rizika vzniku komplikací u daného nemocného (kritéria viz výše);
- přítomnosti nebo nepřítomnosti možného zdroje infekce (klinicky dokumentovaná infekce nebo horečka nejasného původu);
- lokální epidemiologické situaci na daném pracovišti (nezbytná úzká spolupráce s antibiotickým střediskem).

Iniciální antibiotická léčba u klinicky dokumentované infekce neutropenického nemocného

Pouze menší část nemocných má v období zahájení febrilní klinické příznaky odpovídající infekčnímu fokusu v určité lokalizaci (např. klinický obraz odpovídající pneumonii). U této menší skupiny nemocných je volba empiricky podávaných antibiotik dána rizikovostí nemocného, znalostí o průniku antibiotik do postižené lokalizace, pokrytím nejčastějších patogenů vyvolávajících infekci v této oblasti, a to vše při zachování širokospektrálního krytí.

Tab. 28.10. Rozdělení nemocných s febrilní neutropenií

Nízké riziko (pro zařazení je nutné splnění všech podmínek)	Vysoké riziko (pro zařazení stačí splnění jedné podmínky)
<ul style="list-style-type: none"> absolutní počet neutrofilů a očekávaný nejnižší počet neutrofilů $\geq 0,1 \cdot 10^9/l$ neutropenie v době infekce trvá < 7 dní a celková očekávaná doba neutropenie < 10 dnů nepřítomnost známek sepse/závažné infekce (hypotenze, tachykardie, dehydratace, bolest břicha, neurologické změny) nejvyšší teplota $< 39^\circ C$ normální funkce jater a ledvín není infekce nitrožilního katétru klinicky stabilní pacient/ambulantní pacient nádorové onemocnění v remisi není přidružena žádná jiná závažná choroba (diabetes mellitus, CHOPN, chronická srdeční insuficience) dobrý výkonnostní stav (<i>performance status</i>) nemocný dříve neprodělal mykotickou infekcí věk < 60 let 	<ul style="list-style-type: none"> absolutní počet neutrofilů a očekávaný nejnižší počet neutrofilů $< 0,1 \cdot 10^9/l$ neutropenie v době infekce trvá ≥ 7 dní a celková očekávaná doba neutropenie > 10 dnů klinicky nestabilní pacient (hypotenze, tachykardie, dehydratace, bolest břicha, neurologická symptomatologie)/hospitalizovaný pacient teplota $> 39^\circ C$ špatná funkce jater nebo ledvín patologie na RTG S+P transplantace krvetvorných buněk akutní leukémie, pokud není v remisi progredující nádorové onemocnění závažné přidružené onemocnění (diabetes mellitus, CHOPN, chronická srdeční insuficience) věk > 60 let

Iniciální antibiotická léčba horečky nejasného původu u neutropenického nemocného

U většiny neutropenických nemocných není initiaálně zjištěno žádné potenciální ložisko infekce.

V tomto případě je empirická antibiotická léčba febrilní neutropenie zaměřena na pokrytí širokého spektra bakterií, které se nejčastěji vyskytují při prvních známkách infekce (viz tab. 28.8.). Vždy však musí být pokryta nejnebezpečnější část spektra

Tab. 28.11. Empirická volba antibiotik u nemocných s febrilní neutropenií

Režim	Indikace	Zvolená antibiotika
Nízké riziko		
Ambulantní režim (p.o.)	dobrá spolupráce	potencovaný aminopenicilin (co-ampicilin, co-amoxicilin) + fluorochinolon (ciprofloxacín)
Hospitalizační režim (i.v.)	není dobrá spolupráce	potencovaný aminopenicilin (co-ampicilin, co-amoxicilin) + aminoglykosid (gentamicin) nebo fluorochinolon (ciprofloxacín)
Vysoké riziko		
Monoterapie	hemodynamicky stabilní nemocný s vysokým rizikem	protipseudomonádový penicilin nebo cefoperazon/sulbaktam nebo cefalosporin 4. generace nebo karbapenem
Kombinovaná léčba bez glykopeptidu	hemodynamicky nestabilní nemocný s vysokým rizikem	protipseudomonádový penicilin nebo cefoperazon/sulbaktam nebo cefalosporin 4. generace nebo karbapenem + aminoglykosid (amikacin, isepamycin) nebo aztreonam
Kombinovaná léčba s glykopeptidem	viz výš + • pracoviště s vysokým výskytem viridujících streptokoků nebo • známky kanylové infekce nebo • těžká mukozitida a současně hemodynamická nestabilita	glykopeptid (vankomycin) + protipseudomonádový penicilin nebo cefoperazon/sulbaktam nebo cefalosporin 4. generace nebo karbapenem +/- aminoglykosid (amikacin, isepamycin) nebo aztreonam

Předpona co- označuje potenciální další substanci, v případě co-ampicilinu se jedná o ampicilin potencovaný sulbaktamem, v případě co-amoxicilinu se jedná o amoxicilin potencovaný klavulanátem.

bakteriálních infekcí, tedy G⁻ bakterie (především *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp.). G⁺ infekce, nemívají ve většině případů dramatický průběh, což umožňuje zahájit u většiny pacientů empirickou léčbu antibiotiky s účinkem na G⁺ bakterie až po 48–72 hodinách od vzniku febrilní neutropenie.

Na základě určení stupně rizika rozvoje komplikací existují dva základní přístupy k iniciální antibiotické léčbě horečky nejasného původu u neutropenických nemocných:

- léčba nemocných s nízkým rizikem vzniku komplikací – léčba perorálními antibiotiky v ambulantní péči;
- léčba nemocných s vysokým rizikem vzniku komplikací – léčba intravenózními antibiotiky za hospitalizace.

Iniciální empirická antibiotická léčba nemocných s nízkým rizikem vzniku komplikací – léčba perorálními antibiotiky v ambulantní péči

Absolutní podmínkou ambulantní léčby je však dobře spolupracující nemocný, který je léčen v dosahu pracoviště s nepřetržitým provozem a má možnost

okamžitého návratu do nemocnice při známkách zhoršování klinického stavu po celých 24 hodin.

Pokud nemocný nespolupracuje nebo nemá možnost okamžitého návratu do nemocnice, pak je u těchto pacientů s nízkým rizikem nutná hospitalizace. Volba ATB je stejná, jen často volíme intravenózní podávání.

Volba ATB je zobrazena v tab. 28.11.

Iniciální empirická antibiotická léčba nemocných s vysokým rizikem vzniku komplikací – léčba intravenózními antibiotiky za hospitalizace

Tento hospitalizační přístup je nutný u většiny nemocných s febrilní neutropenií. Většina nemocných totiž spadá do skupiny vysokého rizika rozvoje komplikací (dle výše zmíněných kritérií) a vyžadují nitrožilní podávání antibiotik a monitorování průběhu infekce.

Iniciální empirická antibiotická léčba intravenózními antibiotiky je volbou jednoho ze tří schémat:

- antibiotická monoterapie – indikována u hemodynamicky stabilních nemocných s vysokým rizikem;

Tab. 28.12. Dávkování antibiotik používaných v empirické léčbě febrilní neutropenie

Název	Dávka/den
Potencované aminopeniciliny	
amoxicilin/klavulanát (Augmentin, Amoksiklav) p.o.	3× 625 mg
amoxicilin/klavulanát (Augmentin, Amoksiklav) i.v.	3× 1,2 g
Chinolony	
ciprofloxacín (Ciprinol) p.o.	2× 500 mg
ciprofloxacín (Ciprinol) i.v.	2× 400 mg
Cefalosporiny 3. generace	
cefoperazon/sulbaktam (Sulperazon) i.v.	3× 2 g
ceftazidim (Fortum) i.v.	3× 2 g
Cefalosporiny 4. generace	
cefepim (Maxipime) i.v.	3× 2 g
cefpirom (Cefrom) i.v.	3× 2 g
Protioseudomonádový penicilin	
piperacilin/tazobaktam (Tazocin) i.v.	3× 4,5 g
Karbapenemy	
imipenem/cilastatin (Tienam) i.v.	3× 1 g nebo 4× 0,5 g
meropenem (Meronem) i.v.	3× 1 g nebo 4× 0,5 g
Aminoglykosidy	
gentamicin (Gentamycin) i.v.	3× 80 mg
amikacin (Amikin) i.v.	1× 1 g
isepamicin (Isepacin)	1× 15 mg/kg (max. 1,5 g)
Glykopeptidy	
vankomycin (Vancocin, Edicin) i.v.	2× 1 g

- antibiotická dvojkombinace bez glykopeptidového antibiotika (bez vankomycinu) – indikována u většiny nemocných s vysokým rizikem, ale především u hemodynamicky nestabilních;
- antibiotická kombinace s glykopeptidovým antibiotikem (vankomycinem) – indikována výjimečně.

Vlastní volbu ATB a indikace jednotlivých režimů ukazuje tab. 28.12.

V případě febrilní neutropenie léčené perorálně amoxicilinem/klavulanátem a ciprofloxacinem lze ciprofloxacín při jeho nesnášenlivosti nahradit cotrimoxazolem v běžném dávkování.

28.3.8. Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po třech dnech antimikrobiální terapie

Ústup horečky může být při přetrvávající neutropenii pomalý. Přesto přetrvávání horečky při antibakteriální léčbě trvající déle než 3 dny u nemocných, bez klinicky nebo mikrobiologicky dokumentované infekce znamená, že jde o:

- pomalou odpověď bakteriální infekce na zavedenou antibiotickou léčbu;
- bakteriální infekci rezistentní na zavedení antibiotika;
- nebakteriální infekci;
- sekundární infekci;
- nedostatečné koncentrace antibiotika v séru a tkáních;
- infekci avaskulárního místa (absces);
- katérovou infekci při ponechaném infikovaném nitrožilním katétru;
- polékovou horečku.

U nemocných s neutropenií, kteří jsou febrilní i po 3 dnech antibiotické léčby, je nutné podrobné přešetření k vyloučení možné infekce (fyzikální vyšetření, posouzení stavu nitrožilních katétrů, mikrobiologické přešetření, RTG plic, zobrazovací vyšetření zaměřené na orgány podezřelé z infekčního postižení – především ultrasonografie břicha a HRCT plic).

Pokračování antibiotické léčby u klinicky nebo mikrobiologicky dokumentované infekce neutropenického nemocného

Došlo-li během prvních tří dnů podávání empirické antibiotické léčby k izolaci původce infekce, pak je na základě určení mikroorganismu a zjištění jeho citlivosti na antibiotika nutné upravit antimikrobiální léčbu tak, aby bylo dosaženo optimálního účinku. Je nutné nadále zachovat širokospektré krytí (zajištění proti superinfekci jiným patogenem způsobujícím fulminantní průběh infekce).

Stejně tak pokud během tohoto období došlo k progresi stavu do klinicky jednoznačné infekce (např. pneumonie), ale vlastní etiologie je neznámá – pak je nutná úprava antibiotické léčby dle předpokládaného původce, který se v této lokalizaci vyskytuje nejčastěji, a dle průniku ATB do postižené oblasti.

Pokračování antibiotické léčby horečky nejasného původu u neutropenického nemocného

Pokud přešetření nevede ke zjištění infekce, další postup závisí na míře rizika nemocného, resp. na iniciální antibiotické léčbě.

Pokračování empirické antibiotické léčby – nízké riziko (obr. 28.5.)

- Pokračování v léčbě zavedenými antibiotiky – u pacientů, kde přešetření nevedlo k nálezu zdroje infekce a je očekáván konec neutropenie během 5 následujících dnů;
- změna celé antibiotické kombinace – indikována při rozvoji hemodynamické nestability. Volí se režimy kombinované antibiotické léčby s glykopeptidem nebo bez glykopeptidu (dle kritérií), které se používají v iniciální léčbě u nemocných s vysokým rizikem (viz tab. 28.11.).

Pokračování empirické antibiotické léčby – vysoké riziko (viz obr. 28.5.)

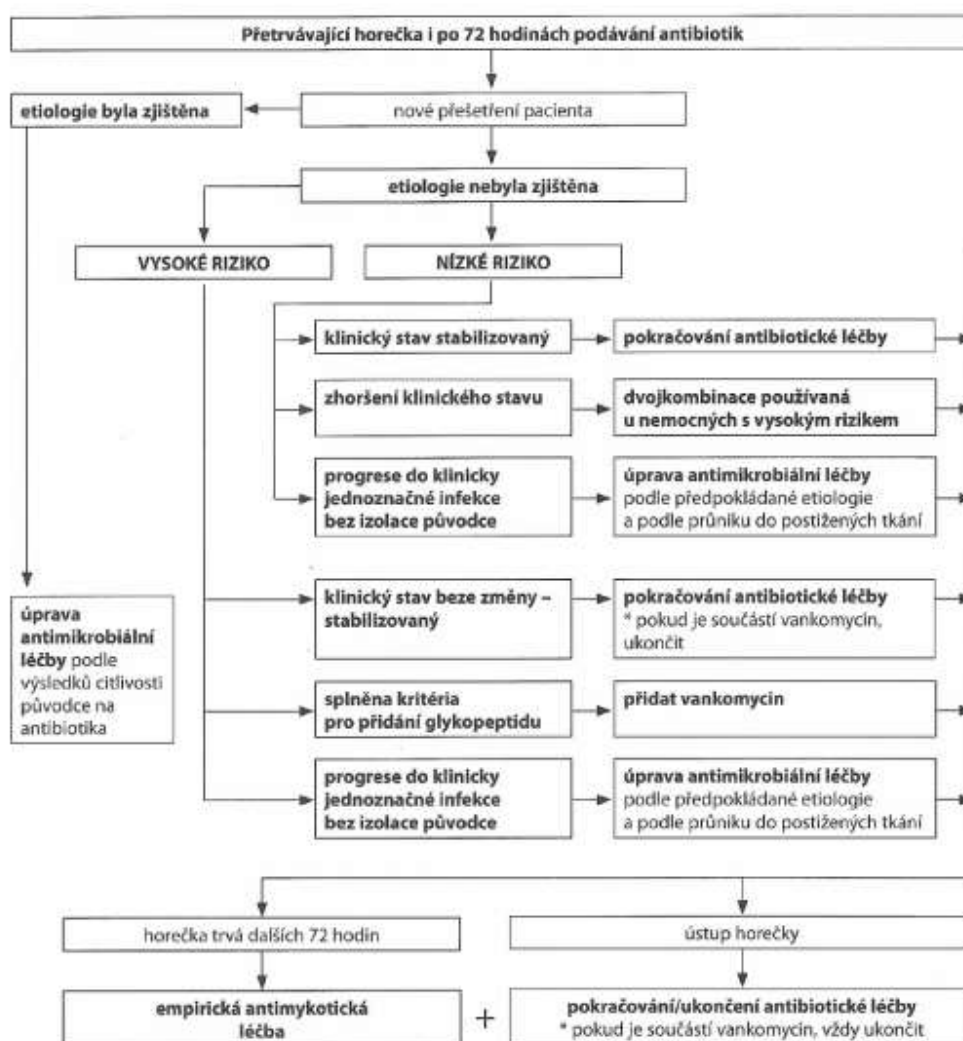
- Pokračování v léčbě zavedenými antibiotiky – u pacientů, kde přešetření nevedlo k nálezu zdroje infekce a je očekáván konec neutropenie během 5 následujících dnů;
- přidání aminoglykosidu do kombinace (amikacin, isepacin) – je-li nemocný léčen monoterapií;
- přidání glykopeptidu-vankomycinu (ke stávající monoterapii nebo dvojkombinaci) – jen u nemocných s hemodynamickou nestabilitou, mukozitidou nebo známkami kanylové infekce. Není-li po dalších 3 dnech léčebná odpověď, je nutné podávání vankomycinu ukončit (riziko rozvoje rezistence).

28.3.9. Pokračování léčby při přetrvávání febrilií po 5–7 dnech antimikrobiální terapie

Nemocní s horečkou přetrvávající i po týdnu antibiotické léčby mají nejméně v jedné třetině případů systémovou mykotickou infekci (v naprosté většině případů způsobenou *Candida* spp. nebo *Aspergillus* spp.), a je proto u nich indikována empirická antimykotická léčba (viz obr. 28.5.).

Tab. 28.13. Systémová antimykotika a jejich dávkování v empirické léčbě febrilní neutropenie

Antimykotika	
Název	Dávka/den
amfotericin B (Amphotericin B Squibb) i.v.	0,8–1 mg/kg/den
<i>Liposomální formy amfotericinu B</i>	
amfotericin B coloidní disperse (Amphocil) i.v.	3–4 mg/kg/den
amfotericin B lipidový komplex (Abelcet) i.v.	5 mg/kg/den
liposomální amfotericin B (AmBisome) i.v.	3–5 mg/kg/den
flukonazol (Mycamax, Diflucan) i.v. (nebyla-li profylaxe flukonazolem a jsou vzácné vláknité plísně)	2x 200–400 mg/den
itraconazol (Sporanox) i.v.	první 2 dny 2x 200 mg/den následující dny 1x 200 mg/den
vorikonazol (Vfend) i.v.	první den 2x 6 mg/kg následující dny 2x 4 mg/kg
kaspofungin (Cancidas) i.v.	první den 70 mg/den následující dny 50 mg/den



Obr. 28.5. Algoritmus léčby nemocných, u nichž přetrvává horečka po 3 a 5–7 dnech

Současné podávaná antibiotická léčba se redukuje většinou na monoterapii širokospektrálním antibiotikem pro zabránění sekundární bakteriální infekci.

Antimykotika používaná v empirické antimykotické léčbě febrilní neutropenie ukazuje tab. 28.13.

28.3.10. Ukončení antimikrobiální léčby

Ukončení antibiotické léčby u afebrilních nemocných

Nemocní s klinicky/mikrobiologicky prokázanou bakteriální infekcí. Antibiotika jsou podávána až do klinického, mikrobiologického i radiologického ústupu infekce (slizniční infekce týden, bakteriémie 1–2 týdny, pneumonie obvykle vyžadují 2–3 týdny).

Nemocní s neutropenií a horečkou nejasného původu s empiricky podávanými antibiotiky. Nejdůležitějšími faktory při rozhodování o délce antibiotické léčby u těchto nemocných jsou počet neutrofilů v periferní krvi a klinický stav:

- došlo k vzestupu neutrofilů $> 0,5 \cdot 10^9$ – ATB léčbu ukončujeme po 2 dnech bez febrilií po vzestupu neutrofilů nad $0,5 \cdot 10^9$;
- nedošlo k vzestupu neutrofilů $> 0,5 \cdot 10^9$, ale nemocný je hemodynamicky stabilní bez známek infekce, bez mukozitidy – ukončujeme ATB léčbu po celkově 5–7 dnech bez febrilií;
- nedošlo k vzestupu neutrofilů $> 0,5 \cdot 10^9$ a nemocný je současně hemodynamicky nestabilní nebo s mukozitidou nebo absolutním počtem neutrofilů $< 0,1 \cdot 10^9$ – pokračujeme s ATB léčbou do vzestupu neutrofilů nad $0,5 \cdot 10^9$ (maximální délka podávání ATB je 14 dní).

Ukončení antimykotické léčby u afebrilních nemocných

Nemocní s klinicky/mikrobiologicky prokázanou systémovou mykotickou infekcí. Délka antimykotické léčby je závislá na původci a na rozsahu onemocnění. Většinou trvá léčba týdny, ale i měsíce.

Nemocní s neutropenií a horečkou nejasného původu s empiricky podávanými antimykotiky. Postup při ukončení systémové antimykotické léčby u těchto nemocných je následující:

- pokud vymizí neutropenie, pacient je v dobrém klinickém stavu a kontrolní CT hrudníku a břicha neprokáže ložiska podezřelá z mykotického původu, je možné léčbu systémovým antimykotikem ukončit. Minimální délka podávání by však měla být přibližně 14 dní (respektive celková dávka amfotericinu B minimálně 1 g);

- u pacientů s dlouhodobou neutropenií je možné ukončit antimykotickou léčbou po 14 dnech, pokud není klinicky zjevná mykotická infekce, nemocný je klinicky stabilní a kontrolní CT hrudníku a břicha neprokáže ložiska podezřelá z mykotického původu;
- u pacientů s dlouhodobou neutropenií, kteří nejsou v dobrém klinickém stavu nebo jsou vysoce rizikováni, se doporučuje podávání antimykotika po celou dobu neutropenie, pokud se ovšem očekává v blízké době vzestup počtu neutrofilů.

Ukončení antibiotické a antimykotické léčby u nemocných s přetrvávající horečkou

Nemocní, kteří jsou stále febrilní i přes několik dnů trvající léčbu širokospektrálními antibiotiky a systémovými antimykotiky, musí být znovu celkově přešetřeni se zaměřením především na hluboké mykotické infekce, na infekce virové a mykobakteriální. Ultrasonografie, především však CT břicha a CT hrudníku, jsou zásadními metodami pro hledání mykotických ložisek. Platí to jak pro febrilní nemocné, kteří mají stále neutropenií, tak zejména pro nemocné, u nichž neutropenie již odezněla. Mykotická ložiska ve slezině, játrech nebo ledvinách se často zvětší nebo zviditelní po vzestupu počtu neutrofilů (hepatosplenická kandidóza).

Obecně platí, že antibiotickou a antimykotickou léčbu u této skupiny nemocných s přetrvávajícími febriliemi ukončujeme po minimálně 14 dnech a po co nejpečlivějším vyloučení infekčního původu horečky.

28.3.11. Další způsoby léčby febrilní neutropenie

Transfúze granulocytů

Podávání transfúzí granulocytů nemocným s febrilní neutropenií nevede ke snížení mortality, a navíc je zatíženo vysokým rizikem komplikací. Z těchto důvodů se v současné době pro rutinní léčbu infekce při neutropenií nedoporučuje. Někteří autoři je doporučují jen u těžké neutropenie s prokázanou bakteriální nebo mykotickou infekcí, která nereaguje na antimikrobiální léčbu.

Leukocytární růstové faktory – filgrastim (G-CSF) a sagramostim (GM-CSF)

Podávání leukocytárních růstových faktorů současně s další léčbou febrilní neutropenie signifikantně zkrátí trvání neutropenie, nezkrátí však trvání horečky a podávání protiinfekčních léků ani signifikantně nesníží morbiditu, a především mortalitu.

Rutiní používání leukocytárních růstových faktorů není indikováno u nekomplikované febrilní neutropenie. Jejich podávání je možno považovat za vhodné pouze ve velmi závažných případech se zřetelnou závažnou infekcí (pneumonie, hypotenze, závažná celulitida nebo sinusitida či systémová mykotická infekce s multiorgánovým selháním a sepsí), kdy nelze očekávat brzké obnovení neutrofilní krevtvorby. Léčba leukocytárním růstovým faktorem může být zvažována u pacientů dlouhodobě neutropenických, s dokumentovanou infekcí, která neodpovídá dobře na antimikrobiální léčbu.

Léčba grampozitivní infekce rezistentní na vankomycin

Pro léčbu infekcí vyvolaných vankomycin-rezistentními grampozitivními mikroorganismy se v nedávné době objevily dva nové přípravky, linezolid a synercid. Oba jsou dnes indikovány výlučně v případech prokázané rezistence izolovaných grampozitivních bakterií na vankomycin.

- **Linezolid** je řazen mezi novou skupinu antibiotik – oxazolidinony – a nejvíce zkrácenou rezistenci s ostatními antibiotiky, biologická dostupnost po perorálním podání je téměř 100 %. Dávkování: intravenózně, ale i perorálně v dávkách 600 mg každých 12 hodin.
- **Quinopristin/dalfopristin** je směs dvou různých antibiotik. Dávkování: 7,5 mg/kg intravenózně každých 8 hodin.

28.3.12. Antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných

Výskyt febrilních epizod při neutropenii může být snížen profylaktickým podáváním antibiotik včasné afebrilní fázi neutropenie. Přínos antimikrobiální profylaxe je však často anulován toxicitou léčby, přerůstáním mykotické infekce a vznikem rezistentní bakteriální a mykotické flóry.

Vzhledem k výše zmíněnému platí, že s výjimkou profylaxe *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*) není antimikrobiální profylaxe u neutropenických nemocných všeobecně doporučována.

Profylaxe infekce *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*)

Je indikována u všech nemocných se zvýšeným rizikem této infekce ($CD4 < 200 \cdot 10^6$), a to bez ohledu na skutečnost, zda je přítomna neutropenie.

Vhodná antibiotika: **trimethoprim-sulfamethoxazol** p.o. 1× 480 mg denně nebo 3× 960 mg týdně.

Profylaxe mykotických infekcí

Indikována je u nemocných s vysokým rizikem rozvoje mykotických infekcí (alogenní transplantace krevetvorných buněk, indukční a reindukční léčba akutní myeloidní leukémie, léčba spojená s neutropenií trávající déle než 7 dní, těžká mukozitida). Rutinní podávání antimykotické profylaxe u všech neutropenických pacientů v podobě azolových antimykotik není doporučováno.

Vhodná antimykotika:

- **posakonazol** p.o. 3× 200 mg denně (u nejvyššího rizika – AML/MDS indukce/reindukce, alogenní transplantace s reakcí štěpu proti hostiteli);
- **vorikonazol** p.o. 2× 200 mg denně (u alogenní transplantace);
- **flukonazol** p.o. 2× 200 mg denně;
- **itrakonazol** p.o. 2× 200 mg denně (nebo perorální roztok 2× 100–200 mg denně) (nutný monitoring hladin léku, riziko lékových interakcí).

Profylaxe bakteriálních infekcí

Nejčastěji se k profylaxi bakteriálních infekcí používají perorální chinolony a co-trimoxazol. Chinolony jsou v prevenci účinnější než co-trimoxazol, ale jejich nevýhodou je nedostatečný účinek proti G+ flóře a nárůst výskytu rezistentních G– mikroorganismů v průběhu léčby.

Rutiní profylaxe chinolony u nemocných s neutropenií není indikována. Pokud je v individuálních případech přece jen použita (chemoterapie vedoucí k dlouhodobé neutropenii a těžké mukozitidě), pak v kombinaci s penicilinem V nebo co-trimoxazolem (pokrytí G+ flóry) a měla by být podávána co nejkratší dobu a u co nejmenšího počtu vybraných rizikových nemocných.

Vhodná antibiotika: **ciprofloxacin** p.o. 2× 500 mg denně.

28.4. Mykotické infekce

Mykotické infekce představují skupinu infekčních komplikací, které jsou u onkologických nemocných spojeny s velmi závažnou prognózou.

Hlavními rizikovými faktory pro vznik mykotických infekcí jsou hematologická malignita, transplantace krevetvorné tkáně (hlavně alogenní), reakce štěpu proti hostiteli, neutropenie trávající déle než 10 dní a kortikoterapie.

Podle stupně invazivity můžeme mykotické infekce rozdělit na povrchové (postihující tělesné povrchy – např. orofaryngeální kandidóza) a invazivní (invadující do tkání).

1.4.6. Annex 6

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Křen L., Křikavová L., Mayer J. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2007;9(3):240-252. ISSN 1212-4184.

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

¹MUDr. Zdeněk Ráčil, ²Mgr. Iva Kocmanová, ³MUDr. Barbora Wagnerová, ⁴MUDr. Leoš Křen, Ph.D., ⁵MUDr. Lucie Křikavová, ¹prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.

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

²FN Brno, Oddělení klinické mikrobiologie

³FN Brno, Interní hematologická klinika

⁴Masarykova univerzita v Brně, LF MU a FN Brno, Ústav patologie

⁵FN Brno, Radiologická klinika

Souhrn

Invazivní mykotické infekce představují závažnou infekční komplikaci imunokompromitovaných nemocných s nádorovým onemocněním. Ve srovnání s bakteriálními infekcemi je jejich výskyt jednoznačně méně častý, na druhou stranu incidence invazivních mykotických infekcí narůstá a morbidita a mortalita s nimi spojená je výrazně vyšší, než je tomu u infekcí bakteriálních. Přestože invazivní mykózy postihují celou skupinu nemocných s nádorovým onemocněním, je jejich výskyt u pacientů se solidními nádory spíše vzácný. Naopak velice časté jsou u nemocných s hematologickými malignitami, a to především je-li součástí léčebného režimu transplantace krevetvorné tkáně.^(1,2) Předcházející dvě desetiletí přinesly významné změny v epidemiologii invazivních mykóz a během posledních několika málo let pak došlo i ke značným pokrokům v diagnostice a léčbě těchto velmi závažných infekcí.

Klíčová slova

Invazivní mykotické infekce • rizikové faktory • klinické příznaky • diagnostika

Původci invazivních mykotických infekcí

Více než devadesát procent invazivních mykotických infekcí u nemocných s nádorovým onemocněním je vyvoláno kmeny *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. Nicméně stále častěji se můžeme setkat i s infekcemi vyvolanými takzvanými vzácnými mykotickými patogeny, jako jsou především mikromycety třídy *Zygomycetes* (*Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp.), *Fusarium* spp., a eventuálně i některé další, vysloveně vzácné houby (*Alternaria* spp., *Scedosporium* spp. aj.).⁽³⁾ Přestože je popsáno přes 100 druhů kandiđ, více než 95 % všech invazivních infekcí vyvolává pouze 5 z nich: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Kmeny kvasinek jsou

běžnými komenzály povrchu lidského těla (především sliznic trávicího ústrojí). Není proto překvapivím, že většina případů invazivní kandiđy u onkologických, a zvláště pak hematologických nemocných je infekcí endogenní (prostup kolonizujících kmenů kvasinek poškozenou sliznicí při mukozitidě do cirkulace). Může však jít i o infekci exogenní, jak je tomu u většiny kvasinkových infekcí centrálních žilních katétrů (přenos především rukama personálu).^(1,2) Podobně jako u kandiđ je také dokumentováno kolem 100 aspergillových rodů, ale naprostou většinu invazivních infekcí u lidí vyvolává jen několik z nich: *A. fumigatus*, méně častěji pak *A. flavus*, *A. niger* a *A. terreus*.⁽⁴⁾ Aspergillové konidie jsou ubikvitní a vyskytují se ve vzduchu, prachu a teplotě půdy. V nemocničním prostředí je pak můžeme nacházet ve vzduchu, spráčkách, rezervoárech vody a květináčích. Jejich množství ve vzduchu se výrazně zvyšuje při různých rekonstrukcích a stavebních úpravách v nemocnicích a jejich okolí. Invazivní aspergilóza je

tady infekcí exogenní, kdy infekci u imunokompromitovaných nemocných vyvolají inhalované konidie.^{14, 20} Také invazivní zygomycóza a fusarióza jsou infekce exogenní. Konidie zygomycet a fusarií jsou opět ubikvitní a vyskytují se v prachu, stolici vodě a ftející vegetaci. K infekci dochází inhalací, ingestí, eventuálně i kontaminací ran. U zygomycóz dominuje přenos inhalační cestou a podobně jako u aspergiových kmenů může dojít k nozokomiálnímu rozšíření zygomycet křídlatkami a opět především v období rekonstrukčních prací. U fusariózy je vedle inhalační cesty velmi častou branou vstupu infekce do organismu kontaminace drobných kožních poranění.^{14, 20}

Epidemiologie

Během posledních dvou dekad došlo k významnějšímu nárůstu frekvence výskytu invazivních mykotických infekcí.¹¹ Příčinou tohoto stavu je neustále narůstající počet závažně imunokompromitovaných nemocných. Od roku 1980 výrazně vzrostl počet pacientů se solidními tumory a hematologickými onemocněními, kteří jsou léčeni agresivní chemoterapií vedoucí k neutropenii, narostlo významné množství transplantací krevtvořné tkáně (především pak alogenních transplantací krevtvořné tkáně), zvýšil se počet transplantací solidních orgánů, více nemocných je léčeno imunosupresivními léky z nejněžnějších indikací a jsou léčeni i nemocní ve vyšších věkových skupinách.¹¹ Frekvence výskytu invazivních mykotických infekcí je velmi malá u nemocných se solidními tumory a pohybuje se pod 2 %. Riziko vzniku mykotické infekce je zde významně spojeno s intenzitou léčby (s nejvyšší frekvencí invazivních mykóz, která se však pohybuje maximálně kolem 2,5 %, se setkáváme u nádorových on-

mocnění plic, jícnu, žlučníku a ovarií).¹⁶ Absolutní většinu případů (> 50 %) tvoří invazivní kandidóza, a to i v současnosti, na rozdíl od nemocných léčených pro hematologickou malignitu. Ve více než 2/3 je způsobena kmeny *Candida albicans*. Naopak infekce vyvolané vláknitými houbami jsou u těchto nemocných velmi vzácné.^{16, 21}

Zcela odlišnou situaci nacházíme u pacientů s hematologickou malignitou. Zde se v závislosti na charakteru onemocnění, respektive charakteru a intenzitě protinádorové léčby, pohybuje frekvence invazivních mykotických infekcí od 2 % (např. autologní transplantace krevtvořné tkáně) až po 15–25 % (např. indukční léčba akutní leukémie nebo alogenní transplantace krevtvořné tkáně).¹⁶

Právě u této skupiny onkologických nemocných došlo k největším změnám ve spektru invazivních mykóz. Od začátku devadesátých let minulého století, kdy se rozšířila masivní profylaxe flukonazolem u hematologických nemocných, trvale klesá incidence invazivních kandidóz.^{14, 7, 9} Tento pokles je však způsoben pouze snížením výskytu kandidemí vyvolaných flukonazol citlivými kmeny kvasinek (především *Candida albicans*). Naopak ve stejné době došlo k významnému procentuálnímu nárůstu infekcí vyvolaných kmeny s vysokou rezistencí na flukonazol (*C. glabrata* a *C. krusei*), které jsou v současné době příčinou více než poloviny invazivních kandidóz.²⁰ Rezistence těchto kmenů na flukonazol se však v různých zemích (ale i v různých nemocničních zařízeních) liší a v České republice je přibližně 20–30 % kmenů *Candida glabrata* a 90–95 % kmenů *Candida krusei* na flukonazol rezistentních. Profylaxe flukonazolem a pokles výskytu invazivních kandidových infekcí u hematologických nemocných za posled-

ních 20 let jsou však doprovázeny výrazným nárůstem incidence invazivních mykotických infekcí vyvolaných vláknitými houbami.^{14, 7, 9} Absolutní většinu těchto infekcí představuje invazivní aspergilóza, která je v současné době nejčastější mykózou u nemocných po alogenní transplantaci krevtvořné tkáně.^{16, 18} Incidence infekcí vyvolaných ostatními vláknitými houbami, a to především invazivní zygomycózy (*Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp.) a invazivní fusariózy (*Fusarium* spp.), je sice nízká, ale během posledních několika let zvláště ve velkých transplantáčních centrech významně narostla.^{17, 1} (Tab. 1)

Rizikové faktory

Rizikové faktory invazivní kandidózy

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

Tab. 1 – Incidence invazivních mykotických infekcí u jednotlivých skupin onkologických nemocných^{13, 4, 6)}

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

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

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

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

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

a skutní dalšími 16krát. Pobyt na JIP pak významně usnadňuje přenos kmenů kvasinek mezi nemocnými, a je proto důležitým přídatným rizikovým faktorem.⁽¹⁾ JIP z těchto rizikových faktorů je do určité míry účinné, že preventivní opatření (především redukce používání širokospektrých antibiotik, zlepšení péče o žilní katetry a důsledné dodržování postupů zabráňujících přenosu infekce rukama personálu) mohou z velké části snížit riziko invazivní kandidózy.⁽¹⁾ (Tab. 2)

Rizikové faktory invazivní aspergilózy a infekcí vyvolaných ostatními vzácnými vláknitými houbami

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

opět platí, že nejvýznamnějším rizikovým faktorem je hematologická malignita, včetně transplantace krevetvorné tkáně. Riziko invazivní zygomykózy pak dále zvyšuje GvHD a její léčba, dlouhodobá kortikoterapie, terapie dextrooxaminem, diabetická ketoacidóza, renální selhání a expozice rekonstrukčním pracím v nemocnici. Poslední práce také ukazují na určité zvýšené riziko zygomykózy při dlouhodobém podávání vorikonazolu, širokospektrého antimykotika, které však na zygomykózu není účinné.^(1, 2)

Hlavními rizikovými faktory invazivní fusariózy jsou neutropenie a reakce štěpu proti hostiteli a její léčba, zejména je-li použito vysokých dávek kortikoidů.^(1, 2, 13)

Klinické projevy

Klinické projevy invazivní kandidózy

Invazivní kandidóza probíhá ve většině případů pod obrazem izolované kandidémie. Klinické manifestace kandidémie jsou však velmi nespecifické. Většinou je jediným příznakem přetrvávající horečka, eventuálně septický stav nereagující na podávání širokospektrých antibiotik.^(1, 2)

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

Přibližně u 15 % onkologických nemocných s neutropenií se v průběhu invazivní kandidózy objeví makroodúšní rash. Nejčastěji je lokalizován na končetinách, ale může být i celotělový a často je zaměřován za kožní poškozenou alergickou reakcí.⁽¹³⁾ Histologická vyšetření těchto míst pak prokážou v hlubších vrstvách dermis přítomnost blastokontidií a pseudohyfy.⁽¹⁴⁾

Hematogenní cestou může infekce diseminovat do nejrůznějších tkání a orgánů. Teoreticky může dojít k postižení jakékoliv tkáně, a potom tedy k rozvoji příznaků vyplývajících z postižení těchto orgánů. U neutropenických nemocných, většinou s dlouhodobou hlubokou neutropenií (např. u nemocných léčených pro akutní leukémii), je nejčastější formou této křečové diseminace invazivní kandidózy postižení jater, sleziny a v některých případech i ledvin – tzv. hepatosplenická kandidóza.⁽¹⁵⁾

Klinické projevy invazivní aspergilózy

Vzhledem k inhalační formě infekce začíná invazivní aspergilóza ve většině případů pod obrazem pneumonie, jen přibližně v 5 % případů pak pod obrazem sinusitidy. Infekce může následně opět diseminovat hematogenní cestou do nejrůznějších orgánů (játra, CNS, ledviny). U hematologických nemocných a především pak u pacientů po transplantaci krevetvorné tkáně k této diseminaci dochází ve 30–50 % případů.⁽¹⁶⁾ Obr. 1, 2.

Klinické projevy invazivní zygomykózy a fusariózy

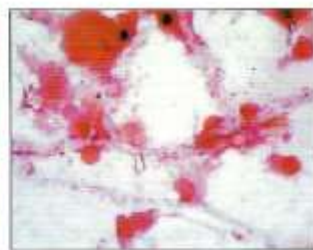
Invazivní zygomykóza typicky postihuje rinokonstrální oblast. U neutropenických nemocných se však nejčastěji setkáváme s formou plísní. Méně často je pak postižení kožní a gastrointestinální. Typickým projevem zygomykózy je vaskulární (především arteriální) invaze a následná trombotizace cév s infarzací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



Obt. 1 – Disseminovaná invazivní aspergilloza – postižení modru



Obt. 2 – Disseminovaná invazivní aspergilloza – postižení nosní sliznice (šipka ukazuje místo postření)



Obt. 3 – Přímá mikroskopie – barvení podle Grama – Aspergillus (šip. imitace štůhůtek)

zní mykotické infekce je extrémně rychlá, progresse většinou s fulminantním koncem.¹⁰⁸ Klinické formy pak ukazuje Tab. 4. Zatímco u imunokompetentních nemocných fusaróza postihuje většinou pouze místo vstupu mikroorganismu (keratitida, onychomykóza, kožní infekce), u 75 % nemocných s hematologickou malignitou infekce z místa vstupu do organismu (kožní léze, dýchací cesty) velice rychle hematogenně diseminuje.¹¹¹ Při diseminaci infekce může být postižen prakticky jakýkoliv orgán, nicméně nejčastěji se setkáváme s postižením kůže (70–90 %), plic a paranasálních sinů (70–80 %).¹⁰⁹ Onemocnění se pak klinicky manifestuje jako fibrilní stav nereagující na antibiotickou léčbu, většinou současně s pneumonií, sinusitidou nebo celulitidou v místě kožní léze, pokud tato byla branou

vstupu infekce. Jak je zmínáno výše, u většiny nemocných dochází při diseminaci charakteristicky k rozvoji mnohobodných bolestivých kožních lézí (drobné ulcerující léze, podkožní noduly, erytémy, které mohou vznikát po celém těle, predilekčně však na končetinách).¹¹² Klinický průběh onemocnění je opět většinou velice rychlý.

Diagnostika

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

a nespecifické. Kulturační vyšetření ze sterilních materiálů je často negativní anebo pozdně pozitivní a histopatologická diagnóza, která vyžaduje invazivní proceduru k získání vzorku tkáně, je u kritických a pancytopenických pacientů jen velmi obtížně proveditelná.^{117, 118} Narůst invazivních mykotických infekcí a jejich vysoká mortalita však vedly k požadavku časného stanovení diagnózy, a tak i k časnějšímu zahájení antimykotické léčby s cílem zlepšit prognózu nemocných s touto infekcí. Proto došlo v posledním desetiletí k rozvoji sérologických a molekulárně biologických metod (tzv. nekultivačních metod), které tuto diagnostiku umožňují. Jednoznačně největších pokroků bylo v tomto směru dosaženo v časně diagnostice invazivní aspergillozy. U invazivní kandidózy jsou nekultivační metody prozatím méně přesvědčivé a u infekcí vyvolaných ostatními vláknitými houbami stále na úrovni výzkumu. Pořád ale platí, že konvenční mikrobiologické a histologické diagnostické přístupy jsou základním kamenem pro definitivní stanovení diagnózy invazivní mykotické infekce.¹¹⁹

Úspěšná diagnóza a léčba invazivních mykóz tedy jednoznačně vyžaduje týmový přístup zahrnující spolupráci kliniků, mikrobiologů, molekulárních biologů a patológů.

Metody pro diagnózu invazivních mykotických infekcí

Konvenční mikrobiologické metody

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

Tab. 4 – Klinické formy invazivní zygomykózy a jejich projevy¹¹⁰

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

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

Mykologický patogen	Charakteristická mikroskopická morfologie
<i>Candida</i> spp.	oválné pučiči kvasinky 2–5 µm, možnost přítomnosti pseudohyf a v některých případech i skutečných septovaných hyf
<i>Aspergillus</i> spp.	septované dichotomicky se větvící hyfy uniformní šíře (3–6 µm), v kavitách mohou být viditelné i havičky koničů široké, tenkostěnné, aseptované nebo velmi řídko septované hyfy šíře 8–25 µm, okraje hyf jsou nerovnoměrné a větvení je nepravidelné
<i>Fusarium</i> spp.	septované, pravidelně se větvící hyfy s pravidelným okrajem

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

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

Tab. 7 – Příčiny falešné pozitivita a negativita při detekci galaktomannanu⁽¹⁹⁾

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



Obr. 4 – Kultura – *Candida albicans*



Obr. 5 – Kultura – *Aspergillus fumigatus*

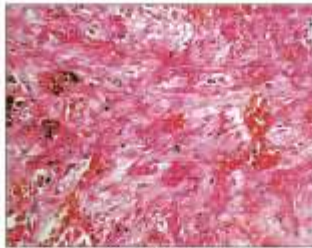
především barvení podle Grama nebo Giemsa a velice účinné je i barvení za použití fluorescenčních barviv (např. Calcofluor), které se specificky vážou na chitin ve stěnách hub.

Velkou výhodou přímé mikroskopie je rychlost (výsledky mohou být k dispozici již do 1 hodiny od odběru materiálu). Nevýhodou tohoto vyšetření je relativně malá senzitivita, která je nižší než u kultivace, a tedy negativita přímé mikroskopie materiálu nevyklučuje mykologickou infekci⁽¹⁹⁾ Obr. 3.

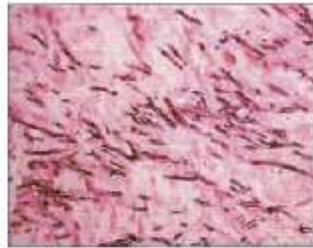
Kultivace. Kultivace kvasinek a plísní z biologických materiálů má pro diagnózu invazivních mykóz zásadní význam. Umožňuje přesnou identifikaci patogenů a následně je navíc možné vyšetření jejich citlivosti k antimykotikům.

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

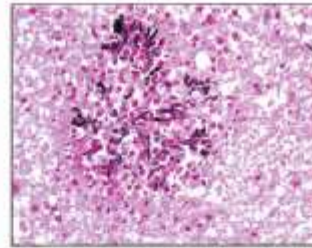
Druhým limitujícím faktorem kultivace je



Obr. 6 - Histologie - barvení hematoxylin-eozinem. Invasivní aspergilóza - postižení plic.



Obr. 7 - Histologie - barvení podle Grocotta. Invasivní aspergilóza - postižení plic - stejný pacient jako na Obr. 6.



Obr. 8 - Histologie - barvení podle Grocotta. Invasivní aspergilóza - postižení CNS - stejný pacient jako na Obr. 7.

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

Histologické metody

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

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

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

Nekulturační metody

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

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



Obr. 9 - Detekce galaktomannanu ELISA metodou - výsledek reakce následně je detekována změna barvy osbarvení

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

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

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



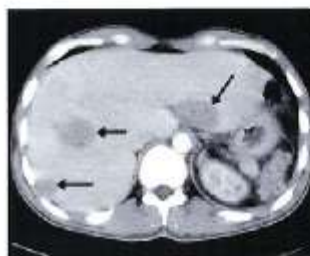
Obr. 10 – Přehledný snímek plic – invazivní aspergilloza – pozitivní plic (bilaterálně rozšíření v prsoum lůžku na různých úrovních a horního pole s mnohačetnou méně viditelnou – neepifódní částí)



Obr. 11 – HRCT plic – invazivní aspergilloza – pozitivní plic v obou lalóckách plic mnohačetné dutiny máty až sčtyřlíst, mají charakter mléčného zakalení



Obr. 12 – CT mozku – invazivní aspergilloza – pozitivní CNS (lévný pacien) jako rozostření 1 a 2)



Obr. 13 – CT jater – invazivní aspergilloza – pozitivní jater (mnohočetná kóžka v jaterní režně i postkontrastně hypodenzní) lipky ukazují místa porážení



Obr. 14 – HRCT plic – invazivní aspergilloza – pozitivní plic. Vývoj obrazu na HRCT u nemocného s výrazným neutropenií po chemoterapii pro akutní myeloidní leukémii. (A) mnohačetné drobné drobné blůž.; (B) stopkový útvár s l. d.; (C) kóžka kóžka s air crescent sign a okolní infiltrát l. d.

parapsilosis a *C. kofy*) a metodou použitou k detekci mannanu.⁽¹⁸⁾ Dříve používaná latexová aglutinace měla velmi nízkou senzitivitu a dnes je již nahrazena sandwichovou ELISA metodou, která je významně citivější a komerčně dostupná jako Platelia Candida Ag (Bio-Rad). Jako pozitivní je v tomto křtu označován vzorek s hodnotou mannanu větší než 0,5 ng/ml. K diagnostice invazivní kandididózy je využívána také detekce protilátek proti mannanu, již zmíněný tzv. antimannan. V našich podmínkách je nejčastěji používána opět ELISA metoda detekující protilátky proti mannanu všech tříd, komerčně dostupná jako Platelia Ab/Ao/Ak (Bio-Rad). Při použití tohoto testu je pak zjištěná hodnota 5–10 AU/ml označována jako intermedieární a hodnota > 10 AU/ml jako pozitivní. Klinické využití detekce protilátek je však značně limitováno. Příčinou je jednak falešná negativita u imunokompromitovaných nemocných, u kterých dochází k produkci často jen minimálního množství protilátek, a jednak falešná pozitivita u pacientů se slizniční kolonizací kvasinami, kdy dochází k imunitní odpovědi na antigeny těchto kolonizujících kmenů.⁽¹⁹⁾ (Tab. 6)

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

nách) se opět dříve používala metoda latexové aglutinace, která však byla nahrazena jednoznačně citivější sandwichovou ELISA metodou (Platelia Aspergillus EIA, Bio-Rad). Tento test využívá vazby monoklonální protilátky na galaktoturanové epitopy molekuly galaktomannanu. Množství těchto epitopů může kolísat mezi jednotlivými aspergřovými kmeny a v různých fázích infekce. Předpokládá se, že pro uvolnění galaktomannanu z hyf do cirkulace je nezbytná angiinivaze infekce. Stupeň angiinivaze pak kolísá v závislosti na imunitním deficitu nemocného a stupni poškození tkáňí cytotatiky nebo radioterapií. Nutnost angiinivaze je také vysvětlením, proč u některých typů aspergřových infekcí, jako např. aspergřomiu, kde hyfy rostou v preformované dutině bez invaze do tkáňí, je test negativní. Po průniku do cirkulace může být galaktomannan vázán specifickými protilátkami a vytvářet imunitní komplexy, a tak vést k falešné negativitě testu. Nicméně u imunokompromitovaných nemocných, u kterých je imunitní odpověď potlačena, se tento mechanismus uplatňuje pravděpodobně jen minimálně.^(17, 19)

Test je semikvantitativní, výsledek je udáván ve formě indexu pozitivity – poměru optické denzity testovaného vzorku a optické denzity kontrolního vzorku, obsahujícího přibližně 1 ng galaktomannanu/ml. Hodnota indexu pozitivity, od kterého je

Tab. 6 – Příčiny falešné pozitivivity a negativivity při detekci 1,3- β -D glukanu⁽¹⁷⁾

1,3- β -D glukán	
Falešná pozitivita	
hemodialýza s celulóznou kapslí (ne polymetylmetakrylátové)	obsahuje 1,3- β -D-glukán
gáza	obsahuje 1,3- β -D-glukán
intravenózní imunoglobuliny	obsahuje 1,3- β -D-glukán z celulózných membrán při zpracování krevních derivátů
Falešná negativita	
není popisována	

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

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

Tab. 10 - Diagnostika invazivní kandidózy - využití jednotlivých metod

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

Tab. 11 – Diagnostika invazivní aspergilózy – využití jednotlivých metod

	Senzitivita	Specifita	PPV	NPV	Komentář
Konvenční mikrobiologické metody – kultivace					
materiál z dýchacích cest (sputum, tracheální aspirát, tekutina získaná z BAL) ^(25, 26)	40 % ⁽²⁵⁾	90 % ⁽²⁵⁾	závisí na rizikosti nemocného ⁽²⁶⁾ 1. alogenní HSCT, hematologická malignita, neutropenie – 72 % 2. autologní HSCT, kortikoterapie, solidní tumory – 58 % 3. ostatní – 14 %	95 % ⁽²⁵⁾	
ostatní sterilní materiály (mozkomšní mok, biopsie tkání a punktáty abscesů)	relativně vysoká – např. CT vedená tenkojehlová biopsie plic – 71 % ⁽²⁷⁾	téměř 100 %	téměř 100 %		klínicky méně využitelné – biopsie tkání není často možná provést u kriticky nemocných
Konvenční mikrobiologické metody – cytologie					
materiál z dýchacích cest (sputum, tracheální aspirát, tekutina získaná z BAL) ⁽²⁸⁾	64 %	89 %	závisí na rizikosti nemocného – vysoké riziko – hematologická malignita, alogenní HSCT – 84 %	97 %	
ostatní sterilní materiály (mozkomšní mok, biopsie tkání a punktáty abscesů)	relativně vysoká – např. CT vedená tenkojehlová biopsie plic – 71 % ⁽²⁷⁾	téměř 100 %	téměř 100 %		klínicky méně využitelné – biopsie tkání není často možná provést u kriticky nemocných
Histologie – primárně sterilní materiály					
biopsie tkání a punktáty abscesů	relativně vysoká – např. CT vedená tenkojehlová biopsie plic – 71 % ⁽²⁷⁾	téměř 100 %	téměř 100 %		klínicky méně využitelné – biopsie tkání není často možná provést u kriticky nemocných
Sérologické metody					
galaktomannan – sérum ⁽²⁹⁾	97 %	99 %	99 %	99 %	pozitivita = 2 a vícekrát IP > / = 0,5, specifita stoupá s rizikostí nemocného, pozitivita předchází až o 10 dní klinickou diagnózu ⁽²⁹⁾ vývoj hodnoty IP při léčbě koreluje s léčebnou odpovědí ⁽³⁰⁾
galaktomannan – tekutina získaná BAL	85 %	100 %	100 %	88 %	pozitivita v tekutině získané BAL často předchází i o několik dní pozitivitu v séru
1,3-β-D glukán ⁽²⁹⁾	80,0 %	87,1 % ^A	83,8 % ^A	75,1 % ^A	předchází o 10 dní klinickou diagnózu ⁽²⁹⁾ – pro celou skupinu IF
Zobrazovací metody					
rtg plic	známky nespecifické a pozdní				
HRCT plic	Výhody: pozitivní u 40–50 % neutropenických nemocných s normálním rtg plic, pravidelně prováděné HRCT plic zkrátí dobu do stanovení dg. o 5–7 dní, charakteristický vývoj změn na HRCT (halo, atypická infiltrace, air crescent) u neutropenických nemocných				Nevýhody: změny na HRCT nejsou jednoznačně typické pro mykotické infekce, nelze odlišit typ mykotické infekce s angioinvasí
CT paranazálních dutin (PND)	indikováno při známkách postižení PND – infiltrace často s invazí do skeletu				
CT (UZV) parenchymatálních orgánů, zejména jater a sleziny, event. mozku	nutné u nemocných s klinickými známkami přetrvávající infekce či organového postižení pro vyloučení hematogenní diseminace infekce				

PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota, ASCT – transplantace krevní tkáně, IF – invazivní mykózy

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

INVAZIVNÍ FUSARIOZA					
Konvenční mikrobiologické metody – kultivace a cytologie					
hemokultura	pozitivní u 40-60 % pacientů ¹² , zásadní význam pro stanovení diagnózy a odlišení od ostatních vláknitých hub				
ostatní materiály (kůže, punktát z paranazálních dutin, materiál z dýchacích cest, bioptické materiály)	zásadní význam pro stanovení diagnózy a odlišení od ostatních vláknitých hub, při pozitivním nálezu a příslušném klinickém korelátu u imunosuprimovaných nemocných je vzhledem k závažnosti nálezu ve většině případů interpretován jako klinicky významný				
Histologie					
biopsie tkání zejména kožních lézí	často první provedené vyšetření, pro definitivní odlišení nutná kultivace				
Sérologické metody					
1,3-β-D glukán²³	senzitivita	specifita	PPV	NPV	přechází 10 dní klinickou diagnózu ²⁴ ^ – pro celou skupinu IF
	100,0 %	87,1 % ^A	83,8 % ^A	75,1 % ^A	
Zobrazovací metody – podle místa postižení					
rtg plic	známky nespecifické a pozdní				
HRCT plic	změny neodlišitelné od invazivní aspergilózy, respektive infekce vyvolané jinou vláknitou houbou				
CT paranazálních dutin (PND)	indikováno při známkách postižení PND – infiltrace často s invazí do skeletu				
CT (UZV) parenchymatózních orgánů, zejména jater a sleziny, event. mozku	nutná u nemocných s klinickými známkami přetrvávající infekce či orgánového postižení pro vyloučení hematogenní diseminace infekce				
INVAZIVNÍ ZYGOMYKÓZA					
Konvenční mikrobiologické metody – kultivace a cytologie					
aspirát z paranazálních dutin, materiál z dýchacích cest, eventuálně další bioptické materiály (kůže, biopsie stěvních, punktáty parenchymatózních orgánů)	zásadní význam pro stanovení diagnózy a odlišení od ostatních vláknitých hub, při pozitivním nálezu a příslušném klinickém korelátu u imunosuprimovaných nemocných je vzhledem k závažnosti nálezu ve většině případů interpretován jako klinicky významný				
Histologie					
biopsie tkání	často jediné vyšetření s pozitivním výsledkem, pro definitivní odlišení nutná kultivace				
Sérologické metody					
nelze použít					
Zobrazovací metody – podle místa postižení					
rtg plic	známky nespecifické a pozdní				
HRCT plic	změny neodlišitelné od invazivní aspergilózy, respektive infekce vyvolané jinou vláknitou houbou				
CT paranazálních dutin (PND)	indikováno při známkách postižení PND – infiltrace často s invazí do skeletu				
CT (UZV) parenchymatózních orgánů, zejména jater a sleziny, eventuálně mozku	nutné u nemocných s klinickými známkami přetrvávající infekce či orgánového postižení pro vyloučení hematogenní diseminace infekce				

PPV – pozitivní predikční hodnota, NPV – negativní predikční hodnota, IF – invazivní mykózy

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

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

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

vazivní aspergilózy s mozkomíšním moku pro posouzení postižení CNS touto infekcí. Obr. 9.

