

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav mikrobiologie



**Zdokonalení časně diagnostiky invazivní plicní aspergilózy
způsobené *Aspergillus fumigatus* pomocí specifických bio-
markerů ze séra a moče**

Doktorská dizertační práce

Olomouc 2019

Mgr. Radim Dobiáš

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci „Zdokonalení časné diagnostiky invazivní plicní aspergilózy způsobené *Aspergillus fumigatus* pomocí specifických biomarkerů ze séra a moče“ vypracoval samostatně v průběhu doktorského studia pod odborným vedením školitele doc. MUDr. Petra Hamala, Ph.D. a prof. MUDr. et Mgr. Milana Rašky, Ph. D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Mgr. Radim Dobiáš.....

Poděkování:

Touto cestou bych chtěl poděkovat svým školitelům doc. MUDr. Petru Hamalovi, Ph. D. a prof. MUDr. et Mgr. Milanu Raškovi, Ph. D. za jejich odborné vedení v rámci mého doktorského studia a za cenné rady a připomínky při revizi textu této dizertační práce, dále bych rád poděkoval prof. Ing. Vladimíru Havlíčkovi, Ph. D. a jeho spolupracovníkům (Mikrobiologický ústav AVČR) za provedení detekcí TAFC ze vzorků moči pacientů metodou HPLC/ESI-FTICR a cenné rady a připomínky při revizi textu této dizertační práce. Poděkování patří také spolupracovníkům z Laboratoře klinické mykologie, Oddělení bakteriologie a mykologie a RNDr. Aleně Kloudové, vedoucí centra klinických laboratoří, Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě za pomoc při přípravě vzorků a podporu při výzkumné činnosti. Práce byla finančně podporována granty IGA_LF_2014_021, IGA_LF_2015_035 a IGA_LF_2016_022.

Mgr. Radim Dobiáš

Obsah

1	ÚVOD	8
2	MOŽNOSTI ČASNÉ DIAGNOSTIKY IPA V SOUČASNÉ LABORATORNÍ PRAXI	11
2.1	Význam galaktomananu v diagnostice invazivní aspergilózy non-neutropenických pacientů	12
2.2	Význam (1,3)- β -D-glukanu v diagnostice invazivní aspergilózy non-neutropenických pacientů	12
2.3	Význam specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> v diagnostice invazivní aspergilózy v séru non-neutropenických pacientů	13
2.4	Význam specifických mikrobiálních sideroforů v diagnostice invazivní aspergilózy.....	14
2.5	Možnosti ostatních laboratorních testů v diagnostice invazivní plicní aspergilózy.....	15
3	CÍLE PRÁCE	18
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Návrh studie	20
4.1.1	Detekce galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu, specifických IgA a IgG <i>A. fumigatus</i>	20
4.1.2	Triacetylfusarinin C.....	26
4.1.2.1	Diagnostická strategie.....	27

4.2	(1,3)-β-D-glukan, galaktomanan, specifické IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> v séru	28
4.3	Zpracování vzorků a HPLC / ESI-FTICR	29
4.4	Analýza dat	30
5	VÝSLEDKY	31
5.1	Populační studie	31
5.1.1	<i>Galaktomanan, (1,3)-β-D-glukan, specifické IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> v séru</i>	31
5.1.2	<i>Triacetylfusarinin C v moči</i>	35
5.2	Diagnostický a prognostický význam stanovení galaktomananu, (1,3)-β-D-glukanu, specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> v séru	38
5.2.1	<i>Detekce galaktomananu ze séra</i>	41
5.2.2	<i>Detekce (1,3)-β-D-glukanu ze séra</i>	42
5.2.3	<i>Detekce specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> ze séra</i>	42
5.2.4	<i>Laboratorní diagnostika IPA založená na pozitivitě galaktomananu a (1,3)-β-D-glukanu současně</i>	42
5.2.5	<i>Laboratorní diagnostika IPA založená na pozitivitě více testů současně v různých kombinacích (galaktomananu, (1,3)-β-D-glukanu a specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i>)</i>	43
5.2.6	<i>Laboratorní diagnostika IPA založená na strategii “alespoň jeden pozitivní test” (galaktomanan, (1,3)-β-D-glukan, specifické IgAG)</i>	43
5.2.7	<i>Statisticky významná zjištění</i>	44
5.3	Detekce triacetylfusarininu C v moči	45

6	DISKUZE	48
6.1	Detekce galaktomananu.....	48
6.2	Detekce (1,3)- β -D-glukanu	48
6.3	Detekce specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> v séru	49
6.4	Dvojitá pozitivita detekcí galaktomananu a (1,3)- β -D-glukanu	51
6.5	Dvojitá pozitivita detekcí galaktomananu a specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> nebo (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i> nebo trojitá pozitivita galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i>	52
6.6	Strategie “alespoň jeden pozitivní test” (galaktomanan a (1,3)- β -D-glukan nebo galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan a specifické IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i>)	53
6.7	Význam koncentrace specifických IgA proti <i>A. fumigatus</i> v mortalitě pacientů při invazivní aspergilóze	54
6.8	Detekce triacetylfusarininu C v moči pacientů s pravděpodobnou (EORTC / MSG) / pravděpodobnou (AspICU) IPA.....	55
7	LIMITY STUDIE.....	59
8	ZÁVĚR	61
8.1	Galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan a specifické IgA a IgG proti <i>A. fumigatus</i>	61
8.2	Triacetylfusarinin C.....	61

9	SOUHRN	62
10	SUMMARY	64
11	LITERATURA	66
12	PUBLIKAČNÍ ČINNOST V PRŮBĚHU DSP	76
12.1	Publikace v časopisech s impakt faktorem	76
12.2	Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru	77
12.3	Přednášky a postery s abstraktem	78
13	SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A ZKRATEK	81
13.1	Seznam tabulek	81