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

neboť je detekovatelný kromě u nemocných s invazivní aspergilózou a kandidózou také u nemocných s infekcemi vyvolanými vzácnými houbami, jako jsou *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces* spp., *Acremonium* spp. aj. Na druhou stranu nelze tento test použít k detekci kryptokokové infekce a k diagnostice invazivní zygomykózy. Příčinou je právě výše zmíněná malé množství 1,3-β-D glukanu v jejich buněčné stěně.²¹⁾

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

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

Hlavní výhodou tohoto testu je jeho „pan-fungality“, nevýhodou je jak velká citlivost (měřeny jsou pikogramové hodnoty polysacharidů), tak i laboratorní a finanční náročnost. I u tohoto testu jsou popisovány falešné pozitivy (Tab. 8).^{17,18}

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

V současné době však molekulární biologické metody stále nepatří mezi rutinní postupy při diagnostice invazivních mykóz. Hlavní příčinou je neexistence mezilaboratorní standardizace.^{17,18}

Zobrazovací metody

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

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

na rentgenovém snímku plic. U neutropenických nemocných mají změny na HRCT plic i typický vývoj. V časně fázi infekce se setkáváme s takzvanými „halo“ příznaky (pozitivní u 68 % nemocných 3. den infekce). V pozdní fázi infekce pak nacházíme tzv. „air crescent“ příznak (pozitivní u 63 % nemocných 14. den infekce). Nevýhodou HRCT je však fakt, že nás dokáže informovat pouze o přítomnosti infekce plic vyvolané vláknitou houbou s angioinvasí, nepřináší však informaci o etiologii této infekce. Nejčastěji jde sice o invazivní aspergillózu, ale stejný obraz můžeme nacházet i u invazivní zygomycózy, eventuálně i fusariózy.¹⁹ Obr. 10–14.

Diagnostika jednotlivých invazivních mykóz

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

Závěr

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

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

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

Literatura

1. PFALLER, MA. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. *Clin Infect Dis*, 2008, 43 Suppl. 1, p. S3–14.

2. RUMKE, M., MASCHMEYER, G. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer – review of the literature. *Eur J Med Res*, 2002, 7, p. 227–235.

3. NUCCI, M., MARR, KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis*, 2006, 41, p. S21–S26.

4. YAMAZAKI, T., KUME, H., MURASE, S., et al. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in error of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol*, 1995, 37, p. 1732–1738.

5. HANNA, H., KONTONYANNIS, D., SUONENEN, J., et al. The changing epidemiology of candidemia in hematologic malignancy: *Candida albicans* and *Candida krusei* are the leading cause of fungemia. Program and abstracts of the 45th ICAAC, December 16–19, 2005, Washington, D. C., USA, p. Abstract M-980.

6. O'BRIEN, SN., BLULLEVEN, NMA., MAHFOUZ, TH., et al. Infections in Patients with Hematological Cancer: Recent Developments. *Hematology*, 2003, p. 433–472.

7. VAN BURK, JH., LEBENBERG, W., MYRSON, D., et al. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in liver marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 335 patients. *Medicine (Baltimore)*, 1998, 77, p. 245–254.

8. GROLL, AH., SHAH, PM., MENTZEL, C., et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*, 1995, 63, p. 23–32.

9. MORGAN, J., ALEXANDER, B., WANNEMUEHLER, K. Quantitation of Risk for Invasive Fungal Infections (IFI) among Transplant (TX) Recipients Reporting to TRANSNET. Program and abstracts of the 45th ICAAC, October 30–November 2, 2004, Washington, D.C., USA, p. Abstract M-1058.

10. MARR, KA., CARTER, RA., BOECKH, M., et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*, 2002, 100, p. 4558–4566.

11. MARR, KA., CARTER, RA., CRIPPS, F., et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2002, 34, p. 909–917.

12. DIGMANI, MC., ANASSIE, E. *Invasive Aspergillosis*. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10 Suppl. 1, p. 67–75.

13. REX, JH., WALSH, TJ., ANASSIE, EJ. Fungal infections in immunocompromised hosts. *Adv Intern Med*, 1998, 43, p. 321–371.

14. BODEY, GP., LUNA, M. Skin lesions associated with disseminated candidiasis. *JAMA*, 1974, 230, p. 1436–1438.

15. LIN, SJ., SCHRANZ, J., TEUTSCH, SM. Aspergillus case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*, 2001, 32, p. 358–360.

16. SPELLBERG, B., EDWARDS, J., JR., IBRAHIM, A. Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18, p. 555–559.

17. ALEXANDER, BO., PFALLER, MA. Contemporary Tools for Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clin Infect Dis*, 2005, 43, Suppl. 1, p. S15–27.

18. SHAO, PL., HUANG, LM., HSUEH, PI. Invasive fungal infection – laboratory diagnosis and antifungal treatment. *J Microbiol Immunol Infect*, 2006, 30, p. 178–188.

19. ELLEPOLA, AN., MORRISON, CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol*, 2005, 43 Suppl. No. 1, p. S5–S4.

20. MASCHMEYER, G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new trends. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27 Suppl. 1, p. 3–6.

21. SENDID, B., TABOURET, M., POIRDT, JL., et al. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and anti-mannan antibodies: useful combined test for diagnosis.

- gnosis of systemic candidosis. *J Clin Microbiol*, 1998; 37, p. 1510-1517.
22. CHEN, Y., SUN, H., WANG, J., et al. Usefulness of Combined Detection of Mannanemia and Antimannan Antibodies for the Diagnosis of Invasive Candidosis. Program and abstracts of the 44th ICAAC, October 30-November 2, 2004, Washington, D. C., USA, p. Abstract M-054.
23. OSTROSKY-ZEICHNER, L., ALEXANDER, B.D., KETT, D.H., et al. Multicenter clinical evaluation of the (1,3) beta-D glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*, 2005; 41, p. 604-609.
24. ODABASI, Z., MATTIUZZI, G., ESTEY, E., et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: evidence, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*, 2004; 39, p. 199-205.
25. LEVY, H., HORAK, D.A., TEGTMEIER, B.F., et al. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respir Med*, 1992; 86, p. 249-248.
26. HORWATH, J.A., DUMMER, S. The use of respiratory tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med*, 1996; 100, p. 171-175.
27. HOSAR, A., ANGHILIERI, M., CARRAFIELLO, G., et al. Utility of percutaneous lung biopsy for diagnosing hematous fungal infections in hematologic malignancies. *Haematologica*, 2003; 88, p. 1400-1403.
28. MAERTENS, J., THEUNISSEN, K., VERBKEN, E., et al. Prospective clinical evaluation of liver cells for galactomannan detection in adult hematologic cancer patients and hematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*, 2004; 125, p. 852-860.
29. MARR, K.A., SALAJEE, S.A., MCLAUGHLIN, L., et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*, 2004; 190, p. 641-649.
30. BOUTBOUL, F., ALBERTI, C., LEBLANC, T., et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis*, 2002; 34, p. 950-953.

Práce byla podpořena IGA MZ ČR N10053-02005.

e-mail: zracek@fnbrno.cz

1.4.9. Annex 9

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Lengerová M., Mayer J. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék.* 2007;53(9):990-999. ISSN 1801–7592.

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí sérologických metod

Z. Ráčil¹, I. Kocmanová¹, B. Wagnerová¹, M. Lengerová¹, J. Mayer²

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Galaktomannan – marker invazivní aspergilózy (IA)

Galaktomannan (GM) je polysacharid buněčné stěny aspergilů a některých

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

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

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

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

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

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

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

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

Tab. 2. Příčiny falešné positivity Platelia Aspergillus testu.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Indikace

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

Interpretace

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

Využití

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

Další materiály vhodné k testování

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

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

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

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

Mannan a antimannan – diagnostika invazivní kandidózy (IC)

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

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

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

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

PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

mannanu a protilátek proti němu, tzv. antimannanu.

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

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

Existují dvě hlavní příčiny.

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

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

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

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

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

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

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

PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Závěr

Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických

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

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

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

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

Literatura

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

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

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

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

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

1.4.10. Annex 10

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Mayer J. Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2007;13(5):176-183. ISSN 1211-264X.

Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy

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

¹Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

²Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

SOUHRN

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

Klin mikrobiol inf léc 2007;13(5):176-183

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

Došlo do redakce: 3. 7. 2007

Přijato k tisku: 5. 9. 2007

Úvod

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

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

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

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

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

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

Galaktomannan: struktura, uvolňování a možnosti detekce antigenu

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

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

Latexová aglutinace (Pastorex Aspergillus, BioRad, France) se ještě místy používá (zejména tam, kde je vyšetření prováděno spíše příležitostně) – v rutinní diagnostice je ale v současné době nahrazena sendvičovou ELISA metodou, která je 10 až 15krát (při použití cut off 1,5) a nebo až 30krát

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

Využití detekce galaktomannanu pro diagnózu invazivní aspergilózy

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

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

Faktory ovlivňující senzitivitu testu

Typ a závažnost imunosuprese

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

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

Manifestace aspergilové infekce

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

Předchozí podání antimykotik

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

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

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

Cut-off

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

Frekvence prováděných odběrů

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

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

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

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

Faktory ovlivňující PPV testu

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

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

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

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

Tabulka 3
Faktory ovlivňující senzitivitu Platelia Aspergillus

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

Tabulka 4
Příčiny falešné pozitivity Platelia Aspergillus testu

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

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

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

Klinicky závažnějším problémem jsou však falešné pozitivivity testu přetrvávající i v opakovaných odběrech, které pak imitují obraz nalezený při skutečné infekci. Odlišení falešné a skutečné pozitivivity 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 pozitivivity testu, jednak pro jeho správnou interpretaci, ale především pro nutnost v maximální míře tyto faktory u pravidelně monitorovaných nemocných eliminovat. Nejčastější příčiny falešných pozitivit Platelia Aspergillus testu jsou zmíněny v následujícím textu [11,12,22,30,31].

Intravenózní podání penicilinových antibiotik

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

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

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

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

Aplikace roztoku Plasma-Lyte

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

Průnik antigenu z gastrointestinálního traktu

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

Infekce jinými patogeny

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

Ostatní příčiny falešné pozitivivity

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

Detekce galaktomannanu umožňuje časnější diagnózu IA

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

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

Galaktomannan jako marker léčebné odpovědi IA

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

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

Tabulka 5
Detekce galaktomannanu – Platelia Aspergillus – souhrn

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

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

Ostatní materiály

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

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

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

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

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

Závěr

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

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

Literatura

- Paganò L, Cairò M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006;91(8):1068–1075.
- Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34(7):909–917.
- von Ellert M, Roos N, Schulten R, et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995;62(6):341–347.
- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347(6):408–415.
- Lee YR, Choi YW, Lee KJ, et al. CT halo sign: the spectrum of pulmonary diseases. *Br J Radiol* 2005;78(933):852–865.
- Lehmann PF and Reiss E. Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits. *Infect Immun* 1978;20(2):570–572.
- Reiss E and Lehmann PF. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1979;25(1):357–365.
- Laage JP, Kobayashi H, Debaupas JP, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994;62(12):5424–5433.
- Swanink CM, Meis JP, Rijs AJ, et al. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):257–260.
- Petráň V, Petráň R, Solomon J, et al. Multidimensional volumetric imaging of pulmonary infiltrates for measuring therapeutic response to antifungal therapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(4):1510–1517.
- Mennink-Kersten MA, Donnelly JP and Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004;4(5):349–357.
- Aguiño VR, Goldani LZ and Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 2007;163(4):191–202.
- Maertens J, Verhaegen J, Demuynek H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-

- linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillus. *J Clin Microbiol*. 1999;37(10):3223-3228.
14. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, et al. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood*. 2001;97(6):1604-1610.
 15. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis*. 2002;185(9):1297-1306.
 16. Sulhian A, Boutboul F, Ribaud P, et al. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*. 2001;91(2):311-318.
 17. Hebebrecht R, Latscher-Bru V, Oprea C, et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2002;20(7):1898-1906.
 18. Pined C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):2184-2186.
 19. Rovira M, Jimenez M, De La Bellacasa JP, et al. Detection of Aspergillus galactomannan by enzyme immunoassay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. *Transplantation*. 2004;77(8):1260-1264.
 20. Quindós G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12 Suppl 740-52.
 21. McIntosh LA and Jones EL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol*. 2004;126(3):289-297.
 22. Maertens J, Theunissen K, Ledwycyk T, et al. Advances in the serological diagnosis of invasive Aspergillus infections in patients with hematological disorders. *Mycoses*. 2007;50 Suppl 12-17.
 23. Bailly V, Huerne M, Latge JP, et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*. 2005;73(11):494-503.
 24. Hope WW, Walsh TJ and Denning DW. The invasive and suppurative syndromes due to Aspergillus spp. *Med Mycol*. 2005;43 Suppl 1S207-238.
 25. Husain S, Kwak EJ, Ohman A, et al. Prospective assessment of Platelia Aspergillus galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004;4(5):795-802.
 26. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*. 2004;190(3):641-649.
 27. Maertens J, Theunissen K, Verbeke E, et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and hematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*. 2004;126(5):852-860.
 28. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, et al. Antifungal therapy decreases sensitivity of the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2005;40(12):1762-1769.
 29. Račić Z, Kocmanova I, Kubicova E, et al. Variation of galactomannan level during 24-hour period in haematological patients with/without invasive aspergillosis (Paper 729). Abstract of the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID). 2006; Nice, France. European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2006.
 30. Wheat LJ. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2005;27(7):51-57.
 31. Ventagner V, Walsh TJ, Hope W, et al. Galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(1):21-32.
 32. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False-positive galactomannan platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):913-916.
 33. Adam O, Aupein A, Wilquin F, et al. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive Aspergillus galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):917-920.
 34. Mattei D, Rappelli D, Mordani N, et al. False-positive Aspergillus galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5362-5363.
 35. Bart-Delabasse E, Bastie M, Al Jijakli A, et al. Detection of Aspergillus galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5214-5220.
 36. Machetti M, Purfaro E and Viscoli C. Galactomannan in piperacillin-tazobactam: how much and to what extent? *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(9):3984-3985.
 37. Walsh TJ, Shoham S, Tetraizene R, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4744-4748.
 38. Aubey A, Foucher R, Bottero J, et al. Occurrence and kinetics of false-positive Aspergillus galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):389-394.
 39. Singh N, Ohman A, Husain S, et al. Reactivity of platelia Aspergillus galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):1989-1992.
 40. Hage CA, Reynolds JM, Durkin M, et al. Plasma lyte as a cause of false-positive results for Aspergillus galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):676-677.
 41. Aisling R, van den Doon R and Rath PM. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997;40(9-10):353-357.
 42. Bijlveas NM, Donnelly JP, Meis JP, et al. Aspergillus galactomannan antigen levels in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl Infect Dis*. 2002;4(2):64-65.
 43. Meenink-Kersten MA, Rugebeek D, Klont RR, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3925-3931.
 44. Kappe R and Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Platelia Aspergillus antigen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*. 1993;31(9):2489-2490.
 45. Dalle F, Charles PE, Blanc X, et al. Cryptococcus neoformans Galactosylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with Aspergillus Galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2929-2931.
 46. Knight F and Mckenzie DW. Aspergillus antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*. 1992;339(8785):188.
 47. Dalle F, Lopez J, Caillot D, et al. False-positive results caused by comon swabs in commercial Aspergillus antigen latex agglutination test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21(2):130-132.
 48. Kwak EJ, Husain S, Ohman A, et al. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):435-438.
 49. Hashiguchi K, Niki Y and Soejima R. Cyclophosphamide induces false-positive results in detection of aspergillus antigen in urine. *Chest*. 1994;105(3):975-976.
 50. Pazzo C, Ponton J and Del Palacio A. Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):299-305.
 51. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis*. 2005;41(9):1242-1250.
 52. Brodoefel H, Vogel M, Hebart H, et al. Long-term CT follow-up in 40 non-HIV immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis: kinetics of CT morphology and correlation with clinical findings and outcome. *AJR Am J Roentgenol*. 2006;187(2):404-413.
 53. Boulboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis*. 2002;34(7):939-943.
 54. Klont RR, Meenink-Kersten MA, Rugebeek D, et al. Paradoxical increase in circulating Aspergillus antigen during treatment with caspofungin in a patient with pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2005;43(3):e23-25.
 55. Maertens J, Glasmaicher A, Selleslag D, et al. Evaluation of serum sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for circulating galactomannan during caspofungin therapy: results from the caspofungin invasive aspergillosis study. *Clin Infect Dis*. 2005;41(1):e9-14.
 56. El Suleiby CM, Allison KJ, Knapp KM, et al. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving Aspergillus, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3560-3563.
 57. Klont RR, Meenink-Kersten MA and Verweij PE. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis*. 2004;39(10):1467-1474.
 58. Musler B, Fredricks D, Leisenring W, et al. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5517-5522.
 59. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, et al. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in hematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol*. 2003;121(3):448-457.
 60. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, et al. Aspergillus galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1496-1499.
 61. Kami M, Ogawa S, Kanda Y, et al. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain reaction, latex agglutination test, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol*. 1999;106(2):536-537.
 62. Wheat LJ. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2005;27(8):59-63.
 63. Pfeiffer CD, Fine JP and Saffar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1417-1427.
 64. Maertens J, Theunissen K, Doeren D, et al. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol*. 2006;44 Suppl 173-178.
 65. Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transpl Infect Dis*. 2003;5(4):158-166.





















3.1.1.1. Annex 12

Stemler J., Bruns C., Mellinghoff SC., Alakel N., Akan H., Ananda-Rajah M., Auburger J., Bojko P., Chandrasekar PH., Chayakulkeeree M., Cozzi JA., de Kort EA., Groll AH., Heath CH., Henze L., Jimenez MH., Kanj SS., Khanna N., Koldehoff M., Lee D., Mager A., Marchesi F., Martino-Bufarull R., Nucci M., Oksi J., Pagano L., Phillips B., Prattes J., Pyrpasopoulou A., Rabitsch W., Schalk E., Schmidt-Hieber M., Sidharthan N., Soler-Palacín P., Stern A., Weinbergerová B., El Zakhem A., Cornely OA., Koehler P. Baseline Chest Computed Tomography as Standard of Care in High-Risk Hematology Patients. *J. Fungi*. 2020;6(1):36. doi: 10.3390/jof6010036. ISSN 2309-608X.

IF = 4,621 v roce 2019; MICROBIOLOGY Q1, MYCOLOGY Q1; 4 citace dle WOS či Scopus, bez autocitací

Article

Baseline Chest Computed Tomography as Standard of Care in High-Risk Hematology Patients

Jannik Stemler ^{1,2,3,*} , Caroline Bruns ^{1,2,3}, Sibylle C. Mellinghoff ^{1,2,3}, Nael Alakel ⁴ , Hamdi Akan ⁵, Michelle Ananda-Rajah ⁶ , Jutta Auberger ⁷, Peter Bojko ⁸, Pranatharthi H. Chandrasekar ⁹, Methée Chayakulkeeree ¹⁰ , José A. Cozzi ¹¹ , Elizabeth A. de Kort ¹² , Andreas H. Groll ¹³, Christopher H. Heath ^{14,15,16} , Larissa Henze ¹⁷ , Marcos Hernandez Jimenez ^{18,19}, Souha S. Kanj ²⁰, Nina Khanna ²¹, Michael Koldehoff ²² , Dong-Gun Lee ²³, Alina Mager ²⁴ , Francesco Marchesi ²⁵, Rodrigo Martino-Bufarull ²⁶, Marcio Nucci ²⁷ , Jarmo Oksi ²⁸, Livio Pagano ^{29,30} , Bob Phillips ^{31,32} , Juergen Prattes ³³ , Athina Pyrpasopoulou ³⁴, Werner Rabitsch ³⁵, Enrico Schalk ³⁶ , Martin Schmidt-Hieber ³⁷, Neeraj Sidharthan ³⁸ , Pere Soler-Palacín ³⁹ , Anat Stern ⁴⁰ , Barbora Weinbergerová ⁴¹, Aline El Zakhem ⁴², Oliver A. Cornely ^{1,2,3,43,†}  and Philipp Koehler ^{1,2,†} 

- 1 Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseldorf (CIO ABCD), Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, 50937 Cologne, Germany; caroline.brun@uk-koeln.de (C.B.); sibylle.mellinghoff@uk-koeln.de (S.C.M.); oliver.cornely@uk-koeln.de (O.A.C.); philipp.koehler@uk-koeln.de (P.K.)
- 2 Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany
- 3 German Centre for Infection Research, Partner Site Bonn-Cologne, 50937 Cologne, Germany
- 4 Department of Internal Medicine I, University Hospital of Dresden, 01307 Dresden, Germany; nael.alakel@uniklinikum-dresden.de
- 5 Hematology Clinical Research Unit, Cebeci Hospital, Ankara University Faculty of Medicine, 06100 Ankara, Turkey; hamdiakan@gmail.com
- 6 Dept of Infectious Diseases and General Medical Unit, Alfred Health & Central Clinical School, Monash University, Melbourne 3004, Australia; michelle.ananda-rajah@monash.edu
- 7 Onkologische Schwerpunktpraxis Freilassing, 83395 Freilassing, Germany; auberger@onko-endo.de
- 8 Department of Hematology and Oncology, Red Cross Hospital Munich, 80634 Munich, Germany; peter.bojko@swmbrk.de
- 9 Division of Infectious Diseases, Wayne State University School of Medicine, Karmanos Cancer Center, Detroit, MI 48201, USA; pchandrasekar@med.wayne.edu
- 10 Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand; methee.cha@mahidol.ac.th
- 11 Hematology Department, Hospital Provincial Del Centenario, Rosario 2000, Argentina; joseacozzi@hotmail.com
- 12 Department of Hematology, Radboud University Medical Center, 6500 Nijmegen, The Netherlands; Elizabeth.Dekort@Radboudumc.nl
- 13 Infectious Disease Research Program, Center for Bone Marrow Transplantation and, Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Children's Hospital, 48149 Münster, Germany; grollan@ukmuenster.de
- 14 Department of Microbiology (PathWest Laboratory Medicine, WA, FSH Network), Perth 6000, Australia; chris.heath@health.wa.gov.au
- 15 Depts. of Infectious Diseases, Fiona Stanley Hospital & Royal Perth Hospital, Perth 6000, Australia
- 16 Faculty of Health & Medical Sciences, University of Western Australia, Murdoch/Perth, Murdoch 6150, Australia
- 17 Department of Medicine, Clinic III – Hematology, Oncology, Palliative Medicine, Rostock University Medical Center, 18057 Rostock, Germany; larissa.henze@med.uni-rostock.de
- 18 Head of the bone marrow unit, Hospital City Dr. Enrique Tejera, 2001 Valencia, Venezuela; mhernanj@gmail.com

- 19 Department of Medicine, Facultad de Ciencias de la Salud, University of Carabobo, 2001 Valencia, Venezuela
- 20 Division of Infectious Diseases, Infection Control Program, Antimicrobial Stewardship Program, American University of Beirut Medical Center, Beirut 1107 2020, Lebanon; sk11@aub.edu.lb
- 21 Division of Infection Diseases and Hospital Epidemiology, University and University Hospital of Basel, 4031 Basel, Switzerland; nina.khanna@usb.ch
- 22 Department of Bone Marrow Transplantation, West German Cancer Center, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, 45147 Essen, Germany; michael.koldehoff@uk-essen.de
- 23 Division of infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Catholic Hematology Hospital & Seoul St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 06591 Seoul, Korea; symonlee@catholic.ac.kr
- 24 Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, 50937 Cologne, Germany; Alina.mager@uk-koeln.de
- 25 Hematology and Stem Cell Transplant Unit, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Via Elio Chianesi, 53 00144 Rome, Italy; francesco.marchesi@ifo.gov.it
- 26 Servei d'Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; rmartino@santpau.cat
- 27 Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil; mnucci@hucff.ufrj.br
- 28 Department of Infectious Diseases, Turku University Hospital and University of Turku, 20521 Turku, Finland; Jarmo.Oksi@tyks.fi
- 29 Dipartimento di Diagnostica per Immagini, Radioterapia Oncologica ed Ematologia, Fondazione Policlinico A. Gemelli -IRCCS, 00169 Rome, Italy; Livio.Pagano@unicatt.it
- 30 Sezione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Radiologiche ed Ematologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, 00168 Rome, Italy
- 31 Leeds Children's Hospital, Leeds General Infirmary, Leeds Teaching Hospitals, NHS Trust, Leeds LS1 3EX, UK; bob.phillips@york.ac.uk
- 32 Centre for Reviews and Dissemination, Alcuin College, University of York, York YO10 5DD, UK
- 33 Department of Internal Medicine, Section of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Medical University of Graz, 8036 Graz, Austria; juergen.prattes@medunigraz.at
- 34 Infectious Diseases Unit, Hippokration Hospital, 54642 Thessaloniki, Greece; a.pyrpasopoulou@doctors.org.uk
- 35 Department of Internal Medicine I, Bone Marrow Transplant-Unit, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; werner.rabitsch@meduniwien.ac.at
- 36 Department of Hematology and Oncology, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Medical Center, 39120 Magdeburg, Germany; enrico.schalk@med.ovgu.de
- 37 2. Medizinische Klinik, Carl-Thiem-Klinikum Cottbus, 03048 Cottbus, Germany; m.schmidt_hieber@ctk.de
- 38 Department of Clinical Haematology, Amrita Institute of Medical Sciences, Kochi 682041, India; neerajsidh@gmail.com
- 39 Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit. Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, 08035 Barcelona, Spain; psoler@vhebron.net
- 40 Infectious Diseases institute, Rambam Health Care Campus, 3109601 Haifa, Israel; a_shteren@rambam.health.gov.il
- 41 Department of Internal Medicine–Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, 62500 Brno, Czech Republic; weinbergerova.barbora@fnbrno.cz
- 42 Division of Infectious Diseases, American University of Beirut Medical Center, Beirut 1107 2020, Lebanon; az51@aub.edu.lb
- 43 Clinical Trials Centre Cologne, ZKS Köln, 50935 Cologne, Germany
- * Correspondence: jannik.stemler@uk-koeln.de; Tel.: +49(0)-221-478-32884
- † These authors contributed equally to this work.

Received: 30 January 2020; Accepted: 11 March 2020; Published: 13 March 2020



Abstract: Baseline chest computed tomography (BCT) in high-risk hematology patients allows for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). The distribution of BCT implementation in hematology departments and impact on outcome is unknown. A web-based questionnaire was

designed. International scientific bodies were invited. The estimated numbers of annually treated hematology patients, chest imaging timepoints and techniques, IPA rates, and follow-up imaging were assessed. In total, 142 physicians from 43 countries participated. The specialties included infectious diseases ($n = 69$; 49%), hematology ($n = 68$; 48%), and others ($n = 41$; 29%). BCT was performed in 57% ($n = 54$) of 92 hospitals. Upon the diagnosis of malignancy or admission, 48% and 24% performed BCT, respectively, and X-ray was performed in 48% and 69%, respectively. BCT was more often used in hematopoietic cell transplantation and in relapsed acute leukemia. European centers performed BCT in 59% and non-European centers in 53%. Median estimated IPA rate was 8% and did not differ between BCT (9%; IQR 5–15%) and non-BCT centers (7%; IQR 5–10%) ($p = 0.69$). Follow-up computed tomography (CT) for IPA was performed in 98% ($n = 90$) of centers. In high-risk hematology patients, baseline CT is becoming a standard-of-care. Chest X-ray, while inferior, is still widely used. Randomized, controlled trials are needed to investigate the impact of BCT on patient outcome.

Keywords: invasive aspergillosis; antifungal prophylaxis; infection in hematology

1. Introduction

Invasive aspergillosis (IA) typically affects high-risk hematology patients, in particular those with acute leukemia or the recipients of hematopoietic cell transplantation (HCT) [1]. The incidence of probable or proven IA in these patients ranges from 2%, while on posaconazole prophylaxis to 11.2% without mold-directed prophylaxis [2,3]. The overall and attributable mortality are high reaching up to 42% and 27%, respectively [4,5]. Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is associated with even higher mortality up to 75%, and it has been shown to negatively impact the long-term survival of leukemia patients [6,7].

Early diagnosis and treatment are crucial in the management of IPA to improve patient outcome [8,9]. However, IA is still a frequently missed diagnosis in hematological patients [10]. In patients that were diagnosed with IPA, the serial assessment of pulmonary findings on chest CT has been shown to be superior when compared to galactomannan or lesion counts in survival prediction and combination of these tools seems useful [11].

Baseline chest computed tomography (BCT) in adult high-risk hematology patients has been suggested for the early diagnosis of IPA. Abnormal findings on BCT were found to be an independent risk factor for invasive fungal disease (IFD) [12]. Recent prospective studies in patients that were admitted for intensive chemotherapy or HCT found abnormalities on BCT in 36% ($n = 196$) of patients close to admission time, and 10% met the EORTC/MSG radiographic consensus criteria for IFD [13]. When BCT findings were abnormal, the risk of developing IPA doubled as compared to unremarkable BCT findings [14]. A study that was conducted in Israel found abnormal BCT in 31% ($n = 295$) of patients; of these, 5% were diagnosed with IPA on admission and another 10% subsequently during hospital stay. In the subgroup of patients with de novo acute myeloid leukemia (AML), 55% of IPA were detected by BCT [15]. However, none of this has been the subject of randomized, controlled trials, yet complicating the impact assessment of BCT on mortality and follow-up.

BCT appears to be a useful screening tool for identifying those patients that require treatment for IPA rather than prophylaxis. However, the added value might depend on local epidemiology, exact timing of the CT, specific imaging techniques, and it might differ between patient groups. Since this patient population frequently receives mold-active prophylaxis during remission induction chemotherapy, BCT might help to differentiate primary IPA from breakthrough invasive fungal infection (BT-IFI) [16]. The guidelines do not recommend BCT in this high-risk group [9,17]. Currently, it is unknown how widely BCT has been implemented and what the specifics of BCT use in hematology

departments are. Therefore, we conducted a survey to determine the current BCT practice in hematology departments throughout the world.

2. Materials and Methods

A web-based health services research questionnaire was designed and made accessible via www.clinicalsurveys.net.

Members of the following scientific bodies were invited to participate: Working group on Infections in Hematology and Oncology of the German Society for Hematology and Oncology (AGIHO), Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group (AML CG), Australian and New Zealand Mycoses Interest Group (ANZMIG), European Confederation of Medical Mycology (ECMM), European Hematology Association (EHA)—Study Working Group on Infections in Hematology, European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), FungiScope[®] registry contributors, International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Mycoses Study Group Education and Research Consortium (MSGERC), Epidemiological Surveillance of Infections in Hematological Diseases (SEIFEM), Austrian Society for Hematology and Medical Oncology (OeGHO), and Swiss Society of Hematology (SHG-SSH). The participants were encouraged to respond for their medical center and spread the survey through their personal network.

All of the participants were asked to provide country and institution as an obligatory item, whereas additional personal data, affiliated scientific organizations, and practicing specialty were optional. The participants were encouraged to provide estimated annual numbers of patients that were treated at their hematology center with the following underlying conditions: AML (de novo/relapsed), acute lymphatic leukemia (ALL) (de novo/relapsed), and allogeneic HCT. The estimated rates of IPA in these patient groups were to be provided.

The timepoints and techniques of chest imaging for the respective underlying condition were assessed via a multiple-choice chessboard response form. Timepoints comprised at diagnosis, at staging, at admission, before each chemotherapy course, upon signs and symptoms of respiratory infection, at first fever, after 72–96 h of persistent fever, despite antibacterial treatment. The imaging techniques to be selected were X-ray, computed tomography (CT), or no imaging. All of the indicated timepoints of imaging may overlap. Baseline CT was not explicitly mentioned in order to obtain a non-suggestive assessment.

CT scan specificities, namely contrast-enhanced or non-contrast, low-dose or standard-dose, and evaluation of imaging through other specialties than radiology were assessed. Standard-of-care follow-up CT imaging for diagnosed IPA were to be selected on day 7, 14, 21, 28, or none.

BCT was defined as the performance of a CT scan upon admission or at diagnosis of the above-mentioned underlying conditions according to the two above-mentioned studies [14,15]. These two groups may overlap. For practicability of the survey, “HCT” was listed in diagnoses but also considered as medical history. Double-entries or invalid responses were not considered for statistical analysis. Initially, the findings of BCT were to be assessed. This approach was abandoned due to practical reasons, since even estimated determination of specific radiological findings for IPA is highly complex.

Free text options were provided wherever necessary.

Statistical analysis used SPSS software version 25 (IBM, Chicago, IL, USA). Participants' data entries from categorical variables were summarized employing frequencies and percentages. Median and interquartile range (IQR) were used in the continuous variables. Categorical data were compared while using Chi² test or Fisher's exact test. A *p* value <0.05 was set as being statistically significant.

3. Results

Between July 1st and August 31st 2019, members of the above listed scientific societies entered data into the survey form.

Among 142 participants from 43 countries, 92 entered data for all of the questions. Seventy-nine (55.6%) participated in Europe and sixty-three (44.4%) participated outside Europe. Countries with highest participant numbers were Germany ($n = 32$; 22.5%), Italy, and the United States ($n = 11$; 7.7% each), followed by Brazil and Spain ($n = 6$; 4.2% each) (Table 1 and Figure 1).

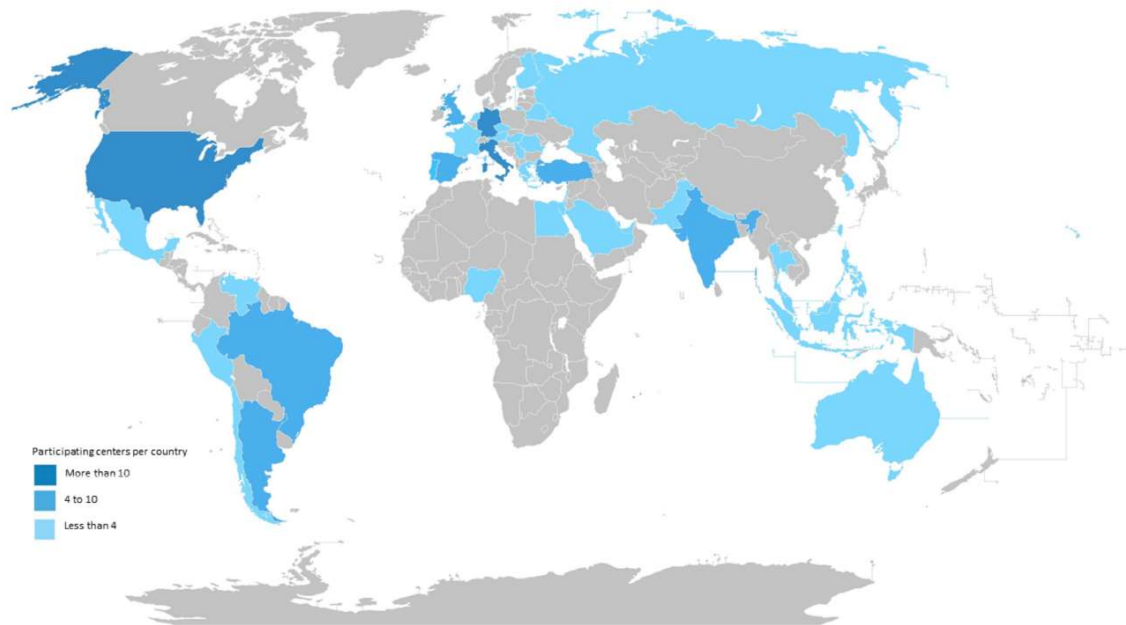


Figure 1. Geographic Distribution of Survey Participants.

Table 1. Participant characteristics.

Country $n = 43$	n	[%]	Continent $n = 142$	n	[%]
Argentina	4	2.8	Europe	79	55.6
Australia	3	2.1	America	31	21.7
Austria	3	2.1	Asia	13	9.1
Belarus	1	0.7	Africa	15	10.5
Brazil	6	4.2	Oceania	4	2.8
Chile	1	0.7	European vs. non-European countries	n	[%]
Czech Republic	2	1.4	Non-European	63	44.4
Egypt	2	1.4	European	79	55.6
Finland	2	1.4	Medical specialty*	n	[%]
France	3	2.1	Infectious Diseases	69	48.6
Germany	32	22.5	Hematology	68	47.9
Hungary	1	0.7	Microbiology	15	10.6
India	4	2.8	Intensive Care	8	5.6
Indonesia	1	0.7	Oncology	6	4.2
Israel	2	1.4	Pediatrics	4	2.8
Italy	11	7.7	other	8	5.6

Table 1. Cont.

Country <i>n</i> = 43	<i>n</i>	[%]	Continent <i>n</i> = 142	<i>n</i>	[%]
Lebanon	2	1.4			
Malaysia	3	2.1			
Mexico	1	0.7			
Nepal	1	0.7			
Netherlands	1	0.7			
Nigeria	1	0.7			
Pakistan	1	0.7			
Peru	3	2.1			
Philippines	1	0.7			
Portugal	1	0.7			
Qatar	1	0.7			
Romania	1	0.7			
Russia	2	1.4			
Saudi Arabia	1	0.7			
Serbia	2	1.4			
Singapore	1	0.7			
Republic of Korea	1	0.7			
Spain	6	4.2			
Switzerland	4	2.8			
Taiwan	2	1.4			
Thailand	1	0.7			
Turkey	5	3.5			
United Arab Emirates	1	0.7			
United Kingdom	5	3.5			
United States of America	11	7.7			
Venezuela	3	2.1			
Overall	142	100			

* numbers are super-additive.

Specialties involved were infectious diseases ($n = 69$; 48.6%), hematology ($n = 68$; 47.9%), microbiology ($n = 15$; 10.6%), intensive care ($n = 8$; 5.6%), oncology ($n = 6$; 4.2%), and pediatrics ($n = 4$; 2.8%) (Table 1).

The estimates of total overall annually treated patient numbers at participating hospitals ($n = 101$ responses) include 5505 AML (3736 de novo; 1769 relapsed), 2641 ALL (1817 de novo; 824 relapsed), and 5287 allogeneic HCT patients. The estimated median numbers of annually treated patients are 40 (IQR 18–70) for AML, 16 (IQR 7–35) for ALL, and 35 (IQR 2.5–75) for HCT (Table 2).

Table 2. Patient numbers treated annually (at participating sites).

<i>n</i> = 101	AML Total	AML de novo	AML Relapsed	ALL Total	ALL de novo	ALL Relapsed	Allogeneic HCT *
Median (IQR)	40 (18–70)	25 (10–50)	10 (5–25)	16 (7–35)	10 (5–20)	5 (2–10)	35 (2.5–75)
(Min–Max)	0–377	0–300	0–150	0–206	0–150	0–60	0–400
Overall annually patient numbers	5505	3736	1769	2641	1817	824	5287

* this group may overlap with others. AML = acute myeloid leukemia; ALL = acute lymphoblastic leukemia; HCT = hematopoietic cell transplantation, IQR = interquartile range.

CT and/or X-ray across all patient groups is performed, as follows (*n* = 95 responses). At disease staging, X-ray is done in 34% (*n* = 32) and CT in 49% (*n* = 47), no imaging in 45% (*n* = 43). Before the beginning of chemotherapy administration, X-ray is performed in 34% (*n* = 32), CT in 18% (*n* = 17) and no imaging in 61% (*n* = 58). Upon initial signs or symptoms of pneumonia, X-ray is carried out in 40% (*n* = 38), CT in 76% (*n* = 72), and no imaging in 3% (*n* = 3). At first fever, X-ray is completed in 48% (*n* = 46) and CT in 20% (*n* = 19), while, at persistent fever, over 72 to 96 h 15% (*n* = 14) and 89% (*n* = 85) do X-ray or CT, respectively. In these two situations, 41% and 8% do not perform any imaging, respectively (Figure 2).

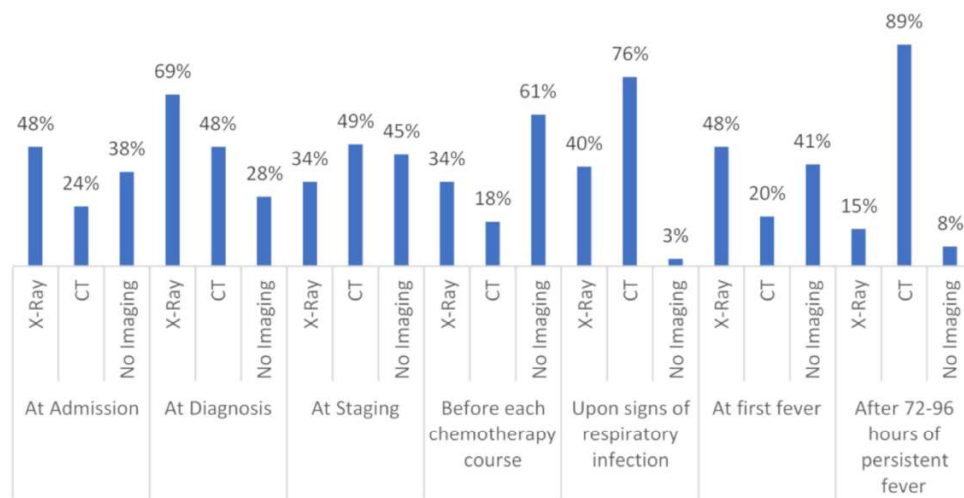


Figure 2. Shows the different timepoints and techniques of chest imaging in high-risk hematology patients in detail; *n* = 95. CT = computed tomography.

At admission or at diagnosis of malignancy, X-ray is performed in 48% and 69% of participating centers, respectively. At the same timepoints, 24% and 48% of centers performed CT, respectively. As per our definition, this qualifies as BCT, which makes a proportion of 56.8% (*n* = 54) of centers performing BCT for any timepoint and condition (*n* = 95). Detailed BCT numbers at admission are 13.7% (*n* = 13) and 14.7% (*n* = 14) for de novo and relapsed AML, respectively, 11.6% (*n* = 11) and 14.7% (*n* = 14) for de novo and relapsed ALL, respectively, and 16.8% (*n* = 16) for HCT. The detailed BCT numbers at diagnosis are 20.0% (*n* = 19) and 25.3% (*n* = 24) for de novo and relapsed AML, respectively, 26.3% (*n* = 25) and 29.5% (*n* = 28) in de novo and relapsed ALL, respectively, and 37.9% (*n* = 36) for HCT. Overall, HCT is the underlying condition that is most frequently triggering BCT (44.2%; *n* = 42) and BCT is more frequently performed in relapsed than in *de novo* acute leukemia (Figure 3). The first implementation of BCT in a center was in 2010. Table S1 displays detailed timepoints, techniques, and numbers of chest imaging with respect to the underlying condition.

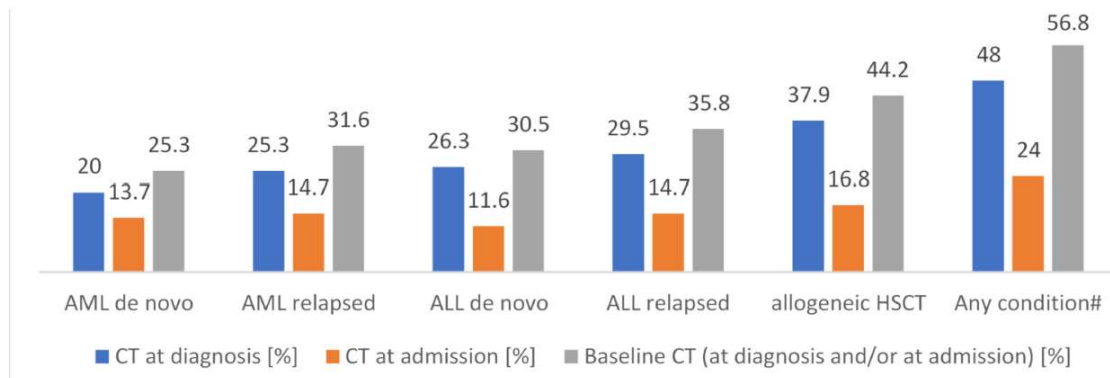


Figure 3. Underlying condition and performance of X-ray or CT at diagnosis or at admission, respectively—defined as Baseline CT; $n = 95$. # Numbers are super-additive. CT = computed tomography; AML = acute myeloid leukemia; ALL = acute lymphoblastic leukemia; HCT = hematopoietic cell transplantation.

CT is contrast-enhanced in 37.6% ($n = 35$) and non-enhanced in 62.4% ($n = 58$). CT is low-dose in 37.6% ($n = 35$) and standard dose in 62.4% ($n = 58$) (total $n = 93$). The BCT scan specificities are 33.3% ($n = 18$) enhanced and 66.7% ($n = 36$) non-enhanced while 61.1% ($n = 33$) are standard-dose and 38.9% ($n = 21$) low-dose. In addition to radiology reports, the participants mostly read CT scans themselves. For BCT centers, this is the case in 87% ($n = 47$) (Table 3).

Table 3. Chest computed tomography (CT) specificities.

		Chest CT Specificities		<i>n</i>	[%]
All centers $n = 93$ *	Chest CT	contrast-enhanced		35	37.6
		not contrast-enhanced		58	62.4
	Doses	Standard-dose CT		58	62.4
		Low-dose CT		35	37.6
	CT assessment #	Yes		79	84.9
		No		14	15.1
Baseline CT centers only $n = 54$	Chest CT	contrast-enhanced		18	33.3
		not contrast-enhanced		36	66.7
	Doses	Standard-dose CT		33	61.1
		Low-dose CT		21	38.9
	CT assessment #	Yes		47	87.0
		No		7	13.0

* total n of response to the respective question; # participants indicated if they evaluate chest imaging themselves despite not being radiologists. CT = computed tomography.

Overall, the median estimated rate of IPA is 8% (IQR 5 to 14%; $n = 94$). In non-BCT performing centers, it is only 7% (IQR 5-10%; $n = 37$), whereas it is 9% (5-15%; $n = 52$) in BCT centers ($p = 0.69$) (Table 4).

Table 4. Median estimated invasive pulmonary aspergillosis (IPA) rates.

<i>n</i>	Participating Centers	IPA Rate, Median (IQR)	<i>p</i> -Value
<i>n</i> = 94 *	Overall participating centers <i>n</i> = 94	8 (5–14)	-
<i>n</i> = 89 *	BCT centers <i>n</i> = 52	9 (5–15)	0.69
	non-BCT centers <i>n</i> = 37	7 (5–10)	
<i>n</i> = 94 *	European centers <i>n</i> = 58	10 (5–15)	0.25
	non-European centers <i>n</i> = 36	8 (5–14)	

*total *n* of valid responses to the respective questions. IPA = invasive pulmonary aspergillosis; BCT = baseline chest computed tomography.

European centers perform BCT in 59.0% (*n* = 36), while non-European centers do so in 52.9% (*n* = 18). The reported estimated IPA rates do not differ between European and non-European centers (medians 10% vs. 8%; *p* = 0.25) (Table 4).

Follow-up CT imaging in the case of IPA diagnosis (*n* = 92) is performed in 97.8%. CT on day 7 after IPA diagnosis is performed in 27.2%, on day 14 in 65.4%, on day 21 in 33.7%, and on day 28 in 28.3% of centers. Other timepoints for follow-up CT were indicated in 14.1% (*n* = 13) (Figure 4).

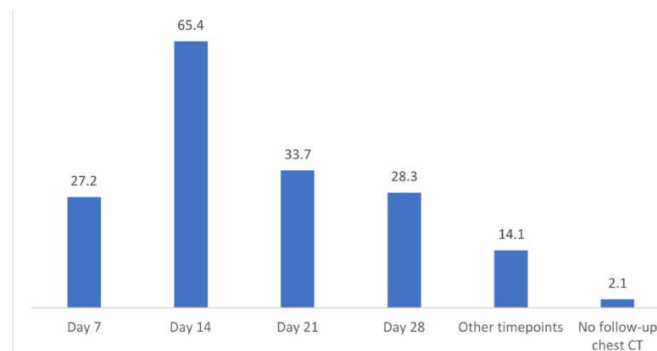


Figure 4. Timepoints and percentages of follow-up CT if IPA was diagnosed in a patient, *n* = 92 valid responses. CT = computed tomography; IPA = invasive pulmonary aspergillosis.

4. Discussion

In this web-based survey study, 142 participants from 43 countries contributed to assessing current chest imaging use in high-risk hematology patients. BCT, defined as chest CT at diagnosis or at admission, is performed in 57% of centers to detect IPA early. The BCT rates in relapsed acute leukemia and in allogeneic HCT recipients are higher than in de novo acute leukemia [18]. As an expected finding, CT is mostly part of diagnostic-driven approaches, in particular in the case of persistent fever or suspected pneumonia, as recommended by guidelines [9,17].

Despite the acknowledged reduced diagnostic accuracy of plain radiography compared with CT for detection of IPA in neutropenic patients, it is still broadly used as a frontline investigation [19,20]. Chest X-ray was the preferred imaging procedure at baseline, although a negative X-ray calls for the more sensitive CT and a positive X-ray demands a standard or low-dose CT for its higher diagnostic specificity [19,20].

Low-dose CT detects and characterizes lung lesions in neutropenic patients early and with equal precision when compared to standard-dose CT [21,22]. Still, the use of standard-dose CT is more

widespread than low-dose CT. When BCT is implemented, one needs to keep in mind that the effective radiation dose of modern techniques is less than that of a conventional standard dose CT [23]. Therefore, introducing low-dose BCT might provide acceptable radiation exposure and allow for early diagnosis of IPA with a lower fungal burden and improved patient outcome [24–26]. This point is particularly important for pediatric cancer patients as most will be long-term survivors. However, pediatric data for BCT is limited [27].

The median estimated IPA rates appeared to be higher with BCT in this survey, a finding that is in line with previous single center studies, but also underlying relatively small sample size and comprising the inherent bias of diagnosing more IPA episodes than without BCT [14,15]. The higher IPA rate suggest BCT as being likely beneficial for early diagnosis, also if asymptomatic. Early CT in hematological patients has been proposed to detect IPA at an early state of disease potentially improving patient outcome [28]. However, early findings on CT frequently do not match EORTC/MSG criteria and can delay diagnosis and subsequently deteriorate disease prognosis [29]. Therefore, in the revised EORTC/MSG radiological criteria, it was decided to include a broader range of radiological findings [13]. These were recently validated, revealing that nearly one-third of IPA patients presented with a consolidation pattern, but without typical nodules on the first CT [30].

Follow-up CT was more frequently indicated on day 14 than on day 7. Reflecting the course of infiltrate size, the aspergillosis EQUAL score recently suggested CT scans on days 7, 14, and then 21 or 28, but that is only practiced in 3% of the studied sites [11,31]. Some past studies did not favor baseline chest imaging due to low yield, although study design and population differed in their analyses [27,32]. To the knowledge of the authors, prospective clinical trials assessing baseline CT findings on patient outcome are lacking.

Our study has its limitations. First, 36% of respondents did not complete all of the questionnaire items. Second, only members of scientific bodies were invited to respond. Finally, frequencies were asked as estimates and may, thus, be imprecise. The widespread lack of in-house surveillance systems might make reported practices and fungal incidence imprecise. Our definition of BCT only comprises timepoints, but does not consider the heterogeneity of patient groups and their individual risk for IPA, such as heavily pre-treated patients that are admitted for HCT. The strengths of the study lie in a worldwide distribution of participants and an extensive analysis of chest imaging policies in high-risk hematology patients.

In conclusion, BCT in high-risk hematology patients has evolved into a standard of care in many centers worldwide, despite the absence of randomized controlled trials (RCTs) evaluating this procedure. However, chest X-ray, as the inferior technique, is still widely used. Low-dose CT techniques are apparently underused. Although much depends on local epidemiology, risk stratification of patients and local resources, centers considering the implementation BCT may find it useful for early diagnosis and the treatment of IPA in high-risk hematology patients.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2309-608X/6/1/36/s1>, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, J.S., O.A.C., and P.K. methodology, J.S., S.C.M., O.A.C. and P.K. software, C.B. validation, J.S. and C.B. formal analysis, J.S. and C.B. investigation, J.S., S.C.M., N.A., H.A., M.A.-R., J.A., P.B., P.H.C., M.C., J.A.C., E.A.d.K., A.H.G., C.H.H., L.H., M.H.J., S.S.K., N.K., M.K., D.-G.L., F.M., R.M.-B., M.N., J.O., L.P., B.P., J.P., A.P., W.R., E.S., M.S.-H., N.S., P.S.-P., A.S., B.W., A.E.Z., O.A.C. and P.K. resources, N.A., H.A., M.A.-R., J.A., P.B., P.H.C., M.C., J.A.C., E.A.d.K., A.H.G., C.H.H., L.H., M.H.J., S.S.K., N.K., M.K., D.-G.L., A.M., F.M., R.M.-B., M.N., J.O., L.P., B.P., J.P., A.P., W.R., E.S., M.S.-H., N.S., P.S.-P., A.S., B.W., A.E.Z., O.A.C. and P.K. data curation, J.S. and C.B. writing—original draft preparation, J.S. writing—review and editing, J.S., C.B., S.C.M., N.A., H.A., M.A.-R., J.A., P.B., P.H.C., M.C., J.A.C., E.A.d.K., A.H.G., C.H.H., L.H., M.H.J., S.S.K., N.K., M.K., D.-G.L., F.M., R.M.-B., M.N., J.O., L.P., B.P., J.P., A.P., W.R., E.S., M.S.-H., N.S., P.S.-P., A.S., B.W., A.E.Z., O.A.C. and P.K. visualization, J.S. and C.B. supervision, O.A.C. and P.K. project administration, J.S., O.A.C. and P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank our valued colleagues for their contribution to the study and for providing a full set of answers to the survey: Samir Agrawal, London, United Kingdom; Veli-Jukka Anttila, Helsinki, Finland; Ronen Ben Ami, Tel Aviv, Israel; Gernot Beutel, Hannover, Germany; Jan Braess, Regensburg, Germany; Alessandro Busca, Torino, Italy; Ana Maria Carneiro, Porto, Portugal; Cardozo Celia, Barcelona, Spain; Simone Cesaro, Verona, Italy; Aristine Cheng, Taipei, Taiwan; Nieves de la Rosa, Lima, Perú; Forrest Graeme, Portland, USA; Justin Hasenkamp, Göttingen, Germany; Holger Hebart, Schwäbisch Gmünd, Germany; Martin Hoffmann, Ludwigshafen, Germany; Ernst Holler, Regensburg, Germany; Maria Ilaria del Principe, Rome, Italy; Sviatlana Kandaurova, Minsk, Belarus; Iman Kholly, Cairo, Egypt; Nikolai Klimko, St. Petersburg, Russia; Karl Anton Kreuzer, Cologne, Germany; Marie-Pierre Ledoux, Strasbourg, France; Gero Massenkeil, Gütersloh, Germany; Grant McQuaker, Glasgow, United Kingdom; Marisa Miceli, Ann Arbor, USA; Hugo Morales, Curitiba, Brazil; Orla Morrissey, Melbourne, Australia; Gianpaolo Nadali, Verona, Italy; Erni Nelwan, Jakarta, Indonesia; Ada Ngwogu, Abuja, Nigeria; Jens Panse, Aachen, Germany; Monica Piedimonte, Rome, Italy; Trabasso Plinio, Campinas, Brazil; Lucia Prezioso, Parma, Italy; Mariella Raijmakers, Santiago de Chile, Chile; Christina Rieger, Munich, Germany; Emmanuel Roilides, Thessaloniki, Greece; Aleksandar Savic, Novi Sad, Serbia; Carlos Seas, Lima, Perú; Galina Solopova, Moscow, Russia; Karsten Spiekermann, Munich, Germany; Nada Suvajdzic-Vukovic, Belgrade, Serbia; Alina Daniela Tanase, Bucharest, Romania; Ozge Turhan, Antalya, Turkey; Lourdes Vazquez, Salamanca, Spain; Maria JGT Vehreschild, Frankfurt, Germany; Michael Weiss, Cologne, Germany; Andreas Widmer, Basel, Switzerland; Lucrecia Yanez, Santander, Spain; Odabasi Zekaver, Istanbul, Turkey; Stefan Zimmerli, Bern, Switzerland. We thank Susann Blossfeld for technical support and assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Steinbach, W.J.; Marr, K.A.; Anaissie, E.J.; Azie, N.; Quan, S.P.; Meier-Kriesche, H.U.; Apewokin, S.; Horn, D.L. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J. Infect.* **2012**, *65*, 453–464. [[CrossRef](#)]
- Cornely, O.A.; Maertens, J.; Winston, D.J.; Perfect, J.; Ullmann, A.J.; Walsh, T.J.; Helfgott, D.; Holowiecki, J.; Stockelberg, D.; Goh, Y.T.; et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 348–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wald, A.; Leisenring, W.; Van Burik, J.A.; Bowden, R.A. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* **1997**, *175*, 1459–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Koehler, P.; Hamprecht, A.; Bader, O.; Bekeredjian-Ding, I.; Buchheidt, D.; Doelken, G.; Elias, J.; Haase, G.; Hahn-Ast, C.; Karthaus, M.; et al. Epidemiology of invasive aspergillosis and azole resistance in patients with acute leukaemia: The SEPIA Study. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49*, 218–223. [[CrossRef](#)]
- Pagano, L.; Caira, M.; Candoni, A.; Offidani, M.; Fianchi, L.; Martino, B.; Pastore, D.; Picardi, M.; Bonini, A.; Chierichini, A.; et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: The SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **2006**, *91*, 1068–1075.
- Pardo, E.; Lemiale, V.; Mokart, D.; Stoclin, A.; Moreau, A.S.; Kerhuel, L.; Calvet, L.; Valade, S.; De Jong, A.; Darmon, M.; et al. Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with hematological malignancies. *Intensive Care Med.* **2019**, *45*, 1732–1741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cattaneo, C.; Gramegna, D.; Malagola, M.; Pagani, C.; Borlenghi, E.; Cerqui, E.; Passi, A.; Sciume, M.; Bernardi, S.; Crippa, C.; et al. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: A still frequent condition with a negative impact on the overall treatment outcome. *Leuk. Lymphoma* **2019**, *60*, 3044–3050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dib, R.W.; Hachem, R.Y.; Chaftari, A.M.; Ghaly, F.; Jiang, Y.; Raad, I. Treating invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy: Diagnostic-driven approach versus empiric therapies. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 656. [[CrossRef](#)]
- Patterson, T.F.; Thompson, G.R.I.I.I.; Denning, D.W.; Fishman, J.A.; Hadley, S.; Herbrecht, R.; Kontoyannis, D.P.; Marr, K.A.; Morrison, V.A.; Nguyen, M.H.; et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, e1–e60. [[CrossRef](#)]
- Lewis, R.E.; Cahyame-Zuniga, L.; Leventakos, K.; Chamilos, G.; Ben-Ami, R.; Tamboli, P.; Tarrand, J.; Bodey, G.P.; Luna, M.; Kontoyannis, D.P. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: A 20-year autopsy study. *Mycoses* **2013**, *56*, 638–645. [[CrossRef](#)]

11. Vehreschild, J.J.; Heussel, C.P.; Groll, A.H.; Vehreschild, M.; Silling, G.; Wurthwein, G.; Brecht, M.; Cornely, O.A. Serial assessment of pulmonary lesion volume by computed tomography allows survival prediction in invasive pulmonary aspergillosis. *Eur. Radiol.* **2017**, *27*, 3275–3282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ceesay, M.M.; Desai, S.R.; Berry, L.; Cleverley, J.; Kibbler, C.C.; Pomplun, S.; Nicholson, A.G.; Douiri, A.; Wade, J.; Smith, M.; et al. A comprehensive diagnostic approach using galactomannan, targeted beta-d-glucan, baseline computerized tomography and biopsy yields a significant burden of invasive fungal disease in at risk haematology patients. *Br. J. Haematol.* **2015**, *168*, 219–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Donnelly, J.P.; Chen, S.C.; Kauffman, C.A.; Steinbach, W.J.; Baddley, J.W.; Verweij, P.E.; Clancy, C.J.; Wingard, J.R.; Lockhart, S.R.; Groll, A.H.; et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
14. Ceesay, M.M.; Desai, S.R.; Cleverley, J.; Berry, L.; Smith, M.; Wade, J.; Mufti, G.J.; Pagliuca, A. Pre-symptomatic (Baseline) computed tomography predicts invasive pulmonary aspergillosis in high-risk adult haemato-oncology patients. *Br. J. Haematol.* **2018**, *182*, 723–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bitterman, R.; Hardak, E.; Raines, M.; Stern, A.; Zuckerman, T.; Ofran, Y.; Lavi, N.; Guralnik, L.; Frisch, A.; Nudelman, O.; et al. Baseline Chest Computed Tomography for Early Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Hemato-oncological Patients—A Prospective Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
16. Cornely, O.A.; Hoenigl, M.; Lass-Flörl, C.; Chen, S.C.; Kontoyiannis, D.P.; Morrissey, C.O.; Thompson, G.R. Defining breakthrough invasive fungal infection-Position paper of the mycoses study group education and research consortium and the European Confederation of Medical Mycology. *Mycoses* **2019**, *62*, 716–729. [[CrossRef](#)]
17. Ullmann, A.J.; Aguado, J.M.; Arikan-Akdagli, S.; Denning, D.W.; Groll, A.H.; Lagrou, K.; Lass-Flörl, C.; Lewis, R.E.; Muñoz, P.; Verweij, P.E.; et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: Executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, e1–e38. [[CrossRef](#)]
18. Kousha, M.; Tadi, R.; Soubani, A.O. Pulmonary aspergillosis: A clinical review. *Eur. Respir. Rev.* **2011**, *20*, 156. [[CrossRef](#)]
19. Ramila, E.; Sureda, A.; Martino, R.; Santamaria, A.; Franquet, T.; Puzo, C.; Montesinos, J.; Perea, G.; Sierra, J. Bronchoscopy guided by high-resolution computed tomography for the diagnosis of pulmonary infections in patients with hematologic malignancies and normal plain chest X-ray. *Haematologica* **2000**, *85*, 961–966.
20. Estacio, O.; Loh, Z.; Baker, A.; Chong, G.; Grigg, A.; Churilov, L.; Hawkes, E.A. Limited utility of routine chest X-ray in initial evaluation of neutropenic fever in patients with haematological diseases undergoing chemotherapy. *Intern. Med. J.* **2018**, *48*, 556–560. [[CrossRef](#)]
21. Kubo, T.; Ohno, Y.; Takenaka, D.; Nishino, M.; Gautam, S.; Sugimura, K.; Kauczor, H.U.; Hatabu, H. Standard-dose vs. low-dose CT protocols in the evaluation of localized lung lesions: Capability for lesion characterization-iLEAD study. *Eur. J. Radiol. Open* **2016**, *3*, 67–73. [[CrossRef](#)]
22. Gerritsen, M.G.; Willeminck, M.J.; Pompe, E.; Van der Bruggen, T.; Van Rhenen, A.; Lammers, J.W.; Wessels, F.; Sprengers, R.W.; De Jong, P.A.; Minnema, M.C. Improving early diagnosis of pulmonary infections in patients with febrile neutropenia using low-dose chest computed tomography. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172256. [[CrossRef](#)]
23. Van der Bruggen-Bogaarts, B.A.H.A.; Broerse, J.J.; Lammers, J.-W.J.; Van Waas, P.F.G.M.; Geleijns, J. Radiation Exposure in Standard and High-Resolution Chest CT Scans. *CHEST* **1995**, *107*, 113–115. [[CrossRef](#)]
24. Cornely, O.A.; Maertens, J.; Bresnik, M.; Ebrahimi, R.; Dellow, E.; Herbrecht, R.; Donnelly, J.P. Efficacy outcomes in a randomised trial of liposomal amphotericin B based on revised EORTC/MSG 2008 definitions of invasive mould disease. *Mycoses* **2011**, *54*, e449–e455. [[CrossRef](#)]
25. Greene, R.E.; Schlam, H.T.; Oestmann, J.W.; Stark, P.; Durand, C.; Lortholary, O.; Wingard, J.R.; Herbrecht, R.; Ribaud, P.; Patterson, T.F.; et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: Clinical significance of the halo sign. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *44*, 373–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Caillot, D.; Casasnovas, O.; Bernard, A.; Couaillier, J.F.; Durand, C.; Cuisenier, B.; Solary, E.; Piard, F.; Petrella, T.; Bonnin, A.; et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Kasow, K.A.; Krueger, J.; Srivastava, D.K.; Li, C.; Barfield, R.; Leung, W.; Horwitz, E.M.; Madden, R.; Woodard, P.; Hussain, I.; et al. Clinical utility of computed tomography screening of chest, abdomen, and sinuses before hematopoietic stem cell transplantation: The St. Jude experience. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **2009**, *15*, 490–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Nucci, M.; Nouer, S.A.; Cappone, D.; Anaissie, E. Early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematologic patients: An opportunity to improve the outcome. *Haematologica* **2013**, *98*, 1657–1660. [[CrossRef](#)]
29. Girmenia, C.; Guerrisi, P.; Frustaci, A.M.; Fama, A.; Finolezzi, E.; Perrone, S.; Gentile, G.; Collerone, F.; Brocchieri, S.; Guerrisi, V. New category of probable invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 990–996. [[CrossRef](#)]
30. Herbrecht, R.; Guffroy, B.; Danion, F.; Venkatasamy, A.; Simand, C.; Ledoux, M.-P. Validation by real-life data of the new radiological criteria of the revised and updated consensus definition for invasive fungal diseases. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [[CrossRef](#)]
31. Cornely, O.A.; Koehler, P.; Arenz, D.; Mellingshoff, S.C. EQUAL Aspergillosis Score 2018: An ECMM score derived from current guidelines to measure QUALity of the clinical management of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* **2018**, *61*, 833–836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. El Boghdadly, Z.; Oran, B.; Jiang, Y.; Rondon, G.; Champlin, R.; Kontoyiannis, D.P. Pretransplant chest computed tomography screening in asymptomatic patients with leukemia and myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transpl.* **2017**, *52*, 476–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.1.1.3. Annex 14

Racil Z., Winterova J., Kouba M., Zak P., Malaskova L., Buresova L., Toskova M., Lengerova M., Kocmanova I., Weinbergerova B., Timilsina S., Rolencova M., Cetkovsky P., Mayer J. Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience. *Mycoses*. 2012;55(6):483-492. ISSN 1439-0507.

IF = 1,278 v roce 2012; MYCOLOGY Q3, DERMATOLOGY Q3; 47 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací



Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience

Zdenek Racil,^{1,7*} Jana Winterova,^{1*} Michal Kouba,² Pavel Zak,³ Ludmila Malaskova,⁴ Lucie Buresova,⁵ Martina Toskova,¹ Martina Lengerova,¹ Iva Kocmanova,⁶ Barbora Weinbergerova,¹ Shira Timilsina,¹ Monika Rolencova,¹ Petr Cetkovsky⁷ and Jiri Mayer^{1,7}

¹Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ²Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic; ³Department of Medicine 2 – Clinical Hematology, Faculty of Medicine, University Hospital and Charles University, Hradec Králové, Czech Republic; ⁴Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ⁵Faculty of Medicine and Science, Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ⁶Department of Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic and ⁷CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Summary

The objective of this retrospective study was to evaluate results from voriconazole therapeutic drug monitoring (TDM) in haematological patients in routine clinical practice. Between 2005 and 2010, 1228 blood samples were obtained from 264 haematological patients (median 3 samples/patient; range 1–27) receiving voriconazole for targeted/preemptive treatment of invasive aspergillosis (IA) (46.3% of samples), empirical therapy (12.9%) or prophylaxis (40.8%). A high-pressure liquid chromatography assay was used to analyse voriconazole concentrations. Clinical and laboratory data were analysed retrospectively. The median of the detected voriconazole plasma concentration was 1.00 µg ml⁻¹ (range <0.20–13.47 µg ml⁻¹). Significant inter- and intra-patients variability of measured concentrations (81.9% and 50.5%) were identified. With the exception of omeprazole administration, there was no relevant relationship between measured voriconazole concentrations and drug dose, route administration, age, gender, CYP2C19*2 genotype, gastrointestinal tract abnormality, administration via nasogastric tube, serum creatinine, and liver enzymes. However, per patient analysis identified significant role of individual voriconazole dose and drug form change on measured plasma concentration. Measured voriconazole concentrations did not correlate with the treatment outcome of patients with IA. We only identified a limited number of adverse events related to voriconazole therapy; however, the median plasma concentration was not different from concentrations measured in samples without reported toxicity. Our retrospective study has suggested that routine monitoring of voriconazole plasma concentrations has probably only a limited role in daily haematological practice.

Key words: Voriconazole, plasma concentration, haematological malignancy.

Correspondence: Z. Racil, MD, PhD, Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic.
Tel.: +420 532233642. Fax: +420 532233603.
E-mail: zracil@fnbrno.cz

*ZR and JW contributed equally.

Submitted for publication 4 December 2011

Revised 5 February 2012

Accepted for publication 8 February 2012

Introduction

Invasive fungal diseases (IFD) are an important cause of morbidity and mortality in patients with haematological diseases.^{1,2} Voriconazole is a broad-spectrum triazole used for the treatment of proven and probable IFD (mainly invasive aspergillosis¹), as well as for prophylaxis of these diseases in high-risk haematological patients.^{4,5}

Some recent studies have suggested a possible relationship between voriconazole plasma concentration and the therapeutic outcome of treated infection^{6–9} as well as drug toxicity.^{6,8} However, it is well-known that several variables may influence the steady-state voriconazole plasma concentration, including modification of bioavailability from food due to the oral formulation, non-linear dose response, hepatic metabolism, genetic polymorphism of cytochrome P450, and drug-drug interactions.^{10–17} Therefore, the clinical setting where voriconazole therapeutic drug monitoring (TDM) should be used, whether it be routinely or situation-based only (e.g. failure of therapy or possible drug related toxicity), is still a matter of debate. Moreover, only one study to date has shown that changing the dose based on a single measurement of plasma concentration led to an increase in the subsequent voriconazole plasma concentration that resulted in an improvement in patient outcome.⁶ Above all, the vast majority of published studies were conducted on a limited number of patients with a limited number of obtained samples per patient.^{6–8,17}

Therefore, in this study, we conducted a large retrospective analysis of patients in three tertiary care hospitals in the Czech Republic to evaluate the role of voriconazole TDM in a real clinical setting. This study aimed to identify clinically important factors that possibly affect measured plasma concentration, and finally to investigate the possible role of the measured voriconazole plasma concentrations on the outcome of patients treated for proven and probable invasive aspergillosis or on the development of reported adverse events associated with administration of this triazole in routine clinical practice.

Methods

All adult patients treated with voriconazole at three tertiary care haematological centres in the Czech Republic (Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno; Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; and Department of Medicine 2 – Clinical Hematology, University Hospital and Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove) between 2005 and 2010, and who had received voriconazole TDM as a part of routine procedures were identified from medical records. The patients' clinical, laboratory, and pharmacy data were retrospectively analysed. Voriconazole TDM was performed at the discretion of the treating physician. In most cases, TDM was used to inform the physician of the achieved voriconazole plasma concentration after the start of

therapy or after a change in voriconazole dose or form. In addition, TDM was performed if there were concerns about failure of therapy or a suspected adverse event. Possible voriconazole dose adjustments were decided by the treating physician and occurred when, based on the literature, voriconazole plasma concentrations were identified as inadequate or high. Clinical condition itself was only exceptionally the reason for voriconazole dose change. The Institutional Review Board of the University Hospital Brno approved this study.

For the analysis of the relationship between voriconazole plasma concentration and outcome of invasive aspergillosis, the European Organization for Research and Treatment Cancer (EORTC/MSG) criteria for the definition of proven and probable invasive aspergillosis (IA)¹⁸ as well as the definition of treatment outcome¹⁹ were used. Adverse events were marked as possibly related to voriconazole in the absence of any other clear explanation (i.e. any other medications with similar side effects or a clinical condition with similar signs and symptoms). For evaluation of hepatic toxicity, liver function tests results from the day of voriconazole plasma level sampling (if not available, the earliest available subsequent liver function test analysis) were used. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0 (http://http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_40) were used for toxicity assessment.

Trough voriconazole plasma concentrations were drawn 15–30 min prior to the next dose of the drug given in 12 h intervals. Time of administration of the last dose of voriconazole and exact time of blood sampling was routinely collected. Thus, samples that did not strictly fulfil mentioned prespecified criteria for trough voriconazole concentration measurement were not included in the analysis. Concentrations were quantified using a standardised high-pressure liquid chromatography assay at each participating centre with the technique previously described.²⁰ For statistical analyses, any results below the limit of detection ($<0.20 \mu\text{g ml}^{-1}$) were marked as 0.

For the analysis of CYP2C19*2 and *3 polymorphisms, retrospectively, collected and stored patients' DNA from routine analyses (e.g. CMV viral load determination) was used. The DNA was extracted from 5 ml of EDTA-anticoagulated peripheral blood using the QIAamp Blood Kit (Qiagen, Germany). In 142 subjects, stored DNA was available and was tested on a one-time basis for CYP2C19*2 (681G>A) (rs4244285) and CYP2C19*3 (636G>A) (rs4986893) using commercial TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) at the end of the study.

For statistical analysis, the software Statistica [Stat-Soft Inc. (2010)], Statistica (data analysis software system, version 9.1, <http://www.statsoft.com>), and R (R Development Core Team, 2009) were used. Proportions were compared with the M-L Chi-square or Fisher exact tests, as appropriate. Continuous variables were compared with the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis ANOVA tests, as appropriate. The relationship between voriconazole plasma levels and another continuous variable was examined using the Spearman correlation coefficient. A two-sided P -value <0.05 was considered statistically significant. Inter- and intra-patient variability was estimated using a coefficient of variation.

Results

Measurements of voriconazole plasma concentration

During the study period, 1228 samples from 264 patients with haematological disease were analysed [mean and median 4.7 and 3 (range 1–27) samples per patient]. Table 1 shows the patient characteristics and indicates the type of voriconazole administration used during the sampling.

The majority (89.0%) of samples were obtained during administration of the oral form of voriconazole, with 400 mg day⁻¹ being the most frequent dose used (69.1% of all samples and 71.2% of samples obtained during oral administration of the drug). The absolute daily doses as well as daily doses per kilogram of patient weight were significantly higher with the administration of the intravenous form of voriconazole ($P < 0.001$; Table 1).

The mean and median of the detected voriconazole plasma concentration were 1.40 and 1.00 µg ml⁻¹ (range 0.20–13.47), respectively. The inter- and intra-patient variability in the measured voriconazole plasma concentrations were 83.7% and 66.5% for all patients, respectively. The values of identical parameters in the homogenous group of patients treated with 400 mg day⁻¹ orally only were 81.9% and 50.5%, respectively.

Voriconazole levels were undetectable (<0.20 µg ml⁻¹) in 10% of analysed samples and <1.00 and 2.00 µg ml⁻¹ in 50% and 76% of all samples, respectively. The voriconazole plasma concentration exceeded 5.00 µg ml⁻¹ (range 5.12–13.47 µg ml⁻¹) in only 38 (3.1%) samples from 26 (9.8%) patients.

Dose- and voriconazole form-concentration relationship

There was no significant correlation between voriconazole daily dose (total as well as per mg kg⁻¹) and measured voriconazole plasma concentrations

($N = 1225$, $r_s = 0.055$, $P = 0.056$ for absolute daily dose and $N = 1080$, $r_s = 0.035$, $P = 0.253$ for daily mg kg⁻¹ dose). Moreover, there was no significant difference between voriconazole plasma concentrations obtained during the administration of oral or intravenous forms of the drug ($P = 0.298$).

Importantly, even a global analysis did not identify any relationship between daily voriconazole dose and measured plasma concentration, the analysis of individual patients results and their change after modification of the daily dosing of the drug found a significant role of individual voriconazole dose changes (absolute daily dose as well as daily dose in mg kg⁻¹) in the change of measured plasma concentration (Fig. 1a and b; $P < 0.001$ for both dosing). Similarly, the global analysis did not find differences in voriconazole concentration between oral and intravenous forms of the drug; however, when the analysis was conducted on a per patient basis, differences in the concentration were observed. When the intravenous form was switched to the oral form of the drug ($N = 21$), the mean daily dose decreased by 0.52 mg kg⁻¹ (SD 2.15) and the mean voriconazole plasma concentration decreased by 0.6 µg ml⁻¹ (SD 1.88). In contrast, when the oral form was switched to the intravenous form of the drug ($N = 14$), the mean daily voriconazole dose increased by 0.14 mg kg⁻¹ (SD 1.85) and the mean voriconazole plasma concentration increased by 0.52 µg ml⁻¹ (SD 1.52).

Factors affecting measured voriconazole plasma concentration

Several factors that possibly affect voriconazole plasma levels were analysed. We found that administration of omeprazole significantly increased the voriconazole plasma concentration ($P = 0.008$). In contrast, gender, the genotype of CYP2C19*2 (wild-type or heterozygote), abnormality of the gastrointestinal tract (defined as mucositis and/or ileus and/or intestinal graft vs. host disease), and administration of voriconazole through a nasogastric tube did not affect the measured voriconazole concentrations (Table 2). Moreover, we identified a significant positive correlation of voriconazole plasma concentration with age, level of serum creatinine, bilirubin, aspartate aminotransferase, and gamma-glutamyl transferase (Table 3). However, these correlations were very weak ($r_s = 0.060$ – 0.234), and therefore although these data are statistically significant, the clinical impact is very limited or minimal (Table 3). Moreover, multivariate analysis using linear regression model

Table 1 Baseline characteristics.

Patients	
No. of patients	264
Age (years) – median (range)	51 (18–77)
Gender – male/female (n, %)	154 (58.3%)/110 (41.7%)
Patient's baseline disease – n (%)	
AML	118 (44.7%)
ALL	30 (11.4%)
NHL	26 (9.8%)
CML	16 (6.1%)
CLL	15 (5.7%)
MM	13 (4.9%)
Other	46 (17.4%)
Patient's CYP2C19 genotype – n (%)	
CYP2C19*2 – wild type/mutated heterozygote/ mutated homozygote	103 (72.5%)/39 (27.5%)/0 ¹
CYP2C19*3 – wild type/mutated heterozygote/ mutated homozygote	87 (100%)/0/0 ²
Samples	
No. of samples	1228
No. of samples per patient – median (range)	3 (1–27)
Days from the start of therapy to sampling – median (range)	26 (1–409) ³
Voriconazole form during sampling	
Oral – N (%)	1093 (89.0%)
Intravenous – N (%)	133 (10.8%)
Not known – N (%)	2 (0.2%)
Voriconazole dose during sampling	
Voriconazole dose (mg day ⁻¹) – median (range):	
All samples (N = 1225)	400 (200–1200) ⁴
Oral form only (N = 1090)	400 (200–1200) ^{5,6}
Intravenous form only (N = 133)	400 (200–800) ^{5,6}
Voriconazole dose (mg kg ⁻¹ day ⁻¹) – median (range):	
All samples (N = 1080)	5.8 (2.2–27.3) ⁷
Oral form only (N = 955)	5.7 (2.2–27.3) ^{5,8}
Intravenous form only (N = 123)	6.7 (2.3–13.3) ^{5,8}
Anticancer therapy during sampling	
Allogeneic HSCT	708 (57.6%)
Induction/reinduction/consolidation therapy of acute leukaemia	284 (23.1%)
Autologous HSCT	70 (5.7%)
Other	118 (9.6%)
None	10 (0.8%)
Indication for voriconazole during sampling	
Therapy of proven IFD	59 (4.8%)
Preemptive therapy of probable or possible IA	510 (41.5%)
Empirical therapy of febrile neutropaenia	158 (12.9%)
Prophylaxis (including secondary prophylaxis)	501 (40.8%)

¹Analysis performed in 142 patients.

²Analysis performed in 87 patients.

³In 8 samples the time period was not known.

⁴In 3 samples the dose of voriconazole was not known.

⁵In 2 samples the form of voriconazole was not known.

⁶During administration of intravenous form of voriconazole the dose (mg day⁻¹) of the drug was significantly higher ($P < 0.001$) (Mann–Whitney test).

⁷In 148 samples, the actual weight of the patient or voriconazole dose was not known.

⁸During administration of intravenous form of voriconazole the dose (mg kg⁻¹ day⁻¹) of the drug was significantly higher ($P < 0.001$) (Mann–Whitney test).

ALL, acute lymphoblastic leukaemia; AML, acute myeloid leukaemia; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CML, chronic myeloid leukaemia; HSCT, haematopoietic stem cell transplantation; IA, invasive aspergillosis; IFD, invasive fungal disease; MM, multiple myeloma; NHL, non-hodgkin lymphoma.

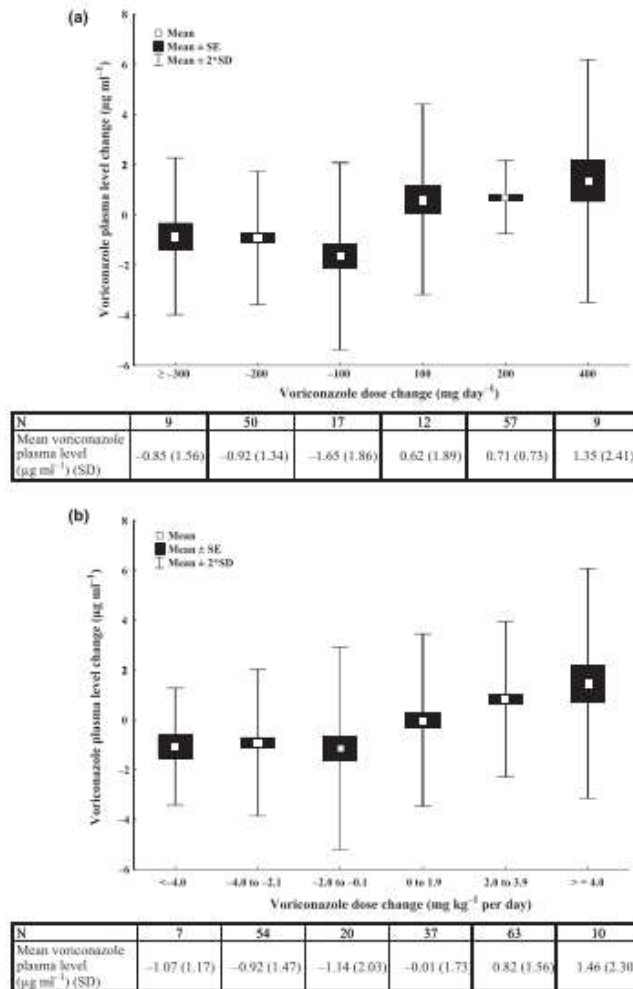


Figure 1 The role of daily voriconazole dose change in mg day^{-1} (a) and $\text{mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (b) on individual voriconazole plasma concentration.

explained only 3.6% variability of measured voriconazole plasma concentrations and thus was not found clinically relevant.

Relationship between measured voriconazole plasma concentration and efficacy

Fifty-three patients with proven ($n = 11$) or probable ($n = 42$) IFDs (all invasive aspergillosis) from our

patient groups were available for analysis of the relationship between measured voriconazole plasma concentration and therapy outcome. The median length of voriconazole therapy in this patient subgroup was 32 days (range 5–160 days) and the median number of voriconazole plasma concentration measurements per case was four (1–27). Thirty-three patients (62%) received combined antifungal therapy with echinocandin, at least during a portion of this time.

Parameter	Measured voriconazole plasma concentration				P
	N	Median ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Range ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	95% IS	
Gender					
male	154 ¹	1.29	<0.2–7.92	1.38–1.81	0.223
female	110 ¹	1.19	<0.2–6.98	1.16–1.59	
Genotype 2C19*2 ²					
wild type	103 ³	1.12	<0.2–6.98	1.16–1.56	0.089
heterozygote	39 ³	1.45	0.29–6.32	1.30–1.99	
Omeprazole administration					
yes	804	1.06	<0.2–13.47	1.39–1.60	0.008
no	424	0.88	<0.2–7.36	1.11–1.34	
Abnormality of GI ⁴					
yes	188 ⁵	0.88	<0.2–5.82	1.05–1.35	0.159
no	905 ⁵	1.05	<0.2–8.98	1.31–1.48	
Administration via nasogastric tube					
yes	40 ⁵	0.84	<0.2–5.21	0.80–1.52	0.311
no	1053 ⁵	1.03	<0.2–8.98	1.29–1.45	

¹Calculated per patient (mean plasma concentration).

²Mutated homozygote of CYP2C19*2 was not identified in our patient population.

³Calculated per patient (mean plasma concentration). In 122 patients, the identification of CYP2C19*2 genotype was not performed.

⁴Defined as presence of mucositis and/or ileus and/or intestinal graft vs. host disease.

⁵Calculated only for samples obtained during administration of oral form of voriconazole. Significant values are given in bold.

Table 2 Relationship between voriconazole plasma concentration and gender, genotype of CYP2C19*2, omeprazole administration, gastrointestinal tract (GIT) abnormality, and administration of voriconazole via a nasogastric tube (Mann-Whitney test).

Table 3 Correlation between voriconazole plasma concentration and age, serum creatinine, total serum protein, albumin, serum bilirubin, liver enzymes, and serum ammonia (Spearman correlation).

Parameter	N	r_s	P
Age ¹	264	0.234	<0.001
Serum creatinine	1158	0.096	0.001
Total serum protein	904	-0.038	0.249
Serum albumin	887	-0.025	0.462
Serum bilirubin	1101	0.060	0.045
Alanine transaminase	1094	0.031	0.300
Aspartate aminotransferase	1094	0.091	0.003
Gamma glutamyl transferase	1089	0.061	0.043
Alkaline phosphatase	1059	0.059	0.054
Serum ammonia	37	0.003	0.987

For evaluation of hepatic toxicity, liver function tests results from the day of voriconazole plasma level sampling (if not available, the earliest available subsequent liver function test analysis) were used.

¹Calculated per patient (mean plasma concentration).

Significant values are given in bold.

There was no significant difference between the voriconazole plasma concentration measured at the end of therapy and the outcome of treated

invasive aspergillosis cases (Table 4). Moreover, paradoxically, patients with better treatment outcomes had significantly lower first measured voriconazole plasma concentration during the therapy, as well as a lower mean of voriconazole plasma concentrations obtained during the entire therapy period (Table 4). This lack of difference between the treatment outcome groups or paradoxically higher measured voriconazole plasma concentrations (first sample, sample at the end of therapy, or mean concentration from all obtained samples during therapy) in patients with therapy failure was also found when the subgroups of patients with and without combined antifungal therapy, or patients with proven and probable aspergillosis only were analysed separately (data not shown).

There was a higher number of voriconazole dose changes in patients with a successful treatment outcome compared with patients with therapy failure, although it did not reach significance (58.8% vs. 33.3%, respectively; $P = 0.128$). However, regardless of a continuous increase in voriconazole dosing during treatment in patients with a successful treatment outcome, the median voriconazole plasma concentration in subsequent measurements revealed similar results in these two patient groups (Table 5).

Table 4 Measured voriconazole plasma concentration in patients according to outcome of therapy of proven/probable invasive aspergillosis.

	Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$) in different groups of patients according to therapy outcome		P
	Success	Failure	
First measured voriconazole plasma concentration			
Median (range) [n]	0.69 (<0.2–3.98) [n = 34]	2.29 (0.28–7.00) [n = 15]	0.003
No. (%) of patients with concentration <1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	19 (55.9%)	3 (20.0%)	0.029
No. (%) of patients with concentration <2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	27 (79.4%)	7 (46.7%)	0.041
Last measured plasma concentration before the end of therapy			
Median (range) [n]	0.99 (<0.2–5.41) [n = 29]	2.07 (<0.2–6.96) [n = 11]	0.280
No. (%) of patients with concentration <1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15 (51.7%)	3 (27.3%)	0.286
No. (%) of patients with concentration <2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	22 (75.9%)	5 (45.5%)	0.128
Mean voriconazole plasma concentration from all obtained samples during the therapy			
Median (range) [n]	1.30 (<0.2–3.21) [n = 37]	1.84 (0.29–6.98) [n = 16]	0.033
No. (%) of patients with concentration <1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15 (40.5%)	2 (12.5%)	0.058
No. (%) of patients with concentration <2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	27 (73.0%)	9 (56.3%)	0.337

Success – defined as complete and partial response; Failure – defined as stable disease, progression, and attributed death to invasive aspergillosis; Number of patients differs according to the availability of voriconazole plasma measurements. Significant values are given in bold.

Table 5 The change of voriconazole dose and measured voriconazole plasma concentration during the therapy of proven/probable invasive aspergillosis according to treatment outcome groups.

	1. sample	2. sample	3. sample	4. sample
Successful outcome at the end of therapy of proven/probable invasive aspergillosis				
No. of analysed patients	34	33	19	12
Voriconazole daily dose (mg day^{-1}) – median (range)	400 (400–600)	400 (200–800)	600 (200–800)	600 (400–800)
Voriconazole plasma concentration – median (range)	0.69 (0–3.98)	0.83 (0–3.67)	1.02 (0–10.28)	1.05 (0–13.47)
No. (%) of patients with concentration <1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	19 (55.9%)	17 (51.5%)	8 (42.1%)	5 (41.7%)
Failure of therapy at the end of treatment of proven/probable invasive aspergillosis				
No. of analysed patients	15	12	6	3
Voriconazole daily dose (mg day^{-1}) – median (range)	400 (400–800)	400 (200–800)	400 (200–400)	400 (300–400)
Voriconazole plasma concentration – median (range)	2.29 (0.28–7.00)	2.11 (0.20–6.96)	1.64 (0–6.62)	–
No. (%) of patients with concentration <1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	3 (20.0%)	1 (8.3%)	3 (50.0%)	2 (66.7%)

Relationship between measured voriconazole plasma concentration and toxicity

Only seven samples were related to possible voriconazole toxicity (neurotoxicity in one case and six episodes of hepatotoxicity) with a median drug serum concentration of $0.92 \mu\text{g ml}^{-1}$ (range <0.20 – $4.52 \mu\text{g ml}^{-1}$). However, this concentration was not substantially different from voriconazole concentrations measured in samples without reported toxicity.

Discussion

This is the largest study published to date that has analysed haematological patients reporting experience with voriconazole TDM in a real-life setting. We con-

firmed previously published studies showing significant inter- and intra-patient variability of measured plasma concentrations.^{6,16} These variabilities were found to reach 80% and 50% in our analysis, respectively, which makes it impossible to predict a measured concentration, not only among different patients treated with the same dosing, but also to predict the next voriconazole plasma level during individual patient treatment. These findings confirm those by Trifillio *et al.* [16] which showed a poor correlation between the initial and subsequently measured voriconazole plasma concentrations.

Our study also confirmed the categorical distribution of results presented in previously published smaller studies.¹³ In 10% of our samples, the drug was under the limit of detection of the assay, and based on data by Pascual *et al.* [6] 50% of the analysed samples would be

associated with a higher likelihood of failure in patients treated for IFD.

Consistent with previous reports,^{6,17} we did not observe a correlation between the daily dose of voriconazole and detected plasma concentrations. Moreover, to date, the influence of the route of voriconazole administration on the measured plasma concentration has not been analysed, with the exception of a small study on healthy volunteers.²¹ Similar to that study,²¹ our study did not find an effect of the voriconazole formulation on the plasma concentration. However, our analysis showed that on an individual patient basis, a switch from the intravenous to oral formulation led to a decrease in the daily dose of voriconazole, which resulted in a decrease in the measured drug plasma concentration, and *vice versa*.

There are number of factors that have been shown in the literature to either have a relationship with or affect the measured voriconazole plasma concentrations, and therefore play a role in drug plasma concentration variability.^{12,17,22-25} The majority of these factors were analysed in this large study presented here. Importantly, we did not find any of these factors to have a clinically significant influence on the measured plasma concentrations. The only exception was with the administration of omeprazole (a competitive inhibitor of CYP2C19¹⁵), that significantly increased the voriconazole plasma concentrations in our study. However, this is in contrast to the study by Wood *et al.*[15] which did not identify this proton pump inhibitor as factor affecting voriconazole pharmacokinetics. Other drugs that possibly interact with voriconazole metabolism were not studied, however, none of the patients analysed here received any known strong CYP450 inducers or inhibitors.¹⁷ Finally, preanalytic variables as the standard sampling time and time of the last voriconazole dose before sampling could lead to variability of measured drug plasma levels.²⁶ However, special attention was paid in our analysis to these variables and all samples that did not fulfil strict prespecified criteria were excluded. Thus, contrary to Miyakis *et al.* [26], only true trough and no random voriconazole plasma concentrations were measured and used for analysis. Similarly, the role of inclusion samples obtained early after the start of therapy in to the analysis could be excluded, because in our study, only 4.2% of samples were obtained before the 5th day of treatment, the day when steady-state voriconazole plasma concentration is achieved. After exclusion of most of these factors, it is very likely that the significant variability in voriconazole plasma concentration was caused by changes in voriconazole distributional vol-

ume or drug clearance,²⁷ which could markedly vary in this population of severely ill, and often septic, haematological patients during the treatment of IFD.

The expected role of voriconazole TDM in daily clinical practice should be used as guidance for antifungal treatment to improve efficacy and minimise toxicity. Smith *et al.* suggested that random concentrations less than 2.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ are related to therapy failure.²⁸ The most cited work by Pascual *et al.*[6] found a higher probability of antifungal treatment failure in patients with random voriconazole concentrations less than 1.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$. However, due to significant intra-patient variability of voriconazole plasma concentrations and the difficulty in predicting the plasma concentration of individual patients,¹⁶ it is unlikely that a single measurement can predict therapy outcome. Therefore, a more clinically relevant observation was described in the study by Miyakis *et al.*, which showed that a median voriconazole concentration less than 2.20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ during therapy was related to therapy failure.

In our study, we did not identify higher initial or terminally measured plasma concentrations or mean of all measured concentrations in patients with a better treatment outcome of invasive aspergillosis. Moreover, the initial single concentration and mean of all analysed concentrations were paradoxically significantly higher in patients with therapy failure. Similarly, the number of patients with a single initial or terminal concentration and mean of measured concentrations less than 1.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (as suggested by Pascual *et al.*) as well as those with concentrations less than <2.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (as suggested by Smith *et al.* and Miyakis *et al.*) were identical or significantly lower in patients with therapy failure (Table 4).

Moreover, when we analysed the number of patients with a dose change during therapy, we again found a higher frequency of changes and increase of voriconazole dose during the therapy in patients with a successful therapy outcome compared with patients with treatment failure. However, in patients with therapy success who received even more frequent increases in the voriconazole dose, the terminally measured voriconazole plasma concentration and the mean voriconazole plasma concentration from the entire treatment period were lower compared with patients who had therapy failure. Moreover, the median voriconazole plasma concentration in subsequent measurements revealed similar results in these two patient groups regardless of continuous increase in voriconazole dosing during the treatment in patients with a successful treatment outcome (Table 5). This may reflect what is seen in common practice, when physicians, influenced by literature data, increase the dose of voriconazole in patients

with good treatment outcome solely based on low measured voriconazole plasma concentrations. In these cases, the dose of voriconazole is not changed in the majority of patients with progression of disease because the analysis shows adequate drug plasma concentration.

It remains clear that treatment response in patients with invasive aspergillosis is largely multifactorial and dependent on many factors,^{2,29} such as baseline disease and activity, the type of immunosuppression, neutrophil counts or increase in counts during the therapy, and others. Therefore, it is unlikely that in real life practice, a single parameter, such as the voriconazole plasma concentration (a parameter that substantially varies during therapy), could significantly influence the treatment outcome.

Neurological^{6,30} and hepatic⁸ adverse events (AEs) related to voriconazole therapy were reported to be associated with high voriconazole plasma concentration exceeding 4.00–6.00 µg ml⁻¹. In our study, we surprisingly found a very low number of AEs that were probably related to voriconazole therapy, and we did not observe substantially different voriconazole plasma concentrations during the AE episode compared with other samples. Moreover, our study found a markedly low number of samples where the measured plasma concentration exceeded 5.00 µg ml⁻¹.

In conclusion, our multicentre study (which although importantly limited by a retrospective design, predominance of orally treated patients, and a relatively small number of patients with proven and probable IFD) was not able to confirm previous findings (which are often based on a limited number of measurements in individual patients) and the measured voriconazole plasma concentrations in our study did not correlate with the treatment outcome of patients with invasive aspergillosis. Thus, voriconazole TDM is most likely only one component, with less impact than expected, in the complex management mosaic of patients with IFD. To determine the definitive role of voriconazole TDM in the management of IFD, a prospective study with two arms is needed, which should include a treatment based only on the clinical condition and a treatment based on voriconazole TDM. Moreover, additional studies that analyse the relationship of voriconazole plasma concentration and its tissue distribution³¹ in patients with IFD could help to better explain this complex issue.

Acknowledgement

This work was supported by CELL – The Czech Leukemia Study Group for Life and by the research grant of the Ministry of Health (IGA NS10442-3/2009

and IGA NS10441-3/2009) of the Czech Republic and the Ministry of Education, Youth, and Sports (MSM6198959223) of the Czech Republic.

Conflict of interest

ZR has served at the speakers' bureau of Pfizer, Astellas Pharma, and has been consultant to Astellas Pharma. All other authors declare no competing financial interests.

References

- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ *et al.* Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 1091–100.
- Pagano L, Caira M, Candoni A *et al.* Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. *Haematologica* 2010; **95**: 644–50.
- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; **347**: 408–15.
- Cordonnier C, Rovira M, Maertens J *et al.* Voriconazole for secondary prophylaxis of invasive fungal infections in allogeneic stem cell transplant recipients: results of the VOSIFI study. *Haematologica* 2010; **95**: 1762–8.
- Torres A, Serrano J, Rojas R *et al.* Voriconazole as primary antifungal prophylaxis in patients with neutropenia after hematopoietic stem cell transplantation or chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2010; **84**: 271–3.
- Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 201–11.
- Miyakis S, van Hal SJ, Ray J, Marriott D. Voriconazole concentrations and outcome of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 927–33.
- Ueda K, Nannya Y, Kumano K *et al.* Monitoring trough concentration of voriconazole is important to ensure successful antifungal therapy and to avoid hepatic damage in patients with hematological disorders. *Int J Hematol* 2009; **89**: 592–9.
- Troke PF, Hockey HP, Hope WW. The clinical efficacy of voriconazole and its relationship to plasma concentrations in patients: an observational study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4782–8.
- Purkins L, Wood N, Kleinermans D, Greenhalgh K, Nichols D. Effect of food on the pharmacokinetics of multiple-dose oral voriconazole. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **56**(Suppl. 1): 17–23.
- Scott LJ, Simpson D. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs* 2007; **67**: 269–98.
- Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet* 2006; **45**: 649–63.
- Trifilio S, Pennick G, Pi J *et al.* Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer* 2007; **109**: 1532–5.

- 14 Pasqualotto AC, Shah M, Wynn R, Denning DW. Voriconazole plasma monitoring. *Arch Dis Child* 2008; **93**: 578–81.
- 15 Wood N, Tan K, Purkins L *et al.* Effect of omeprazole on the steady-state pharmacokinetics of voriconazole. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **56**(Suppl. 1): 56–61.
- 16 Trifilio SM, Yarnold PR, Scheetz MH, Pi J, Pennick G, Mehta J. Serial plasma voriconazole concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1793–6.
- 17 Trifilio S, Ortiz R, Pennick G *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 509–13.
- 18 Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B *et al.* Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 7–14.
- 19 Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA *et al.* Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 2008; **47**: 674–83.
- 20 Pennick GJ, Clark M, Sutton DA, Rinaldi MG. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2348–50.
- 21 Perea JR, Diaz De Rada BS, Quetglas EG, Juarez MJ. Oral versus intravenous therapy in the treatment of systemic mycosis. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**(Suppl. 1): 96–106.
- 22 Lee S, Kim BH, Nam WS *et al.* Effect of CYP2C19 Polymorphism on the Pharmacokinetics of Voriconazole After Single and Multiple Doses in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol* 2012; **52**: 195–203.
- 23 Alvarez-Lerma F, Allepuz-Palau A, García MP *et al.* Impact of intravenous administration of voriconazole in critically ill patients with impaired renal function. *J Chemother* 2008; **20**: 93–100.
- 24 Han K, Capitano B, Bies R *et al.* Bioavailability and population pharmacokinetics of voriconazole in lung transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4424–31.
- 25 Mohammadi I, Piens MA, Padoin C, Robert D. Plasma levels of voriconazole administered via a nasogastric tube to critically ill patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; **24**: 358–60.
- 26 Miyakis S, van Hal SJ, Solvåg CJ, Ray J, Marriott D. Clinician ordering practices for voriconazole therapeutic drug monitoring: experiences of a referral laboratory. *Ther Drug Monit* 2010; **32**: 661–4.
- 27 Han K, Bies R, Johnson H, Capitano B, Venkataramanan R. Population pharmacokinetic evaluation with external validation and Bayesian estimator of voriconazole in liver transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2011; **50**: 201–14.
- 28 Smith J, Salfar N, Knasinski V *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1570–2.
- 29 Baddley JW, Aniles DR, Marr KA *et al.* Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 1559–67.
- 30 Imhof A, Schuer DJ, Schanz U, Schwarz U. Neurological adverse events to voriconazole: evidence for therapeutic drug monitoring. *Swiss Med wklly* 2006; **136**: 739–42.
- 31 Weiler S, Fiegl D, MacFarland R *et al.* Human tissue distribution of voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 925–8.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Distribution of voriconazole (VORI) plasma concentration according to the administered daily dose – mg day⁻¹ (Table A) and mg kg⁻¹ day⁻¹ (Table B).

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

3.4.1.1. Annex 19

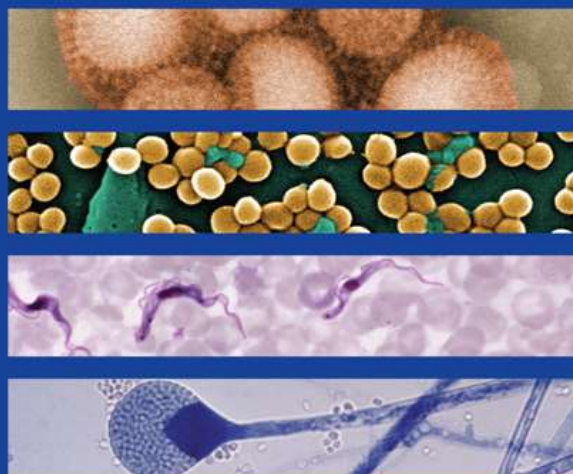
Cruciani M., White PL., Mengoli C., Löffler J., Morton CO., Klingspor L., Buchheidt D., Maertens J., Heinz WJ., Rogers TR., Weinbergerova B., Warris A., Lockhart DEA., Jones B., Cordonnier C., Donnelly JP., Barnes RA., Fungal PCR Initiative. The impact of anti-mould prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 76(3):635-638. doi: 10.1093/jac/dkaa498. ISSN 0305-7453.

IF = 5,790 v roce 2020; INFECTIOUS DISEASES Q1, MICROBIOLOGY Q1, PHARMACOLOGY & PHARMACY Q1; 2 citace dle WOS či Scopus, bez autocitací

Volume 74, Number 2, February 2019 ISSN 0305-7453 (print) ISSN 1460-2091 (online)

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

JAC



academic.oup.com/jac



The British Society for
Antimicrobial Chemotherapy

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

The impact of anti-mould prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis

M. Cruciani¹, P. L. White^{2*}, C. Mengoli³, J. Löffler⁴, C. O. Morton⁵, L. Klingspor⁶, D. Buchheidt⁷, J. Maertens⁸, W. J. Heinz⁹, T. R. Rogers⁹, B. Weinbergerova¹⁰, A. Warris¹¹, D. E. A. Lockhart¹², B. Jones¹³, C. Cordonnier¹⁴, J. P. Donnelly¹⁵ and R. A. Barnes¹⁶ on behalf of the Fungal PCR Initiative†

¹Azienda ULSS 9 Scaligera, Verona, Italy; ²Public Health Wales, Cardiff, UK; ³University of Padua, Padua, Italy; ⁴University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany; ⁵Western Sydney University, Sydney, Australia; ⁶Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; ⁷Heidelberg University, Mannheim, Germany; ⁸Department of Microbiology, Immunology, and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium; ⁹Trinity College Dublin, St James's Hospital Campus, Dublin, Ireland; ¹⁰Department of Internal Medicine – Haematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ¹¹MRC Centre for Medical Mycology, University of Exeter, UK; ¹²University of Aberdeen, Aberdeen, UK; ¹³Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, UK; ¹⁴Hopital Henri Mondor, Creteil, France; ¹⁵University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands; ¹⁶Cardiff University School of Medicine, Cardiff, UK

*Corresponding author. E-mail: lewis.white@wales.nhs.uk
†Members are listed in the Acknowledgements section.

Received 18 September 2020; accepted 29 October 2020

Background: The performance of the galactomannan enzyme immunoassay (GM-EIA) is impaired in patients receiving mould-active antifungal therapy. The impact of mould-active antifungal therapy on *Aspergillus* PCR testing needs to be determined.

Objectives: To determine the influence of anti-mould prophylaxis (AMP) on the performance of PCR blood testing to aid the diagnosis of proven/probable invasive aspergillosis (IA).

Methods: As part of the systematic review and meta-analysis of 22 cohort studies investigating *Aspergillus* PCR blood testing in 2912 patients at risk of IA, subgroup analysis was performed to determine the impact of AMP on the accuracy of *Aspergillus* PCR. The incidence of IA was calculated in patients receiving and not receiving AMP. The impact of two different positivity thresholds (requiring either a single PCR positive test result or ≥ 2 consecutive PCR positive test results) on accuracy was evaluated. Meta-analytical pooling of sensitivity and specificity was performed by logistic mixed-model regression.

Results: In total, 1661 (57%) patients received prophylaxis. The incidence of IA was 14.2%, significantly lower in the prophylaxis group (11%–12%) compared with the non-prophylaxis group (18%–19%) ($P < 0.001$). The use of AMP did not affect sensitivity, but significantly decreased specificity [single PCR positive result threshold: 26% reduction ($P = 0.005$); ≥ 2 consecutive PCR positive results threshold: 12% reduction ($P = 0.019$)].

Conclusions: Contrary to its influence on GM-EIA, AMP significantly decreases *Aspergillus* PCR specificity, without affecting sensitivity, possibly as a consequence of AMP limiting the clinical progression of IA and/or leading to false-negative GM-EIA results, preventing the classification of probable IA using the EORTC/MSGERC definitions.

Introduction

There is convincing evidence showing that both the sensitivity and specificity of the galactomannan enzyme immunoassay (GM-EIA) are impaired in patients receiving mould-active antifungal therapy (AFT).^{1,2} Previous exposure to AFT also needs to be considered when interpreting *Aspergillus* PCR results, as animal studies and clinical trials both indicate that AFT may adversely affect test performance.^{3,4} Recently, a systematic review and meta-analysis investigating *Aspergillus* PCR blood testing to aid the diagnosis of

invasive aspergillosis (IA) in immunocompromised patients was performed.⁵ Most patients had a haematological malignancy, had undergone HSCT or were solid organ transplant (SOT) recipients. The mean prevalence of proven or probable IA was 16.3% (769/4718 patients).⁴ Pooled data showed that PCR has moderate diagnostic accuracy when used as a screening test for IA in high-risk patient groups.⁵ The sensitivity and specificity of PCR for the diagnosis of IA varied according to the interpretative criteria used to define a test as positive. Considering a single positive test result as significant, the sensitivity and specificity were 79.2% and

79.6%, respectively, changing to 59.6% and 95.1% when requiring two consecutive positive results. Diagnostic ORs (DORs), negative predictive values (NPVs) and positive predictive values (PPVs) were 14.8/28.8, 95%/92% and 42/70%, respectively, for a single positive test/two consecutive positive tests.⁴

As part of the systematic review and meta-analysis of cohort studies investigating *Aspergillus* PCR blood testing in patients at risk of IA, subgroup analysis was conducted and included an evaluation of the impact of anti-mould prophylaxis (AMP) on the diagnostic accuracy of *Aspergillus* PCR. This manuscript describes those findings.

Patients and methods

Meta-analytical review

The index tests included PCR testing of blood specimens (whole blood or serum/plasma). Subsequently, methodological heterogeneity was evident, with different DNA extraction methods and PCR methods (e.g. nested, PCR-ELISA, quantitative PCR). Depending on the original date of publication, proven/probable IA was defined using either the original (2002) or the revised (2008) European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group Education and Research Consortium (EORTC/MSGERC) consensus definitions of invasive fungal disease (IFD).^{5,6} At the time of analysis there had been no studies using the recently published second revision of the EORTC/MSGERC consensus definitions; subsequently, *Aspergillus* PCR was not a mycological criterion for defining IA.⁷ Systemic AMP was defined when patients received itraconazole, voriconazole, posaconazole, amphotericin B or caspofungin.

The cumulative incidence of IA was calculated in both patients receiving and not receiving AMP. The impact of two different positivity thresholds (requiring either a single PCR positive test result or ≥ 2 consecutive PCR positive test results) on diagnostic accuracy was evaluated, as the latter threshold is associated with increased specificity. A meta-analytical pooling of sensitivity and specificity was performed by logistic mixed-model regression, where the dependent variable was the positivity of the PCR test and the covariates were 'IA', 'AMP (yes/no)' and 'itraconazole versus other AMP'.⁸ The final comparison was included as the efficacy of itraconazole prophylaxis could be inferior to other AMP. DOR, positive likelihood ratio (LR positive) and negative likelihood ratio (LR negative) were obtained as post-estimation results. PPV and NPV were calculated using the Bayes' rule, as indicated by WHO, using sensitivity, specificity and prevalence data.⁹ For this purpose, the considered incidence was the value calculated for each of the four individual groups, according to positivity threshold and prophylaxis. Logistic mixed-model regression analysis was used over conventional meta-analytical pooling (Table S2, available as [Supplementary data](#) at JAC Online) as it preserves the randomization of each individual study, thereby limiting any confounding bias introduced through simple data pooling.⁸ Calculations were performed with Stata v. 16.0 and Microsoft Excel.

Results

Of the 29 primary studies included in the primary meta-analysis,⁴ 12 used AMP, across the entire population or in subsets of patients, and 17 studies did not use AMP, although 4 of these studies used fluconazole for prophylaxis against certain *Candida* species. The sensitivity/specificity data for *Aspergillus* PCR associated with EORTC/MSGERC-defined IA and the administration of antifungal prophylaxis was available from 22 primary studies (Table S1). Ten studies administered AMP to all patients ($n = 1438$), 10 studies did not administer prophylaxis to any patients ($n = 1027$) and 2 studies differentiated patients receiving ($n = 223$) or not receiving ($n = 224$)

prophylaxis. In total, 1661 patients received prophylaxis and 1251 did not receive prophylaxis.

The overall incidence of IA was 14.2% (95% CI: 13.0–15.5). The incidence of IA was significantly lower in the prophylaxis group compared with the non-prophylaxis group: 11.9% (164/1373, 95% CI: 10.3–13.8) versus 18.7% (216/1156, 95% CI: 16.5–21.0) in studies using a single PCR positivity threshold; and 11.4% (155/1356, 95% CI: 9.8–13.2) versus 18.0% (72/401, 95% CI: 14.5–22.0) in those requiring ≥ 2 consecutive positive test results; the differences were statistically significant ($P < 0.001$), irrespective of the threshold.

The use of AMP had no relevant effect on sensitivity, LR negative and NPV, but decreased specificity, LR positive and PPV (Table 1). When examining data under the criterion of a single positive test result (21 studies; 2529 patients, 1373 receiving prophylaxis and 1156 without prophylaxis) the use of AMP decreased specificity (from 0.86 to 0.60; $P = 0.005$), PPV (from 0.57 to 0.22) and DOR (from 25.7 to 7.60; $P = 0.01$) (Table 1). Requiring ≥ 2 consecutive positive results (12 studies; 1757 patients, 1356 receiving prophylaxis and 401 without prophylaxis), AMP use decreased specificity (from 0.98 to 0.86; $P = 0.019$), PPV (from 0.87 to 0.37) and DOR (from 98.1 to 11.8; $P = 0.02$), but again had no significant impact on sensitivity. Excluding studies with itraconazole prophylaxis did not significantly affect the performance (data not shown).

Discussion

Sensitivity and specificity data were determined in subgroups of patients receiving or not receiving AMP from 22 cohort studies reporting the diagnostic accuracy of PCR testing of blood for the diagnosis of IA in immunocompromised patients. As expected, the cumulative incidence of IA was significantly lower in patients receiving AMP. Prophylaxis significantly decreased the specificity of PCR, irrespective of the interpretative criteria used to define positivity. Conversely, AMP had no significant impact on sensitivity. Likewise, AMP decreased PPV considerably, but had no relevant effect on NPV. A decrease in DOR with both interpretative criteria was observed. One limitation of the study is that the effect of AMP on the PCR performance of assays compliant with Fungal PCR Initiative (FPCRI) methodological recommendations was not evaluated. Given that most studies pre-dated the availability of these recommendations, the number of compliant methods will be limited and subsequent additional analysis will be needed to determine whether optimal methods minimized the effect of AMP.

Data from clinical trials and the systematic review show that mould-active antifungals affect the accuracy of GM-EIA.^{12,10} However, in these studies the effect of anti-mould drugs was heterogeneous, depending on the incidence of breakthrough infections, time of drug administration and positivity threshold used for the GM-EIA test. In one study, AMP had only a minor effect on sensitivity and decreased specificity, but the pre-test probability of IA was very low (1.9%).² By contrast, other observations suggest that receipt of mould-active antifungal drugs decreases sensitivity, without any relevant effect on specificity.^{1,10} This can be explained by antifungal drugs limiting the detectable burden of GM antigen through inhibition of growth and reduction of the *Aspergillus* hyphal load able to shed the antigen, which is only released into the circulation during infection, when the fungus invades the endothelial compartment.¹¹ Indeed, GM is no longer recommended for

Table 1. Effect of AMP on aspergillosis incidence and diagnostic test estimates as determined by logistic mixed-model regression

Parameter	Positivity threshold: 1 positive PCR test		Positivity threshold: ≥ 2 positive PCR tests	
	prophylaxis	no prophylaxis	prophylaxis	no prophylaxis
Incidence, n/N (%)	164/1373 (11.94)	216/1156 (18.68) ^a	155/1356 (11.43)	72/401 (17.96) ^a
Sensitivity (95% CI)	0.83 (0.72–0.91)	0.81 (0.70–0.88)	0.67 (0.51–0.79)	0.70 (0.50–0.84)
Specificity (95% CI)	0.60 (0.43–0.75)	0.86 (0.75–0.92) ^b	0.86 (0.71–0.93)	0.98 (0.91–0.99) ^c
DOR (95% CI)	7.60 (3.77–15.31)	25.69 (13.32–49.54) ^d	11.80 (4.39–31.69)	98.06 (20.79–462.60) ^e
LR positive (95% CI)	2.10 (1.30–2.90)	5.72 (2.64–8.79)	4.62 (1.21–8.02)	30.29 (NE–72.30)
LR negative (95% CI)	0.28 (0.14–0.41)	0.22 (0.12–0.32)	0.39 (0.23–0.56)	0.31 (0.13–0.49)
PPV (95% CI)	0.22 (0.15–0.28)	0.57 (0.38–0.67)	0.37 (0.13–0.51)	0.87 (NE–0.94)
NPV (95% CI)	0.96 (0.95–0.98)	0.95 (0.93–0.97)	0.95 (0.93–0.97)	0.94 (0.90–0.97)

NE, no estimate available. PPVs and NPVs were calculated using the Bayes' rule.

^aDifference in incidence of IA with and without prophylaxis was significant ($P < 0.001$).

^bThe specificity was significantly lower under prophylaxis ($P = 0.005$).

^cThe specificity was significantly lower under prophylaxis ($P = 0.019$).

^dThe DOR was significantly lower under prophylaxis ($P = 0.013$).

^eThe DOR was significantly lower under prophylaxis ($P = 0.022$).

routine blood screening in patients receiving mould-active AFT or prophylaxis.^{12,13}

The effect of AFT on the sensitivity of PCR assays for IA has long been debated. There is some evidence from animal models and clinical trials that mould-active antifungals limit PCR detection, but this effect is not consistent across studies.^{3,14–17} Variation in the antifungal administered, the incidence of IA and the study population will influence the pre-test probability of IA and potential assay performance. Our findings, based on a considerable number of trials and patients, did not show a significant reduction in the sensitivity of *Aspergillus* PCR testing of blood from patients receiving AMP. On the contrary, AMP reduced the proportion of EORTC/MSGERC-defined proven/probable cases of IA and lowered specificity (i.e. increased PCR false positivity).^{5,6} It is possible that active AMP reduces the clinical progression of IA, limiting the manifestations typically associated with IA that are essential when classifying probable IA using the EORTC/MSGERC definitions. Furthermore, given that AMP has been associated with reduced GM-EIA sensitivity, the use of AMP could result in false-negative GM-EIA results preventing cases of possible IA becoming probable IA and compromising PCR specificity. Conversely, the shedding of genomic material into the circulation still occurs during early infection, with the release of DNA (DNAemia) potentially being enhanced by AFT disrupting the fungal cell membrane or wall and detection of this target could define probable IA cases that would be otherwise missed using GM-EIA. Recently, *Aspergillus* PCR has been included in the updated EORTC/MSGERC definitions for IFD, as it provides a robust diagnostic test for screening and confirming the diagnosis of *Aspergillus* infection.⁷ While the use of AMP may limit the diagnostic specificity of a single PCR positive test, the specificity for multiple PCR positive tests (as required in the EORTC/MSGERC definitions) remains excellent and is suitable for confirming a diagnosis of IA. Given the reasons above and that clinical/radiological manifestations typical of overt IFD are required to achieve a classification of probable IA, the presence of *Aspergillus* PCR positivity in this setting will likely continue to provide sufficient mycological specificity. From a clinical perspective, *Aspergillus* PCR of blood is

best used to exclude IA, based on adequate sensitivity, which from this study appears to be unaffected by the use of AMP.

Acknowledgements

This research was presented as a poster at the 9th Trends in Medical Mycology Conference, Nice, France, 11–14 October 2019 (Cruciani et al. Potential impact of anti-mold prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis: an FPCRI systematic review and meta-analysis. Abstract No. P148).

Members of the FPCRI

Authors of this article: C. Mengoli, C. O. Marton, L. Klingspor, D. Buchheidt, J. Maertens, W. J. Heinz, T. R. Rogers, B. Weinbergerova, A. Warris, D. E. A. Lockhart, B. Jones and C. Cordonnier (Aspergillus PCR Clinical-translational working group); and M. Cruciani, P. L. White, J. Löffler, J. P. Donnelly and R. A. Barnes (FPCRI steering committee). For other members of the FPCRI, see www.fpcri.eu.

Funding

This study was conducted as part of our routine work.

Transparency declarations

P.L.W. has performed diagnostic evaluations and received meeting sponsorship from Bruker, Dynamiker and Launch Diagnostics, speaker fees, expert advice fees and meeting sponsorship from Gilead, speaker and expert advice fees from F2G and speaker fees from MSD and Pfizer. P.L.W. is a founding member of the European *Aspergillus* PCR Initiative. J.L. is a founding member of the European *Aspergillus* PCR Initiative and is head of the FPCRI. D.B. has received research grants from Gilead Sciences and Pfizer, served on the speaker bureau of Gilead Sciences, Merck Sharp & Dohme/Merck and Pfizer and received travel grants from Merck Sharp & Dohme/Merck and Pfizer. A.W. is supported by the MRC Centre for Medical Mycology (grant MR/N006364/2) at the University of Exeter and has received research support from Gilead and served at the

speaker bureau of Gilead. T.R.R. has served on the advisory board and at the speaker bureau of Pfizer Healthcare Ireland, Gilead Sciences and Menarini Pharma. J.P.D. has provided consultancy for F2G and Gilead and served at the speaker bureau of Gilead and Pfizer. J.P.D. is a founding member of the European Aspergillus PCR Initiative. R.A.B. is a founding member, treasurer and steering committee member of the FPCRI. M.C., C.M., C.O.M., L.K., J.M., W.J.H., B.W., D.E.A.L., B.J. and C.C.: no conflicts declared.

Supplementary data

Tables S1 and S2 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- Marr KA, Laverdiere M, Gugel A et al. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 1762–9.
- Duarte RF, Sánchez-Ortega I, Cuesta I et al. Serum galactomannan-based early detection of invasive aspergillosis in hematology patients receiving effective antimold prophylaxis. *Clin Infect Dis* 2014; **59**: 1696–702.
- McCulloch E et al. Antifungal treatment affects the laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 2012; **65**: 83–6.
- Cruciani M, Mengoli C, Barnes RA et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; issue **9**: CD009551.
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 7–14.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP 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. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1813–21.
- Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* 2020; **71**: 1367–76.
- Egger M, Davey Smith G, Altman DG. *Systematic Reviews in Health Care. Meta-Analysis in Context*. 2nd edn. BMJ Books, 2001.
- WHO. Screening and diagnostic tests. In: Vaughan JP, Morrow RH (eds). *Manual of Epidemiology for District Health Management*. WHO, 1989.
- Leeftang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; issue **30**: CD007394.
- Hope WW, Kruhlak MJ, Lyman CA et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an *in vitro* model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J Infect Dis* 2007; **195**: 455–66.
- Patterson TF, Thompson GR, Denning DW et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; **63**: e1–60.
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arkan-Akdagli S et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018; **24** Suppl 1: e1–38.
- Reinwald M, Hummel M, Kovalevskaia E et al. Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2260–7.
- Hummel M, Spiess B, Cornely OA et al. *Aspergillus* PCR testing: results from a prospective PCR study within the AmBiload trial. *Eur J Haematol* 2010; **85**: 164–9.
- Armenian SH, Nash KA, Kapoor N et al. Prospective monitoring for invasive aspergillosis using galactomannan and polymerase chain reaction in high risk pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; **31**: 920–6.
- Musher B, Fredricks D, Leisenring W et al. *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5517–22.

3.4.1.2. Annex 20

Hrncirova K., Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Volfova P., Palousova D., Moulis M., Weinbergerova B., Winterova J., Toskova M., Pospisilova S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3392-3394. ISSN 0095-1137.

IF = 4,220 v roce 2020; MICROBIOLOGY Q1; 35 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací

Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples by Use of High-Resolution Melt Analysis[†]

Kristyna Hrnčirova,^{1*} Martina Lengerova,¹ Iva Kocmanova,² Zdenek Racil,³ Pavlina Volfova,¹
Dita Palousova,¹ Mojmir Moulis,⁴ Barbora Weinbergerova,³ Jana Winterova,³
Martina Toskova,³ Sarka Pospisilova,¹ and Jiri Mayer³

Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic¹;
Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic²; Department of
Internal Medicine—Hematology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno,
Czech Republic³; and Department of Pathology, Masaryk University and
University Hospital Brno, Brno, Czech Republic⁴

Received 2 June 2010/Accepted 21 June 2010

We present a method for rapid and simple detection of clinically relevant mucormycetes of the *Mucorales* order in cultures and clinical samples. This seminested real-time PCR uses mucormycete-specific primers and is followed by species identification using high-resolution melt (HRM) analysis. The method is highly suitable for routine clinical diagnostics.

Invasive infections caused by mucormycetes started to occur more frequently in the last decade and are connected with rapid progression and high mortality rates. Early diagnostics and targeted treatment are crucial. Most mucormycosis cases (over 90%) are caused by *Rhizopus* spp., followed by *Mucor* spp., *Lichtheimia* spp., *Rhizomucor pusillus*, and, rarely, some other species (2, 9, 11, 16).

Definitive diagnosis of mucormycosis is usually made after histopathological proof of mucormycete-like hyphae in involved tissue; the causative agent can be determined only by culture (13). So far, no serological test is available and radiological methods are nonspecific.

Molecular detection of mucormycetes is complicated by several factors, and we still do not have any standard protocol. Few methods for the detection of mucormycetes have been published, and only some have been evaluated using clinical samples (1, 5, 10, 14, 15, 17) or samples from animal models (6, 7).

The aim of this study was to develop a rapid and sensitive technique for the detection and identification of clinically important mucormycetes. We adopted primers from a qualitative method previously published by Bialek et al. (1) that is specific for members of the order *Mucorales* targeting 18S ribosomal DNA (rDNA). We modified it to seminested real-time PCR with EvaGreen dye, followed by species distinction by high-resolution melt (HRM) analysis. HRM analysis uses amplification of DNA in the presence of intercalation dye. Fluorescence is measured during a controlled melting of PCR product that results in a melt curve that depends mainly on GC content, length, and sequence of the PCR product. This simple method

can be used for genotyping or mutation scanning without the need for time-consuming sequencing (4, 12).

DNA was isolated from 50 μ l of fungal culture (inoculum was prepared by covering sporulating colonies with approximately 2 ml of sterile 0.85% saline) or a piece of fresh tissue (2 by 1 mm) using the ZR fungal/bacterial DNA kit (Zymo Research). Tissue samples were incubated in lysis buffer overnight, and cultures were immediately processed according to the manufacturer's protocol. Disruption was extended to 15 min (Disruptor Genie; Scientific Industries). DNA from formalin-fixed, paraffin wax-embedded (FFPE) tissue samples was isolated from 2 or 3 scrolls (5 to 10 μ m each) of paraffin block using a DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). Paraffin was dissolved in 1 ml of xylene, and then the tissue was washed two times using 1 ml of 96% ethanol and incubated in 180 μ l of ATL buffer (Qiagen) and 20 μ l of proteinase K (600 mAU/ml solution, where one mAU represents the activity of proteinase K that releases folin-positive amino acids and peptides corresponding to 1 μ mol of tyrosine per min) at 55°C overnight and then at 90°C for 1 h. The next steps were done in accordance with the manufacturer's protocol. DNA isolation from clinical samples was done in a biological safety cabinet. An aliquot of sterile water was processed with each set of samples as a control of potential contamination during the isolation process.

Five microliters of DNA was amplified in 25 μ l of amplification mixture that contained a 0.2 μ M concentration each of primers ZM1 and ZM2 (1), 120 μ M deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; Roche, Germany), 2.5 mM MgCl₂, 1 \times GeneAmp PCR Gold buffer, and 1.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The cycling conditions were 10 min at 95°C, 16 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50°C, and 60 s at 72°C, and 7 min at 72°C. One microliter of PCR product from the external round was then amplified in duplicate using RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Twenty-five microliters of the amplification mixture contained a 0.4 μ M concentration each of primers ZM1 and ZM3 (1), 12.5 μ l of SensiMix HRM, and 1 μ l of EvaGreen (both from a SensiMix HRM kit; Quantace, United Kingdom). The cycling conditions

* Corresponding author. Mailing address: Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine—Hematology, University Hospital Brno, Cernopolni 9, 613 00 Brno, Czech Republic. Phone: 420532234641. Fax: 420532234623. E-mail: khrncirova@fnbrno.cz.

[†] Published ahead of print on 30 June 2010.

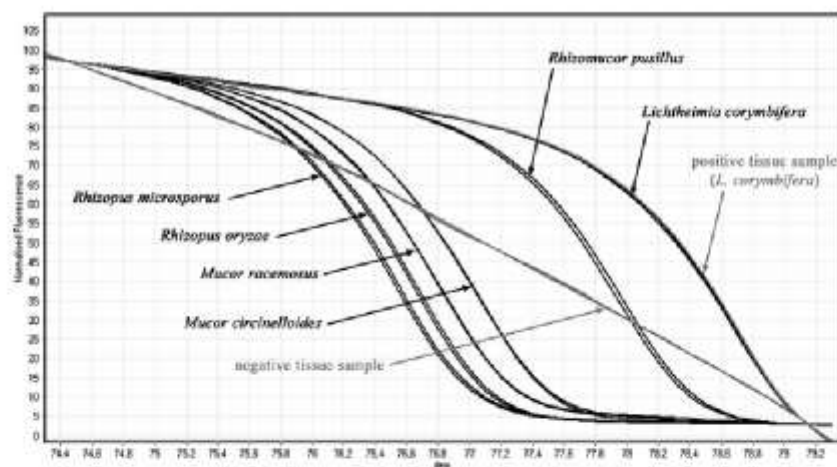


FIG. 1. Representative result of high-resolution melt (HRM) analysis. Shown are HRM curves for six mucormycete isolates (black curves) and one negative and one positive tissue sample (gray curves).

were 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 20 s at 60°C, and 30 s at 72°C (acquired on the green channel), followed by HRM analysis (ramp from 74°C to 79.5°C, rising by 0.1°C each cycle, acquired on the HRM channel). RotorGene 6000 series software (version 1.7) was used for analysis of the results. All positive results were confirmed by sequencing of the PCR product. DNA was purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) and sequenced using a BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using the BLAST alignment program of the GenBank database.

We used DNA extracted from five mucormycete cultures diluted in Tris-EDTA (TE) buffer as positive controls in every run. A DNA isolation control (sterile water processed with clinical samples) and a negative control of PCR (sterile water) were added to each run as well.

In this study, we tested 31 fungal isolates, comprising 10 mucormycete isolates and 21 isolates from other filamentous fungal groups (Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno and Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic). All mucormycete isolates were correctly identified. The melting temperatures (T_m) for each species were as follows: for *Rhizopus microsporus*, 76.46°C; for *Rhizopus oryzae*, 76.59°C; for *Mucor racemosus*, 76.78°C; for *Mucor circinelloides*, 76.98°C; for *Rhizomucor pusillus*, 77.87°C; and for *Lichtheimia corymbifera*, 78.56°C. Representative HRM curves for six different mucormycetes are shown in Fig. 1. All HRM analysis results were confirmed by sequencing. None of the nonmucormycete fungi were positively tested. The results are summarized in Table 1.

We also tested 12 tissue samples, 7 (6 fresh and 1 FFPE) from patients with histopathologically or culture-proven mucormycosis and 5 (3 fresh and 2 FFPE) from patients without

TABLE 1. List of fungal isolates used in this study and results of HRM analysis^a

Organism	Accession no. or source	Result of ergomycete HRM analysis
Mucormycetes		
<i>Rhizopus oryzae</i>	Clinical isolate; DCM CCM 8075	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Rhizopus sp.</i>	Clinical isolate; DCM	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Rhizopus microsporus</i>	Clinical isolate; DCM	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>Rhizomucor pusillus</i>	CCM F-211	<i>Rhizomucor pusillus</i>
<i>Mucor racemosus</i>	CCM 8190	<i>Mucor racemosus</i>
<i>Mucor circinelloides</i>	Clinical isolate; DCM	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	CCM 8077	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
	Clinical isolate; DCM	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
	Clinical isolate; DCM	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
Other filamentous fungi		
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Fusarium proliferatum</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Fusarium solani</i>	CCM 8014	Negative
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Aspergillus niger</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Aspergillus flavus</i>	CCM 8155	Negative
	CCM 8363	Negative
	CCM F-171	Negative
<i>Aspergillus terreus</i>	CCM 8082	Negative
<i>Aspergillus umii</i>	CCM F-414	Negative
<i>Aspergillus nidulans</i> (mutant)	CCM F-266	Negative
<i>Aspergillus sydowii</i>	Environment; DCM	Negative
<i>Neovossia apterosporeum</i>	Clinical isolate; DCM	Negative
<i>Cladophorium rindoporioides</i>	Environment; DCM	Negative
<i>Cladophorium</i> <i>rindoporioides</i> f. sp. <i>psocobae</i>	CCM F-348	Negative
<i>Penicillium commune</i>	CCM F-127	Negative
<i>Penicillium brevicompactum</i>	CCM 8040	Negative
	Environment; DCM	Negative
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Environment; DCM	Negative

^a CCM, Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic; DCM, Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Czech Republic.

TABLE 2. List of tissue samples used in this study and results of HRM analysis

Patient	Tissue sample	Histopathology result	Culture result	HRM analysis result
1	Lung	Positive	Negative	<i>Rhizopus microsporus</i>
2	Lung (FFPE)	Positive	Negative	<i>Rhizomucor pusillus/michei</i>
3	Oral cavity	Positive	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
4	Lung	Positive	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
5	Lung	Positive	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
6	Oral cavity 1	Positive	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
	Oral cavity 2	Positive	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
7	Lung	Negative	Negative	Negative
8	Lung	Negative	Negative	Negative
9	Lung (FFPE)	Negative	Negative	Negative
10	Lung	Negative	Negative	Negative
11	Lung (FFPE)	Negative	Negative	Negative

mucormycosis (obtained from hemato-oncological patients from University Hospital Brno, Czech Republic). All seven tissue samples from patients with proven mucormycosis were PCR positive, and in all cases, we were able to directly determine the mucormycete species: *R. microsporus* ($n = 4$), *L. corymbifera* ($n = 2$), and *R. pusillus/michei* (these two species have 100% sequence homology in the target region and therefore cannot be distinguished; $n = 1$). All five tissue samples from patients without mucormycosis were negative. Results are summarized in Table 2, and representative HRM analysis curves are shown in Fig. 1. Amplification of fragmented DNA from FFPE samples can be problematic (8). In this study, we tested one FFPE tissue from a patient with proven mucormycosis, and the result was positive.

The sensitivity of the method was assessed by amplification of dilutions (2×10^7 to 2×10^0 copies/5 μ l) of plasmid DNA (external PCR products of *R. pusillus* and *L. corymbifera* cloned into the pCR2.1 vector; Invitrogen). Reproducible melt curves were obtained for concentrations up to 0.1 fg of plasmid DNA, the detection limit corresponding to the original qualitative method (1), in both species.

To assess potential PCR inhibition, human albumin gene was detected by real-time PCR (3) in all tissue samples. No inhibition was observed.

In conclusion, the HRM assay presented is very simple and enables rapid and accurate detection and identification of mucormycetes in tissue samples and culture isolates. It is able to distinguish the main clinically relevant mucormycetes and shows no cross-reactivity with nonmucormycete filamentous fungi. It is highly sensitive and specific and is suitable for routine clinical diagnostics. Its potential for use in diagnostics with other clinical materials, such as bronchoalveolar lavage fluid, sputum, etc., needs further study but is evident.

Nucleotide sequence accession numbers. Sequences of products from the internal round of PCR were deposited in GenBank under the following accession numbers: for *Rhizopus microsporus*, HM234125; for *Rhizopus oryzae*, HM234126; for *Mucor racemosus*, HM234127; for *Rhizomucor pusillus*, HM234128; for *Lichtheimia corymbifera*, HM234129; and for *Mucor circinelloides*, HM234130.

This study was supported by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic (NS10442-3/2009 and NS10441-3/2009).

REFERENCES

- Bialek, R., F. Konrad, J. Kern, C. Aepinas, L. Ceenas, G. M. Gonzalez, G. Just-Nubling, B. Willinger, E. Prestrel, C. Lass-Flörl, and V. Rickerts. 2005.

PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* 58:1180-1184.

- Chayakulkeeree, M., M. A. Ghannoum, and J. R. Perfect. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:215-229.
- Chiu, R. W. K., M. F. Murphy, C. Fidler, B. C. Y. Zee, J. S. Waincoat, and Y. M. D. Lu. 2001. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin. Chem.* 47:667-672.
- Erall, M., K. V. Voelkerding, and C. T. Wittwer. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp. Mol. Pathol.* 85:50-58.
- Hata, D. J., S. P. Buckwalter, B. S. Pritt, G. D. Roberts, and N. L. Wengenack. 2008. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. *J. Clin. Microbiol.* 46:2353-2358.
- Ibrahim, A. S., J. C. Bowman, V. Avanesian, K. Brown, B. Spellberg, J. E. Edwards, Jr., and C. M. Douglas. 2005. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3- β -D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:721-727.
- Kasai, M., S. M. Harrington, A. Francesconi, V. Petralloni, R. Petraitis, M. G. Beveridge, T. Knudsen, J. Milanovich, M. P. Cotton, J. Hughes, R. L. Schaufele, T. Sein, J. Bacher, P. R. Murray, D. P. Kontoyannis, and T. J. Walsh. 2008. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 46:3690-3702.
- Lehmann, U., and H. Kreipe. 2001. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* 25:409-418.
- Malani, A. N., and C. A. Kauffman. 2007. Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* 67:1803-1812.
- Nagas, K., T. Ota, A. Tanikawa, Y. Takae, T. Mori, S. Udagawa, and T. Nishikawa. 2005. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rDNA gene. *J. Dermatol. Sci.* 39:23-31.
- Pfaller, M. A., P. G. Pappas, and J. R. Wingard. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* 43:S3-S14.
- Reed, G. H., J. O. Kent, and C. T. Wittwer. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8:597-608.
- Ribes, J. A., C. L. Vanover-Sams, and D. J. Baker. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:236-301.
- Rickerts, V., G. Just-Nubling, F. Konrad, J. Kern, E. Lambrecht, A. Bohme, V. Jacobi, and R. Bialek. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:8-13.
- Rickerts, V., S. Mousset, E. Lambrecht, K. Tintelnot, R. Schwedtfeger, E. Prestrel, V. Jacobi, G. Just-Nubling, and R. Bialek. 2007. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* 44:1078-1083.
- Roden, M. M., T. E. Zsotits, W. L. Buchanan, T. A. Knudsen, T. A. Sarkisova, R. L. Schaufele, M. Sein, T. Sein, C. C. Chiu, J. H. Chu, D. P. Kontoyannis, and T. J. Walsh. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin. Infect. Dis.* 41:634-653.
- Spieß, B., W. Seifarth, M. Hummel, O. Frank, A. Fabarius, C. Zheng, H. Morz, R. Hohlmann, and D. Buchheidt. 2007. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* 45:3743-3753.

3.4.1.3. Annex 21

Lengerova M., Racil Z., Hrcirova K., Kocmanova I., Volfova P., Ricna D., Bejdak P., Moulis M., Pavlovsky Z., Weinbergerova B., Toskova M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):2824-2828. ISSN 0095-1137.

IF = 3,993 v roce 2014; MICROBIOLOGY Q1; 34 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací

Rapid Detection and Identification of Mucormycetes in Bronchoalveolar Lavage Samples from Immunocompromised Patients with Pulmonary Infiltrates by Use of High-Resolution Melt Analysis

Martina Lengerova,^{a,b,c} Zdenek Racil,^{a,b,c} Kristyna Hrcirova,^a Iva Kocmanova,^d Pavlina Volfova,^a Dita Ricna,^a Petr Bejda,^a Mojmir Moulis,^e Zdenek Pavlovsky,^e Barbora Weinbergerova,^a Martina Toskova,^a Jiri Mayer^{a,b,c}

Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic^a; Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic^b; CEITEC—Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic^c; Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic^d; Department of Pathology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic^e

Rapid differential diagnostics of pulmonary infiltrates suspected of invasive fungal disease in an immunocompromised host and early initiation of effective antifungal therapy are crucial for patient outcomes. There are no serological tests available to detect mucormycetes; therefore, PCR-based methods are highly suitable. We validated our previously published PCR followed by high-resolution melt analysis (PCR/HRMA) to detect *Rhizopus* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Lichtheimia corymbifera*, and *Mucor* spp. in bronchoalveolar lavage (BAL) samples from immunocompromised patients who were at risk of invasive fungal disease. All PCR/HRMA-positive samples were retested using novel real-time quantitative PCR (RQ PCR) assays specific to the species identified. In total, between January 2009 and December 2012 we analyzed 99 BAL samples from 86 patients with pulmonary abnormalities using PCR/HRMA. Ninety (91%) BAL samples were negative, and 9 (9%) samples were positive. The sensitivity and specificity of PCR/HRMA were 100% and 93%, respectively. By combining the positive results of PCR/HRMA with positive RQ PCR results, the specificity was raised to 98%. PCR/HRMA, due to its high negative predictive value (99%), represents a fast and reliable tool for routine BAL sample screening for the differential diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients for the four most clinically important mucormycetes.

Invasive mucormycosis (IM), characterized by rapid progression, high morbidity, and mortality, is a serious infectious complication in patients with a hematological malignancy (1). More than 90% of cases are caused by *Rhizopus oryzae* (or *Rhizopus microsporus*), followed by *Mucor* species, *Lichtheimia corymbifera*, and *Rhizomucor pusillus* and rarely by some other mucormycetes (2, 3).

Early diagnosis and a prompt start of targeted IM antifungal therapy are crucial for successful patient outcomes. However, definitive diagnosis of these infections in routine clinical practice is very difficult, and the diagnosis is often not confirmed until there is histological proof of mucormycete-like elements in affected tissues or positive cultures (4, 5).

Contrary to invasive aspergillosis diagnosis, where a large number of attempts were made to detect galactomannan, both in serum and bronchoalveolar lavage (BAL) samples, no such serological test is available for mucormycetes. Even β -D-glucan, when used as a panfungal antigen, is negative in IM.

Therefore, one of the most promising tools for early mucormycete detection is the use of molecular methods, mainly various PCR modifications. Until now, only a limited number of mucormycete-specific PCR methods have been published. Moreover, only some of them allow the quantification of the fungal DNA load in samples (6–10), which can be important to differentiate between a real infection and contamination/colonization of the sample/patient.

We recently introduced a semiquantitative method for the specific detection of mucormycetes in tissue samples using high-resolution melt analysis (HRMA) (11). This method is based on amplification of DNA with specific primers in the presence of an intercalating dye. After PCR, the change in fluorescence is mea-

sured during controlled melting of the PCR product. The shape of the melting curve depends mainly on the GC content, length, and sequence of the PCR product. The ability of this method to detect and identify the most common pathogenic species has been proven in both cultures and tissue samples. Since this technique is very fast and suitable for routine testing, it might be an ideal tool for screening clinical samples from immunocompromised patients who are at risk of IM.

The most frequent manifestation of IM in this patient group is pulmonary disease; however, obtaining lung tissue samples (e.g., by fine-needle biopsy) can be accompanied by serious complications (bleeding and pneumothorax). Therefore, bronchoscopy with BAL is routinely used for the differential diagnosis of pulmonary abnormalities.

The aim of this study was to validate PCR/HRMA for the screening of BAL samples from hematological malignancy patients with pulmonary infiltrates and assess the clinical relevance of mucormycete detection in BAL. Moreover, we designed new species-specific real-time quantitative PCR (RQ PCR) assays for the most clinically relevant mucormycetes (*R. oryzae*, *R. microspo-*

Received 4 March 2014 Returned for modification 16 April 2014

Accepted 15 May 2014

Published ahead of print 21 May 2014

Editor: G. A. Laird

Address correspondence to Martina Lengerova, mlengerova@fnbrno.cz.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00637-14

TABLE 1 Demographic characteristics

Characteristic ^a	No. of patients
Male	50
Female	36
AML	33
CLL	10
ALL	9
HL	3
HCL	3
CML	1
MM	9
NHL	12
Other	6
Allogeneic unrelated HSCT	17
Autologous HSCT	7
Induction/reinduction of acute leukemia	25
Consolidation of acute leukemia	6
Chemotherapy	12
Other therapy	9
No therapy	10

^a AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; HL, Hodgkin's lymphoma; HCL, hairy cell leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; MM, multiple myeloma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

rus, *Mucor* spp., *R. pusillus*, and *L. corymbifera*), which were used to quantify the fungal load in positive samples.

MATERIALS AND METHODS

Mucormycete isolates. Mucormycete isolates were obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM), Czech Republic (*Absidia* [*Lichtheimia*] *corymbifera*, CCM8077; *Mucor racemosus*, CCM8190; *Rhizomucor pusillus*, CCMF-211; and *Rhizopus oryzae*, CCM8075) and culture-positive clinical specimens from the Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Czech Republic (2 *Lichtheimia corymbifera*, 3 *Rhizopus microsporus*, 2 *Rhizopus oryzae*, and 1 *Mucor circinelloides*). Fungal cultures were grown for 5 days, and spores were harvested by scraping the agar surfaces of Petri dishes using a sterile microbiological loop, transferred to 1 ml of 0.9% sodium chloride solution, and stored at -70°C .

Clinical samples. Baseline patient population characteristics are summarized in Table 1. Overall, we tested 99 samples from 86 patients. All patients provided informed consent before the BAL procedure, and the institutional review board approved the study. The samples were processed immediately or stored at -70°C .

Fungal DNA isolation. DNA was isolated from the clinical samples in a biological safety cabinet in a separate laboratory. An aliquot of sterile water was processed with each set of samples as a control for potential contamination during the isolation process. Before the isolation step, samples were thawed for 30 min at room temperature, and DNA was isolated from 50 μl of fungal inoculum or 2 ml of BAL fluid using a ZR fungal/bacterial kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). The sample vortexing time with glass beads was extended from 5 to 15 min, and DNA was eluted with 100 μl of elution buffer as described previously (11).

Detection of the human albumin gene. To verify the DNA isolation process, the human albumin gene was detected in each sample. Quantitative PCR was carried out in a total volume of 25 μl containing 2 \times Absolute QPCR mix (Thermo Scientific, UK), 400 nM each primer, 200 nM TaqMan probe, and 5 μl of genomic DNA. PCR was performed as follows: 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, followed by 50 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s and 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min (12). Samples with negative albumin amplification were excluded from the analysis. All clinical samples were analyzed in duplicate.

PCR/HRMA. PCR amplification was carried out in seminested PCRs followed by HRMA using the protocol described previously (11). Samples

were analyzed in duplicate. DNA extracted from 5 mucormycete strains (*R. microsporus*, *R. oryzae*, *M. racemosus*, *R. pusillus*, and *L. corymbifera*), at a 100 \times dilutions in TE buffer (10 mM Tris-Cl, 0.1 mM disodium EDTA [pH 8]), was used as a positive control in every run. A sample was considered positive if at least one parallel PCR produced a melting curve that was different from that of the negative sample. Rotor-Gene 6000 series software (version 1.7) was used to analyze the results.

RQ PCR assays. We designed new species-specific real-time PCR assays (targeting the internal transcribed spacer 2 [ITS2] region of ribosomal DNA) with Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, USA). The sequences of primers and probes, the sequences used as a template, and the lengths of the PCR products are summarized in Table 2. Due to the intraspecies sequence variability among *Lichtheimia* isolates, it was necessary to design two different assays. Five microliters of isolated DNA was amplified in duplicate in 25 μl of amplification mixture that contained 12.5 μl of 2 \times Absolute QPCR ROX mix (Thermo Scientific, UK), 400 nM primers, and a 200 nM TaqMan MGB probe (for the list of primers and probes used for each assay, see Table 2). Cycling conditions were 15 min at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 50 cycles (15 s at 95 $^{\circ}\text{C}$ and 60 s at 60 $^{\circ}\text{C}$, with acquisition on the green and yellow channels) on the Rotor-Gene 6000. *Mucor* and *Rhizomucor* assays were run as multiplex PCRs. Sterile water (B. Braun, Germany) was used as a no-template control (NTC) in each run. Rotor-Gene 6000 series software (version 1.7) was used to analyze the results. Quantification was done using a standard curve; 5 μl of PCR product was cloned into plasmid vector pCR 2.1 (Invitrogen, USA) in 10 \times dilutions from 2 \times 10⁶ to 2 \times 10⁹ copies of plasmid DNA/5 μl .

Statistical analysis. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and positive and negative likelihood ratios were calculated using MedCalc for Windows (online version 12.7.0; MedCalc Software, Ostend, Belgium [http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php]). The criteria for a positive test were PCR/HRMA positive only or both PCR/HRMA and RQ PCR positive.

RESULTS

We adopted a previously published nested PCR (6) that is targeted to a conservative part of the mucormycete genome and replaced sequencing of the PCR product, which was necessary for species identification using HRMA. As we described in our previous study (11), each of the mucormycete species produces a unique curve shape, and PCR products melt at defined temperatures. Representative results of mucormycete-positive and -negative BAL samples are presented in Fig. 1.

In vitro standardization. The sensitivity of PCR/HRMA and individual RQ PCR assays was tested on serially diluted genomic DNA isolated from mucormycete cultures. The last dilution detected using both PCR/HRMA and RQ PCR contained 1 fg of genomic DNA (<1 genome). The linear dynamic range of the RQ PCR assays was initially assessed using a dilution series of genomic DNA of all species. The assays were shown to be linear over the entire range of 1 ng/ μl to 1 fg/ μl .

Testing clinical samples. In this study, we analyzed 99 BAL samples from 86 patients using PCR/HRMA. Ninety BAL samples were negative; 9 samples were positive (Table 3). None of the samples presented inhibition, and negative controls were never amplified. Species detected using PCR/HRMA were *Rhizopus* spp. (6 samples), *Rhizomucor pusillus* (2 samples), and *Lichtheimia corymbifera* (1 sample). This is in agreement with previously published data, because *Rhizopus* spp. are considered to be the most frequent causes of IM.

Two BAL samples (belonging to two patients with proven IM) were clearly positive (the melting curve was a copy of the one from the positive control, and all parallel reactions were positive). The other 7 samples were marked as weakly positive (the melting curve

TABLE 2 Sequences of primers and TaqMan MGB probes (5' to 3') of assays used in this study

Target species	Primers and probe	Sequence (5' → 3')	Query sequence (GenBank accession no.)	PCR product length (bp)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Forward primer Reverse primer MGB ^a probe	TTCGTGAATCATCGAGTCITTGA AGCAAGCGTACTCTATAGAAGATCCA 6-FAM-CGCAGCTTGCACTCT-MGBNFQ ^b	DQ119010.1	66
<i>Rhizopus oryzae</i>	Forward primer reverse primer MGB probe	AGCAAAGTGGGATAACTAGTGTGAA TGAAGCAGGCGTACTCTATAGAAAAA 6-FAM-CGCAGCTTGCACTCT-MGBNFQ	DQ119031.1	102
<i>Mucor</i> spp.	Forward primer Reverse primer MGB probe	GCAACTTGGCGTCATTGGTA GGATAGAGGGTTGTGTTGATACTGAA 6-FAM-CCAATGAGCACGCCTG-MGBNFQ	DQ118996.1	66
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Forward primer Reverse primer MGB probe	CCGTTCAAGCTACCCGAACA AATGCAAGCCCTCAAGGAAA 6-VIC-TTTGTATGTTGTGACCCITG-MGBNFQ	DQ119000.1	65
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (assay 1)	Forward primer 1 Reverse primer 1 MGB probe 1	TTCAGTTGCTGTCATGGCCTTA CATCCGGCAAATGACTAAAGC 6-FAM-ATACATTIAGTCTAGGCAATT-MGBNFQ	FJ713084.1	67
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (assay 2)	Forward primer 2 Reverse primer 2 MGB probe 2	GTTGAGTTGGAACCTGGGCTTCT AGGACATTGATTTAAGGCCATGA 6-FAM-TTGATGGCATTIAGTTGCT-MGBNFQ	DQ118983.1	67

^a MGB, minor-groove binder.

^b 6-FAM, 6-carboxyfluorescein; MGBNFQ, minor-groove binder nonfluorescent quencher.

was present but diverted slightly from the positive control, and/or amplification was not present in all parallel reactions from the same sample).

Retrospective analysis of medical records was performed, and these cases were not classified as IM, but 2 were classified as pos-

sible invasive fungal disease (IFD) according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group [EORTC/MSG] criteria (13), 4 as other infections (3 as bacterial pneumonia and 1 as *Pneumocystis pneumonia* [PCP]), and 1 as a noninfectious process. Most cases of false positivity of

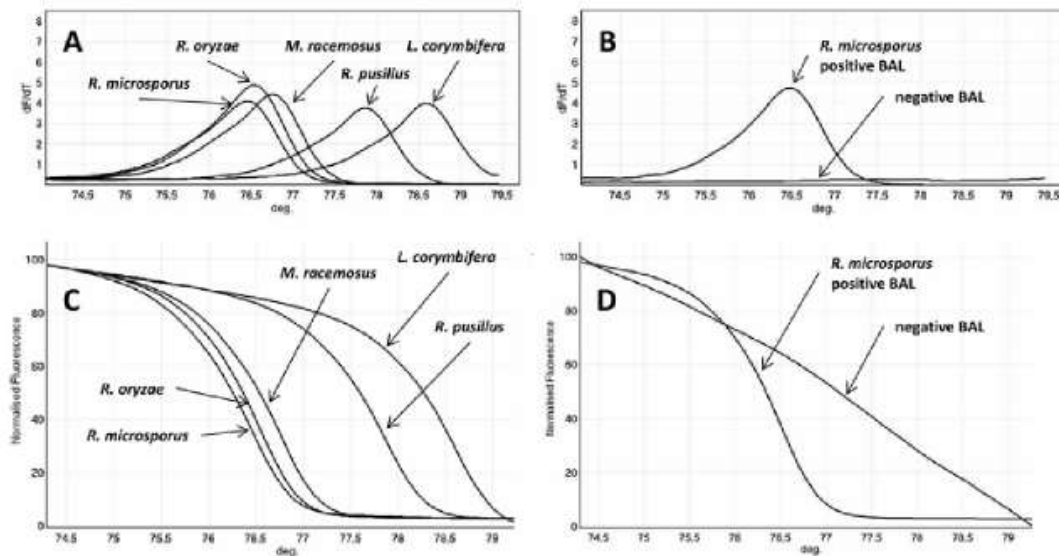


FIG 1 Representative results for HRMA: melting curves of 5 mucormycete isolates (A and C) and positive/negative BAL samples (B and D).

TABLE 3 Summary of cases with positive PCR/HRMA

Patient no.	Date (day-mo-yr)	Underlying disease ^a	Therapy ^b	Results of PCR/HRMA	Species detected by PCR/HRMA	Results of RQ PCR ^c	C _T ^d	Clinical diagnosis ^e
1	29-3-2011	AML	Induction/reinduction	Weakly positive	<i>Rhizopus</i> spp.	Negative	NA	Bacterial pneumonia
2	28-3-2012	MM	Autologous HSCT	Weakly positive	<i>Rhizopus</i> spp.	Negative	NA	Possible IFD
3	23-6-2009	HL	CHT	Weakly positive	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Positive	38.2	Bacterial pneumonia
4	30-4-2012	NHL	No therapy	Weakly positive	<i>Rhizopus</i> spp.	Negative	NA	Bacterial pneumonia
5	19-3-2009	AML	Consolidation	Weakly positive	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Negative	NA	Possible IFD
6	20-2-2009	ALL	Induction/reinduction	Positive	<i>Rhizopus</i> spp.	Positive	24.9	Proven mucormycosis
7	5-1-2009	HCL	Other	Weakly positive	<i>Rhizopus</i> spp.	Negative	NA	Pulmonary fibrosis
8	7-10-2009	NHL	CHT	Weakly positive	<i>Rhizopus</i> spp.	Positive	34.1	PCP
9	25-4-2012	HCL	CHT	Positive	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Positive	31.6	Proven mucormycosis

^a AML, acute myeloid leukemia; MM, multiple myeloma; HL, Hodgkin's lymphoma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; ALL, acute lymphoblastic leukemia; HCL, hairy cell leukemia.

^b HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; CHT, chemotherapy.

^c RQ PCR, real-time quantitative PCR.

^d C_T, cycle threshold; NA, not applicable.

^e IFD, invasive fungal disease; PCP, *Pneumocystis pneumonia*.

the PCR/HRMA test were thus associated with other ongoing infections. Patients with possible IFD did not respond to the initial treatment with antibiotics; therefore, antimycotic drugs (1 patient treated with micafungin [Mycamine] and 1 with amphotericin B) were empirically added, and the patients recovered. The patients classified as having bacterial pneumonia received only antibiotic therapy according to culture findings and recovered. PCP pneumonia was treated successfully with high-dose trimethoprim-sulfamethoxazole.

All PCR/HRMA-positive samples were retested using real-time PCR specific to the species identified; 2/2 (100%) samples from patients with proven IM were positive, and only 2/7 (29%) samples from patients without proven IM were also positive with RQ PCR.

Results for basic statistical parameters were calculated and are presented in Table 4. The two methods showed excellent sensitivity, specificity, and negative predictive value. The combination of PCR/HRMA with species-specific RQ PCR raised the specificity to 98%.

DISCUSSION

The differential diagnosis of fungal pulmonary infections remains challenging, although the early initiation of effective treatment clearly impacts patient outcomes (14). Millon et al. (15) recently published a strategy based on monitoring the mucormycete DNA in serum samples from patients with histopathologically proven IM. Testing serum samples is very convenient, but due to the low

amount of circulating fungal DNA, the positivity of serum samples can be expected only in advanced stages of the disease.

In this study, we evaluated the use of PCR/HRMA to screen BAL samples in which higher loads of the pathogen might be expected. In general, the use of PCR/HRMA was significantly simpler, and the diagnostic results were obtained faster than with the original protocol that consisted of nested PCR and sequencing. We can obtain the results in about 5 h from sample receipt at the laboratory, including the time necessary for DNA isolation.

Our PCR/HRMA showed an excellent NPV (100%). Therefore, a negative test result can virtually rule out an IM diagnosis, and empirically used amphotericin B therapy might be switched to less toxic drugs.

Overall, only 9/99 (9%) BAL samples in our study were PCR/HRMA positive, making it a very useful screening test for testing these nonsterile clinical samples. If patients were treated for IM based on PCR/HRMA positivity, in 4 patients (proven IM or possible IFD), the treatment would be correct, and in only 5/99 (5%) patients (without IFD) would it lead to possible overtreatment. Taking into consideration the lack of a specific diagnostic method and the risk of rapid progression and high mortality due to IM, preemptive treatment based on our results is more than clinically acceptable.

Moreover, the quantification of fungal load with species-specific RQ PCRs is supposed to distinguish contamination or colonization of the airways from an ongoing infection. In this study, RQ PCR increased the specificity and positive predictive value. The discrepancy between PCR/HRMA and RQ PCR results giving low positive samples can be explained by the very low amount of fungal DNA present at the detection limits of both assays, which could be identified with a higher probability with a seminested PCR/HRMA than with a single-round RQ PCR. Moreover, in low positive samples, the primers used in this study coamplify human DNA (present in excess), and this causes distortion of the melting curve (proved by sequencing; data not shown). We suppose that after testing a larger cohort of patients with more IM cases, we will be able to set a threshold (threshold cycle [C_T] value) coupled with IM, which would further increase the positive predictive value.

The main limitation of our study is the low prevalence of the disease (<2.5%) in our cohort; however, this is the limitation of all single-center studies focusing on differential diagnosis of pul-

TABLE 4 Sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the tests using various parameters^a

Measure	% (95% CI ^b) of samples PCR/HRMA positive only	% (95% CI) of samples PCR/HRMA and RQ PCR positive
Sensitivity	100 (19.29–100.00)	100 (19.29–100)
Specificity	93 (85.69–97.04)	98 (92.73–99.69)
PPV	22 (3.47–59.94)	50 (8.30–91.7)
NPV	100 (95.94–100)	100 (96.15–100)
Positive likelihood ratio	13.86 (6.79–28.29)	48.5 (12.3–191.16)
Negative likelihood ratio	0 (NA)	0 (NA)

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

^b CI, confidence interval; NA, not applicable.

monary infections in hematological malignancy patients. The utility of the methods to diagnose IM should be tested on a larger panel of clinical samples or probably more likely on an animal model of IM.

In conclusion, we suggest that PCR/HRMA is a fast and reliable tool for routine screening of BAL samples for the differential diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients. Specific real-time PCR assays might be used to confirm positive results, to quantify the fungal load, or to monitor the response to therapy in patients with proven or probable IM.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of research organization (FNBr grant 65269705) and project CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

REFERENCES

- Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. 2011. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(suppl 1):i5–i14. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq437>.
- Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:215–229. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0107-1>.
- Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* 43:S3–S14. <http://dx.doi.org/10.1086/504490>.
- Lass-Flörl C. 2009. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(suppl 5):S60–S65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02999.x>.
- Pagano L, Offidani M, Fianchi L, Nosari A, Candoni A, Piccardi M, Corvatta L, D'Antonio D, Girmenia C, Martino P, Del Favero A, GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) Infection Program. 2004. Mucormycosis in hematologic patients. *Haematologica* 89:207–214. <http://www.haematologica.org/content/89/2/207.long>.
- Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, Just-Nübling G, Willinger B, Presterl E, Lass-Flörl C, Rickerts V. 2005. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* 58:1180–1184. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2004.024703>.
- Francesconi A, Kasai M, Harrington SM, Beveridge MG, Petraitis R, Petraitis V, Schaufele RL, Walsh TJ. 2008. Automated and manual methods of DNA extraction for *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* analyzed by quantitative real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46:1978–1984. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02246-07>.
- Hata DJ, Buckwalter SP, Pritt BS, Roberts GD, Wengenack NL. 2008. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. *J. Clin. Microbiol.* 46:2353–2358. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02331-07>.
- Ibrahim AS, Bowman JC, Avanesian V, Brown K, Spellberg B, Edwards JE, Douglas CM. 2005. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:721–727. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.2.721-727.2005>.
- Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitis R, Beveridge MG, Knudsen T, Milanovich J, Cotton MP, Hughes J, Schaufele RL, Sein T, Bacher J, Murray PR, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. 2008. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 46:3690–3702. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00917-08>.
- Hrncirova K, Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, Volfova P, Palousova D, Moulis M, Weinbergerova B, Winterova J, Toskova M, Pospisilova S, Mayer J. 2010. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 48:3392–3394. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01109-10>.
- Chiu RWK, Murphy MF, Fidler C, Zee BCY, Waincoat JS, Lo YMD. 2001. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin. Chem.* 47:667–672. <http://www.clinchem.org/content/47/4/667.full.pdf+html>.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE. European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* 46:1813–1821. <http://dx.doi.org/10.1086/588660>.
- Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. 2008. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clin. Infect. Dis.* 47:503–509. <http://dx.doi.org/10.1086/590004>.
- Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, Scherer E, Bellanger AP, Leroy J, Grenouillet F. 2013. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 56:e95–e101. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit094>.

3.4.1.4. Annex 22

Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol.* 2016;54(7):714-724. ISSN 2185-6486.

IF = 2,377 v roce 2016; INFECTIOUS DISEASES Q1, MYCOLOGY Q1, VETERINARY SCIENCES Q1; 22 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací



Original Article

Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis

Matej Bezdicek^{1,2}, Martina Lengerova^{1,2,3,*}, Dita Ricna^{1,2},
Barbora Weinbergerova^{1,2}, Iva Kocmanova⁴, Pavlina Volfova¹,
Lubos Drgona⁵, Miroslava Poczova⁶, Jiri Mayer^{1,2,3} and Zdenek Racil^{1,2,3}

¹Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ²Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ³CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ⁴Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ⁵Department of Oncohematology, Comenius University in Bratislava and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia and ⁶Department of Mycology, HPL Ltd., Bratislava, Slovakia

*To whom correspondence should be addressed. Martina Lengerova, Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Cernoplni 9, 613 00, Brno, Czech Republic, Tel: +420532234629; Fax: +420532234623; E-mail: mlengerova@fnbrno.cz

Received 25 January 2016; Revised 24 March 2016; Accepted 29 March 2016

Abstract

Despite advances in the treatment of invasive fungal diseases (IFD), mortality rates remain high. Moreover, due to the expanding spectrum of causative agents, fast and accurate pathogen identification is necessary. We designed a panfungal polymerase chain reaction (PCR), which targets the highly variable ITS2 region of rDNA genes and uses high resolution melting analysis (HRM) for subsequent species identification. The sensitivity and specificity of this method was tested on a broad spectrum of the most clinically important fungal pathogens including *Aspergillus* spp., *Candida* spp. and mucormycetes. Despite the fact that fluid from bronchoalveolar lavage (BAL) is one of the most frequently tested materials there is a lack of literature sources aimed at panfungal PCR as an IFD diagnostic tool from BAL samples. The applicability of this method in routine practice was evaluated on 104 BAL samples from immunocompromised patients. Due to high ITS region variability, we obtained divergent melting peaks for different fungal species. Thirteen out of 18 patients with proven or probable IFD were positive. Therefore, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of our method were 67%, 100%, 100%, and 94%, respectively. In our assay, fungal pathogens identification is based on HRM, therefore omitting the expensive and time consuming sequencing step. With the high specificity, positive and negative predictive values, short

time needed to obtain a result, and low price, the presented assay is intended to be used as a quick screening method for patients at risk of IFD.

Key words: Panfungal PCR, High resolution melting analysis, Bronchoalveolar lavage fluid, Immunocompromised patients.

Introduction

Although new drugs are available, IFD mortality rates in immunocompromised patients remain high.¹ Prolonged neutropenia is a major risk factor, related mostly to the treatment of acute myeloid leukemia (AML) and/or allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

The vast majority of IFDs are caused by the genera *Aspergillus* and *Candida*. However, in the last few decades more cases caused by rare filamentous fungi (mucormycetes – *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. and *Absidia* spp; *Fusarium* spp.; *Scedosporium* spp.), yeasts (*Trichosporon* spp.) and yeast-like fungi (*Geotrichum* spp.) have been observed.^{2–4} These species' varying susceptibility to antifungal drugs brings the necessity of not only detecting fungal hyphae in biological samples but also identifying the causative agents of infection.

Molecular methods, the most important of which is polymerase chain reaction (PCR), have provided a powerful tool to improve the detection and identification of fungal pathogens in clinical microbiology practice.⁵ However in medical mycology, cultivation, microscopy and detecting fungal antigens in serum still remain the major approaches. In hemato-oncological patients, cultures are often negative due to low load of fungal cells and reduced fungal cells viability after prophylactic therapy. With positive culture, MALDI-TOF with its low cost, resolving power (especially for yeasts), speed and simplicity can be used to identify infectious agents.^{6–9} Histological examination and detection of serological markers are reliable tools to detect a fungal disease, but they are not specific enough to identify fungal pathogens. Direct observation of fungal elements in biological samples using microscopy enables only an estimate of the species based on its size and shape.¹⁰ Both galactomannan (GM) and 1,3-beta-D-glucan (BG) can be produced by multiple species. With negative culture, PCR is the only method that enables pathogen detection and identification to the species level, including the discrimination of closely related species. In comparison with culture, PCR is fast and its sensitivity is significantly higher in immunocompromised patients.^{10,11}

Because of the rising spectrum of fungal pathogens, panfungal PCR could be a favourable method. So far, it is mostly utilized when primarily sterile material is examined.^{12–14} However, as pulmonary disease is the most prominent manifestation of IFD, one of the most frequently tested materials is fluid from BAL. So far, to diagnose

invasive aspergillosis (IA) and invasive mucormycosis (IM) from BAL mostly genus/species specific PCR is used.^{15–17} However, support of the use of panfungal PCR as a diagnostic tool for IFD from BAL samples is missing in the literature. BAL is a primarily nonsterile material and thus interpreting a positive panfungal PCR result can be difficult. It is important to distinguish ongoing infection from the colonization of airways with nonpathogenic species and/or, possible contamination with environmental fungi. Sequencing the obtained PCR product is therefore necessary, but it is costly, time consuming, and mixed sequences are frequently detected in primarily nonsterile material. Besides sequencing, fragment length analysis can be used to identify products obtained from panfungal PCR. However, this method is not discriminatory enough because the length of different fungal species' fragments can be very similar.¹⁸

Recently, high-resolution melting (HRM) analysis was described as a faster, cheaper and more convenient alternative to sequencing.^{10,19–21} This method is based on PCR amplification in the presence of an intercalating dye (EvaGreen or SYBRgreen).²² After PCR, the next step is controlled melting of the PCR product while measuring changes in fluorescence depending on amplicon length, sequence, and CG content. In fungi, this approach is suitable when variable regions are targeted, such as ITS1 and ITS2 rDNA regions.

The aim of this study is to develop a rapid screening method based on panfungal PCR followed by HRM analysis (pan-HRM) to detect clinically significant fungi in BAL samples from immunocompromised patients and to determine its contribution to IFD diagnostics. We verified our method both on cultures and clinical samples. The Pan-HRM results were compared to the results of other methods—culture, BAL GM detection, and detection of aspergilli and mucormycetes using PCR.

Materials and methods

Fungal strains

Twenty-eight fungal species (105 strains) were used to test the ability of the assay to detect clinically relevant fungal species and create a library of reference HRM temperatures (Table 1). Reference strains were obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM, Masaryk University, Czech Republic) and Culture Collection of Fungi (CCF, Charles University in Prague, Czech Republic). Clinical and

Table 1. List of fungal reference strains and clinical isolates.

Species	Reference strains	No. of strains from clinical isolates
<i>Absidia corymbifera</i>	CCM 8077	2
<i>Aspergillus flavus</i>	CCM 8363, CCM F-171, CCF 3151, CCF 1624, CCF 642, CCF 1739, CCF 1288, CCF 2497	2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCM 8338, CCF 1187, CCF 3623	12
<i>Aspergillus nidulans</i>	CCM F-266, CMF 1189, CMF 1767, CMF 1766, CMF 1768	0
<i>Aspergillus niger</i>	CCM 8155, CCM 8189, CCF 1297, CCF 629, CCF 1610, CCF 3264, CCF 3433, CCF 2875, CCF 2477	1
<i>Aspergillus sydowii</i>		2
<i>Aspergillus terreus</i>	CCM 8082, CCF 2539, CCF 3389, CCF 3315, CCF 2911	2
<i>Aspergillus ustus</i>	CCM F-414	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	CCM F-581	0
<i>Candida albicans</i>		10
<i>Candida glabrata</i>		10
<i>Candida krusei</i>		1
<i>Candida parapsilosis</i>		2
<i>Candida tropicalis</i>		1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CCM 8312	0
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	CCM F-705	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	CCM F-485	3
<i>Fusarium proliferatum</i>		1
<i>Fusarium solani</i>	CCM F-358, CCM 8014, CCM 8079, CCM 8034	1
<i>Mucor circunelloides</i>		1
<i>Mucor racemosus</i>	CCM 8190	0
<i>Paecilomyces variotti</i>	CCM F-566, CCM F-398	0
<i>Rhizomucor pusillus</i>	CCM F-211	0
<i>Rhizopus microsporus</i>		1
<i>Rhizopus oryzae</i>	CCM 8075	2
<i>Rhizopus stolonifer</i>	CCM F-445	0
<i>Scedosporium apiospermum</i>		1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		1

environmental isolates were obtained from the Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno. Clinical isolate identification was done by microscopy and sequencing the rDNA ITS2 region.²³

Clinical samples

We tested 104 BAL samples from immunocompromised patients with an episode of pulmonary infection in this study. Patient characteristics are shown in Table 2. All patients provided informed consent to use their BAL samples for scientific purposes. The BAL samples were processed immediately or stored at -70°C . The episodes were classified according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) criteria²⁴ into three categories—proven ($n = 2$), probable ($n = 16$), and possible ($n = 86$).

Culture

Cultivation was carried out on the Sabouraud dextrose agar (Laboratorios CONDA, Madrid, Spain) with Amikacin (200 mg/l) (Bristol-Myers Squibb, Prague, Czech Republic) and Vancomycin (6 mg/l) (SANDOZ, Prague, Czech Republic) for 6 days/ 30°C (yeasts) or 7 days/ 25°C and 37°C (filamentous fungi). Identification of positive culture was done by microscopy and colony morphology and confirmed by sequencing.

GM detection. BAL fluid GM concentrations were determined using the Platelia Aspergillus kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. The BAL fluid samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min, and $300 \mu\text{l}$ of the supernatant of each sample was used for GM detection. A sample with a GM index of positivity above 0.5 was considered positive.

Table 2. Demographic characteristics of patients.

	No. of patients
Total	104
Male	57
Female	47
Acute lymphoblastic leukemia	11
Acute myeloid leukemia	26
Chronic lymphocytic leukemia	11
Chronic myeloid leukemia	1
Hairy cell leukemia	1
HIV positive patients	9
Hodgkin's lymphoma	4
Myelodysplastic syndrome	3
Multiple myeloma	4
non-Hodgkin's lymphoma	4
Solid tumor	9
Unspecified malignant neoplasm	9
Other	12
Probable IFD	16
Proven IFD	2
Possible IFD	86

DNA extraction

DNA extraction from both fungal cultures and BAL samples was carried out using a ZR Fungal/Bacterial Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) with a few modifications as described previously.¹⁷ With each batch of samples an aliquot of sterile water was processed to uncover possible contamination during the DNA isolation step.

pan-HRM

Primers were designed on the free online Primer3 program. (<http://simgene.com/Primer3>). We chose broad range primers that hybridize to conserved sequences of 5.8S (MB-F 5'-GATGAAGAACGCAGCGAAAT-3') and 28S (ITS-R 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3') of rDNA, surrounding variable ITS2, which is suitable for HRM analysis. Bioinformatics' analysis of possible cross reactivity with other fungal species was done in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (<http://www.megasoftware.net/>). The reaction volume of 20 μ l contained 10 μ l of SensiFast HRM mix (Bioline, London, United Kingdom), 0.8 μ M of each primer MB-F and ITS-R and 4 μ l of extracted DNA. Thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 120 s, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 5 s), annealing (60°C for 10 s), and extension (72°C for 20 s). HRM analysis started at 74°C for 90 s (pre-melt conditioning), then the temperature was subsequently increased to 94°C by 0.05°C/s. A Rotorgene 6000 instrument (Corbett

Research, Sydney, Australia) was used for amplification. The results were analyzed using Rotor-Gene 6000 series software 1.7. We considered one clear peak (two peaks in *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*) which intersected the threshold dF/dT > 0.5 as a positive result. Each strain was tested in duplicate in two separate experiments by pan-HRM and a library of their melting temperatures was created. The sensitivity of the pan-HRM reaction was determined by testing the genomic DNA isolated from fungal cultures (*C. albicans*, *F. solani*, and *A. fumigatus*), serially diluted in sterile deionized water. The last positive dilutions for *C. albicans* and *F. solani* contained 1 fg of fungal DNA which corresponds to less than 1 genome. The last positive dilution for *A. fumigatus* was a dilution containing 10 fg of fungal DNA.

Detecting aspergilli and mucormycetes

In our institution, BAL from patients at high risk of IFD or with suspicious IFD symptoms are tested with two methods—commercial real-time PCR assay to detect the four most common *Aspergillus* species *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, and *A. terreus* (gb MICRO Aspergillus, Geni Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic) and mucormycetes-specific nested PCR followed by HRM analysis as described previously.¹⁷ Detecting aspergilli was performed according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The contribution of pan-HRM to IFD diagnostics was assessed. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive likelihood ratios, and negative likelihood ratios were calculated using the online version of MedCalc Version 14.12.0 (http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php).

Results

pan-HRM in reference strains and strains from clinical isolates

The ranges of each species' melting temperatures were determined using both reference strains and strains from clinical isolates to create the HRM temperature library (Table 3). Our method proved its ability to detect a broad spectrum of fungal pathogens.

Detection and accurate identification of the five most common species of *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*) is presented in Figure 1. *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. krusei* provide a

Table 3. Melting temperatures library of reference fungal strains and strains from Department of Clinical Microbiology.

Species	Range of melting temperature (°C)	No. of strains	Length (bp)	GenBank Acc. number
<i>Absidia corymbifera</i>	Neg	3	NA	NA
<i>Aspergillus flavus</i>	89.88–90.15	10	347	AJ853764.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	90.43–90.92	15	348	HF677588.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	90.67–90.95	5	348	AJ937756.1
<i>Aspergillus niger</i>	89.67–90.25	10	350	AJ876876.1
<i>Aspergillus sydowii</i>	90.48–90.65	2	348	AM883163.1
<i>Aspergillus terreus</i> genotype 1	90.78–90.95	2	356	AB661667.1
<i>Aspergillus terreus</i> genotype 2	91.53–91.80	5	356	AB661667.1
<i>Aspergillus ustus</i>	91.17–91.25	1	350	HG964332.1
<i>Aspergillus versicolor</i>	90.42–90.47	1	347	AM883156.1
<i>Candida albicans</i>	84.63–84.85	10	333	KJ187033.1
<i>Candida glabrata</i>	83.37–83.52	10	414	HE993757.1
<i>Candida krusei</i>	88.43–88.45	1	341	KF959839.1
<i>Candida parapsilosis</i>	81.47–81.70	2	305	AB828583.1
<i>Candida parapsilosis</i> 2 nd peak	83.10–83.25	2	305	AB828583.1
<i>Candida tropicalis</i>	81.00–81.22	1	322	JQ904699.1
<i>Candida tropicalis</i> 2 nd peak	82.32–82.35	1	322	JQ904699.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	84.02–84.03	1	369	AJ876525.1
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	77.33–77.40	1	397	JN205865.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	85.23–85.68	4	332	HF546393.1
<i>Fusarium proliferatum</i>	88.20–88.27	1	346	AJ810449.1
<i>Fusarium solani</i>	89.63–90.33	5	353	AB775570.1
<i>Mucor circinelloides</i>	80.22–80.33	1	365	AM745433.1
<i>Mucor racemosus</i>	80.02–80.05	1	362	AB369913.1
<i>Paecilomyces variotti</i>	90.85–90.95	2	349	KC237293.1
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Neg	1	NA	NA
<i>Rhizopus microsporus</i>	Neg	1	NA	NA
<i>Rhizopus oryzae</i>	Neg	3	NA	NA
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Neg	1	NA	NA
<i>Scedosporium apiospermum</i>	88.07–88.10	1	381	AB489090.1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	90.12–90.17	1	363	Z97995.1

Note: Expected length of PCR products according to representative strain from NCBI database.

single melting peak (84.63–84.85°C, 83.37–83.52°C, and 88.43–88.45°C), while *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* are characterized by a pattern with two peaks (81.00–81.22°C and 82.32–82.35°C; 81.47–81.70°C, and 83.10–83.25°C).

Our pan-HRM method was also positive for *Aspergillus* spp. including the most clinically important species of this genus—*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, and *A. niger* (Fig. 1). Due to the similar melting temperatures, it can be difficult to distinguish *A. fumigatus*/*A. nidulans*/*A. sydowii* and *A. niger*/*A. flavus* (Fig. 1). However, using analysis of the melting curves *A. fumigatus* can be distinguished from *A. nidulans* and *A. niger* from *A. flavus* (Fig. 2). Strains of *A. terreus* provided melting peaks in two different temperature ranges (90.78–90.95°C and 91.53–91.80°C). However, after sequencing we found the explanation in two different genotypes of *A. terreus* sp. analysed in our collection of fungal strains.

Fusarium oxysporum, *F. solani* and *F. proliferatum* generated a distinct melting peak (85.23–85.68°C, 88.20–88.27°C and 89.63–90.33°C). The melting peaks for *Fusarium* spp. and other medically important pathogens are presented in Figure 3. The range of melting temperatures of *F. solani* was similar to ranges of melting temperatures of *A. flavus* and *A. niger*. Differentiation of those species is also possible by using melting curves (Fig. 4).

From the group of mucormycetes, we obtained positive results only for *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and *Cunninghamella blakesleeana*. Also *M. circinelloides* and *M. racemosus* provide similar melting temperature but can be distinguished via comparison of their melting curves (Fig. 4). We obtained negative results for the rest of mucormycetes, namely *Absidia corymbifera*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizomucor pusillus*. This was expected due to several

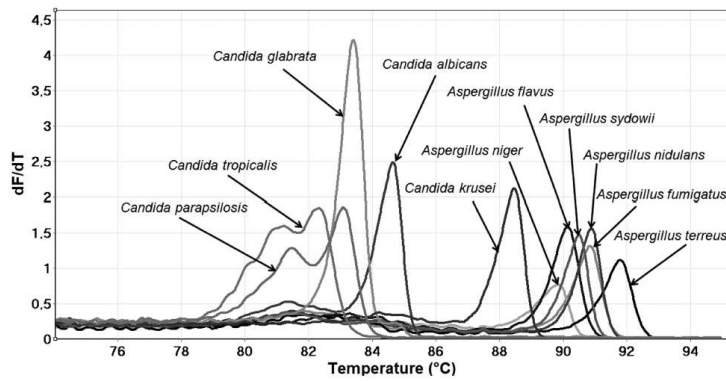


Figure 1. Melting peaks of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.

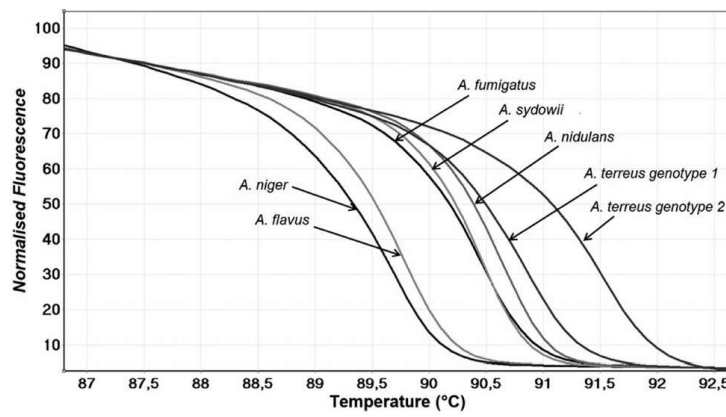


Figure 2. Identifying *Aspergillus* spp. using melting curves from high resolution melting analysis.

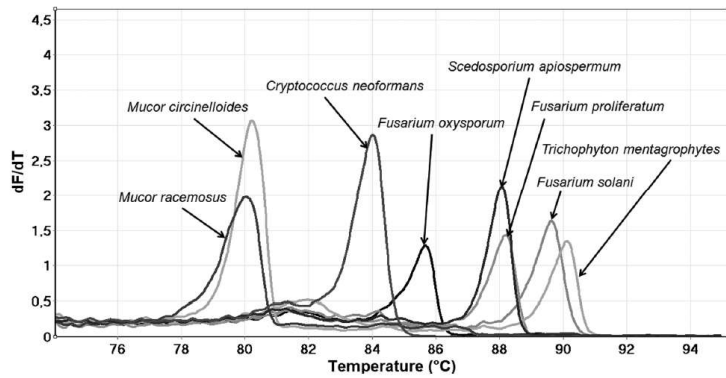


Figure 3. Melting peaks of other medically important fungi.

mismatches between primers and target sequence in mucormycetes DNA caused by low sequence homology of the 5.8S and 28S rDNA region compared to the other fungi. Detecting mixed infection was tested on mixed samples of

C. albicans and *C. glabrata* with DNA concentration ratios 1:1, 1:10, and 1:100 (Fig. 5). Our method is able to differentiate a mixed sample of two fungal species if the DNA concentration ratio between those two agents is 1:1

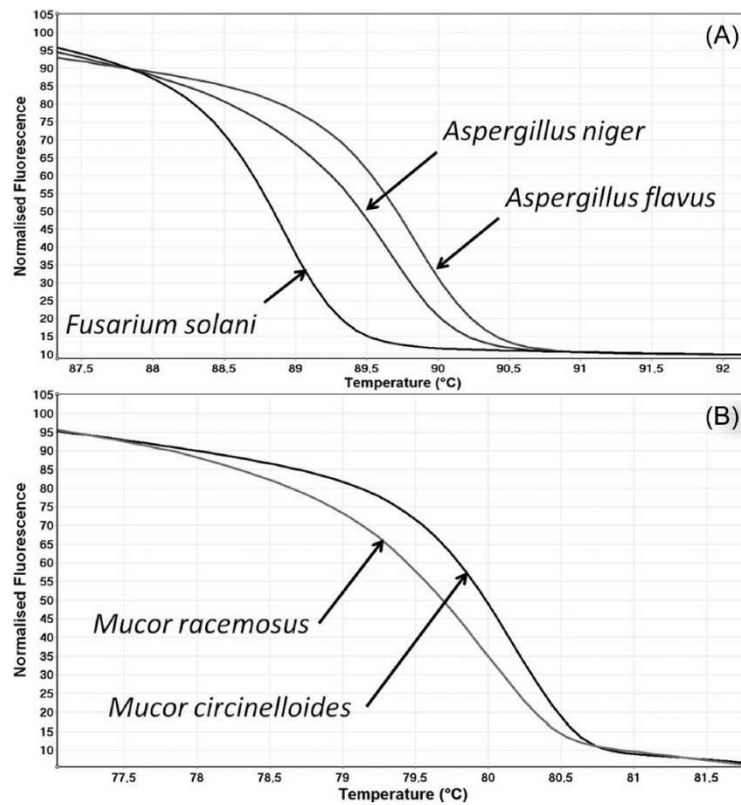


Figure 4. Differentiation of fungal species with similar melting temperature using high resolution melting curve analysis. (A) *Fusarium solani*/*Aspergillus flavus*/*Aspergillus niger*; (B) *Mucor racemosus*/*Mucor circinelloides*.

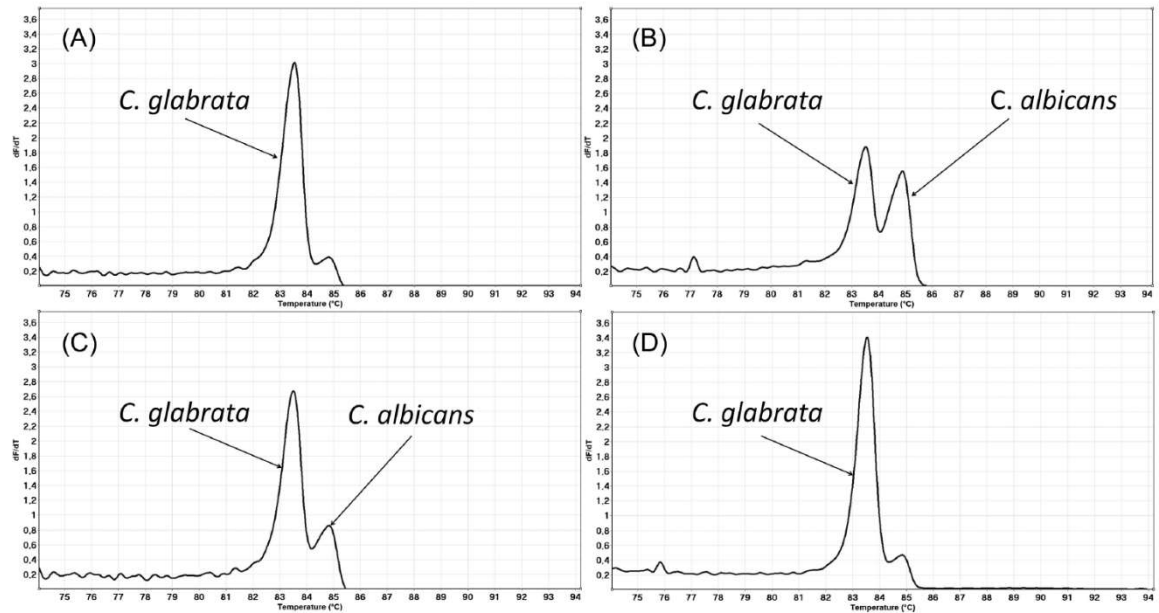


Figure 5. Detecting mixed samples. (A) *Candida glabrata*, (B) *Candida glabrata* : *Candida albicans* 1:1, (C) *Candida glabrata* : *Candida albicans* 10:1, (D) *Candida glabrata* : *Candida albicans* 100:1.

Table 4. Results of microbiological and molecular tests in BAL samples from patients with proven or probable IFD.

Patient	Gender	IFD [†]	Diagnosis*	Culture	GM (IP)	Species-specific PCR	Pan-HRM
1	M	Proven IA	CLL	Neg	2.21	<i>A. fumigatus</i>	Neg
2	M	Probable IA	AML	Neg	3.88	Neg	<i>C. albicans</i>
3	M	Probable IA	MM	<i>A. fumigatus</i>	9.44	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. glabrata</i> + <i>A. fumigatus</i>
4	M	Probable IA	IAA	<i>A. fumigatus</i>	8.96	<i>A. fumigatus</i> + <i>A. niger</i>	<i>C. glabrata</i> + <i>A. fumigatus</i>
5	F	Probable IA	AML	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>	8.49	<i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
6	F	Probable IA	HL	<i>A. fumigatus</i>	6.81	<i>A. fumigatus</i>	Neg
7	M	Probable IA	ALL	<i>A. fumigatus</i>	8.6	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
8	F	Probable IA	MA	<i>A. fumigatus</i>	5.54	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
9	F	Probable IA	AML	<i>A. fumigatus</i>	9.53	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
10	M	Probable IA	MNoL	Neg	1.5	Neg	Neg
11	M	Probable IA	ALL	<i>A. fumigatus</i>	6.96	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
12	F	Probable IA	AML	Neg	0.5	Neg	Neg
13	F	Probable IA	ALL	<i>A. fumigatus</i>	5.14	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
14	M	Probable IA	CLL	<i>A. fumigatus</i>	6.57	<i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i>
15	M	Probable IA	CLL	Neg	7.1	<i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
16	F	Probable IA	AML	ND	6.2	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
17	F	Probable IA	AML	Neg	9.39	<i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
18	M	Proven IM	HL	<i>Rhizomucor miehei</i>	neg	<i>Rhizomucor</i> sp.	neg

[†]IA, invasive aspergillosis, IM, invasive mucormycosis; *IAA, idiopathic aplastic anemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; HL, Hodgkin's lymphoma; MA, mastocytosis; MM, multiple myeloma; MNoL, malignant neoplasm of unspecified part of bronchus or lung; GM (IP), galactomannan in BAL (index of positivity).

or 1:10. When the DNA concentration ratio between two pathogens is higher our method is able to detect only the pathogen with a higher DNA concentration.

pan-HRM in BAL samples

In this study, we tested 104 BAL samples. One BAL sample was obtained from a patient with proven IA, 16 BAL samples were obtained from patients with probable IA. 1 sample was obtained from a patient with proven IM and 86 BAL samples were collected from patients with possible IFD.

Results from patients with proven or probable IFD are summarized in Table 4. In BAL samples from the patients with proven or probable IA (n = 17) culture was positive in 10/17 (59%) cases; 17/17 (100%) samples had highly positive GM. Aspergillus PCR was positive in 14/17 (82%) cases, in five cases, it revealed a mixed infection with two different *Aspergillus* species.

Pan-HRM was positive in 13/17 (76%) samples. Apart from aspergilli, *Candida* spp. were detected, which were most probably contaminants from the upper airways. In Figure 6 we demonstrate the performance of the assay on BAL samples—positive detection of *A. fumigatus*, *A. flavus*, and *C. glabrata* and a negative sample are presented.

The culture from the patient with proven IM revealed *Rhizomucor miehei*. GM was negative, which is in concordance with a diagnosis of invasive mucormycosis. Mu-

cormycetes PCR was positive for *Rhizomucor* sp. Pan-HRM was negative, which confirmed our expectations, based on the results mentioned above.

Culture results, aspergillus PCR and mucormycetes PCR of all 86 samples from patients with possible IFD were negative. All 86 samples were negative using pan-HRM, and we did not observe any false positive results caused by contamination, which is crucial as the BAL is not sterile material and our method is able to detect a broad range of fungi.

The sensitivity, specificity, NPV and PPV of the pan-HRM method based on its ability to prove or rule out IFD are summarized in Table 5.

Discussion

Rapid and accurate diagnostic tests are needed to improve clinical IFD outcomes. For PCR detection of fungi in clinical specimens, either species-specific or broad-range methods can be used. The advantages or disadvantages of both approaches must be considered. Species-specific primers might miss infections caused by untargeted fungi; conversely, pan-fungal primers can provide false positive results due to environmental fungal DNA contamination. The results of species-specific methods are usually available within 24 h, while when panfungal PCR assays are done, verification of the results by sequencing is necessary, which usually takes 2–3 d.

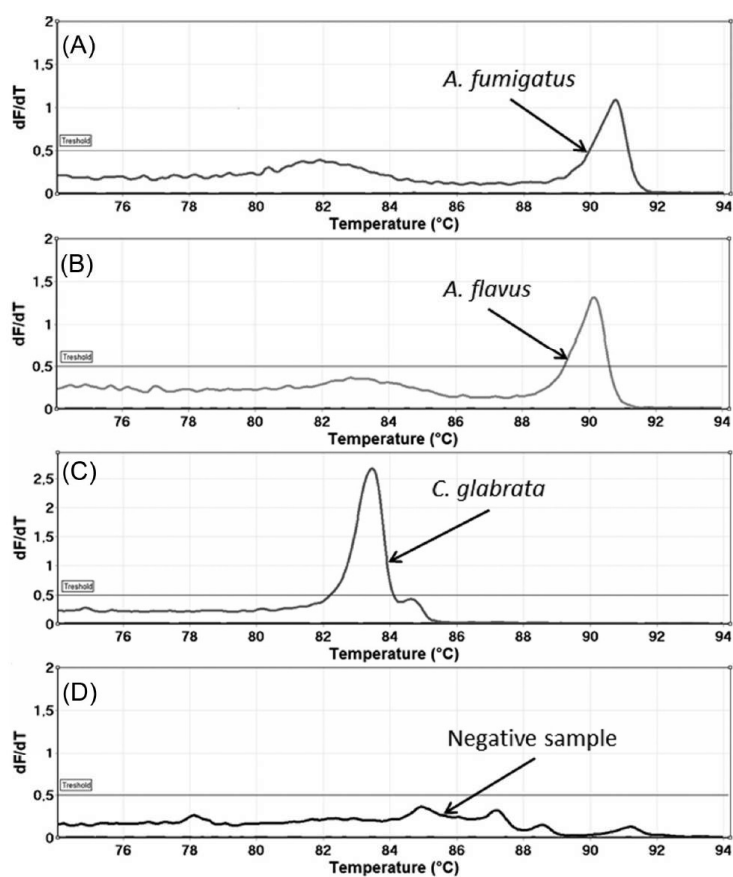


Figure 6. Results of fungal detection in BAL samples. (A) *Aspergillus fumigatus*, (B) *Aspergillus flavus*, (C) *Candida glabrata* and (D) negative sample.

Table 5. Sensitivity, specificity, PPV and NPV of pan-HRM.

	Pan-HRM	95% CI
Sensitivity	66.67%	40.99–86.66
Specificity	100%	95.80–100.00
Positive Likelihood Ratio	—	NA
Negative Likelihood Ratio	0.33	0.17–0.64
PPV	100.00%	73.35–100
NPV	93.48%	86.34–97.57

Note: PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value, HRM – high-resolution melt analysis, CI – confidence interval.

Due to the issues raised above, panfungal PCR use has so far been mainly focused on sterile samples (serum, blood, cerebrospinal fluid)^{12,13,25} or to identify fungal pathogens in fresh or formalin-fixed paraffin embedded tissue specimens from patients with culture or histologically proven IFDs.¹⁴ However, since the lungs are the most common organ affected, BAL samples are frequently tested

for the presence of fungal pathogens. BAL samples are usually tested using species/genus specific PCR to IA and eventually to other possible fungal pathogens such as mucormycetes.^{15–17}

Within the framework of differential diagnosis in our laboratory, we routinely test BAL samples from immunocompromised patients for the presence of *Aspergillus* spp. and mucormycetes. If the results of these two tests are negative, but there is still a suspicion of IFD and/or positive results in other tests (detecting GM and/or BG; microscopy) we then test the samples with nested panfungal PCR followed by sequencing.²³ Unfortunately, due to the presence of colonizing/contaminating microbiota sequences frequently being a non-pathogenic species, sequencing only prolongs the time necessary to obtain results and increases the analysis costs¹⁴ with no significant contribution to the final diagnosis.

In this study, we decided to replace sequencing with a method based on panfungal PCR followed by HRM

analysis. The sensitivity and specificity of this method was validated on both reference strains and clinical isolates. Testing the fungal strains showed that the generated melting peaks together with melting curves are highly discriminatory. It was proved that the assay is able to detect as low as 1–10 fg of fungal DNA (which is similar to real-time PCR). We successfully amplified DNA from the most important fungal pathogens—*Candida* spp., *Aspergillus* spp., and *Fusarium* spp.

After the HRM temperature library was created, our method was tested on a set of samples from immunocompromised patients. In patients with proven or probable IFD, a comparison of results from other tests (culture, GM detection) showed high compliance. The positive detection of yeasts in three patients can most likely be classified as BAL contamination from the oral cavity, since none of these patients had evidence of an infection caused by the *Candida* spp. We were able to detect mixed infections (Patients 3, 4 and 14). In some cases (patients 4, 5, 15, and 17), pan-HRM captured only one species of *Aspergillus*, while the aspergillus specific assay found two different species. When we analysed these cases closely, we found that the DNA load of the species not detected by pan-HRM in the sample was 20 to 25 times lower than the species captured. This correlates with our findings listed above (Fig. 5).

The low false positivity frequency compared to other panfungal methods can be explained by the more stringent PCR amplification conditions. In previously published studies, high sensitivity was usually obtained by using nested PCR, by using our method this was done in a single round. Moreover, our method has a high annealing temperature (60°C) ensuring specific amplification. In our opinion, this makes our method more robust and less susceptible to detecting air-borne fungi.

Due to the single center character of this study, we are aware that our research is limited by its low number of proven and possible cases of IFD. The most prominent drawback of our assay is its inability to detect mucormycetes (possibly except *Mucor* spp.) due to the low sequence homology of the 5.8S and 28S region of rDNA compared to other fungi. It prohibits MB-F/ITS-R primers binding to this region. Therefore, additional tests (e.g., PCR followed by HRM analysis¹⁷) are necessary to exclude invasive mucormycosis.

The role of our method in routine laboratory diagnosis is designed to rapidly detect a fungal pathogen or exclude IFD. A positive pan-HRM result can be obtained in less than 2.5 h (including DNA extraction). Species identification can be difficult using only melting peaks, but as there are differences in IFD treatment caused by different fungal genera, the differentiation at genus level can be enough for an

appropriate start of treatment. The exception is species specific treatment of invasive candidiasis; however, our method is able to reliably distinguish the five most common *Candida* spp. Within detailed differential diagnosis, our method takes place as a screening method which further determines the direction of testing and thereby excludes the necessity of using a complete range of species specific tests, which are costly and time consuming.

In conclusion, we have developed a quick (30 min hands-on time with 1.5 h for PCR and HRM analysis) and cheap (1 USD/reaction) method to detect the most common fungal pathogens. This method is characterized by high specificity (100%), PPV (100%) and NPV (94%), and sensitivity (67%). Despite a lower sensitivity, the great specificity, PPV and NPV together with the low cost and short time needed to obtain the initial results make it an ideal tool for fast screening in patients at risk of IFD. Its results may determine the course of further testing (verification of the results and quantification of fungal DNA load with species-specific tests) and thus shorten the overall time required to achieve the final result.

Acknowledgements

Supported by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (FNBr, 65269705), MUNI/A/1028/2015 and TE02000058.

Declaration of interest

ZR is a consultant and speaker for Astellas Pharma and Pfizer. The other authors declare that they have no relevant conflict of interest.

References

1. Cordonnier C, Robin C, Alanio A et al. Antifungal pre-emptive strategy for high-risk neutropenic patients: why the story is still ongoing. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20** (Suppl 6): 27–35.
2. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** (Suppl 4): 5–24.
3. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; **48**: 1–12.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 4419–4431.
5. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 165–256.
6. Duyvejonck H, Cools P, Decruyenaere J et al. Validation of High Resolution Melting Analysis (HRM) of the Amplified ITS2 Region for the Detection and Identification of Yeasts from Clinical Samples: Comparison with Culture and MALDI-TOF Based Identification. *PLoS One* 2015; **10**: e0132149.

7. Gautier M, Ranque S, Normand AC et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 1366–1371.
8. Ranque S, Normand AC, Cassagne C et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses* 2014; **57**: 135–140.
9. Murray PR. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; **14**: 419–423.
10. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kahkola P et al. Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 4186–4192.
11. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* 2012; **125**: S14–24.
12. Lau A, Chen S, Sorrell T et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 380–385.
13. Sugawara Y, Nakase K, Nakamura A et al. Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. *Eur J Haematol* 2013; **90**: 331–339.
14. Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV et al. Performance of panfungal- and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 1737–1740.
15. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 2039–2045.
16. Musher B, Fredricks D, Leisenring W et al. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5517–5522.
17. Lengerova M, Racil Z, Hrnčirova K et al. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 2824–2828.
18. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ et al. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1846–1851.
19. Somogyvari F, Horvath A, Serly J et al. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *In Vivo* 2012; **26**: 979–983.
20. Bergman A, Fernandez V, Holmstrom KO et al. Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; **26**: 813–818.
21. Mandviwala T, Shinde R, Kalra A et al. High-throughput identification and quantification of Candida species using high resolution derivative melt analysis of panfungal amplicons. *J Mol Diagn* 2010; **12**: 91–101.
22. Tong SY, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3418–3421.
23. Ferrer C, Colom F, Frases S et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2873–2879.
24. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP 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. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1813–1821.
25. Lass-Flörl C, Mutschlechner W, Aigner M et al. Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 863–868.

3.3.1.5. Annex 23

Ricna D., Lengerova M., Bezdicek M., Kocmanova I., Drgona L., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR. *Folia microbiol.* 2019;64(3):421-428. ISSN 0015-5632.

IF = 1,730 v roce 2019; MICROBIOLOGY Q4, BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY Q4; 3 citace dle WOS či Scopus, bez autocitací



Detection and identification of fungi in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients using panfungal PCR

Dita Ricna^{1,2} · Martina Lengerova^{1,2,3} · Matej Bezdicek^{1,2} · Iva Kocmanova⁴ · Lubos Drgona⁵ · Barbora Weinbergerova^{1,2} · Jiri Mayer^{1,2} · Zdenek Racil^{1,2}

Received: 26 June 2018 / Accepted: 29 November 2018 / Published online: 8 December 2018
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2018

Abstract

Rapid diagnostics of fungal pneumonia and initiation of appropriate therapy are still challenging. In this study, we used two panfungal assays to test bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples to prove their ability to confirm invasive fungal disease diagnosis and identify causative agents. Two methods targeting different fungal rDNA regions were used, and the obtained PCR products were sequenced directly or after cloning. In total, 106 BALF samples from 104 patients were tested. After sequencing, we obtained 578 sequences. Four hundred thirty-seven sequences were excluded from further analysis due to duplication ($n = 335$) or similarity with sequences detected in the extraction control sample ($n = 102$); 141 unique sequences were analyzed. Altogether, 23/141 (16%) of the fungi detected belonged to pathogenic species, and 63/141 (45%) were identified as various yeasts; a variety of environmental or very rare fungal human pathogens represented 29/141 (21%) of the total and 26/141 (18%) were described as uncultured fungus. Panfungal PCR detected fungal species that would be missed by specific methods in only one case (probable cryptococcosis). Panfungal PCR followed by sequencing has limited use for testing BALF samples due to frequent commensal or environmental fungal species pickup.

Introduction

The incidence of invasive fungal diseases (IFD) is increasing in immunocompromised hosts, especially in oncology patients and transplant recipients. Despite the expanding range of available antifungal drugs, these infections cause

considerable morbidity and mortality (Cordonnier et al. 2014). The fungal pathogens' timely detection is a prerequisite for successful therapy and for the clinical outcome in patients with IFD (Landlinger et al. 2010). The vast majority of IFD events are still caused by the genera *Candida* and *Aspergillus*; however, over the past decades, more cases caused by previously uncommon fungal genera (for example *Mucormycetes*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Trichosporon* spp.) have been reported (Richardson and Lass-Flörl 2008; Landlinger et al. 2010; Trubiano et al. 2016). Identification to the species level is essential to determine therapy, given the differences in antifungal agent susceptibility (Buitrago et al. 2013).

Conventional diagnostic tests such as radiological imaging, culture-based testing, and histological analyses have limitations in terms of sensitivity, specificity, and time to diagnosis. Moreover, serological assays for the galactomannan antigen (GM) and (1–3)- β -D-glucan (BG) cannot detect all fungal pathogens and have variable specificity, and negative results do not completely exclude an ongoing fungal infection (Pfeiffer et al. 2006; Alanio and Bretagne 2014).

Using polymerase chain reaction (PCR) to detect fungal DNA proved to be a promising tool for the rapid, sensitive, and accurate detection and identification of causative agents,

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12223-018-00669-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Martina Lengerova
Lengerova.Martina@fnbrno.cz

- ¹ Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic
- ² Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic
- ³ Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine - Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Cernoplni 9, 613 00 Brno, Czech Republic
- ⁴ Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic
- ⁵ Department of Oncohematology, Comenius University in Bratislava and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia

but many published PCR assays have focused mainly on *Aspergillus* or *Candida* species (Khot and Fredricks 2009; Lengerova et al. 2010). As the spectrum of fungal pathogens continues to expand, panfungal PCR could be an ideal tool for their detection, since this method has the potential to detect all fungal species. So far, panfungal PCR is mostly utilized when sterile material, such as tissue or blood specimens, is examined (Babouee et al. 2013; Sugawara et al. 2013; Trubiano et al. 2016). However, since pneumonia is the most common IFD manifestation, one of the most frequently tested materials in IFD diagnostics is bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Most studies dealing with IFD detection in BALF focus on invasive aspergillosis (IA) and invasive mucormycosis (IM) using specific assays (Boch et al. 2016; Millon et al. 2016; Springer et al. 2016; Marchesi et al. 2017). Only a few published studies are concerned with panfungal PCR detection in BALF (Bezdicsek et al. 2016; Trubiano et al. 2016).

The aim of this study was to evaluate the utility of a panfungal PCR to test BALF samples from patients at risk of IFD, who were mostly tested negative using method to detect aspergilli and mucormycetes. To achieve this goal, we used previously published panfungal PCR assays, targeting the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the ribosomal DNA (rDNA), followed by PCR product sequencing to elucidate the spectrum of fungal pathogens present in BALF. If mixed PCR products were present (that cannot be directly sequenced), they were cloned into the vector first.

Materials and methods

Clinical samples

In this study, we tested 106 BALFs from 104 immunocompromised patients with episodes of pulmonary infections. All patients provided informed consent before the BAL procedure. The BALF samples were processed immediately or stored at -70°C . Patient population characteristics, underlying diagnosis, and IFD classifications are summarized in Table 1. The episodes were classified according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) criteria (De Pauw et al. 2008).

DNA isolation

DNA was isolated from the BALF in a biological safety cabinet in a separate laboratory. If frozen, samples were thawed for 30 min at room temperature, and DNA was isolated from 2 mL of BALF using a Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions with a few modifications before the DNA extraction as described previously (Lengerova et al. 2014). An aliquot of sterile water was processed with each set of samples to

Table 1 Demographic characteristics of patients

	Patients (%)
Total	104 (100)
Male	61 (59)
Female	43 (41)
Diagnosis	
ALL	7 (7)
AML	24 (23)
CLL	13 (12)
HL	4 (4)
NHL	10 (10)
Solid tumors	28 (27)
MM	2 (2)
Other	16 (15)
Proven IFD	4 (4)
Probable IFD	22 (21)
Possible IFD	78 (75)

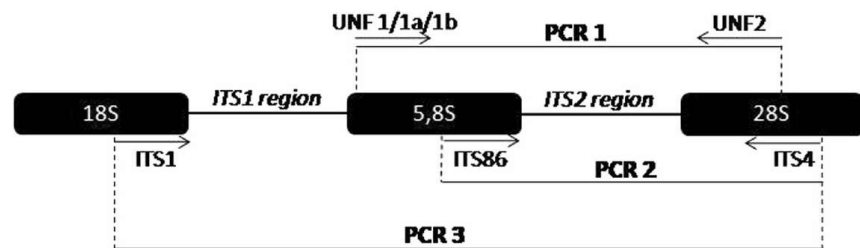
ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; HL, Hodgkin's lymphoma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; MM, multiple myeloma; IFD, invasive fungal disease

uncover possible contamination during the DNA isolation step and marked as an extraction control (EC) sample. We performed albumin gene detection to verify the DNA isolation process gene in each sample (Chiu et al. 2001).

Panfungal PCR assays

Fungal pathogen detection was performed using qualitative panfungal PCR methods with primers amplifying the ITS1 and ITS2 regions (see Fig. 1 for primer position) (Ferrer et al. 2001; Dendis et al. 2003). PCR product length and primers used are summarized in Table 2. Each sample was tested in duplicate including the EC. If mixed PCR products were detected, it was purified using the QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) and then ligated into plasmid vector pCR 2.1 (Invitrogen, USA) and cloned into INV α F' chemically competent *Escherichia coli* according to the manufacturer's instructions. Next day, five to ten white bacterial colonies were subjected to a control PCR reaction using the M13 primers to test transformation efficiency. After verification of the correct insert size by agarose electrophoresis, five colonies were used to inoculate 2 mL LB broth containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin and incubated overnight at 37°C with shaking. Plasmid DNA was isolated using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) according to the described protocol. Inserts were sequenced with the M13 primers. Sequencing was performed using the BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems) on a 3130xl ABI sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Fig. 1 Map of the fungal rDNA region showing the position of primer sets



On the basis of the interim results, we tested the second half of the samples at a later stage of the study only using the external round of the PCR2 method (here named as PCR3). The PCR products obtained by PCR3 were purified using the QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) and directly sequenced using the ITS1 and ITS4 primers.

Identification of fungal pathogens

All sequences were saved in the FASTA format for later processing. Patients' sequences were aligned with the corresponding EC sequences, and matching sequences were excluded from this study. Multiple sequence alignment was carried out in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (<http://www.megasoftware.net/>). All sequences were analyzed using the BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). CBS databases (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioLoMICSSequences.aspx>), and thus, fungal species were identified. Each sequence, which appeared multiple times in the sample for a patient, was counted only once.

Results

In this study, 106 BALF samples from 104 immunocompromised patients were analyzed by two panfungal PCR assays; 73 were positive with either method and 33 were negative. Our study was conducted on samples mostly obtained from patients clinically evaluated as having possible or probable fungal infection. All these samples were tested for the presence of the most frequent fungal infections agents (*Aspergillus* and mucormycetes) using specific real-time PCRs.

The first 53 BALFs from 53 patients were tested using PCR1 and PCR2, which amplify the fungal DNA fragments between 300 and 350 base pairs (bp) and target a broad

spectrum of fungi, including environmental species. These highly sensitive PCR methods (nested PCR/low annealing temperature) led to fungal DNA amplification in all clinical samples and most EC samples. After PCR amplification, multiple bands were present on the agarose gel. Therefore, cloning of the PCR products before sequencing was performed.

Due to repeated problems with EC positivity in each run, the BALFs in the second part of the study (51 patients) were tested by one-round PCR3 with the ITS1-ITS4 primer pair. A total of 53 BAL samples were tested. Twenty-two BAL samples from 20 patients had positive results, and identification was carried out by direct PCR product sequencing; 33 BAL samples from 33 patients were negative for fungal DNA. EC samples were always negative.

The total number of the obtained sequences was 578. Out of them, 437 sequences were excluded from further analysis by alignment because they were detected in multiple colonies from the same sample ($n = 335$) or due to similarity with sequences detected in the EC ($n = 102$). A collection of 141 unique sequences (Supplementary Table 1), 119 obtained after PCR1 + PCR2 and 22 after PCR3, was included in the final processing. Reported fungal species' names correspond with the current taxonomic standard indicated in the NCBI and CBS taxonomy databases, on the basis of external references. When tested with PCR1 + PCR2, there was one fungal species in 25/53 (47%) of the samples, two fungal species in 17/53 (17%), and three fungal species in 6/53 (11%) were observed. Three and more fungal species were identified in 5/53 (10%) patients. A narrower range of fungi was found by PCR3; this one-round method (amplifies DNA fragments about 600 bp) detected only one species per patient.

A diverse range of yeast and molds, including medically important fungi, uncommon pathogens, and fungi never before described in humans, were detected (Tables 3 and 4). From the total number of 141 sequences, 96 (68%) could be identified at the species level (sequences showed 98 to 100%

Table 2 Primers used for PCR methods

Method	PCR primers set	Amplicon length (bp)
PCR 1	UNF1, UNF1a, UNF1b, UNF2 (Dendis et al. 2003)	About 350
PCR 2	ITS1, ITS4, ITS86 (Ferrer et al. 2001)	About 300
PCR 3	ITS1, ITS4 (Ferrer et al. 2001)	About 600

Table 3 Fungal taxa detected by PCR1 and PCR2

Fungal genus/species	No. of sequences
<i>Acremonium</i> spp.	1
<i>Alternaria tenuissima</i>	1
<i>Aspergillus flavus</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6
<i>Aspergillus</i> spp.	5
<i>Aspergillus terreus</i>	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	1
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	5
<i>Candida albicans</i>	15
<i>Candida glabrata</i>	9
<i>Candida guilliermondii</i>	2
<i>Candida parapsilosis</i>	2
<i>Candida</i> spp.	3
<i>Cladosporium</i> spp.	3
<i>Cryptococcus dimenae</i>	1
<i>Cryptococcus magnus</i>	1
<i>Dioszegia</i> spp.	1
<i>Emericella nidulans</i>	2
<i>Epicoccum nigrum</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	2
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1
<i>Issatchenkia orientalis</i>	5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	3
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1
<i>Malassezia furfur</i>	1
<i>Myrothecium verrucaria</i>	1
<i>Penicillium brevicompactum</i>	3
<i>Penicillium glabrum</i>	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3
<i>Penicillium oxalicum</i>	1
<i>Penicillium</i> spp.	3
<i>Pichia fabianii</i>	1
<i>Rhizopus microsporus</i>	1
<i>Rhodotorula</i> spp.	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Sporobolomyces</i> spp.	1
<i>Trichoderma</i> spp.	1
Uncultured fungus	26

identity to sequences deposited in the GenBank database), and 19 (14%) were reported at the genus level (95 to 98% identity). Twenty-six (18%) sequences from the amplified taxa were assigned as uncultured fungi.

Altogether, 18/141 (13%) of the fungi detected belonged to the *Aspergillus* genus. From the other pathogenic species, DNA sequencing revealed rare pathogenic fungi *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor pusillus*, *Fusarium oxysporum*, and *Schizophyllum commune*. Besides aspergilli and

Table 4 Fungal taxa detected by PCR3

Fungal species	No. of sequences
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2
<i>Candida albicans</i>	9
<i>Candida glabrata</i>	4
<i>Candida tropicalis</i>	3
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2
<i>Rhizomucor pusillus</i>	1
<i>Schizophyllum commune</i>	1

mucormycetes, the most frequently observed were various yeasts, in 61/141 (43%) sequences, most probably as contaminants from the oral cavity (Monteiro-da-Silva et al. 2014). A variety of environmental or very rare fungal species, described previously in literature as human pathogens, represented 33/141 (23%) of the total (see Table 3). Also present were four species that have never been described previously as causing infectious diseases, such as *Botryotinia fuckeliana*, *Dioszegia* spp., *Hanseniaspora uvarum*, and *Myrothecium verrucaria*.

The results obtained in a cohort of the proven (4/104) and probable (22/104) IFD patients are summarized in Table 5. In 3 out of 4 patients with proven IFD, both specific and panfungal PCR assays detected pathogenic fungal species. Moreover, in 1 patient, panfungal PCR detected *Cryptococcus* sp., which was not detected by specific methods. Conversely, in patient #4, panfungal PCR detected numerous species that were highly probable contaminants. Cultivation was performed in 2/4 proven IFD patients; one was positive and one negative. GM positivity was observed in one patient. In probable IFD patients, aspergilli were identified in 6/22, when compared to 11/22 BALs positively detected by specific methods. In most BAL from probable (and possible) IFD, more than 1 species was detected, suggesting we picked contaminating/colonizing species. Only 3 BALs from patients with probable IFD and 30 with possible IFD were negative. Cultivation was performed in 15/22 probable IFD patients, in which 5 were positive. GM test yielded positive results in 21/22 patients. In the group of possible patients, cultivation was performed in 5/78 patients; 4 were positive and 1 negative. GM was negative in all patients.

Discussion

Rapid and accurate detection and identification of pathogenic fungi can improve the diagnosis and treatment of IFD. For PCR detection of fungi in clinical specimens, either species-specific assays or broad-range panfungal methods can be used. Each method has its particular advantages and disadvantages. Species-specific assays allow rapid pathogen detection (and quantification), but specific primers might miss

Table 5 Result obtained in proven and probable IFD patients

Patient	Diagnosis	IFD	Specific PCR		Panfungal PCR	
			Species detected	Method used	Species detected	
1	MM	Proven	<i>Aspergillus terreus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Aspergillus terreus</i>	
2	ALL	Proven	<i>Rhizopus microsporus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>	
3	HL	Proven	<i>Rhizomucor pusillus</i>	PCR 3	<i>Rhizomucor pusillus</i>	
4	CLL	Proven	Negative	PCR 1, PCR 2	<i>Cryptococcus sp.</i>	
5	ALL	Probable	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>	
6	HL	Probable	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR 3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
7	Solid tumor	Probable	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
8	AML	Probable	<i>Aspergillus flavus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Aspergillus flavus</i>	
9	CLL	Probable	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Botryotinia fuckeliana</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i>	
10	AML	Probable	<i>Aspergillus sp.</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Aspergillus sydowii/versicolor</i>	
11	AML	Probable	<i>Aspergillus flavus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Penicillium sp.</i>	
12	AML	Probable	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Alternaria sp.</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> , uncultured fungus	
13	HL	Probable	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Botryotinia fuckeliana</i> , uncultured fungus	
14	ALL	Probable	<i>Aspergillus flavus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Fusarium oxysporum</i>	
15	NHL	Probable	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR 1, PCR 2	<i>Candida albicans</i> , <i>Cladosporium sp.</i>	
16	AML	Probable	Negative	PCR 1, PCR 2	<i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Penicillium oxalicum</i>	
17	ALL	Probable	Negative	PCR 1, PCR 2	<i>Cladosporium sp.</i> , <i>Sporobolomyces sp.</i>	
18	AML	Probable	Negative	PCR 1, PCR 2	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Malassezia furfur</i>	
19	NHL	Probable	Negative	PCR 1, PCR 2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
20	NHL	Probable	Negative	PCR 3	<i>Candida albicans</i>	
21	NHL	Probable	Negative	PCR 1, PCR 2	<i>Candida albicans</i>	
22	AML	Probable	Negative	PCR 1, PCR 2	Uncultured fungus	
23	AML	Probable	Negative	PCR 3	Negative	
24	AML	Probable	Negative	PCR 3	Negative	
25	ALL	Probable	Negative	PCR 3	Negative	
26	CLL	Probable	Negative	PCR 3	Negative	

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; HL, Hodgkin's lymphoma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; MM, multiple myeloma; IFD, invasive fungal disease

infections caused by untargeted fungi. Conversely, panfungal methods can detect a broad range of fungal species but are labor intensive (results are usually available within 2–3 days) and require post-PCR analysis, usually sequencing and in silico analysis of sequences for precise identification. Furthermore, there are no commercial assays available which makes standardization between centers difficult. As the spectrum of human pathogens continues to expand, panfungal PCR assays are important in detecting emerging pathogens (Douglas et al. 2016). However, as shown in our study, its usefulness is limited by false positive results due to fungal DNA contamination (environmental or laboratory) or airway colonization. Fungi are often present in laboratory specimens in low abundance, which complicates distinguishing ongoing infection from colonization/contamination (Bittinger et al. 2014). Sample contamination can occur during sample collection or during sample processing at the pre-sequencing stage.

The internal transcribed spacer (ITS) region is widely used as a validated DNA barcode marker for the identification of fungal species (Schoch et al. 2012). Applying a panfungal PCR to amplify the ITS1 or ITS2 region of the rDNA gene followed by DNA sequencing is a highly sensitive and useful tool to detect and identify a wide range of fungi, but clinical studies are mainly focused on sterile samples such as fresh tissues or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens from patients with proven or probable IFD (Babouee et al. 2013; Buitrago et al. 2014; Trubiano et al. 2016; Valero et al. 2016; Gomez et al. 2017; Zeller et al. 2017). Due to the fact that the lungs are the most common organ affected, BAL samples are very useful in IFD diagnostics. Currently, species-specific PCR is widely used for IA or IM detection from BAL (Hoenigl et al. 2014; Lengerova et al. 2014).

In this study, we intended to eliminate possible false negative results caused by the presence of mismatches in the target

sequences when strictly species-specific methods are used or demonstrate the presence of rare fungal species. In 73 positive BALF samples, various fungal organisms were detected and successfully identified to the species level. This result was not surprising, because many nonpathogenic fungi can colonize the respiratory tract (Shin et al. 2013; Bittinger et al. 2014). The positive detection of *Candida* spp. with high frequency can most probably be explained by colonizing/contamination microflora from the upper airways and oral cavity rather than the presence of a pathogen, since none of these patients had evidence of a *Candida* infection.

Although we processed each specimen with its own negative control during DNA extraction (EC sample) and PCR amplification, environmental specimen contamination by airborne fungi can be another possible cause of false positive results in PCR1 and PCR2. The high false positivity frequency can be explained by the less stringent PCR amplification conditions. Despite those limitations, even a combination of PCR1 + PCR2 was able to detect a single clinically relevant species in some samples—we speculate that these were samples in which this species' DNA was the most abundant; probably, these were taken at the more advanced stages of the infection. PCR3 seems to be a more suitable method for screening BAL for fungi because it is less time-consuming due to direct sequencing and more robust with a lower risk of contaminant amplification. In our previously published study, we also proved that using more stringent PCR amplification conditions and high annealing temperature make the panfungal method more robust and less susceptible to detecting air-borne fungi (Bezdicsek et al. 2016). Compared to this study, the method published by Bezdicsek et al. is able to differentiate fungi reliably only at genus level and it fails to detect mucormycetes.

Furthermore, this study uncovered the spectrum of fungal species that can be detected in BAL samples and highlighted the importance of proper fungal PCR result interpretation. A similar spectrum of fungal species was obtained recently when NGS was used to study BAL samples (Bittinger et al. 2014). The findings of uncultured fungi were recorded also by other clinical studies using PCR targeting 18S rDNA (Mukhopadhyay et al. 2015) or ITS2 region (Zeller et al. 2017). The term “uncultured fungi” refers to sequences identified in GenBank as fungal, but of yet-uncharacterized origin (Underhill and Iliev 2014). Like unculturable bacteria in the microbiome, unculturable fungi comprise the largest part of the human mycobiome (Cui et al. 2013).

Despite the extensive laboratory work, in most samples, we were not able to unambiguously prove the fungal species responsible for the infection. There could be several explanations, either the pathogenic fungal species was cleared (e.g., due to empirical antimycotic therapy) or despite the fact that patients fulfilled criteria for probable or possible IFD, the cause of their pneumonia was not fungi.

Based on the results of this study, we would recommend that panfungal PCR is more appropriate to use in samples obtained from sterile sites. Its use for non-sterile sample (e.g., BALF) testing should be limited to situations when standard diagnostic procedures do not render a diagnosis, and a fungal infection is still expected by the clinician. In this situation, very sensitive methods are not desirable since these will very probably pick up numerous colonizing/contaminating fungal species besides pathogens. PCR data should be used in conjunction with other findings, including host factors, clinical manifestations, radiographic imaging, and other biomarkers (McCarthy and Walsh 2016). It is also important not to overemphasize the detection of fungi with uncertain pathogenicity. Their proof as causative agents should be accompanied by other laboratory methods' positive results (positive culture from sterile site or microscopy).

Funding information This study was supported by the Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of research organization (FNBr, 65269705), Grant Agency of the Masaryk University (MUNI/A/1105/2018), and Technology Agency of the Czech Republic (TE02000058).

Compliance with ethical standards

Conflict of interests ZR is a consultant and speaker for Astellas Pharma and Pfizer. The other authors declare that they have no relevant conflict of interest.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Alanio A, Bretagne S (2014) Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin Microbiol Infect* 20:36–41. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12617>
- Babouee B, Goldenberger D, Elzi L, Lardinois D, Sadowski-Cron C, Bubendorf L, Savic Prince S, Battegay M, Frei R, Weisser M (2013) Prospective study of a panfungal PCR assay followed by sequencing, for the detection of fungal DNA in normally sterile specimens in a clinical setting: a complementary tool in the diagnosis of invasive fungal disease? *Clin Microbiol Infect* 19:354–357. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12231>
- Bezdicsek M, Lengerova M, Ricna D, Weinbergerova B, Kocmanova I, Volfova P, Drgona L, Poczova M, Mayer J, Racil Z (2016) Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol* 54:714–724. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw032>
- Bittinger K, Charlson ES, Loy E, Shirley DJ, Haas AR, Laughlin A, Yi Y, Wu GD, Lewis JD, Frank I, Cantu E, Diamond JM, Christie JD, Collman RG, Bushman FD (2014) Improved characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-generation sequencing. *Genome Biol* 15:487. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0487-y>

- Boch T, Spiess B, Comely OA, Vehreschild JJ, Rath PM, Steinmann J, Heinz WJ, Hahn J, Krause SW, Kiehl MG, Egerer G, Liebrechts T, Koldehoff M, Klein M, Nolte F, Mueller MC, Merker N, Will S, Mossner M, Popp H, Hofmann WK, Reinwald M, Buchheidt D (2016) Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3- β -D-glucan, Aspergillus PCR, multifungal DNA-microarray, and Aspergillus azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: results of a prospective multicentre study. *Clin Microbiol Infect* 22:862–868. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.021>
- Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, Bernal-Martinez L, Prieto M, Garcia-Reyne A, Garcia-Rodriguez J, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M (2013) Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect* 19:271–277. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12110>
- Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M (2014) Performance of panfungal–and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 52:1737–1740. <https://doi.org/10.1128/JCM.00328-14>
- Chiu RWK, Murphy MF, Fidler C, Zee BCY, Wainscoat JS, Lo YMD (2001) Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin Chem* 47:667–672
- Cordonnier C, Robin C, Alanio A, Bretagne S (2014) Antifungal pre-emptive strategy for high-risk neutropenic patients: why the story is still ongoing. *Clin Microbiol Infect* 20:27–35. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12428>
- Cui L, Morris A, Ghedin E (2013) The human mycobiome in health and disease. *Genome Med* 5:63. <https://doi.org/10.1186/gm467>
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JÁP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813–1821. <https://doi.org/10.1086/588660>
- Dendis M, Horvath R, Michalek J, Ruzicka F, Grijalva M, Bartos M, Benedik J (2003) PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 9:1191–1202
- Douglas AP, Chen SCA, Slavin MA (2016) Emerging infections caused by non-Aspergillus filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect* 22:670–680. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.011>
- Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL (2001) Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 39:2873–2879
- Gomez CA, Budvytiene I, Zemek AJ, Banaei N (2017) Performance of targeted fungal sequencing for culture-independent diagnosis of invasive fungal disease. *Clin Infect Dis* 65:2035–2041. <https://doi.org/10.1093/cid/cix728>
- Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruellner F, Raggam RB, Posch V, Duettmann W, Hoenigl K, Wolfner A, Koidl C, Buzina W, Reinwald M, Thornton CR, Krause R, Buchheidt D (2014) Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 52:2039–2045. <https://doi.org/10.1128/JCM.00467-14>
- Khot PD, Fredricks DN (2009) PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 7:1201–1221. <https://doi.org/10.1586/eri.09.104>
- Landlinger C, Preuner S, Bašková L, van Grotel M, Hartwig NG, Dworzak M, Mann G, Attarbaschi A, Kager L, Peters C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, van den Heuvel-Eibrink MM, Lion T (2010) Diagnosis of invasive fungal infections by a real-time panfungal PCR assay in immunocompromised pediatric patients. *Leukemia* 24:2032–2038. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.209>
- Lengerova M, Kocmanova I, Hrnčirova K, Racil Z, Mayer J, Najvar L, Kirkpatrick W, Wiederhold N, Patterson T (2010) Use of nested quantitative PCR for monitoring of fungal burden in guinea pig model of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 50:602–608. <https://doi.org/10.1128/JCM.05356-11>
- Lengerova M, Racil Z, Hrnčirova K, Kocmanova I, Volfova P, Ricna D, Bejda P, Moulis M, Pavlovsky Z, Weinbergerova B, Toskova M, Mayer J (2014) Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 52:2824–2828. <https://doi.org/10.1128/JCM.00637-14>
- Marchesi F, Spadea A, Pimpinelli F, Prignano G, Paglia MG, Forcella D, Gumenyuk S, Renzi D, Palombi F, Vulcano A, Pisani F, Romano A, Papa E, Facciolo F, Ensoli F, Girmenia C, Mengarelli A (2017) The predictive value of aspergillus PCR testing on bronchoalveolar lavage fluid for early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematologic patients. *Leuk Lymphoma* 58:2943–2946. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1315116>
- McCarthy MW, Walsh TJ (2016) PCR methodology and applications for the detection of human fungal pathogens. *Expert Rev Mol Diagn* 16:1025–1036. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1219253>
- Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, Cassaing S, Chouaki T, Kauffmann-Lacroix C, Poirier P, Toubas D, Augereau O, Rocchi S, Garcia-Hemoso D, Bretagne S, Group FMS (2016) Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect* 22:810.e811–810.e818. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.006>
- Monteiro-da-Silva F, Araujo R, Sampaio-Maia B (2014) Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. *Med Mycol* 52:498–505. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu027>
- Mukhopadhyay I, Hansen R, Meharg C, Thomson JM, Russell RK, Berry SH, El-Omar EM, Hold GL (2015) The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect* 17:304–310. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.001>
- Pfeiffer C, Fine J, Safdar N (2006) Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 42:1417–1427. <https://doi.org/10.1086/503427>
- Richardson M, Lass-Flörl C (2008) Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 14:5–24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB, List FBCA (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Shin JH, Ranken R, Sefers SE, Lovari R, Quinn CD, Meng S, Carolan HE, Toleno D, Li H, Lee JN, Stratton CW, Massire C, Tang YW (2013) Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51:136–141. <https://doi.org/10.1128/JCM.01907-12>

- Springer J, Goldenberger D, Schmidt F, Weisser M, Wehrle-Wieland E, Einsele H, Frei R, Löffler J (2016) Development and application of two independent real-time PCR assays to detect clinically relevant Mucorales species. *J Med Microbiol* 65:227–234. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000218>
- Sugawara Y, Nakase K, Nakamura A, Ohishi K, Sugimoto Y, Fujieda A, Monma F, Suzuki K, Masuya M, Matsushima Y, Wada H, Nobori T, Katayama N (2013) Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. *Eur J Haematol* 90:331–339. <https://doi.org/10.1111/ejh.12078>
- Trubiano JA, Dennison AM, Morrissey CO, Chua KY, Halliday CL, Chen SC, Spelman D (2016) Clinical utility of panfungal polymerase chain reaction for the diagnosis of invasive fungal disease: a single center experience. *Med Mycol* 54:138–146. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv092>
- Underhill DM, Iliev ID (2014) The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol* 14:405–416. <https://doi.org/10.1038/nri3684>
- Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza O, Buitrago MJ (2016) New panfungal real-time PCR assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 54:2910–2918. <https://doi.org/10.1128/JCM.01580-16>
- Zeller I, Schabereiter-Gurtner C, Mihalits V, Selitsch B, Barousch W, Hirschl AM, Makristathis A, Willinger B (2017) Detection of fungal pathogens by a new broad range real-time PCR assay targeting the fungal ITS2 region. *J Med Microbiol* 66:1383–1392. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000575>

4.1.4. Annex 27

Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Verga L., Višek B., Ilhan O., Nadali G., Weinbergerová B., Córdoba-Mascuñano R., Marchetti M., Collins GP., Farina F., Cattaneo C., Cabirta A., Gomes-Silva M., Itri F., van Doesum J., Ledoux MP., Čerňan M., Jakšić O., Duarte RF., Magliano G., Omrani AS., Fracchiolla NS., Kulasekararaj A., Valković T., Poulsen CB., Machado M., Glenthøj A., Stoma I., Ráčil Z., Piukovics K., Navrátil M., Emarah Z., Sili U., Maertens J., Blennow O., Bergantim R., García-Vidal C., Prezioso L., Guidetti A., Del Principe MI., Popova M., de Jonge N., Ormazabal-Vélez I., Fernández N., Falces-Romero I., Cuccaro A., Meers S., Buquicchio C., Antić D., Al-Khabori M., García-Sanz R., Biernat MM., Tisi MC., Sal E., Rahimli L., Čolović N., Schönlein M., Calbacho M., Tascini C., Miranda-Castillo C., Khanna N., Méndez GA., Petzer V., Novák J., Besson C., Duléry R., Lamure S., Nucci M., Zambrotta G., Žák P., Seval GC., Bonuomo V., Mayer J., López-García A., Sacchi MV., Booth S., Ciceri F., Oberti M., Salvini M., Izuzquiza M., Nunes-Rodrigues R., Ammatuna E., Obr A., Herbrecht R., Núñez-Martín-Buitrago L., Mancini V., Shwaylia H., Sciumè M., Essame J., Nygaard M., Batinić J., Gonzaga Y., Regalado-Artamendi I., Karlsson LK., Shapetska M., Hanakova M., El-Ashwah S., Borbényi Z., Çolak GM., Nordlander A., Dragonetti G., Maraglino AME., Rinaldi A., De Ramón-Sánchez C., Cornely OA.; EPICOVIDEHA working group. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):168. doi: 10.1186/s13045-021-01177-0. ISSN 17568722.

IF = 17,388 v roce 2020; ONCOLOGY Q1, HEMATOLOGY Q1; 4 citace dle WOS či Scopus, bez autocitací

RESEARCH

Open Access



COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA)

Livio Pagano^{1,2,†}, Jon Salmanton-García^{3,4,†}, Francesco Marchesi⁵, Alessandro Busca⁶, Paolo Corradini⁷, Martin Hoenig^{8,9,10}, Nikolai Klimko¹¹, Philipp Koehler^{3,4}, Antonio Pagliuca¹², Francesco Passamonti¹³, Luisa Verga^{14,15}, Benjamin Višek¹⁶, Osman Ilhan¹⁷, Gianpaolo Nadali¹⁸, Barbora Weinbergerová¹⁹, Raúl Córdoba-Masculano²⁰, Monia Marchetti²¹, Graham P. Collins²², Francesca Farina²³, Chiara Cattaneo²⁴, Alba Cabrita^{25,26}, Maria Gomes-Silva²⁷, Federico Itri²⁸, Jaap van Doesum²⁹, Marie-Pierre Ledoux³⁰, Martin Čerňan³¹, Ozren Jakšić³², Rafael F. Duarte³³, Gabriele Magliano³⁴, Ali S. Omrani³⁵, Nicola S. Fracchiolla³⁶, Austin Kulasekararaj^{37,38}, Toni Valković^{39,40,41}, Christian Bjørn Poulsen⁴², Marina Machado⁴³, Andreas Glenthøj⁴⁴, Igor Stoma⁴⁵, Zdeněk Ráčil⁴⁶, Klára Piukovics⁴⁷, Milan Navrátil⁴⁸, Ziad Emarah⁴⁹, Uluhan Sili⁵⁰, Johan Maertens⁵¹, Ola Blennow⁵², Rui Bergantim^{53,54,55,56}, Carolina García-Vidal⁵⁷, Lucia Prezioso⁵⁸, Anna Guidetti⁵⁹, Maria Ilaria del Principe⁶⁰, Marina Popova⁶¹, Nick de Jonge⁶², Irati Ormazabal-Vélez⁶³, Noemí Fernández⁶⁴, Iker Falces-Romero⁶⁵, Annarosa Cuccaro⁶⁶, Stef Meers⁶⁷, Caterina Buquicchio⁶⁸, Darko Antić^{69,70}, Murtadha Al-Khabori⁷¹, Ramón García-Sanz^{72,73}, Monika M. Biernat⁷⁴, Maria Chiara Tisi⁷⁵, Ertan Sal^{3,4}, Laman Rahimli^{3,4}, Natasa Čolović^{69,70}, Martin Schönlein⁷⁶, Maria Calbacho⁷⁷, Carlo Tascini⁷⁸, Carolina Miranda-Castillo⁷⁹, Nina Khanna⁸⁰, Gustavo-Adolfo Méndez⁸¹, Verena Petzer⁸², Jan Novák⁸³, Caroline Besson⁸⁴, Rémy Duléry⁸⁵, Sylvain Lamure⁸⁶, Marcio Nucci⁸⁷, Giovanni Zambrotta^{14,15}, Pavel Žák¹⁶, Guldane Cengiz Seval¹⁷, Valentina Bonuomo¹⁸, Jiří Mayer¹⁹, Alberto López-García⁸⁸, Maria Vittoria Sacchi²¹, Stephen Booth²², Fabio Ciceri²³, Margherita Oberti²⁴, Marco Salvini¹³, Macarena Izuzquiza^{25,26}, Raquel Nunes-Rodrigues²⁷, Emanuele Ammatuna²⁹, Aleš Obr³¹, Raoul Herbrecht³⁰, Lucía Núñez-Martín-Buitrago³³, Valentina Mancini³⁴, Hawraa Shwaylia⁸⁹, Mariarita Sciumè³⁶, Jenna Essame³⁷, Marietta Nygaard⁴², Josip Batinic^{40,90,91}, Yung Gonzaga⁹², Isabel Regalado-Artamendi⁹³, Linda Katharina Karlsson⁴⁴, Maryia Shapetska⁹⁴, Michaela Hanakova⁴⁶, Shaimaa El-Ashwah⁴⁹, Zita Borbényi⁴⁷, Gökçe Melis Çolak⁵⁰, Anna Nordlander^{52,95}, Giulia Dragonetti^{1,2}, Alessio Maria Edoardo Maraglino^{1,2}, Amelia Rinaldi⁵⁸, Cristina De Ramón-Sánchez⁹⁶ and Oliver A. Cornely^{3,97,98,99,100} on behalf of EPICOVIDEHA working group

*Correspondence: Livio.Pagano@unicatt.it

[†]Livio Pagano and Jon Salmanton-García have contributed equally to this work

¹Hematology, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli - IRCCS - Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Abstract

Background: Patients with hematological malignancies (HM) are at high risk of mortality from SARS-CoV-2 disease 2019 (COVID-19). A better understanding of risk factors for adverse outcomes may improve clinical management in these patients. We therefore studied baseline characteristics of HM patients developing COVID-19 and analyzed predictors of mortality.

Methods: The survey was supported by the Scientific Working Group Infection in Hematology of the European Hematology Association (EHA). Eligible for the analysis were adult patients with HM and laboratory-confirmed COVID-19 observed between March and December 2020.

Results: The study sample includes 3801 cases, represented by lymphoproliferative (mainly non-Hodgkin lymphoma $n = 1084$, myeloma $n = 684$ and chronic lymphoid leukemia $n = 474$) and myeloproliferative malignancies (mainly acute myeloid leukemia $n = 497$ and myelodysplastic syndromes $n = 279$). Severe/critical COVID-19 was observed in 63.8% of patients ($n = 2425$). Overall, 2778 (73.1%) of the patients were hospitalized, 689 (18.1%) of whom were admitted to intensive care units (ICUs). Overall, 1185 patients (31.2%) died. The primary cause of death was COVID-19 in 688 patients (58.1%), HM in 173 patients (14.6%), and a combination of both COVID-19 and progressing HM in 155 patients (13.1%). Highest mortality was observed in acute myeloid leukemia (199/497, 40%) and myelodysplastic syndromes (118/279, 42.3%). The mortality rate significantly decreased between the first COVID-19 wave (March–May 2020) and the second wave (October–December 2020) (581/1427, 40.7% vs. 439/1773, 24.8%, p value < 0.0001). In the multivariable analysis, age, active malignancy, chronic cardiac disease, liver disease, renal impairment, smoking history, and ICU stay correlated with mortality. Acute myeloid leukemia was a higher mortality risk than lymphoproliferative diseases.

Conclusions: This survey confirms that COVID-19 patients with HM are at high risk of lethal complications. However, improved COVID-19 prevention has reduced mortality despite an increase in the number of reported cases.

Keywords: COVID-19, Pandemic, Hematological malignancies, Epidemiology, EHA

Background

Coronavirus disease 19 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) in March 2020 [1]. During that year, COVID-19 spread worldwide, causing over 1.5 million deaths. Patients with hematological malignancies (HM) are considered at high risk of developing severe and life-threatening infections, because of immune deficiency and immunosuppressive treatments. Severe infections in HM patients can determine a worsening of the clinical outcome, potentially affecting life expectancy. SARS-CoV-2 affects HM patients disproportionately, leading often to severe COVID-19 with a high mortality rate [2]. So far, various reports have been published on COVID-19 HM patients, but in most cases on small patient cohorts [3–8], specific HM [9–12], or larger reports from single countries [13–16]. In June 2021, an ongoing worldwide registry of the American Society of Hematology (ASH) reported a total of 1013 cases of COVID-19 infections in HM [17]. Altogether, these data show a significant mortality rate, ranging between 13.8 and 39%, and highlighting the major relevance of COVID-19 management in this frail patient population [3–17]. Advanced disease, one or more co-morbidities, older age, type of

malignancy, in particular acute myeloid leukemia (AML), and several laboratory parameters, for example high C-reactive protein, lymphopenia, and neutropenia, were found to be risk factors for COVID-19 in HM patients [14–16]. A possible role of some antineoplastic drugs has been reported to be protective in patients with myeloproliferative disorders [18, 19]. Despite the current spread of vaccination programs among HM patients in several countries, the future trajectory of this pandemic seems still to be uncertain. Collecting further data and gaining a better knowledge about COVID-19 in HM is therefore relevant for hematologists around the world.

The EPICOVIDEHA, Epidemiology of COVID-19 Infection in Patients with Hematological Malignancies: A European Hematology Association Survey, multinational project aimed to collect COVID-19 cases occurring in HM patients in 2020, and was performed on behalf of the Scientific Working Group Infection in Hematology of the European Hematology Association (EHA). The objective was to assess epidemiology and outcomes of COVID-19 in HM patients.

Methods

Study design and patients

EPICOVIDEHA is an international open web-based registry for patients with HM infected with SARS-CoV-2

[20]. The survey has been approved by the Institutional Review Board and Ethics Committee of the Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli—IRCCS, Università Cattolica del Sacro Cuore of Rome, Italy (Study ID: 3226). The corresponding local ethics committee of each participating institution has approved the EPICOVIDEHA study when applicable. EPICOVIDEHA has been registered at www.clinicaltrials.gov with the identifier NCT04733729. Different medical hematology societies have joined this project (Additional file 1: Table 1). Participating institutions documented episodes of COVID-19 in their patients with baseline HM between March 2020 and December 2020. Data were collected via the EPICOVIDEHA electronic case report form (eCRF), available at www.clinicalsurveys.net. This online survey is provided by EFS Fall 2018 (Questback, Cologne, Germany).

Procedures

Experts at the University Hospital Cologne, Cologne, Germany, with previous experience in the research and study of HM and infectious diseases, reviewed each case included in the registry, for completeness and consistency. Each patient was reviewed for validity following the inclusion criteria: (a) HM (excluding non-malignant hematological disorders or solid tumors), (b) malignancy with activity during the 5 years before COVID-19 (either diagnosis or treatment), (c) patient over 18 years of age, (d) hematological diagnosis before COVID-19, and (e) laboratory diagnosis for COVID-19 (not clinical diagnosis). Data on patients' demographic characteristics and baseline conditions before COVID-19 were collected. Additional variables, such as type of COVID-19 test, the reason for COVID-19 test, admission to ICU after COVID-19, day of death, and cause of death were collected.

The diagnosis of COVID-19 was made according to the international recommendations of the WHO [21]. At the time of the survey design, no well-defined criteria were yet available to establish a degree of infection severity. Therefore, the following definitions have been included: asymptomatic (no clinical signs or symptoms); mild (non-pneumonia and mild pneumonia); severe (dyspnea, respiratory frequency ≥ 30 breaths per min, $SpO_2 \leq 93\%$, $PaO_2/FiO_2 < 300$, or lung infiltrates $> 50\%$), and critical (patients admitted in intensive care for respiratory failure, septic shock, or multiple organ dysfunction or failure). However, our grading definition was very similar to the one suggested by the China Centers for Disease Control and Prevention definitions [22]. Overall case-fatality rate (overall mortality) was defined as the proportion of deaths for any cause compared to the total number of patients registered

during the observation time. Attributable or contributable deaths were defined on the basis of subjective judgment of the local physician.

Study objectives

The primary objective of this study was to assess the epidemiology and the outcome of HM affected by COVID-19. Secondary objectives were: (1) to estimate the prevalence of disease severity (i.e., asymptomatic, mild, severe disease); (2) to evaluate the prevalence of ICU admission; (3) to estimate the frequency of pre-existing co-morbidities; (4) to evaluate the overall case-fatality rate; (5) to assess geographical patterns of the disease; (6) to stratify patients according to treatment of the underlying HM (off/on) and according to type of therapy (i.e., chemotherapy, immunotherapy, targeted therapy, hematopoietic stem cell transplant [HSCT]).

Statistical analysis

The primary analysis describes the demographic and clinical characteristics of patients with COVID-19 after a previous HM diagnosis. Categorical variables are presented with frequencies and percentages, and continuous variables with median, interquartile range (IQR) and absolute range. The secondary analysis studies independent predictors of overall mortality in hematological patients with COVID-19, by employing a Cox proportional hazard model. Univariable Cox regression model was performed with variables suspected to play a role in the mortality of HM patients with COVID-19 (i.e. sex [reference female], age, malignancy status [reference controlled disease], hematological malignancy [reference Hodgkin lymphoma], COVID-19 infection [reference asymptomatic], ICU stay, chronic cardiopathy, liver disease, chronic pulmonary disease, diabetes mellitus, obesity, renal impairment, smoking history, neutrophils [reference ≤ 500 units/ mm^3], lymphocytes [reference ≤ 200 units/ mm^3], and last chemotherapy [reference > 3 months before COVID-19]). Variables with a p -value ≤ 0.1 were considered for multivariable analysis. A multivariable Cox regression model was calculated with the Wald backward method, and only those variables that were statistically significant displayed. Mortality was analyzed using Kaplan–Meier survival plots. Log-rank test was used to compare the survival probability of the patients included in the different models, based on COVID-19 severity, baseline malignancy, pandemic wave, and HSCT/non-HSCT. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant. No a priori sample size calculation was done for this exploratory study. SPSSv25.0 was employed for statistical analyses (SPSS, IBM Corp., Chicago, IL, United States).

Role of funding source

The funder of the study had no role in study design, data analysis, and interpretation, or writing of the report. All authors had full access to the data and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

A total of 132 centers in 32 countries participated in this survey (Fig. 1, Additional file 2: Tables 2), and registered 4117 cases. Of these, 316 (7.7%) were excluded for the following reasons: age < 18 years old, clinical diagnosis of COVID-19, double-entry, non-malignant hematological diseases, incomplete information, more than 5 years off-therapy from the last chemotherapy, or solid cancer.

The demographic and clinical characteristics of 3801 valid cases are reported in Table 1. There was a higher prevalence of males ($n = 2222$, 58.5%) and Caucasian ethnic background ($n = 3289$, 86.5%). The median age was 65 years (IQR: 54–74; range 18–95).

Patients with non-Hodgkin lymphoma (NHL) represented the largest subgroup ($n = 1084$, 28.5%), followed by patients with multiple myeloma (MM) ($n = 684$, 18%) and those with AML ($n = 497$, 13.1%). Overall, 67.3% of the patients who developed COVID-19 had a baseline lymphoproliferative disease ($n = 2557$) (Table 1). More than 51% of the patients had active disease ($n = 1963$), and 2502 patients (65.8%) had received chemotherapy in the 3 months before the onset of COVID-19 (Table 2). The most frequent treatments were chemotherapy with immunotherapy or immunotherapy alone administered to 983 patients (25.9%), compatible with the proportion of patients with NHL. In 271 patients (7.1%), the infection occurred concomitantly with the diagnosis of HM,

and in 138 of those (50.9%) before treatment initiation for the baseline malignancy (Table 1). Five hundred fifty-seven patients (14.7%) had a transplant procedure performed in their clinical history (292 autologous HSCT [auto-HSCT] and 265 allogeneic HSCT [allo-HSCT]). In 247 patients, 173 allo-HSCT and 74 auto-HSCT recipients, the transplant procedure was the last therapy before COVID-19 infection. In total 24 patients in the registry were treated with chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells reinfusion, of which 3 patients had been treated with additional therapies after the CAR-T cell therapy (Table 2).

Overall, 2304 (60.6%) patients had at least one comorbidity, with cardiovascular diseases being most frequent ($n = 1146$, 30.1%). In 447 patients (12.5%) smoking history was reported (Table 1).

At the onset of COVID-19 infection, 280 patients (7.4%) had neutrophils below $0.5 \times 10^9/\text{mm}^3$, and 344 patients (9.1%) lymphocytes below $0.2 \times 10^9/\text{mm}^3$ (Table 3).

SARS-CoV-2 infection was diagnosed by nasopharyngeal swab in almost all patients ($n = 3700$, 97.3%). COVID-19 tests were performed in 3027 patients (79.6%) because of pulmonary and/or extrapulmonary symptoms, and in 727 patients (19.1%) as part of asymptomatic screening. Reason for testing was unknown in 47 (1.2%). Presence of respiratory symptoms, mainly cough and dyspnea, was the most frequent clinical presentation, reported in 2285 (60.1%), and in 831 of them (21.9%) it was combined with extrapulmonary symptoms. In 742 patients (19.5%) extrapulmonary symptoms, in particular anosmia, diarrhea,



Fig. 1 Geographical distribution of patient reported to EPICOVIDEHA

Table 1 Demographic and clinical characteristics of enrolled patients at COVID-19 diagnosis

	n	%
Sex		
Female	1579	41.5
Male	2222	58.5
Age, median (IQR) [range]	65 (54–74), [18–95]	
Comorbidities		
Chronic cardiopathy	1146	30.1
Chronic pulmonary disease	614	16.2
Diabetes mellitus	620	16.3
Liver disease	167	4.4
Obesity	345	9.1
Renal impairment	325	8.6
Smoking history	477	12.5
No risk factor identified	1463	38.5
Baseline hematological malignancies		
Acute lymphoid leukemia	169	4.4
Chronic lymphoid leukemia	474	12.5
Acute myeloid leukemia	497	13.1
Chronic myeloid leukemia	161	4.2
Myelodysplastic syndrome	279	7.3
Low-intermediate risk	138	3.6
High risk	48	1.3
Not stated	93	2.4
Hairy cell leukemia	23	0.6
Hodgkin lymphoma	135	3.6
Non-Hodgkin lymphoma	1084	28.5
Indolent	497	13.1
Aggressive	516	13.6
Not stated	71	1.9
Essential thrombocythemia	69	1.8
Myelofibrosis	122	3.2
Polycythemia vera	70	1.8
Systemic mastocytosis	6	0.2
Multiple myeloma	684	18.0
Amyloidosis	8	0.2
Aplastic anemia	20	0.5
Status^a		
Controlled disease	1760	46.3
Complete remission	1170	30.8
Partial remission	590	15.5
Active disease	1963	51.6
Onset	888	23.4
Refractory/Resistant	473	12.4
Stable disease	524	13.8
Unknown	78	2.1
Unknown	78	2.1

Data can be super additive

^a Onset patients had a contemporaneous diagnosis of the malignancy and the COVID-19, regardless of malignancy treatment initiation. Stable disease patients include patients at watch and wait

Table 2 Summary of received treatments for Hematological Malignancies at the onset of COVID-19

	n	%
Last/ongoing treatment strategy before COVID-19		
Immunotherapy	857	22.5
Targeted therapy ^a	607	16.0
Conventional chemotherapy	597	15.7
No treatment	538	14.1
Palliative/supportive measures	226	6.0
Immunomodulators	218	5.7
Allogeneic HSCT	173	4.6
Anagrelide/Hydroxyurea	145	3.8
Hypomethylating agents	141	3.7
Immunotherapy only	125	3.3
Autologous HSCT	74	1.9
Unknown	41	1.1
Other	28	0.7
CAR-T	21	0.6
Radiotherapy	10	0.3
Summary of received treatment^b		
Chemotherapy	3178	83.6
In the last month	1979	52.1
In the last 3 months	523	13.8
Treatment ended > 3 months	631	16.6
Not stated	45	1.2
Radiotherapy	186	4.9
Allogeneic HSCT	265	7.0
Autologous HSCT	292	7.7
CAR-T	24	0.6
Other strategies	150	3.9
No treatment	538	14.2

HSCT Hematopoietic stem cell transplantation, CAR-T chimeric antigen receptor T-cell therapies

^a Bortezomib, Ibrutinib, idelalisib, ruxolitinib, TKI (tyrosine kinase inhibitors), and venetoclax

^b Data can be super-additive

skin rash, were predominant in terms of clinical presentation (Table 3).

COVID-19 infection was determined to be critical in 689 patients (18.1%), severe in 1736 (45.7%), mild in 658 (17.3%), and asymptomatic in 675 (17.8%) (Table 3).

Overall, 2778 patients (73.1%) were hospitalized. The median duration of overall hospitalization was 15 days (IQR: 8–27, range 1–235), regardless of patient outcome. Among the hospitalized patients, 689 (18.1%) required hospitalization in an ICU, 449 of these (65.2%) with invasive mechanical ventilation (MV) (Table 3).

Altogether, during the observation phase, 1185 patients (31.2%) died. The primary cause of death was COVID-19 in 688 patients (58.1%), HM in 173 patients (14.6%), and

Table 3 Clinical features of COVID-19 in our patient cohort

	<i>n</i>	%
<i>COVID-19 infection</i>		
Asymptomatic	675	17.8
Mild	658	17.3
Severe	1736	45.7
Critical	689	18.1
Unknown	43	1.1
<i>COVID-19 test sample^a</i>		
BAL	60	1.6
SARS-CoV-2 nasopharyngeal swab	3700	97.3
SARS-CoV-2 serology	86	2.3
<i>Reason for COVID-19 test^a</i>		
Pulmonary symptoms	1454	38.3
Pulmonary + extrapulmonary symptoms	831	21.9
Extrapulmonary symptoms	742	19.5
Screening	727	19.1
Unknown	47	1.2
<i>Neutrophils level at COVID-19 diagnosis^b</i>		
$\leq 0.5 \times 10^9/\text{mm}^3$	280	7.4
$0.501-0.999 \times 10^9/\text{mm}^3$	217	5.7
$\geq 1 \times 10^9/\text{mm}^3$	2738	72.0
<i>Lymphocytes level at COVID-19 diagnosis^b</i>		
$\leq 0.2 \times 10^9/\text{mm}^3$	344	9.1
$0.201-0.499 \times 10^9/\text{mm}^3$	538	14.2
$\geq 0.5 \times 10^9/\text{mm}^3$	2367	62.3
<i>Stay during COVID-19</i>		
Admitted to hospital	2778	73.1
Length of hospital stay, median (IQR) [range]	15 (8-27), [1-235]	-
ICU	689	18.1
Length of ICU stay, median (IQR) [range]	11 (5-20), [1-111]	-
Invasive MV	449	11.8
Non-invasive MV	221	5.8
<i>Clinical outcome of COVID-19</i>		
Death	1185	31.2
Observation time, median (IQR) [range]	89 (21-172), [0-436]	-
<i>Reason for death^a</i>		
Not related to COVID-19	125	3.3
Contributable by COVID-19	155	4.1
Attributable to COVID-19	843	22.2
Attributable to HM	328	8.6
Death due to other reasons	123	3.2
Death due to unknown reasons	78	2.1

BAL Bronchoalveolar lavage, COVID-19 coronavirus disease 19, HM hematological malignancy, ICU intensive care unit, MV mechanical ventilation, SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

^a Data can be super additive

^b Data not available in all patients

a combination of both COVID-19 and progressing HM in 155 patients (13.1%). In the remaining cases the cause was unknown or due to other reasons.

Patients over the age of 70 years had the highest mortality (661/1475, 44.8%). Considering the different HM, the higher number of fatalities was observed in AML (199/497, 40%) and in myelodysplastic syndromes (MDS)

Table 4 Overall mortality rate by disease and treatment received

	Overall mortality	
	Survived n (%)	Died n (%)
<i>Baseline hematological malignancies</i>		
Acute lymphoid leukemia	125 (74)	44 (26)
Chronic lymphoid leukemia	340 (71.7)	134 (28.3)
Acute myeloid leukemia	298 (60)	199 (40)
Chronic myeloid leukemia	144 (89.5)	17 (10.5)
Myelodysplastic syndrome	161 (57.7)	118 (42.3)
Low-intermediate risk	77 (55.8)	61 (44.2)
High risk	26 (54.2)	22 (45.8)
Not stated	58 (62.4)	35 (37.6)
Hairy cell leukemia	15 (65.2)	8 (34.8)
Hodgkin lymphoma	120 (88.9)	15 (11.1)
Non-Hodgkin lymphoma	739 (68.2)	345 (31.8)
Indolent	354 (71.3)	143 (28.7)
Aggressive	337 (65.3)	179 (34.7)
Not stated	48 (67.6)	23 (32.4)
Essential thrombocythemia	57 (82.6)	12 (17.4)
Myelofibrosis	77 (63.1)	45 (36.9)
Polycythemia vera	56 (80)	14 (20)
Systemic mastocytosis	5 (83.4)	1 (16.6)
Multiple Myeloma	458 (67)	226 (33)
Amyloidosis	7 (87.5)	1 (12.5)
Aplastic anemia	14 (70)	6 (30)
<i>Last/ongoing treatment strategy before COVID-19</i>		
Anagrelide/Hydroxyurea	106 (73.1)	39 (26.9)
Conventional chemotherapy	423 (70.9)	174 (29.1)
Hypomethylating agents	58 (41.2)	83 (58.8)
Immunotherapy only	89 (71.2)	36 (28.8)
Immunotherapy	595 (69.4)	262 (30.6)
Immunomodulators	139 (63.8)	79 (36.2)
Targeted therapy ^a	453 (74.6)	154 (25.4)
Allogeneic HSCT	130 (75.2)	43 (24.8)
Autologous HSCT	54 (73)	20 (27)
CAR-T	11 (52.4)	10 (47.6)
Radiotherapy	9 (90)	1 (10)
Palliative/supportive measures	122(56)	104 (46)
Other	17 (60.7)	11 (39.3)
Unknown	28 (68.3)	13 (31.7)
No treatment	382 (71)	156 (29)

HSCT Hematopoietic stem cell transplantation, CAR-T chimeric antigen receptor T-cell therapies

^a Bortezomib, ibrutinib, idelalisib, ruxolitinib, TKI (tyrosine kinase inhibitors) and venetoclax

(118/279, 42.3%) (Table 4). Mortality in AML/MDS was significantly higher when compared to mortality in other HM ($p < 0.0001$) (Fig. 2).

Regarding last underlying treatments for HM before COVID-19, the highest mortality rate was observed among

patients receiving demethylating agents (83/141, 58.9% [95% confidence interval [CI] 50.6–66.7]) and in palliative treatment settings (104/226, 46% [95%CI 39.4–52.5]). Despite the small number of patients undergoing CAR-T reinfusion, mortality rate in these patients was high (47.6% [95% CI 28.3–67.6]; 10/21 patients). Patients undergoing auto-HSCT or allo-HSCT had mortality rates of 27% ([95% CI 18.2–38.1] 20/74 cases) and 24.8% ([95% CI 19.0–31.8] 43/173 cases), respectively (Table 4). The mortality rate of patients who received a transplant as most recent therapy was significantly lower when compared to non-transplant patients ($p < 0.027$) (Fig. 3).

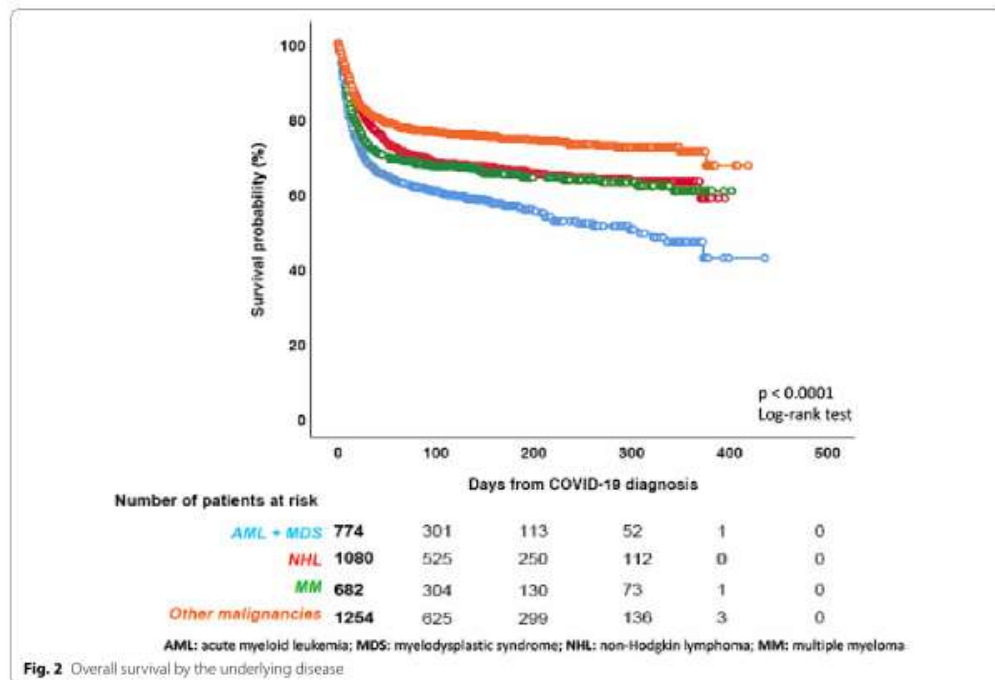
Patients with critical COVID-19 (63.6% [95% CI 59.9–67.1, 438/689]) died in a higher proportion than those with severe (30.3% [95% CI 28.2–32.5, 526/1736]), $p < 0.0001$ or mild infection (16.7% [95% CI 14.1–19.8, 110/658]), $p < 0.0001$. The mortality rate observed in patients with severe infection 30.3% ([95% CI 28.2–32.5] 526/1736), was significantly higher than reported in patients with mild COVID-19 (16.7% [95% CI 14.1–19.8] 110/658), $p < 0.0001$. The mortality in mildly symptomatic patients was not vastly different from that observed in initially asymptomatic patients: 15.4% ([95% CI 12.9–18.3] 104/675) $p = 0.516$ (Fig. 4, Additional file 3: Table 3). Clinical presentation with pulmonary symptoms was associated with a significantly higher mortality rate versus presentation with extrapulmonary symptomatology alone (mortality rate 876/2285, 38.3% [95% CI 36.4–40.4] vs. 163/742, 22.0% [95% CI 19.1–25.1], $p < 0.0001$).

A higher mortality rate was reported for patients admitted to ICU (438/689, 63.5% [95% CI 59.9–67.1]), compared to non-ICU patients (747/3112, 24% [95% CI 22.5–25.5]) $p < 0.0001$. Furthermore, among the ICU patients, a significantly higher mortality rate was observed in patients with invasive MV versus those without (322/449, 71.7% [95% CI 67.4–75.7] vs. 116/240, 48.3% [95% CI 42.1–54.6] $p < 0.0001$).

Considering the two waves of COVID-19 (1st wave March–May 2020, 2nd wave October–December 2020), there was a significant decrease in the mortality rate in the second wave (581/1427, 40.7% [95% CI 38.2–43.3] vs. 439/1773, 24.8% [95% CI 22.8–26.8] $p < 0.0001$) (Fig. 5). The reduction of mortality was consistent across different HM diagnoses (Fig. 6).

In the univariable Cox regression analysis, multiple factors negatively influenced mortality (Table 5). Conversely, having a neutrophil count greater than $0.5 \times 10^9/\text{mm}^3$ or a lymphocyte count greater than $0.2 \times 10^9/\text{mm}^3$ were found to be protective.

In the multivariable analysis the following parameters were significantly associated with higher mortality: age increase, active disease, chronic cardiopathy, liver



disease, renal impairment, smoking history, and ICU stay. Among HM, AML is the malignancy associated with a significantly high mortality (Table 5).

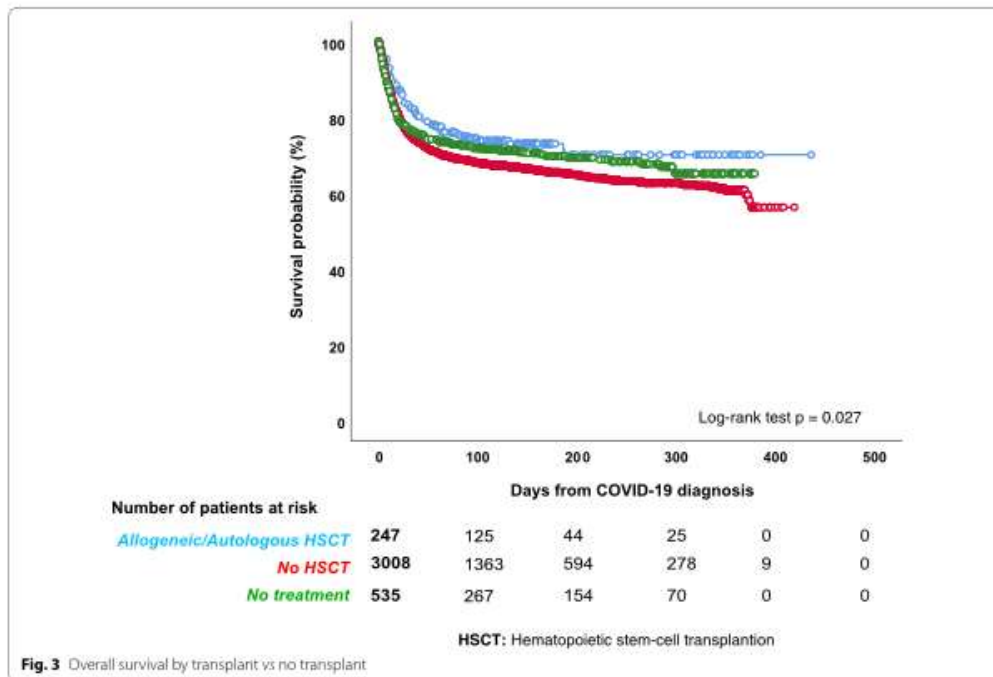
Discussion

The incidence of COVID-19 infection in HM ranges between 1 and 3.9% [23]. Mostly, patients get infected in the community, although in 1.1% to 15% of infections nosocomial transmissions are reported [24]. A clear correlation between the type of HM and the incidence of COVID-19 infection has not been described in the literature, but current data indicate that lymphoproliferative disorders, in particular NHL, chronic lymphocytic leukemia, and MM are particularly associated with higher risk from COVID-19.

Here we presented a large survey on COVID-19 among HM patients, with almost 4000 patients reported from 132 hematology institutions mainly located in Europe. In addition, this survey has collected COVID-19 cases from March to December 2020, allowing us to analyze not only which patients were at risk, but also how the infectious process has evolved over time. Our data confirm that a larger number of COVID-19 cases was diagnosed among

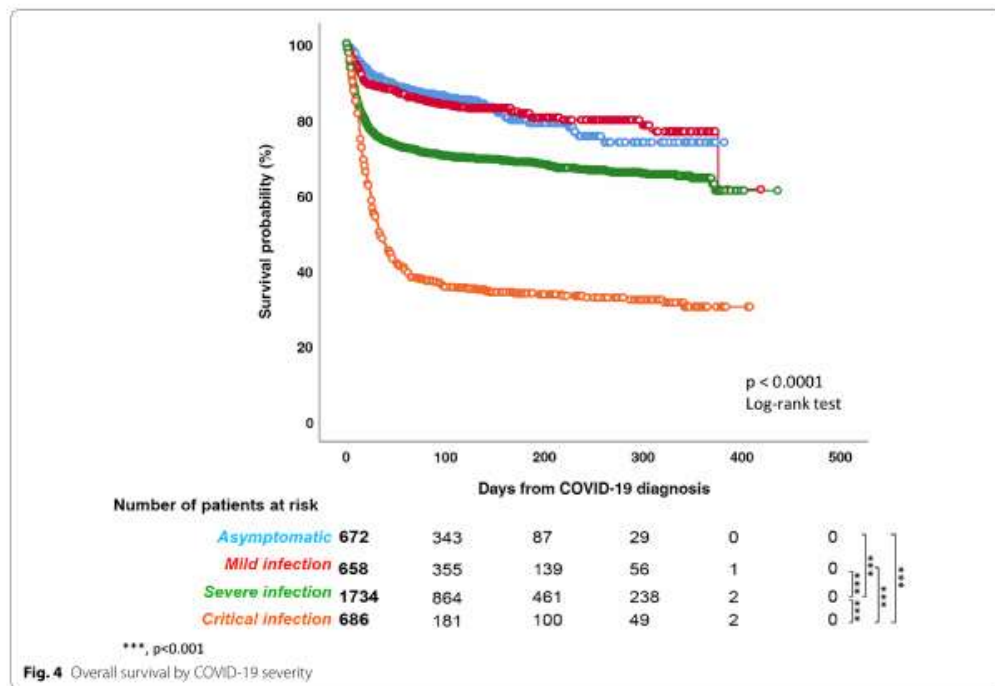
patients with lymphoproliferative disorders, in particular NHL and MM, as previously documented [9, 10]. However, we also observed a high number of COVID-19 among patients with AML (12.5%), which is considered a rare malignancy. As for comorbidities, our patient population reflects the overall population, with cardiovascular diseases being the most frequent comorbidity reported [16]. Most of the patients recorded in our survey had a severe/critical clinical presentation of COVID-19 (about 60%), over two-thirds were hospitalized and about 18% required ICU admission. These data are not surprising and emphasize the frailty of HM patients, and are slightly higher compared with those reported in the literature, ranging between 15.5 to 52.4% and 6.9 to 14% for severe and critical clinical presentation, respectively [3–17].

The overall and the attributable mortality rates observed in our study (31.2% and 22.2%, respectively) are within the range of those reported in the literature among HM (published reports are summarized in Additional file 4: Table 4), confirming that COVID-19 mortality is significantly higher in HM patients than in the overall population, where current data show a mortality rate ranging between 0.1 and 9.4% across the different countries around the world (www.coronavirus.jhu.edu/data/



mortality). Moreover, as expected, the overall mortality rate has been age-dependent, with higher mortality rates observed among patients aged over 70 years. In line with other studies [7, 14, 16], our data have shown that AML and MDS patients, especially those with high-risk MDS, have the worst clinical outcome and the highest mortality rate (up to 45%). In fact, AML was the only that was independently associated with mortality in our multivariable model. A recently published study focusing only on AML patients reported an overall mortality very similar to that described in our study [25]. There are several possible explanations of this phenomenon. First, patients with AML/MDS are often aged over than 65 years old. Second, they present a profound immunodeficiency as a consequence of both disease and treatments received. Third, they are patients in which a treatment delay is often not possible due to the urgent need of starting an active therapy. This last aspect is quite relevant, especially if we consider that a lower mortality in patients who delayed AML treatment was described compared to those with and without treatment modification [25]. In high-risk MDS patients, treatment with demethylating agents was associated with a particularly high mortality rate. Our study highlights the role of these agents as

being potentially associated with high mortality in AML/MDS patients with COVID-19. Our data also showed that patients undergoing HSCT (either autologous or allogeneic) presented a significantly lower mortality rate following COVID-19, compared to non-transplant patients. We report an overall mortality rate of 24.8% and 27% in allo-HSCT and auto-HSCT, respectively, almost identical to that very recently described in the study of the European Society for Blood and Marrow Transplantation [12]. This observation is coherent with previous published data, suggesting a significantly lower mortality rate among transplanted patients compared with non-transplanted HM patients [15]. Patients who receive HSCT, especially an allogeneic one, are by definition younger and healthier than the overall onco-hematological patients. In fact, we observed that most of conditions associated with higher overall mortality (i.e. older age, comorbidities, uncontrolled disease) were over-represented in the non-transplant cohort. These aspects may explain in part the lower mortality we observed in transplanted patients. Interestingly, patients undergoing CAR-T infusion have shown a worse clinical outcome in our survey, with 10 deaths among 21 COVID-19 patients registered in the database. Other significant predictors



of mortality in the multivariable analysis included active disease, chronic cardiopathy, liver disease, renal impairment, smoking history, and ICU stay.

Moreover, we found a significantly lower mortality in COVID-19 HM patients in the second wave as compared to the first wave of COVID 19. Improved clinical outcome has been documented for many different diseases, including those with the highest mortality rates. This improvement in the second wave of COVID-19 is of interest, and could be the result of several factors, including a better knowledge of the clinical course of the disease, more effective protective procedure for HM patients, a detection of a larger number of asymptomatic/mild cases by screening swabs and/or an improvement of specific treatments against COVID-19, for example remdesivir, monoclonal antibodies, convalescent plasma. Coherently with our hypothesis, in the second wave, we found a significantly higher rate of asymptomatic and mild infections and a significantly lower rate of severe infections. However, even though we did not observe significant differences in HM distribution, in the second wave we found more patients with controlled disease compared to the first one.

We strongly believe that our findings will impact the management of HM patients also in the near future. Even if we are witnessing a huge worldwide vaccination program, preliminary data published so far suggest that anti-SARS-CoV-2 vaccines shows significantly less robust efficacy in eliciting an immune response in HM patients than observed in the general population [26, 27]. Moreover, we are assisting to the wide diffusion of variants of concerns under the vaccine selective pressure. Indeed, several cases of breakthrough infections have been reported in the general population, with a significant mortality rate [28, 29]. We expect that, in the immediate future, we will assist to several cases of SARS-CoV-2 infections in fully vaccinated HM patients. From this point of view, the better understanding of epidemiologic features and risk factors for COVID-19 in HM patients, might surely help hematologists in the management of their patients and even in modifying the chemotherapeutic programs where possible. HM patients still deserve special attention and protective measures should continue.

Our large registry study comes with some limitations. First, at the time the study was designed, the role of thromboembolic phenomena of COVID-19

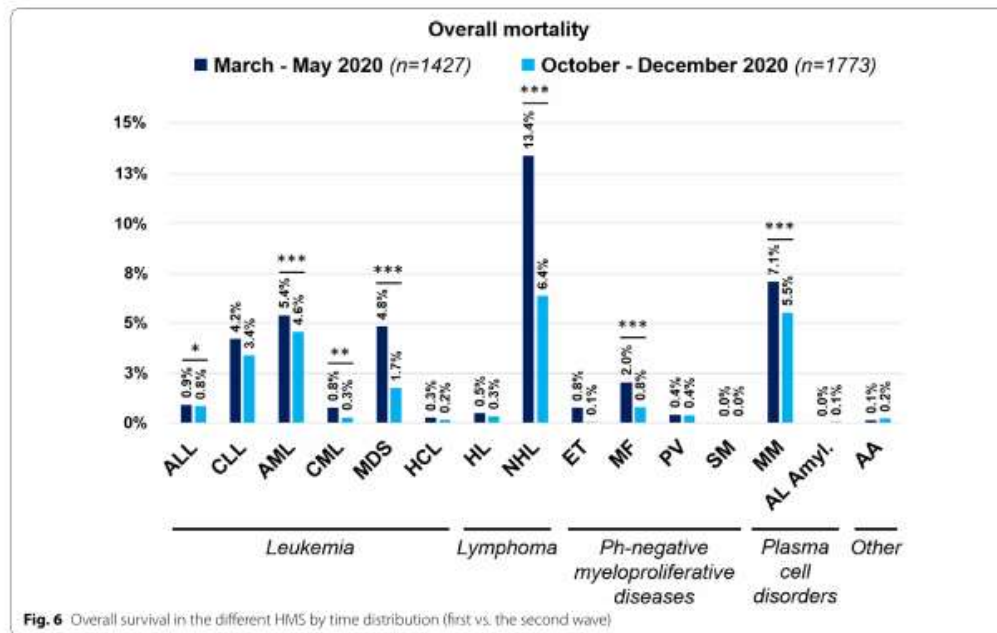
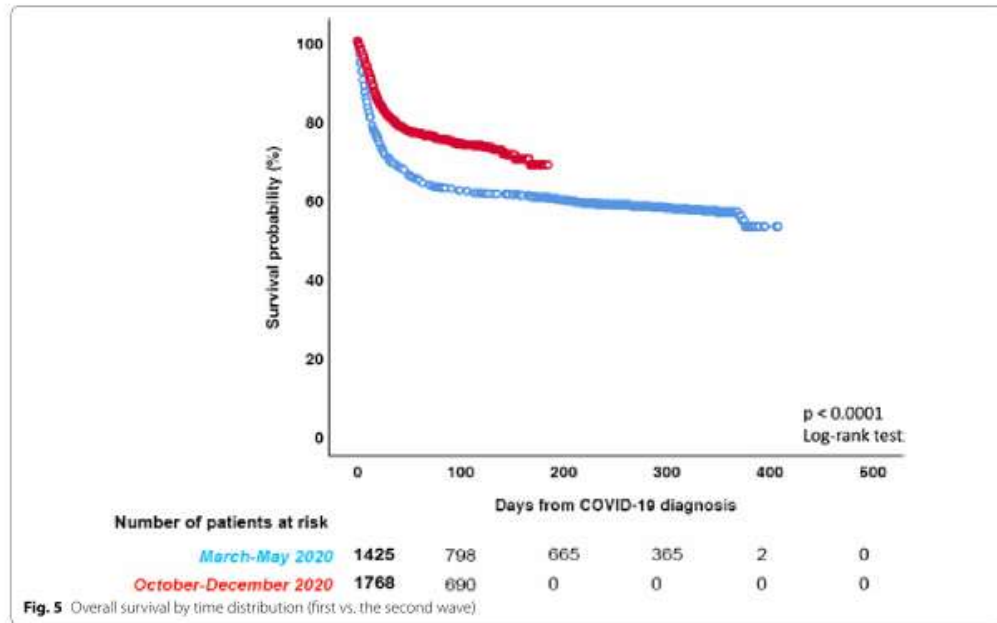


Table 5 Overall mortality predictors in COVID-19 HM patients

	Univariable			Multivariable		
	p value	HR	95% CI	p value	HR	95% CI
Sex						
Female	–	–	–	–	–	–
Male	0.059	1.119	0.095–1.258	0.376	1.065	0.927–1.223
Age	<0.0001	1.036	1.031–1.041	<0.0001	1.032	1.026–1.039
Malignancy status						
Controlled disease	–	–	–	–	–	–
Active disease	<0.0001	2.107	1.863–2.383	<0.0001	1.860	1.615–2.141
Unknown	<0.0001	2.293	1.607–3.274	<0.0001	2.353	1.538–3.601
Hematological malignancy						
Hodgkin lymphoma	–	–	–	–	–	–
Chronic lymphoid leukemia	<0.0001	2.789	1.635–4.757	0.763	1.093	0.614–1.947
Acute myeloid leukemia	<0.0001	4.364	2.581–7.376	0.011	2.046	1.176–3.557
Chronic myeloid leukemia	0.915	0.963	0.481–1.928	0.086	0.513	0.239–1.099
Acute lymphoblastic leukemia	0.002	2.530	1.405–4.553	0.250	1.457	0.767–2.768
Non-Hodgkin lymphoma	<0.0001	3.041	1.814–5.100	0.569	1.171	0.68–2.015
Aplastic anemia	0.040	2.695	1.045–6.948	0.179	2.022	0.724–5.645
Essential thrombocythemia	0.234	1.585	0.742–3.387	0.332	0.667	0.295–1.511
Multiple myeloma	<0.0001	3.355	1.989–5.658	0.630	1.145	0.661–1.984
Myelodysplastic syndrome	<0.0001	4.627	2.704–7.919	0.072	1.706	0.953–3.056
Myelofibrosis	<0.0001	3.786	2.110–6.791	0.185	1.540	0.813–2.915
Polycythemia vera	0.059	2.016	0.973–4.176	0.985	0.992	0.456–2.158
Amyloidosis	0.893	1.150	0.152–8.705	0.932	–	–
Hairy cell leukemia	0.019	2.936	1.197–7.202	0.301	1.806	0.589–5.533
Systemic mastocytosis	0.715	1.457	0.192–11.031	0.968	0.959	0.126–7.323
COVID-19 infection						
Asymptomatic	–	–	–	–	–	–
Mild infection	0.545	1.087	0.830–1.422	0.653	1.074	0.786–1.467
Severe infection	<0.0001	2.127	1.722–2.628	<0.0001	1.682	1.312–2.157
Critical infection	<0.0001	5.333	4.300–6.613	<0.0001	4.230	3.294–5.432
Unknown	0.623	1.229	0.540–2.800	0.928	–	–
Chronic cardiopathy	<0.0001	2.011	1.792–2.257	<0.0001	1.406	1.218–1.624
Liver disease	0.008	1.394	1.091–1.781	0.020	1.388	1.052–1.831
Chronic pulmonary disease	<0.0001	1.516	1.320–1.740	0.926	1.008	0.85–1.195
Diabetes mellitus	<0.0001	1.352	1.172–1.560	0.439	1.070	0.901–1.272
Obesity	0.796	0.974	0.796–1.191	–	–	–
Renal impairment	<0.0001	1.883	1.589–2.232	<0.0001	1.404	1.143–1.724
Smoking history	0.013	1.224	1.043–1.436	0.031	1.223	1.019–1.469
Neutrophils, cells/mm ³						
≤ 0.5 × 10 ⁹ /mm ³	–	–	–	–	–	–
0.501–0.999 × 10 ⁹ /mm ³	<0.0001	0.594	0.450–0.785	0.272	0.845	0.626–1.141
≥ 1 × 10 ⁹ /mm ³	<0.0001	0.514	0.431–0.614	0.184	0.862	0.693–1.073
Lymphocytes, cells/mm ³						
≤ 0.2 × 10 ⁹ /mm ³	–	–	–	–	–	–
0.201–0.499 × 10 ⁹ /mm ³	0.004	0.746	0.611–0.912	0.021	0.779	0.629–0.963
≥ 0.5 × 10 ⁹ /mm ³	<0.0001	0.499	0.422–0.590	<0.0001	0.601	0.499–0.722
Last chemotherapy						
> 3 months before COVID-19	–	–	–	–	–	–
In the last 3 months	<0.0001	1.531	1.226–1.912	0.081	1.236	0.974–1.568
In the last month	<0.0001	1.688	1.408–2.024	0.657	1.047	0.854–1.284
Unknown	0.103	1.578	0.911–2.734	0.998	0.999	0.537–1.86

HR Hazard ratio, CI confidence intervals

infection was still unknown and therefore not included in the survey. Second, we have deliberately excluded the data relating to the various COVID-19 therapeutic approaches because they are extremely heterogeneous and treatment recommendations change rapidly. Third, due to our registry design we have not been able to calculate the incidence of COVID-19 in the various subclasses of HM. Last, due to the intrinsic limitations of the study, it is not possible to provide cumulative incidences regarding relevant aspects, such as mortality, as there is no certainty about whether all participating sites documented all eligible cases.

These data need to be carefully interpreted considering the incidence of individual HM in the general population and the patient performance status, which affects their social dimension and lifestyle in the community.

Conclusion

This study sheds light on the epidemiology, risk factors and outcomes of COVID-19 among patients with HM. While the introduction of COVID-19 vaccinations will lead to a marked reduction of infections in HM patients, the possibility of a lower efficacy of vaccinations needs to be taken into account [30], possibly resembling previous experiences with influenza vaccination. Future studies are needed to evaluate whether the use of vaccination will be able to prevent the development and above all mortality in the identified risk categories of HM.

Abbreviations

allo-HSCT: Allogeneic HSCT (hematopoietic stem cell transplantation); AML: Acute myeloid leukemia; ASH: American Society of Hematology; auto-HSCT: Autologous HSCT (hematopoietic stem cell transplantation); BAL: Bronchoalveolar lavage; CAR-T: Chimeric antigen receptor T-cell therapies; CI: Confidence intervals; COVID-19: Coronavirus disease 19; eCRF: Electronic case report form; EHA: European Hematology Association; EPICOVIDEHA: Epidemiology of COVID-19 Infection in Patients with Hematological Malignancies: A European Hematology Association Survey; HM: Hematological malignancy; HR: Hazard ratio; HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation; ICU: Intensive care unit; IQR: Interquartile range; MDS: Myelodysplastic syndromes; MM: Multiple myeloma; MV: Mechanical ventilation; NHL: Non-Hodgkin lymphoma; SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; TKI: Tyrosine kinase inhibitors; WHO: World Health Organization.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01177-0>.

Additional file 1: Supplementary Table 1. Partnership from National and International Scientific Society.

Additional file 2: Supplementary Table 2. List of participating institutions.

Additional file 3: Supplementary Table 3. Demographic and clinical characteristics of enrolled patients depending on the COVID-19 severity.

Additional file 4: Supplementary Table 4. Multicentre studies on COVID-19 in patients with hematologic malignancies reported during 2020.

Acknowledgements

The authors thank all contributors for their utmost contributions and support to the project during a pandemic situation and to Susann Blossfeld and Corinna Kramer for their administrative and technical assistance.

Authors' contributions

LP served as the principal investigator. LP and JSG contributed to study design, study supervision, and data interpretation and wrote the paper. LP, OC, FR, PC, NK, AP, MH, PK, PC, conceived the study idea. LP, JSG, and FM did the statistical plan, analysis and interpreted the data. All the authors recruited participants and collected and interpreted data. All authors contributed to manuscript writing and review of the manuscript. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

EPICOVIDEHA has received funds from Optics COMMITTM (COVID-19 Unmet Medical Needs and Associated Research Extension) COVID-19 RFP program by GILEAD Science, United States (Project 2020-8223).

Availability of data and materials

Individual participant data that underlie the results reported in this Article, after de-identification (text, tables, figures, and appendices), will be available together with the study protocol. This will be from 9 to 24 months following Article publication. Data will be available only for investigators whose proposed use of the data has been approved by an independent review committee identified for this purpose.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was formally approved by the Ethical Committee of Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli—IRCCS, Università Cattolica del Sacro Cuore of Rome with the following registration number: 3226. The study was conducted in compliance with Helsinki declaration and Good Clinical Practice. The corresponding local ethics committee of each participating institution has approved the EPICOVIDEHA study when applicable. EPICOVIDEHA has been registered at www.clinicaltrials.gov with the identifier NCT04733729. The anonymized data that do not contain any personally identifiable information from any sources implies that the informed consent is not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Hematology, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli - IRCCS - Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy. ²Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy. ³Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseeldorf, Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. ⁴Cologne Excellence Cluster On Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. ⁵Hematology and Stem Cell Transplant Unit, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy. ⁶Stem Cell Transplant Center, AOU Città Della Salute E Della Scienza, Turin, Italy. ⁷University of Milan and Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Dei Tumori, Milan, Italy. ⁸Division of Infectious Diseases and Global Public Health,

Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA, USA. ⁹Clinical and Translational Fungal-Working Group, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA. ¹⁰Section of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria. ¹¹North-Western State Medical University Named After Iliá Ilich Méchnikov, Saint-Petersburg, Russia. ¹²Department of Hematological Medicine, King's College Hospital NHS Foundation Trust, London, UK. ¹³Department of Medicine and Surgery, University of Insubria, ASST Sette Laghi, Ospedale Di Circolo di Varese, Varese, Italy. ¹⁴Azienda Ospedaliera San Gerardo - Monza, Monza, Italy. ¹⁵Università Milano-Bicocca, Milan, Italy. ¹⁶University Hospital Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic. ¹⁷Ankara University, Ankara, Turkey. ¹⁸Policlinico Borgo Roma Verona, Verona, Italy. ¹⁹Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ²⁰Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Health Research Institute IIS-FJD, Madrid, Spain. ²¹Hematology and BMT Unit, Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio E Biagio E Cesare Arrigo, Alessandria, Italy. ²²NIHR Oxford Biomedical Research Centre, Churchill Hospital, Oxford, UK. ²³Hematology and Bone Marrow Transplantation, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy. ²⁴ASST-Spedali Civili, Brescia, Italy. ²⁵Department of Hematology, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Experimental Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain. ²⁶Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. ²⁷Portuguese Institute of Oncology, Lisbon, Portugal. ²⁸San Luigi Gonzaga Hospital - Orbassano, Orbassano, Italy. ²⁹University Medical Center Groningen, Groningen, Netherlands. ³⁰ICANS, Strasbourg, France. ³¹Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic. ³²Department of Hematology, University Hospital Dubrava, Zagreb, Croatia. ³³Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain. ³⁴ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan, Italy. ³⁵Communicable Disease Center, Hamad Medical Corporation, Doha, Qatar. ³⁶Fondazione IRCCS Ca' Grandia Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy. ³⁷King's College Hospital, London, UK. ³⁸King's College London, London, UK. ³⁹University Hospital Centre Rijeka, Rijeka, Croatia. ⁴⁰Croatian Cooperative Group for Hematological Diseases (CROHEM), Zagreb, Croatia. ⁴¹Faculty of Medicine and Faculty of Health Studies, University of Rijeka, Rijeka, Croatia. ⁴²Zealand University Hospital, Roskilde, Roskilde, Denmark. ⁴³Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁴⁴Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark. ⁴⁵Gomel State Medical University, Gomel, Belarus. ⁴⁶Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic. ⁴⁷Department of Internal Medicine, Albert Szent-Györgyi Health Center, Faculty of Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary. ⁴⁸University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic. ⁴⁹Oncology Center, Mansoura University, Mansoura, Egypt. ⁵⁰Marmara University, Istanbul, Turkey. ⁵¹KU Leuven, Leuven, Belgium. ⁵²Department of Infectious Diseases, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden. ⁵³IS-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal. ⁵⁴Cancer Drug Resistance Group, IPATIMUP-Institute of Molecular Pathology and Immunology, University of Porto, Porto, Portugal. ⁵⁵Clinical Hematology, Centro Hospitalar E Universitário São João, Porto, Portugal. ⁵⁶Clinical Hematology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal. ⁵⁷Hospital Clinic, Barcelona, Spain. ⁵⁸U.O. Ematologia E Centro Trapianti Midollo Osseo, Ospedale Maggiore, Parma, Italy. ⁵⁹Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Dei Tumori, Milan, Italy. ⁶⁰Department of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy. ⁶¹Hematology and Transplantation, Raisa Gorbacheva Research Institute of Pediatric Oncology, Pavlov University, St. Petersburg, Russia. ⁶²Amsterdam UMC, Location VUmc, Amsterdam, Netherlands. ⁶³Complejo Hospitalario de Navarra, Iruña-Pamplona, Spain. ⁶⁴Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain. ⁶⁵La Paz University Hospital, Madrid, Spain. ⁶⁶Hematology Unit, Center for Translational Medicine, Azienda USL Toscana NordOvest, Livorno, Italy. ⁶⁷AZ Klinia, Brasschaat, Belgium. ⁶⁸Ematologia Con Trapianto, Ospedale Dimeiccoli Barletta, Barletta, Italy. ⁶⁹Clinic of Hematology, University Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia. ⁷⁰Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia. ⁷¹Sultan Qaboos University Hospital, Muscat, Oman. ⁷²Hematology Department, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain. ⁷³IBSAL, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain. ⁷⁴Department of Haematology, Blood Neoplasms, and Bone Marrow Transplantation, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland. ⁷⁵Cell Therapy and Hematology, San Bortolo Hospital,

Vicenza, Italy. ⁷⁶Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation With Section of Pneumology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁷⁷Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. ⁷⁸Azienda Sanitaria Universitaria del Friuli Centrale, Udine, Italy. ⁷⁹Hospital Rey Juan Carlos, Móstoles, Spain. ⁸⁰Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, Department of Clinical Research, University and University Hospital of Basel, Basel, Switzerland. ⁸¹Hospital Escuela de Agudos Dr. Ramón Madariaga, Posadas, Argentina. ⁸²Department of Hematology and Oncology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria. ⁸³University Hospital of Královské Vinohrady, Prague, Czech Republic. ⁸⁴Centre Hospitalier de Versailles, Versailles, France. ⁸⁵Service d'Hématologie Clinique Et de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Sorbonne Université, Inserm UMRs 938, Paris, France. ⁸⁶Département d'Hématologie Clinique, CHU de Montpellier, UMR-CNRS 5535, Université de Montpellier, Montpellier, France. ⁸⁷Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ⁸⁸Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Health Research Institute IIS-FJD, Madrid, Spain. ⁸⁹National Center for Cancer Care and Research, Hamad Medical Corporation, Doha, Qatar. ⁹⁰University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia. ⁹¹Faculty of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia. ⁹²Hematology Service, Instituto Nacional Do Cancer, Rio de Janeiro, Brazil. ⁹³Haematology and Haemotherapy Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁹⁴Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantation and Hematology, Minsk, Belarus. ⁹⁵Department of Cell Therapy and Allogeneic Stem Cell Transplantation (CAST), Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden. ⁹⁶Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC), Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Salamanca, Spain. ⁹⁷Chair Translational Research, Cologne Excellence Cluster On Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. ⁹⁸Clinical Trials Centre Cologne (ZKS Köln), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. ⁹⁹Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. ¹⁰⁰German Centre for Infection Research (DZIF), Partner Site Bonn-Cologne, Cologne, Germany.

Received: 9 July 2021 Accepted: 25 September 2021
Published online: 14 October 2021

References

1. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic (Last access: May 31, 2021)
2. Vijenthira A, Gong JY, Fox TA, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 3377 patients. *Blood*. 2020;136:2881–92.
3. Cattaneo C, Daffini R, Pagani C, et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in hematologic patients affected by COVID-19. *Cancer*. 2020;126:5069–76.
4. Borah P, Mirgh S, Sharma SK, et al. Effect of age, comorbidity and remission status on outcome of COVID-19 in patients with hematological malignancies. *Blood Cells Mol Dis*. 2021;87:102525.
5. Wood WA, Neuberger DS, Thompson JC, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a report from the ASH Research Collaborative Data Hub. *Blood Adv*. 2020;4:5966–75.
6. Kuderer NM, Choueiri TK, Shah DP, et al. Clinical impact of COVID-19 on patients with cancer (CCC19): a cohort study. *Lancet*. 2020;395:1907–18.
7. Lee LYW, Cazier JB, Starkey T, et al. COVID-19 prevalence and mortality in patients with cancer and the effect of primary tumour subtype and patient demographics: a prospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2020;21:1309–16.
8. Glenthøj A, Jakobsen LH, Sengenelov H, et al. SARS-CoV-2 infection among patients with hematological disorders: severity and one-month outcome in 66 Danish patients in a nationwide cohort study. *Eur J Haematol*. 2021;106:72–81.
9. Regalado-Artamendi I, Jiménez-Ubieto A, Hernández-Rivas JA, et al. Risk factors and mortality of COVID-19 in patients with lymphoma: a multi-center study. *Hemasphere*. 2021;5:e538.

10. Chari A, Samur MK, Martinez-Lopez J, et al. Clinical features associated with COVID-19 outcome in multiple myeloma: first results from the International Myeloma Society data set. *Blood*. 2020;136:3033–40.
11. Sharma A, Bhatt NS, St Martin A, et al. Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in hematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study. *Lancet Haematol*. 2021;8:e185–93.
12. Ljungman P, de la Camara R, Mikulska M, et al. COVID-19 and stem cell transplantation; results from an EBMT and GETH multicentre prospective study. *Leukemia* 2021. Online ahead of print.
13. Yigenoglu TN, Ata N, Altuntas F, et al. The outcome of COVID-19 in patients with hematological malignancy. *J Med Virol*. 2021;93:1099–104.
14. García-Suárez J, de la Cruz J, Cedillo A, et al. Impact of hematologic malignancy and type of cancer therapy on COVID-19 severity and mortality: lessons from a large population-based registry study. *J Hematol Oncol*. 2020;13:133.
15. Piñanà JL, Martino R, García-García I, et al. Risk factors and outcome of COVID-19 in patients with hematological malignancies. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9:21.
16. Passamonti F, Cattaneo C, Arcaini L, et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 severity in patients with hematological malignancies in Italy: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Haematol*. 2020;7:e737–45.
17. <https://www.ashresearchcollaborative.org/s/covid-19-registry/data-summaries> (Last access: May 25, 2021)
18. Barbuti T, De Stefano V, Alvarez-Larran A, et al. Among classic myeloproliferative neoplasms, essential thrombocythemia is associated with the greatest risk of venous thromboembolism during COVID-19. *Blood Cancer J*. 2021;11:21.
19. Galimberti S, Petroni M, Barate C, et al. Tyrosine kinase inhibitors play an antiviral action in patients affected by chronic myeloid leukemia: a possible model supporting their use in the fight against SARS-CoV-2. *Front Oncol*. 2020;10:1428.
20. Salmanton-García J, Busca A, Cornely OA, et al. EPICOVIDEHA: a ready-to-use platform for epidemiological studies in hematological patients with COVID-19. *Hemasphere*. 2021;5(7):e612.
21. COVID-19 clinical management. Living guidance World Health Organization. January 15, 2021. WHO/2019-nCoV/clinical/2021.1.
22. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020;323:1239–42.
23. Sánchez-Pina JM, Rodríguez Rodríguez M, Castro Quismondo N, et al. Clinical course and risk factors for mortality from COVID-19 in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol*. 2020;105:597–607.
24. Infante MS, González-Gascón Y, Marin I, et al. COVID-19 in patients with hematological malignancies: a retrospective case series. *Int J Lab Hematol*. 2020;42:e256–9.
25. Palanques-Pastor T, Megias-Venacat JE, Martínez F, et al. Characteristics, clinical outcomes, and risk factors of SARS-CoV-2 infection in adult acute myeloid leukemia patients: experience of the PETHEMA group. *Leuk Lymphoma* 2021. <https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1948031>. Online ahead of print.
26. Herishanu Y, Avivi I, Aharon A, et al. Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2021;137:3165–73.
27. Pimpinelli F, Marchesi F, Piaggio G, et al. Fifth-week immunogenicity and safety of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in patients with multiple myeloma and myeloproliferative malignancies on active treatment: preliminary data from a single Institution. *J Hematol Oncol*. 2021;14:81.
28. Bergwerk M, Gonen T, Lustig Y, et al. Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers. *N Engl J Med*. 2021. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2109072>. Online ahead of print.
29. Brown CM, Vostok J, Johnson H, et al. Outbreak of SARS-CoV-2 infections, including COVID-19 vaccine breakthrough infections, associated with large public gatherings—Barnstable County, Massachusetts, July 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021;70:1059–62.
30. Terpos E, Trougakos IP, Gavriatopoulou M, et al. Low neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in elderly myeloma patients after the first BNT162b2 vaccine dose. *Blood*. 2021;137:3674–6.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



4.1.5. Annex 28

Busca A., Salmanton-García J., Corradini P., Marchesi F., Cabirta A., Di Blasi R., Dulery R., Lamure S., Farina F., Weinbergerová B., Batinić J., Nordlander A., Lopez-Garcia A., Drgona L., Espigado I., Falces-Romero I., Garcia-Sanz R., Garcia-Vidal C., Guidetti A., Khanna N., Kulesekararaj A., Maertens J., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O., Pagano L. COVID-19 and CAR-T cells: current challenges and future directions-a report from the EPICOVIDEHA survey by EHA-IDWP. *Blood Adv.* 2022; 12;6(7):2427-2433. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005616. ISSN 2473-9537.

IF = 6,799 v roce 2020; HEMATOLOGY Q1; 0 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací

COVID-19 and CAR T cells: a report on current challenges and future directions from the EPICOVIDEHA survey by EHA-IDWP

Alessandro Busca,^{1,*} Jon Salmanton-García,^{2,3,*} Paolo Corradini,⁴ Francesco Marchesi,⁵ Alba Cabrita,^{6,7} Roberta Di Blasi,⁸ Remy Dulery,⁹ Sylvain Lamure,¹⁰ Francesca Farina,¹¹ Barbora Weinbergerová,¹² Josip Batinić,¹³⁻¹⁵ Anna Nordlander,¹⁶ Alberto López-García,¹⁷ L'uboš Drgoňa,¹⁸ Ildefonso Espigado-Tocino,¹⁹ Iker Falces-Romero,²⁰ Ramón García-Sanz,²¹ Carolina García-Vidal,²² Anna Guidetti,²³ Nina Khanna,²⁴ Austin Kulasekararaj,²⁵ Johan Maertens,²⁶ Martin Hoenig,²⁷⁻²⁹ Nikolai Klimko,³⁰ Philipp Koehler,^{2,3} Antonio Pagliuca,³¹ Francesco Passamonti,³² Oliver A. Cornely,^{2,3,33,34} and Livio Pagano^{35,36}

¹Stem Cell Transplant Center, Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza, Turin, Italy; ²Department I of Internal Medicine, Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany; ³Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases, University Hospital Cologne, Cologne, Germany; ⁴University of Milan and Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; ⁵Hematology and Stem Cell Transplant Unit, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy; ⁶Department of Hematology, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain; ⁷Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ⁸Hôpital Saint Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France; ⁹Service d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Unité Mixte de Recherche (UMR) 938, Sorbonne Université, Paris, France; ¹⁰Department of Clinical Hematology, Montpellier University Hospital, IGMM UMR1535 CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France; ¹¹IRCCS Ospedale San Raffaele, Milan, Italy; ¹²Department of Internal Medicine-Hematology and Oncology, Masaryk University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ¹³University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia; ¹⁴Croatian Cooperative Group for Hematological Diseases (CROHEM), Zagreb, Croatia; ¹⁵Faculty of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia; ¹⁶Department of Infectious Diseases, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden; ¹⁷Fundacion Jimenez-Diaz, Madrid, Spain; ¹⁸Comenius University and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia; ¹⁹Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain; ²⁰La Paz University Hospital, Madrid, Spain; ²¹Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ²²Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ²³Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, University of Milan, Milan, Italy; ²⁴Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, Department of Clinical Research, University and University Hospital of Basel, Basel, Switzerland; ²⁵King's College Hospital, London, United Kingdom; ²⁶Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium; ²⁷Division of Infectious Diseases and Global Public Health, Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA; ²⁸Clinical and Translational Fungal Working Group, University of California San Diego, La Jolla, CA; ²⁹Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria; ³⁰Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, North Western State Medical University, St Petersburg, Russia; ³¹Department of Hematological Medicine, Kings College Hospital, National Health Service Foundation Trust, London, United Kingdom; ³²Department of Medicine and Surgery, University of Insubria and Azienda Socio Sanitaria Territoriale Sette Laghi, Ospedale di Circolo di Varese, Varese, Italy; ³³University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Clinical Trials Centre Cologne, Cologne, Germany; ³⁴German Centre for Infection Research, Partner Site Bonn-Cologne, Cologne, Germany; ³⁵Hematology, IRCCS Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rome, Italy; and ³⁶Hematology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy

Key Points

- The EHA-IDWP developed an observational registry collecting data on COVID-19 infection in patients who received CAR T-cell therapy.
- Prevalence of COVID-19 was 4.8%, and overall mortality was 50%, highlighting the need for prevention of infection in these patients.

Introduction

Since it was first reported in China, coronavirus disease 2019 (COVID-19) has spread rapidly around the world, and the number of cases has increased exponentially.¹ Initial reports suggested that patients with cancer have an estimated twofold increased risk of contracting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) compared with the general population.² More importantly, it is expected that COVID-19 will be particularly life threatening in patients with hematological malignancies because of their immune dysfunction. Recent studies have reported an overall COVID-19-related mortality of 29% to 42%³⁻⁸ in patients with hematological disease, depending on the type of malignancy, in contrast to the 2% to 7% observed in the general population. Regrettably, there remains a lack of studies about COVID-19 in patients receiving cellular therapies, including chimeric antigen receptor (CAR) T cells.^{9,10} CAR T cells are genetically modified autologous T cells, which have shown great promise in the treatment of advanced malignant hematological disorders, including non-Hodgkin lymphoma, acute lymphoblastic leukemia, and multiple myeloma.¹¹ CAR T-cell recipients have significant B-cell aplasia requiring immunoglobulin G replacement therapy and may also develop delayed cytopenias, leaving them unable to mount any humoral response to viral infections.¹² Shah et al¹⁰ demonstrated that the seroconversion rate in a small cohort of patients treated with hemopoietic stem cell transplantation (HSCT) and CAR T-cell therapy did not exceed 66%.

Submitted 25 June 2021; accepted 24 October 2021; prepublished online on *Blood Advances* First Edition 8 November 2021; final version published online 11 April 2022.
DOI 10.1182/bloodadvances.2021005616.

*A.B. and J.S.-G. contributed equally to this study.

Requests for data sharing may be submitted to Alessandro Busca (abusca@cittadellasalute.to.it).

© 2022 by The American Society of Hematology. Licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0), permitting only noncommercial, nonderivative use with attribution. All other rights reserved.

According to these observations, the outcomes of COVID-19 in patients treated with CAR T cells remain unclear. The aim of this study was to describe the clinical outcomes of patients developing COVID-19 after treatment with CAR T cells.

Methods

In this retrospective observational multicenter study, we collected data on all consecutive adult patients who received CAR T-cell therapy with symptomatic COVID-19 between January 2020 and February 2021 across 18 European centers (Spain, $n = 6$; France, $n = 3$; Italy, $n = 2$; and Belgium, Croatia, Czechia, Slovakia, Sweden, Switzerland, and the United Kingdom, $n = 1$ each) participating in the survey promoted by the European Hematology Association (EHA) Scientific Working Group on Infection in Hematology (EPICOVIDEHA survey),¹³ developed by the EHA Infectious Diseases Working Party (IDWP). Confirmed cases of COVID-19 were defined by positive reverse transcription polymerase chain reaction assays of specimens collected on nasopharyngeal swabs. Each institutional review board independently approved the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Researchers at each center collected data using an online questionnaire hosted at www.clinicalsurveys.net. The EPICOVIDEHA trial was registered at www.clinicaltrials.gov as #NCT04733729. Only deidentified data have been entered and analyzed. We obtained demographic data, comorbidities, and underlying hematological disease, including clinically significant outcomes (hospital and intensive care unit [ICU] admission and vital status) and management strategies of COVID-19. The severity of COVID-19 at admission was graded according to the China Centers for Disease Control and Prevention definitions: mild (nonpneumonia and mild pneumonia), severe (dyspnea, respiratory frequency ≥ 30 breaths per minute, oxygen saturation $\leq 93\%$, or ratio of arterial oxygen partial pressure/fractional inspired oxygen of 50%), and critical (respiratory failure, septic shock, or multiple organ dysfunction or failure).

SPSS v25.0 was employed for statistical analyses (IBM Corp., Chicago, IL). Categorical variables are presented using frequency and percentage, and continuous variables are shown by median, interquartile range (IQR), and absolute range. Additionally, overall mortality was evaluated by employing a Cox proportional hazards model. Univariable Cox regression model was performed with variables suspected to play a role in the mortality of patients with COVID-19 receiving CAR T-cell therapy. Variables with a P value $\leq .1$ were considered for multivariable analysis. Multivariable Cox regression model was calculated with the Wald backward method, and only statistically significant variables were reported. A P value $\leq .05$ was considered statistically significant.

Results and discussion

Overall, 459 patients received CAR T-cell therapy, of whom 30 met the criteria for diagnosis of COVID-19. Median age at COVID-19 diagnosis was 57 years (IQR, 51-64; range, 18-74); 13 patients (43.3%) were female, and 17 patients (56.7%) were male. Demographic and clinical characteristics of CAR T-cell recipients with COVID-19 are summarized in Table 1. Patients received CAR T cells for the treatment of large B-cell lymphoma ($n = 28$), multiple myeloma ($n = 1$), and acute lymphoblastic leukemia ($n = 1$). A majority of patients received CAR-T therapy in 2020 ($n = 17$), 3 in 2018, 9 in 2019, and 1 in 2021. CAR T cells were tisagenlecleucel

(Kymriah) in 16 cases and axicabtagene (Yescarta) in 13 cases, and 1 patient with multiple myeloma was treated with CAR T cells targeting B-cell maturation antigen. A majority of patients received bridging therapy ($n = 21$ of 30) and fludarabine plus cyclophosphamide as lymphodepletion conditioning ($n = 29$ of 30). Severe (grade ≥ 3) CRS after receiving CAR T cells was observed in 1 patient only. No patient received COVID-19 vaccine. Seventeen patients (56.7%) developed COVID-19 within 6 months from CAR T-cell infusion, and 13 patients (43.3%) developed it after 6 months. Prevalence of COVID-19 in our patients was 4.8%, based on the total number of CAR T-cell recipients reported by participating centers in 2020 ($n = 17$ of 353).

Median time from CAR T-cell treatment to COVID-19 diagnosis was 169 days (IQR, 37-313; range, 1-635). Cellular and humoral immune reconstitution after CAR T cells showed that 90 days after infusion, median absolute neutrophil count and absolute lymphocyte count (ALC) were $1700/\text{mm}^3$ (IQR, 1090-2700; range, 300-11260) and $435/\text{mm}^3$ (IQR, 200-775; range, 80-3500), respectively, whereas at the time of COVID-19 diagnosis, median absolute neutrophil count and ALC were $925/\text{mm}^3$ (IQR, 495-2450; range, 18-11510) and $370/\text{mm}^3$ (IQR, 200-1250; range, 6-1750), respectively. Overall, 10% ($n = 3$), 20% ($n = 6$), and 66.7% ($n = 20$) of patients had asymptomatic, mild, or severe COVID-19, respectively. Comorbidities preceding diagnosis of COVID-19 were detected in 19 patients (76.7%), including chronic cardiopathy ($n = 8$; 23.3%), chronic pulmonary diseases ($n = 7$; 23.3%), smoking history ($n = 6$; 20.0%), and obesity ($n = 5$; 16.7%). In total, 13 patients (43.3%) required admission to ICU after COVID-19, and 9 of them (66.7%) required mechanical ventilation.

Patients received treatment for COVID-19 according to local policy; 15 patients were treated with convalescent plasma alone ($n = 3$) or convalescent plasma combined with remdesivir with or without steroids ($n = 8$), remdesivir with lopinavir/ritonavir and steroids ($n = 1$), and tocilizumab and steroids ($n = 3$); 5 patients were treated with steroids alone ($n = 4$) or steroids combined with remdesivir and tocilizumab ($n = 1$); 1 patient was treated with azithromycin; and 1 patient was treated with remdesivir alone. In total, 5 patients did not require any specific treatment; in 2 cases, this was because of poor general condition, and in 3 cases, treatment was unknown.

Median follow-up was 71 days (IQR, 44-142; range, 21-379) after CAR T-cell infusion, and at the last follow-up, 15 patients (50.0%) were alive and 15 patients (50.0%) had died. Ten patients (33%) died as a result of COVID-19 infection (associated with pulmonary embolism plus heart failure in 1 case and possible fungal infection in 1 case), and 5 patients died as a result of recurrent underlying disease (associated with COVID-19 infection in 3 patients). Seven (63.6%) of the 11 patients with relapsed/refractory disease and 7 (41.1%) of the 17 patients with complete remission/stable disease died as a result of COVID-19. In 2 patients, baseline malignancy status was unknown; 1 patient died, and 1 survived.

Severe (grade ≥ 3) CRS after CAR T cells was observed in 1 patient only, and in total, 8 (53.3%) of 15 patients who developed CRS after CAR T-cell infusion required treatment with tocilizumab with or without steroids. None of the parameters analyzed in the univariable analysis had a significant impact on patient outcomes. Only disease status at the time of COVID-19 was marginally significant for adverse outcome ($P = .075$), adjusted by sex (male vs female; $P = .0092$; Table 2).

Table 1. Characteristics of patients with COVID-19 receiving CAR T-cell therapy (n = 30)

Patient	Baseline hematological malignancy	Disease status at COVID-19 diagnosis	Time from CAR T cells to COVID-19, d	CAR T-cell construct	Bidding therapy	Lymphodepletion	Grade at CAR T-cell therapy			Reason for death (time after COVID-19 diagnosis, d)*
							CRS	ICANS	Tocilizumab	
1	NHL LBCL	R/R	37	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	1	1	Malignancy (35)
2	NHL LBCL	CR	221	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	NA
3	NHL LBCL	CR	240	Ax-cel	X	Flu-Cyc	2	NA	X	COVID-19 + other (52)
4	NHL LBCL	R/R	1	Taa-cel	X	Flu-Cyc	2	NA	X	COVID-19 (25)
5	NHL LBCL	CR	85	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	2	X	NA
6	NHL LBCL	SD	14	Taa-cel	X	Bendam	2	1	X	COVID-19 + other (170)
7	MM	R/R	90	BCMA AR1-0002	X	Flu-Cyc	NA	NA	NA	NA
8	NHL LBCL	R/R	42	Taa-cel	X	Flu-Cyc	2	NA	X	Malignancy + COVID-19 (33)
9	NHL LBCL	R/R	387	Taa-cel	X	Flu-Cyc	2	NA	X	NA
10	NHL LBCL	CR	313	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	X	NA
11	ALL	Unknown	9	Taa-cel	X	Flu-Cyc	NA	NA	NA	NA
12	NHL LBCL	R/R	302	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	X	COVID-19 (42)
13	NHL LBCL	CR	85	Taa-cel	X	Flu-Cyc	NA	NA	NA	NA
14	NHL LBCL	CR	457	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	NA
15	NHL LBCL	R/R	158	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	X	Malignancy (22)
16	NHL LBCL	R/R	65	Taa-cel	X	Flu-Cyc	1	3	X	Malignancy + COVID-19 (21)
17	NHL LBCL	CR	270	Ax-cel	X	Flu-Cyc	3	NA	X	NA
18	NHL LBCL	Unknown	19	Taa-cel	X	Flu-Cyc	2	NA	X	COVID-19 (50)
19	NHL LBCL	R/R	180	Taa-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	X	NA
20	NHL LBCL	CR	186	Taa-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	COVID-19 (51)
21	NHL LBCL	CR	348	Ax-cel	X	Flu-Cyc	2	2	X	NA
22	NHL LBCL	CR	19	Taa-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	NA
23	NHL LBCL	CR	605	Taa-cel	X	Flu-Cyc	NA	NA	NA	COVID-19 (46)
24	NHL NOS	CR	635	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	COVID-19 (44)
25	NHL LBCL	R/R	180	Taa-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	Malignancy + COVID-19 (32)
26	NHL LBCL	CR	485	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	COVID-19 (53)
27	NHL LBCL	CR	510	Ax-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	NA	COVID-19 (124)
28	NHL LBCL	CR	66	Taa-cel	X	Flu-Cyc	1	NA	X	NA
29	NHL LBCL	R/R	12	Taa-cel	X	Flu-Cyc	1	1	NA	NA
30	NHL LBCL	CR	35	Taa-cel	X	Flu-Cyc	NA	NA	NA	NA

*Other reasons for death: Patient #3, possible IFI; patient #6, pulmonary embolism and heart failure.

ALL, acute lymphoblastic leukemia; ax-cel, axicabtagene ciltaucel; BCMA, B-cell maturation antigen; bendam, bendamustine; CR, complete remission; CRS, cytokine release syndrome; Flu-Cyc, fluoxetine plus cyclophosphamide; ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome; LBCL, large B-cell lymphoma; MM, multiple myeloma; NA, not applicable; NHL, non-Hodgkin lymphoma; R/R, relapsed/refractory; SD, stable disease; Taa-cel, tisagenlecleucel.

*Other reasons for death: patient 3, possible invasive fungal infection; patient 6, pulmonary embolism and heart failure.

Table 2. Univariable and multivariable analyses of factors associated with mortality of patients with COVID-19 receiving CAR T cells

	All patients						Time between CAR T-cell therapy and COVID-19, mo					
	Univariable			Multivariable			≤6			>6		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Sex												
Female	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Male	2.682	0.849-8.474	.093	2.742	0.848-8.861	.092	4.897	0.591-40.604	.141	1.928	0.417-8.908	.401
Age, y												
<50	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
≥50	5.119	0.673-38.955	.115	–	–	–	1.809	0.222-14.742	.580	42.159	0.068-26 050.639	.254
Comorbidities, n												
None	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1	3.093	0.772-12.393	.111	–	–	–	3.093	0.772-12.393	.111	3.438	0.482-24.537	.218
2	3.021	0.498-18.328	.229	–	–	–	3.021	0.498-18.328	.229	2.095	0.185-22.871	.558
≥3	1.880	0.413-8.562	.414	–	–	–	1.880	0.413-8.562	.414	6.111	0.820-45.529	.077
Malignancy status at COVID-19 diagnosis												
Controlled disease	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Active disease	2.707	0.931-7.870	.067	2.652	0.907-7.754	.075	2.707	0.931-7.870	.067	1.121	0.133-9.446	.916
Unknown	1.579	0.188-13.238	.674	1.059	0.123-9.132	.958	–	–	–	.947	–	–
CAR T-cell construct												
Axi-cel	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Tisa-cel	0.888	0.321-2.458	.820	–	–	–	0.479	0.092-2.494	.382	1.552	0.296-8.132	.603
Other	–	–	.986	–	–	–	–	–	.981	–	–	–
ICU stay	1.529	0.554-4.225	.413	–	–	–	0.887	0.211-3.729	.870	3.331	0.643-17.247	.152
Tocilizumab/steroids after CAR T cells	1.437	0.520-3.972	.484	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Time from CAR T cells to COVID-19, mo												
≤6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
>6	0.996	0.359-2.770	.996	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Neutrophils at COVID-19 diagnosis, n per mm³												
≤500	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
>500	0.611	0.161-2.321	.469	–	–	–	0.761	0.167-3.472	.724	–	–	–
Lymphocytes at COVID-19 diagnosis, n per mm³												
≤200	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
>200	0.551	0.164-1.846	.334	–	–	–	0.568	0.133-2.419	.444	0.872	0.089-8.511	.907

Axi-cel, axicabtagene ciloleucel; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; tisa-cel, tisagenlecleucel.

In the present multicenter international study, we sought to evaluate COVID-19 outcomes in a cohort of 459 consecutive patients who received CAR T-cell therapy. Several studies have addressed clinical courses and outcomes of COVID-19 in patients with hematological disease as well as the presence of risk factors for more aggressive life-threatening disease.^{4,7,14-16} Patients with hematological malignancies may be considered more vulnerable than the general population; however, the exact prevalence of SARS-CoV-2 infection in this setting is still unclear. We documented a 4.8% prevalence of COVID-19 in our study group, remarkably higher than the 0.1% reported in the general population, and median onset of COVID-19 was 169 days after CAR T-cell therapy. Several factors could explain the high rate of COVID-19 in patients receiving CAR T cells. Our study included a homogeneous group of heavily

pretreated patients with large B-cell lymphoma who received at least 2 lines of treatment before CAR T-cell and lymphodepletion therapies. Delayed cytopenias and impaired immune reconstitution, leading to a significant risk of infectious complications, have been well documented after CAR T-cell therapy.¹² Consistent with findings seen in prior studies, we observed a low lymphocyte count 90 days after CAR T cells (median ALC, 435/mm³) and at the time of COVID-19 diagnosis (median ALC, 370/mm³; 23% of patients had <200 lymphocytes per mm³), although the presence of both neutropenia and lymphocytopenia at COVID-19 diagnosis was not statistically significant in univariable analysis. In addition, it should be emphasized that the presence of relapsed/refractory disease in one-third of patients at the time of COVID-19 should be taken into account as a potential confounding factor. Regrettably, we were

Downloaded from <http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/6/7/2430/1887713> by guest on 15 April 2022

unable to investigate in detail humoral or cellular immune reconstitution or whether worsening of lymphopenia during infection had an impact on survival. Notably, our results showed that half of the patients developed COVID-19 after the first 6 months post-CAR T-cell therapy, underscoring that prolonged delayed immune recovery may persist for a long period of time after cellular therapy.¹⁷ Currently, there are few clinical trials evaluating the potential role of COVID-19 treatment in patients with cancer¹⁸; observational studies are also extremely limited. In our study, patients received a wide array of treatments, making difficult to draw any firm conclusions. Based on the presence of impaired humoral and cellular immune reconstitution after CAR T-cell therapy in a consistent number of patients, suboptimal responses to current treatments used in patients with COVID-19 are expected, although specific studies are urgently required to address this issue.

Mortality rates in patients receiving cellular therapy have been reported in few studies. Altuntas et al⁹ evaluated 32 recipients of autologous and allogeneic grafts and found a 33% case fatality rate among patients still receiving immunosuppressive agents at the time of COVID-19 diagnosis. Similar results have been reported by the European Society for Blood and Marrow Transplantation group, with a mortality rate reaching 25%; older age, need for ICU admission, and moderate/high immunodeficiency index increased the risk for mortality.¹⁹ The Center for International Blood and Marrow Transplant Research reported the results of 318 patients with COVID-19 who had undergone HSCT (allogeneic, n = 184; autologous, n = 134). Overall mortality was 22% among those who underwent allogeneic HSCT; age > 50 years, male sex, and time from HSCT to COVID-19 diagnosis < 6 months were factors significantly associated with mortality.²⁰ Shah et al¹⁰ evaluated 77 patients with COVID-19 who had been treated with HSCT (n = 72) and CAR T-cell therapy (n = 5); the overall death rate was 41%, roughly similar to that reported in our study, and was largely driven by patients with advanced disease. The 50% mortality rate was remarkably high in our patients, considering that 10 of 15 deaths resulted from COVID-19 or COVID-19-related events. In this respect, it is worthwhile to keep in mind that two-thirds of our patients had severe infections, and 30% of our patients required mechanical ventilation. In addition, advanced disease status at the time of COVID-19 diagnosis should be considered a potential factor limiting favorable outcomes for patients, as emphasized by the univariable analysis. Several factors might explain the higher mortality rate observed in our study as compared with that reported in patients who had undergone HSCT. Patients with relevant comorbidities are usually excluded from HSCT programs, whereas comorbidities do not preclude CAR T-cell treatment in these vulnerable patients. Time interval from HSCT to COVID-19 has emerged as a factor associated with mortality in many studies, ranging from 13.7 to 18.9 months,^{12,14,19,20} significantly longer than the median time from CAR T-cell therapy to COVID-19 reported in our series (median time, 169 days).

Preliminary data in patients who have undergone HSCT show that COVID-19 is associated with low lymphocyte counts, particularly in T-cell compartments; however, lymphopenia does not seem to impair immune reconstitution in recovery from COVID-19. Regrettably, we do not have data on lymphocyte subsets after COVID-19 in our cohort of patients, although protracted and profound lymphopenias after CAR T cells have been reported in several studies. In

addition, whether differences in CAR T-cell products affect the kinetics of immunodeficiency recovery remains to be determined.

If prospective large studies corroborate our preliminary results, it seems wise to define strategies able to mitigate the adverse events occurring in patients receiving CAR T cells who develop COVID-19. Prioritization of COVID-19 vaccination in patients with hematological disease is of paramount importance; however, based on existing knowledge of the reduced immunogenicity in the immunocompromised host, CAR T-cell recipients are not expected to generate robust responses to COVID-19 vaccines. In this respect, additional preventive measures should be explored. It has been shown that cellular therapies may be safely administered throughout the COVID-19 pandemic when appropriate interventions are instituted, including antimicrobial stewardship programs, screening of donors and recipients, and safe delivery of cellular products. Appealing alternatives to vaccination are monoclonal antibodies or prophylaxis with oral agents (fluvoxamine and molnupiravir), although clinical trials in patients with hematological disease are urgently needed.

Our study is limited by its retrospective nature and small number of patients. Nevertheless, our results highlight a significant mortality rate in patients with COVID-19 who have received CAR T-cell therapy. Therapeutic strategies will need to be developed to ensure that CAR T-cell therapy can be delivered safely and successfully while COVID-19 remains endemic. Furthermore, data on vaccinations in this cohort are eagerly awaited to help formulate safe delivery.

Acknowledgments

The authors thank all contributors for their utmost contributions and support to the project during a pandemic situation and to Susann Blossfeld and Corinna Kramer for their administrative and technical assistance.

EPICOVIDEHA has received funds from the Optics COMMITM (COVID-19 Unmet Medical Needs and Associated Research Extension) COVID-19 RFP program by Gilead Sciences (Foster City, CA; project 2020-8223).

Authorship

Contribution: A.B., J.S.-G., P.C., and L.P. conceived of and co-designed the database; A.B., J.S.-G., and L.P. contributed to data analysis; A.B. wrote the manuscript; and all authors critically reviewed and revised the manuscript and provided final approval.

Conflict-of-interest disclosure: A.B. has received lecture honoraria from Gilead Sciences, Merck, Pfizer Pharmaceuticals, Basilea Pharmaceutica, Biotest, and Jazz Pharmaceuticals and served as a board member of Gilead Sciences and Takeda Pharmaceutical Company. S.L. has received support from Janssen, Gilead Sciences, Roche, AbbVie, Sanofi, Novartis, Actelion, and Pfizer and a research grant from Janssen. L.D. has received lecture honoraria from AbbVie, Amgen, Celgene, Eisai, Gilead Sciences, Kyowa Kirin, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Roche, Sandoz, Servier Laboratories, Takeda Pharmaceutical Company, and Teva Pharmaceutical Industries and served as a board member of AbbVie, Gilead Sciences, Novartis, Pfizer, and Takeda Pharmaceutical Company. M.H. reports research funding from Gilead Sciences, Astellas Pharma, Pfizer, and Merck Sharp & Dohme, outside the submitted work. N.K. reports research funding and honoraria from Gilead Sciences, Astellas Pharma, Pfizer,

and Merck Sharp & Dohme, outside the submitted work. P.K. is supported by the German Federal Ministry of Research and Education and the State of North Rhine-Westphalia, Germany; has received nonfinancial scientific grants from Miltenyi Biotect GmbH (Bergisch Gladbach, Germany) and the Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases, University of Cologne (Cologne, Germany); and has received lecture honoraria from and/or is an advisor to the Akademie für Infektionsmedizin e.V., Ambu GmbH, Astellas Pharma, the European Confederation of Medical Mycology, Gilead Sciences, GPR Academy Ruesselsheim, Merck Sharp & Dohme GmbH, Noxon N.V., Pfizer Pharma GmbH, and the University Hospital, Ludwig Maximilian University of Munich, outside the submitted work. O.A.C. reports grants or contracts from Amlyx Pharmaceuticals, Basilea Pharmaceutica, the German Federal Ministry of Education and Research, Cidara Therapeutics, the German Centre for Infection Research, the EU Directorate-General for Research and Innovation (101037867), F2G, Gilead Sciences, Matinas BioPharma, Medpace, Merck Sharp & Dohme, Mundipharma, Octapharma, Pfizer, and Scynexis; consulting fees from Amlyx Pharmaceuticals, Biocron, Biosys, Cidara Therapeutics, Da Volterra, Gilead Sciences, Matinas BioPharma, Medpace, Menarini, Molecular Partners, MSGERC, Noxon Pharma, Octapharma, PSI, Scynexis, and Seres Therapeutics; honoraria for lectures from Abbott Laboratories, Al-Jazeera Pharmaceutical Industries, Astellas Pharma, Grupo Biotoscana/United Medical/Knight, Hikma Pharmaceuticals, Medscape, Medupdate, Merck/Merck Sharp & Dohme, Mylan, and Pfizer; payment for expert testimony from Cidara Therapeutics; participation on a data safety monitoring board or advisory board for Actelion, Allegra Therapeutics, Cidara Therapeutics, Entasis Therapeutics, IQVIA, Janssen, Medpace, Paratek Pharma, PSI, and Shionogi; a pending patent currently being reviewed at the German Patent and Trade Mark Office; and other interests from DGHO, DGI, ECMM, ISHAM, MSGERC, and Wiley. The remaining authors declare no competing financial interests.

A complete list of the members of the EPICOVIDEHA Study Group appears in "Appendix."

References

- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720.
- Miyashita H, Mikami T, Chopra N, et al. Do patients with cancer have a poorer prognosis of COVID-19? An experience in New York City. *Ann Oncol*. 2020;31(8):1088-1089.
- Passamonti F, Cattaneo C, Arcaini L, et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 severity in patients with haematological malignancies in Italy: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Haematol*. 2020;7(10):e737-e745.
- Mehta V, Goel S, Kabarriti R, et al. Case fatality rate of cancer patients with COVID-19 in a New York hospital system. *Cancer Discov*. 2020;10(7):935-941.
- Malard F, Genthon A, Brissot E, et al. COVID-19 outcomes in patients with hematologic disease. *Bone Marrow Transplant*. 2020;55(11):2180-2184.
- Piñana JL, Martino R, García-García I, et al; Infectious Complications Subcommittee of the Spanish Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cell Therapy Group (GETH). Risk factors and outcome of COVID-19 in patients with hematological malignancies. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9:21.
- Martin-Moro F, Marquet J, Piris M, et al. Survival study of hospitalised patients with concurrent COVID-19 and haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2020;190(1):e16-e20.
- Scarfò L, Chatzikonstantinou T, Rigolin GM, et al. COVID-19 severity and mortality in patients with chronic lymphocytic leukemia: a joint study by ERIC, the European Research Initiative on CLL, and CLL Campus. *Leukemia*. 2020;34(9):2354-2363.

ORCID profiles: A.B., 0000-0001-5361-5613; J.S.-G., 0000-0002-6766-8297; P.C., 0000-0002-9186-1353; F.M., 0000-0001-6353-2272; A.C., 0000-0001-7198-8894; R.D.B., 0000-0001-9001-573X; R.D., 0000-0002-5024-1713; S.L., 0000-0001-5980-305X; F.F., 0000-0002-4350-3105; B.W., 0000-0001-6460-2471; J.B., 0000-0001-5595-9911; A.L.-G., 0000-0002-5354-5261; L.D., 0000-0002-5089-3201; I.E., 0000-0002-4043-6613; I.F.-R., 0000-0001-5888-7706; R.G.-S., 0000-0003-4120-2787; C.G.-V., 0000-0002-8915-0683; A.G., 0000-0002-4195-6397; N.Khanna, 0000-0002-2642-419X; A.K., 0000-0003-3180-3570; J.M., 0000-0003-4257-5980; M.H., 0000-0002-1653-2824; N.Klimko, 0000-0001-6095-7531; P.K., 0000-0002-7386-7495; A.P., 0000-0003-2519-0333; F.P., 0000-0001-8068-5289; O.C., 0000-0001-9599-3137; L.P., 0000-0001-8287-928X.

Correspondence: Alessandro Busca, Stem Cell Transplant Unit, AOU Cittadella Salute e della Scienza, Corso Bramante 88, 10126 Turin, Italy; e-mail: abusca@cittadellasalute.to.it; and Jon Salmanton-Garcia, University Hospital Cologne, Internal Medicine I, Infectious Diseases 2, Herderstrasse 52-54, 50931 Cologne, Germany; e-mail: jon.salmanton-garcia@uk-koeln.de.

Appendix: study group members

Investigators of the EPICOVIDEHA Study Group have 2 different statuses: authors and collaborators. Authors: Alessandro Busca, Jon Salmanton-Garcia, Paolo Corradini, Francesco Marchesi, Alba Cabrita, Roberta Di Blasi, Remy Dulery, Sylvain Lamure, Francesca Farina, Barbora Weinbergerová, Josip Batinić, Anna Nordlander, Alberto López-García, L'uboš Drgoňa, Ildefonso Espigado-Tocino, Iker Falces-Romero, Ramón García-Sanz, Carolina García-Vidal, Anna Guidetti, Nina Khanna, Austin Kulasekararaj, Johan Maertens, Martin Hoeningl, Nikolai Klimko, Philipp Koehler, Antonio Pagliuca, Francesco Passamonti, Oliver A. Cornely, and Livio Pagano. Collaborators: Jiri Mayer, Cristina de Ramón-Sánchez, Jenna Essame, Nicole García-Poutón, Raúl Córdoba, Marina Machado, Juan-Alberto Martín-González, Ola Blennow, Elisa Roldán, and Jakob Passweg.

9. Altuntas F, Ata N, Yigenoglu TN, et al; Turkish Ministry of Health, Hematology Scientific Working Group. COVID-19 in hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(4):952-955.
10. Shah GL, DeWolf S, Lee YJ, et al. Favorable outcomes of COVID-19 in recipients of hematopoietic cell transplantation. *J Clin Invest.* 2020; 130(12):6656-6667.
11. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 2021;11(4):69.
12. Strati P, Varma A, Adkins S, et al. Hematopoietic recovery and immune reconstitution after axicabtagene ciloleucel in patients with large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2021;106(10):2667-2672.
13. Salmanton-García J, Busca A, Cornely OA, et al. EPICOVIDEHA: a ready-to use platform for epidemiological studies in hematological patients with COVID-19. *HemaSphere.* 2021;5(7):e612.
14. Shah V, Ko Ko T, Zuckerman M, et al. Poor outcome and prolonged persistence of SARS-CoV-2 RNA in COVID-19 patients with haematological malignancies; King's College Hospital experience. *Br J Haematol.* 2020;190(5):e279-e282.
15. Maia C, Martín-Sánchez E, Garcés JJ, et al. Immunologic characterization of COVID-19 patients with hematological cancer. *Haematologica.* 2020; 106(5):1457-1460.
16. Vjenthira A, Gong IY, Fox TA, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 3377 patients. *Blood.* 2020;136(25):2881-2892.
17. Logue JM, Zucchetti E, Bachmeier CA, et al. Immune reconstitution and associated infections following axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2020;106(4):978-986.
18. Rivera DR, Peters S, Panagiotou OA, et al. Utilization of COVID-19 treatments and clinical outcomes among patients with cancer: a COVID-19 and cancer consortium (CCC19) cohort study. *Cancer Discov.* 2020;10(10):1514-1527.
19. Ljungman P, de la Camara R, Mikulska M, et al. COVID-19 and stem cell transplantation; results from an EBMT and GETH multicenter prospective survey. *Leukemia.* 2021;35(10):2885-2894.
20. Sharma A, Bhatt NS, St Martin A, et al. Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in haematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study [published correction appears in *Lancet Haematol.* 2021;8(6):e393]. *Lancet Haematol.* 2021;8(3):e185-e193.

Downloaded from <http://ahajournals.org/bloodadvances/article-pdf/6/7/2427/1887717advancesadv2021005616.pdf> by guest on 15 April 2022.

4.1.6. Annex 29

Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Lopez-Garcia A., Lamure S., Itri F., Gomes da Silva M., Dragonetti G., Falces-Romero I., van Doesum J., Sili U., Labrador J., Calbacho M., Bilgin Y., Weinbergerová B., Serrano Gomez LM., Ribera JM., Malak S., Loureiro-Amigo J., Glenthøj A., Cordoba R., Nunes Rodrigues R., Gonzalez-Lopez TJ., Karlsson LK., Jimenez MJ., Hernández-Rivas JÁ., Jaksic O., Racil Z., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., Klimko N., Koehler P., Pagliuca A., Passamonti F., Cornely O. COVID-19 in vaccinated adult patients with hematological malignancies. Preliminary results from EPICOVIDEHA. *Blood* 2022; 139(10):1588-1592. doi: 10.1182/blood.2021014124. ISSN 1528-0020.

IF = 23,629 v roce 2020; HEMATOLOGY Q1; 0 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací



TO THE EDITOR:

COVID-19 in vaccinated adult patients with hematological malignancies: preliminary results from EPICOVIDEHA

Livio Pagano,^{1,2,4} Jon Salmanton-García,^{3,4,*} Francesco Marchesi,^{5,*} Alberto López-García,⁶ Sylvain Lamure,⁷ Federico Itri,⁸ Maria Gomes-Silva,⁹ Giulia Dragonetti,^{1,2} Iker Falces-Romero,¹⁰ Jaap van Doesum,¹¹ Uluhan Sili,¹² Jorge Labrador,¹³ Maria Calbacho,¹⁴ Yavuz M. Bilgin,¹⁵ Barbora Weinbergerová,¹⁶ Laura Serrano,¹⁷ José-María Ribera-Santa Susana,¹⁸ Sandra Malak,¹⁹ José Loureiro-Amigo,²⁰ Andreas Glenthøj,²¹ Raúl Córdoba-Masculano,⁶ Raquel Nunes-Rodrigues,²² Tomás-José González-López,¹³ Linda Katharina Karlsson,²³ María-Josefa Jiménez-Lorenzo,²⁴ José-Ángel Hernández-Rivas,²⁵ Ozren Jaksic,²⁶ Zdeněk Ráčil,²⁷ Alessandro Busca,²⁸ Paolo Corradini,²⁹ Martin Hoenigl,³⁰⁻³² Nikolai Klimko,³³ Philipp Koehler,^{3,4} Antonio Pagliuca,³⁴ Francesco Passamonti,³⁵ and Oliver A. Cornely,^{3,4,36-38} on behalf of the EPICOVIDEHA working group

¹Department of Hematology, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli-Institute for Cancer Research and Care (IRCCS), Rome, Italy; ²Department of Hematology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy; ³Department I of Internal Medicine, University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), Cologne, Germany; ⁴University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), Cologne, Germany; ⁵Hematology and Stem Cell Transplant Unit, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy; ⁶Fundación Jimenez Diaz University Hospital, Health Research Institute, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez-Díaz (IS-FJD), Madrid, Spain; ⁷Département d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier, Unité Mixte de Recherche-Centre National de la Recherche Scientifique (UMR-CNRS) 5535, Université de Montpellier, Montpellier, France; ⁸San Luigi Gonzaga Hospital-Orbassano, Orbassano, Italy; ⁹Portuguese Institute of Oncology, Lisbon, Portugal; ¹⁰La Paz University Hospital, Madrid, Spain; ¹¹Department of Hematology, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands; ¹²Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Marmara University, Istanbul, Turkey; ¹³Department of Hematology, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain; ¹⁴Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ¹⁵Admiraal de Ruijter Hospital, Goes, The Netherlands; ¹⁶Department of Internal Medicine-Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ¹⁷Hospital Universitario de Cabueñes, Gijón, Spain; ¹⁸Hospital Germans Trias i Pujol-Institut Català d'Oncologia Badalona Servicio de Hematología Clínica, Barcelona, Spain; ¹⁹Département d'Oncologie Médicale, Hématologie, Institut Curie, Saint Cloud, France; ²⁰Hospital de Sant Joan Despi Moisés Broggi, Sant Joan Despi, Spain; ²¹Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; ²²Departamento de Hematología, Instituto Português de Oncologia, Lisboa, Portugal; ²³Department of Hematology, Center for Hemoglobinopathies, Herlev and Gentofte Hospital, Herlev, Denmark; ²⁴Hospital Germans Trias i Pujol-Institut Català d'Oncologia Badalona Servicio de Hematología Clínica, Barcelona, Spain; ²⁵Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain; ²⁶Department of Hematology, Dubrava University Hospital, Zagreb, Croatia; ²⁷Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic; ²⁸Stem Cell Transplant Center, Azienda Ospedaliera-Universitaria (AOU) Città della Salute e della Scienza, Turin, Italy; ²⁹University of Milan and Fondazione, IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; ³⁰Division of Infectious Diseases and Global Public Health, Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA; ³¹Clinical and Translational Fungal-Working Group, University of California San Diego, La Jolla, CA; ³²Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria; ³³North-Western State Medical University (named after) Iliá Ilich Méchnikov, Saint-Petersburg, Russia; ³⁴Department of Hematological Medicine, King's College Hospital National Health Service (NHS) Foundation Trust, London, United Kingdom; ³⁵Department of Medicine, Surgery, University of Insubria and Azienda socio sanitaria territoriale (ASST) Sette Laghi, Ospedale di Circolo of Varese, Varese, Italy; ³⁶University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Clinical Trials Centre Cologne (Zentrum für Klinische Studien [ZKS] Köln), Cologne, Germany; ³⁷University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), Cologne, Germany; and ³⁸German Centre for Infection Research (DZIF), Partner Site Bonn-Cologne, Cologne, Germany

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a life-threatening condition of high relevance for comorbid patients, such as those with baseline hematological malignancies (HM).¹⁻³ In April 2020, the European Hematology Association - Infectious Diseases Working Party opened an open web-based registry to collect all cases of HM adult patients that developed COVID-19 infections (EPICOVIDEHA survey).⁴ This registry aimed to describe the epidemiology, risk factors, and mortality rates of HM patients. Overall, we collected 3801 valid cases, and we observed an overall mortality rate of 31%.⁵

Nearly 1 year after the first described COVID-19 case, in December 2020, the first vaccines against the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) were available,^{6,7} and administration to the highest risk populations including HM patients started.^{8,9} From 1 January 2021, we prospectively collected registry data on adult fully or partially vaccinated HM patients that developed COVID-19 to assess the vaccine efficacy and potentially

identify categories of patients that may be less protected by vaccines. With this report, we share our findings of the first 113 patients included in the registry.

EPICOVIDEHA survey has been approved centrally by the Institutional Review Board and Ethics Committee of Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli - IRCCS - Università Cattolica del Sacro Cuore (Rome, Italy) and by the respective local partners as appropriate. EPICOVIDEHA has been registered at www.clinicaltrials.gov with the identifier NCT04733729.⁴ From 1 January 2021 until 31 December 2021, all participating institutions document episodes of COVID-19 in their patients with baseline HM that received a vaccination against SARS-CoV-2. Data are collected via the EPICOVIDEHA electronic case report form, available at www.clinicalsurveys.net. This online survey is provided by Enterprise Feedback Suite Fall 2018 (Questback, Cologne, Germany). Clinical and epidemiological data from

Downloaded from <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/139/10/1588/1879381/blood.2021.101124.pdf> by guest on 19 April 2022

Table 1. Clinical characteristics of 113 vaccinated HM patients that developed COVID-19 infection

	Patients, n	%
Sex		
Female/male	44/69	38.9/61.1
Age (y.o.) (IQR) [range]	66 (58 - 78) [21 - 94]	
50/>50 y.o.	16/97	14.2/85.8
Comorbidities		
None/1-2-3 comorbidities	36/77	31.9/68.1
Smoking history	17	15.0
Malignancy		
Acute lymphoid leukemia	3	2.6
Chronic lymphoid leukemia	28	24.8
Acute myeloid leukemia	5	4.4
Chronic myeloid leukemia	1	0.9
Myelodysplastic syndrome	7	6.2
Hodgkin lymphoma	4	3.5
Non-Hodgkin lymphoma	36	31.9
Myelofibrosis	3	2.7
Polycythemia vera	2	1.8
Systemic mastocytosis	2	1.8
Multiple myeloma	20	17.7
Aplastic anemia	2	1.8
Malignancy status before COVID-19		
Controlled disease*	51	45.1
Active disease	60	53.1
Not reported	2	1.8
Last malignancy treatment (in the last 3 mo)		
alloHSCT (in the last 6 mo)	1	0.9
Chemotherapy	77	68.1
Conventional chemotherapy	13	11.5
Hypomethylating agents	4	3.5
Immunotherapy	9	8.0
Immunochemotherapy	30	26.5
Targeted therapy	21	18.6
No treatment	35	31.0
Patients with previous COVID-19 infections	2	1.8
Yes/no	2/111	1.8/98.2
Vaccination		
One dose	25	22.1
Two doses	88	77.8
Patient that received vaccination at least 14 d before COVID-19 infection	87	77.0
Type of vaccine		
mRNA + LNP		
BioNTech/Pfizer	79	69.9

Table 1. (continued)

	Patients, n	%
Moderna COVE	20	17.7
Vector-based		
AstraZeneca Oxford	10	8.8
Inactivated		
Sinovac	4	3.5
Antispike protein Ig dosage after vaccination (referring to WHO international standards, BAU/mL)		
No response (<30)	27	23.9
Weak response (31-250)	5	4.4
Optimal response (>250)	8	7
Unknown/not measured	73	64.7
COVID-19 infection		
WT	11	9.7
English: alpha (α)	16	14.2
South African: beta (β)	1	0.9
Indian: delta (δ)	9	8.0
Not tested	76	67.3
Severity		
Asymptomatic	22	19.5
Mild infection	12	10.6
Severe infection	63	55.8
Critical infection	16	14.2
Symptomatology at onset		
Asymptomatic	23	20.4
Pulmonary symptoms	37	32.7
Extrapulmonary symptoms	14	12.4
Pulmonary and extrapulmonary	39	34.5
Neutrophil count		
≥500/mm ³	98	86.7
Lymphocyte count		
≥200/mm ³	92	81.4

alloHSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; BAU, binding antibody units; COVE, Coronavirus Efficacy and Safety Study; IQR, interquartile range; LNP, lipid nanoparticles; mRNA, messenger RNA; N, number; WT, wild type; y.o., years old.

*Controlled disease: partial remission or better.

patients with the laboratory-based diagnosis of SARS-CoV-2 infection after partial or complete vaccination are collected. Data captured included underlying conditions before SARS-CoV-2, HM status and management before SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 vaccination, and infection details and mortality. The diagnosis of COVID-19 accords to the international recommendations of the World Health Organization (WHO).¹⁰ The severity of COVID-19 at admission is graded according to the China Centers for Disease Control and Prevention definitions.¹¹ Patients are considered fully vaccinated if the final dose was administered at least 14 days

Table 2. Outcome of vaccinated patients that developed COVID-19 infection

	N patients	%
Stay during COVID-19		
Hospital	75	66.4
COVID-19 ward	59	83.8
ICU	16	14.2
Of which, invasive mechanical ventilation	10	8.8
Home	38	33.6
Overall mortality at 30 d	14	12.4
Attributable to COVID-19	9/14	64.3
+ Hematological malignancy	3/14	21.4
Contributable by COVID-19	4/14	28.6
+ Other reasons*	2/14	14.3
Not related to COVID-19	1/14	7.1
+ Hematological malignancy	1/14	7.1
Mortality according to severity		
Asymptomatic	1/14	7.1
Mild infection	1/14	7.1
Severe infection	7/14	50.0
Critical infection	5/14	35.7
Mortality for stay		
Hospital	13/14	11.5
ICU	5/14	35.7
Of which, invasive mechanical ventilation	5/5	100.0
Home	1/14	7.1
Mortality according to type of vaccine		
BioNTech/Pfizer	12/79	15.2
Moderna COVE	1/20	5.0
AstraZeneca Oxford	1/10	10.0
Sinovac	0/4	0.0
Mortality according to SARS-CoV-2 variant		
WT	0/14	0.0
English: alpha (α)	4/14	28.6
South African: beta (β)	0/14	0.0
Indian: delta (δ)	0/14	0.0
Not tested	10/14	71.4
Mortality according to vaccine scheme		
1 dose	4/25	28.6
Full dose	10/78	71.4
Mortality according to type of hematological malignancy		
Acute lymphoid leukemia	0/3	0.0
Chronic lymphoid leukemia	2/28	7.1

Table 2. (continued)

	N patients	%
Acute myeloid leukemia	0/5	0.0
Chronic myeloid leukemia	0/1	0.0
Myelodysplastic syndrome	2/7	28.6
Hodgkin lymphoma	1/4	25.0
Non-Hodgkin lymphoma	6/36	16.7
Myelofibrosis	1/3	33.3
Polycythemia vera	0/2	0.0
Systemic mastocytosis	1/2	50.0
Multiple myeloma	1/20	5.0
Aplastic anemia	0/2	0.0
Mortality for patients with active hematological malignancy		
Yes/no	7/7	50.0/50.0
Mortality for patients with chemo-immuno or radiotherapy		
in the last 3 mo	10/14	71.4
more than 3 mo/w&w	4/14	28.6

alloHSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; COVE, Coronavirus Efficacy and Safety Study; ICU, intensive care unit; w&w, watch and wait.

*Renal impairment plus bacterial infection; intestinal subocclusion.

before symptom onset or a positive polymerase chain reaction test for SARS-CoV-2.

As of 31 August 2021, 113 COVID-19 episodes among partially or completely vaccinated patients with HM have been registered in EPICOVIDEHA. These patients have been reported from 42 out of 163 centers in 14 out of 38 European and non-European countries participating in the survey. The clinical characteristics of these patients are reported in Table 1. The majority of them were males (61.1%) and over 50 years of age (85.8%). More than 80% of patients had underlying lymphoproliferative malignancies (chronic lymphoid leukemia [CLL], non-Hodgkin lymphoma [NHL], acute lymphoblastic leukemia, Hodgkin's lymphoma, and multiple myeloma). Seventy-eight (68.1%) patients received active treatment of underlying HM at the time of COVID-19 or within the prior 3 months. Following the recommendations of major international scientific societies,^{8,9} the majority of our patients received an mRNA vaccine (BioNTech/Pfizer n = 79 [69.9%], Moderna n = 20 [17.7%]), whereas the remaining 14 (12.4%) received a vector-based vaccine (AstraZeneca Oxford, n = 10) or an inactivated vaccine (Sinovac CoronaVac, n = 4); overall, the median time from the last dose of vaccine and COVID-19 diagnosis was of 64 days (IQR: 33.5-108). Eighty-seven patients (77%) were considered fully vaccinated, whereas the remaining 26 received only 1 shot; in all fully vaccinated patients, COVID-19 was diagnosed more than 2 weeks after the second vaccine dose. Viral genomes of infection were analyzed in only 37 (32.7%) cases and the α-variant was the most frequently observed (supplemental Figure 1). Postvaccine IgG levels against SARS-CoV-2 spike protein were analyzed in 40 (35.4%) fully vaccinated patients, 2 to 4 weeks from the last vaccine dose. Among these patients, only 13 (32.5%) presented an

antibody response to vaccine (optimal: 8; weak: 5), whereas the remaining 27 (67.5%) were considered no responders (BAU <30/mL). Overall, 79 (60.4%) patients had a severe or critical infection. Seventy-five patients (66.4%) were admitted to the hospital: 16 (21.3%) of them to an ICU, and 10/16 required mechanical ventilation (Table 2); detailed data about COVID-19 symptoms and severity according to HM diagnosis have been described in supplemental Table 1. After a follow-up of 30 days post-COVID-19 diagnosis, the overall mortality rate was 12.4% (n = 14). COVID-19 was the main or a secondary cause of death for all but 1 patient; interestingly, we did not observe any statistical difference in terms of mortality between partially or fully vaccinated patients (15.4% vs 11.5%; $P = .734$) and between patients achieving a serological response to vaccine vs nonresponders (13.3% vs 15.6%; $P = 1$). In addition, we did not find any significant differences in terms of age or comorbidities comparing responder vs nonresponder patients. Moreover, our multivariable analysis showed that the only factor independently related to the risk of death in our cohort of vaccinated patients was the age ($P = .035$; HR 1.053, 95% CI: 1.004-1.105) (supplemental Table 2). Ten of 14 (71.4%) patients who died had underlying lymphoproliferative malignancies. With the caution due to the limited number of reported cases, it is worth it to underline that none of the patients who died had underlying acute myeloid leukemia, which in our previous analysis in nonvaccinated patients was the category with one of the highest mortality rates.⁵

A generalized anti-SARS-CoV-2 vaccination policy has allowed a marked reduction in the incidence of severe COVID-19 in the general population. However, some reports indicate the occurrence of the infection in a limited number of vaccinated subjects.¹²⁻¹⁴ These are mostly subjects who have not developed protective immunity. Our survey, involving 42 hematology departments around the world, provides some preliminary insights. The majority of patients who do not respond to vaccination are patients with lymphoproliferative diseases, mainly CLL and NHL. This has also been observed for other vaccinations (eg, influenza).^{15,16} Our results suggest that the low serologic response rate to anti-SARS-CoV-2 vaccines in patients with HM may translate to higher rates of infections. This has previously been described following monoclonal antibody treatment.¹⁷⁻²³ Unfortunately, only little data are available on the genomic characterization of the virus. We expect to have more detailed data at the end of this survey. Given policies that differ between sites, postvaccination serology results were available in only ~35% of patients, and of those about two-thirds were serologically nonresponders. An important limitation of these data is that methods for evaluating anti-SARS-CoV-2 antibodies were different among enrolling centers; as a consequence we tried to reduce this interlaboratory variability by referring to the WHO standardized method (<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/standardization-of-vaccines-for-coronavirus-disease-covid-19>). Importantly, the overall mortality observed in our patients, although lower than in the prevaccination period (~31%), remained high (12.4%). This percentage, on one hand, remains quite worrying for hematologists, but on the other hand should be interpreted as a significant achievement following the spread of vaccination programs around the world. The hospitalization and mortality rates are still higher than the ones observed in the fully vaccinated general population, where hospitalization rates of 2% to 3% have been reported.^{12,13,24,25} Our study reports preliminary observations, and the low number of vaccinated patients is the main weakness, for now limiting the possibility to define the real incidence of breakthrough COVID-19 in HM.

Recruitment to this survey continues, and larger numbers of cases will enable us to draw more conclusions in order to develop strategies to prevent severe COVID-19 in this frail population.

Informed consent was collected as applicable.

Acknowledgment

Università Cattolica del Sacro Cuore contributed to the funding of this research project and its publication.

Authorship

Contribution: L.P. set up EPICVIDEHA, conceived the study idea, provided clinical details from local patients, interpreted the data, wrote the initial draft of the manuscript, and revised and approved the final manuscript; J.S.-G. enrolled patients and performed formal validation of the clinical details, extracted data from EPICVIDEHA patients, performed the statistical analysis and interpreted the data, wrote the initial draft of the manuscript, created tables, and revised and approved the final manuscript; F.M. provided clinical details from local patients interpreted the data, interpreted the data, wrote the initial draft of the manuscript, and revised and approved the final manuscript; A.L.-G., S.L., F.I., M.G.-S., G.D., I.F.-R., J.V.D., U.S., J.L., M.C., Y.M.B., B.W., L.S., J.-M.R.-S.S., S.M., J.L.-A., A.G., R.C.-M., R.N.-R., T.-J.G.-L., L.K.K., M.-J.J.-L., J.-A.H.-R., O.J., Z.R., and the researchers listed in the study group provided clinical details from local patients and revised and approved the final manuscript; and A.B., P.C., M.H., N.K., P.K., A.P., F.P., and O.A.C. set up EPICVIDEHA, conceived the study idea, and revised and approved the final manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

A list of the members of the EPICVIDEHA study group appears in "Appendix."

ORCID profiles: L.P., 0000-0001-8287-928X; J.S.-G., 0000-0002-6766-8297; F.M., 0000-0001-6353-2272; A.L.-García, 0000-0002-5354-5261; S.L., 0000-0001-5980-305X; F.I., 0000-0002-3532-5281; M.G.-S., 0000-0002-6993-2450; G.D., 0000-0003-1775-6333; I.F.-R., 0000-0001-5888-7706; J.vanD., 0000-0003-0214-3219; U.S., 0000-0002-9939-9298; J.L., 0000-0002-3696-0287; M.C., 0000-0001-8106-4863; Y.M.B., 0000-0003-4854-5424; B.W., 0000-0001-6460-2471; J.-M.R.-S.S., 0000-0003-1042-6024; S.M., 0000-0001-8823-5055; J.L.-A., 0000-0002-6451-8971; A.G., 0000-0003-2082-0738; R.C.-Mascuñano, 0000-0002-7654-8836; R.N.-R., 0000-0002-8347-4281; T.-J.González-L., 0000-0001-9575-1816; L.K.K., 0000-0003-3317-7550; M.-J.J.-L., 0000-0002-5469-5237; J.-ngelH.-R., 0000-0003-4550-757X; Z.Rácil, 0000-0003-3511-4596; A.B., 0000-0001-5361-5613; P.C., 0000-0002-9186-1353; M.H., 0000-0002-1653-2824; N.K., 0000-0001-6095-7531; P.K., 0000-0002-7386-7495; A.P., 0000-0003-2519-0333; F.P., 0000-0001-8068-5289; O.A.C., 0000-0001-9599-3137.

Correspondence: Livio Pagano, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli-IRCCS-Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo Francesco Vito 1, 00168 Roma, Italia; e-mail: Livio.Pagano@unicatt.it.

Footnotes

Submitted 15 September 2021; accepted 13 October 2021; prepublished online on Blood First Edition 8 November 2021.

*L.P., J.S.-G., and F.M. are joint first authors.

Requests for data sharing may be submitted to Livio Pagano (livio.pagano@unicatt.it).

The online version of this article contains a data supplement.

There is a Blood Commentary on this article in this issue.

Appendix

Members of the EPICOVIDEHA study group: Florian Reizine (Rennes, France); Malgorzata Mikulska (Genoa, Italy); Hytham K. S. Hamid (Caserta, Italy); Nicola S. Fracchiolla (Milan, Italy); Francesca Farina (Milan, Italy); Nicola Coppola (Naples, Italy); Caterina Buquicchio (Bartolotta, Italy); Avinash Aujayeb (Cramlington, United Kingdom); Przemyslaw Zdzinski (Wroclaw, Poland); Maria Chiara Tisi (Vicenza, Italy); Martin Schönlein (Hamburg, Germany); Gianpaolo Nadali (Verona, Italy); Martin Kolditz (Dresden, Germany); Michaela Hanakova (Czech Republic); Monica Fung (San Francisco); Maureen Chbat (Chesnay, France); Caroline Besson (Versailles, France); Valentina Bonuomo (Verona, Italy); and Ghaith Abu-Zeinah (New York, NY).

REFERENCES

1. Wood WA, Neuberger DS, Thompson JC, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a report from the ASH Research Collaborative Data Hub. *Blood Adv.* 2020;4(23):5966-5975.
2. Ljungman P, de la Camara R, Mikulska M, et al. COVID-19 and stem cell transplantation: results from an EBMT and GETH multicenter prospective survey. *Leukemia.* 2021;35(10):2885-2894.
3. Passamonti F, Cattaneo C, Arcaini L, et al. ITA-HEMA-COV Investigators. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 severity in patients with hematological malignancies in Italy: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Haematol.* 2020;7(10):e737-e745.
4. Salmanton-García J, Busca A, Comely OA, et al. EPICOVIDEHA: a ready to use platform for epidemiological studies in hematological patients with COVID-19. *HemaSphere.* 2021;5(7):e612.
5. Pagano L, Salmanton-García J, Marchesi F, et al. EPICOVIDEHA working group. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):168.
6. Anderson EJ, Roupheal NG, Widge AT, et al. mRNA-1273 Study Group. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 2020;383(25):2427-2438.
7. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. C4591001 Clinical Trial Group. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-2615.
8. Brockhoff R, Akan H, Duarte R, et al. Expert opinions for COVID-19 vaccination in patients with hematologic cancer. <https://ehaweb.org/covid-19/eha-statement-on-covid-19-vaccines/recommendations-for-covid-19-vaccination-in-patients-with-hematologic-cancer/>. Accessed 20 September 2021.
9. Committee NCCN-VA. Preliminary recommendations of the NCCN-COVID-19 Vaccination Advisory Committee. 2020. https://www.nccn.org/covid-19/pdf/COVID-19_Vaccination_Guidance_V1.0.pdf. Accessed 24 September 2021.
10. World Health Organization. COVID-19 Clinical management: living guidance. 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>. Accessed 24 September 2021.
11. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020;323(13):1239-1242.
12. Bergwerk M, Gonen T, Lustig Y, et al. Covid-19 breakthrough infections in vaccinated health care workers. *N Engl J Med.* 2021;385(16):1474-1484.
13. Brown CM, Vostok J, Johnson H, et al. Outbreak of SARS-CoV-2 infections, including COVID-19 vaccine breakthrough infections, associated with large public gatherings - Barnstable County, Massachusetts, July 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70(31):1059-1062.
14. Juthami PV, Gupta A, Borges KA, et al. Hospitalisation among vaccine breakthrough COVID-19 infections. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(11):1485-1486.
15. Ljungman P, Nahi H, Linde A. Vaccination of patients with haematological malignancies with one or two doses of influenza vaccine: a randomised study. *Br J Haematol.* 2005;130(1):96-98.
16. Cordonnier C, Mikulska M, Einarsson S, Cesaro S, Ljungman P; ECIL vaccine group. 2017 ECIL 7 vaccine guidelines. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(7):694-695.
17. Greenberger LM, Saltzman LA, Seneffeld JW, Johnson PW, DeGennaro LJ, Nichols GL. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell.* 2021;39(8):1031-1033.
18. Herishanu Y, Avivi I, Aharon A, et al. Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2021;137(23):3165-3173.
19. Pimpinelli F, Marchesi F, Piaggio G, et al. Fifth-week immunogenicity and safety of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in patients with multiple myeloma and myeloproliferative malignancies on active treatment: preliminary data from a single institution. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):81.
20. Herzog Tzarlati K, Gutwein O, Apel A, et al. BNT162b2 COVID-19 vaccine is significantly less effective in patients with hematologic malignancies. *Am J Hematol.* 2021;96(10):1195-1203.
21. Lim SH, Campbell N, Johnson M, et al. Antibody responses after SARS-CoV-2 vaccination in patients with lymphoma. *Lancet Haematol.* 2021;8(8):e542-e544.
22. Parry H, McIlroy G, Bruton R, et al. Antibody responses after first and second Covid-19 vaccination in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Cancer J.* 2021;11(7):136.
23. Terpos E, Gavriatopoulou M, Ntanasis-Stathopoulos I, et al. The neutralizing antibody response post COVID-19 vaccination in patients with myeloma is highly dependent on the type of anti-myeloma treatment. *Blood Cancer J.* 2021;11(8):138.
24. Tenforde MW, Patel MM, Ginde AA, et al. Influenza and Other Viruses in the Acutely Ill (IVY) Network. Effectiveness of SARS-CoV-2 mRNA vaccines for preventing Covid-19 hospitalizations in the United States [published online ahead of print 6 August 2021]. *Clin Infect Dis.* doi:10.1093/cid/ciab687.
25. Griffin JB, Haddix M, Danza P, et al. SARS-CoV-2 infections and hospitalizations among persons aged ≥16 years, by vaccination status - Los Angeles County, California, May 1-July 25, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70(34):1170-1176.

DOI 10.1182/blood.202104124

© 2022 by The American Society of Hematology. Licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0), permitting only noncommercial, nonderivative use with attribution. All other rights reserved.

Downloaded from <https://pubs.asaholibrary.org/blood/article-pdf/139/10/1592/1979387/blood.202104124.pdf> by guest on 15 April 2022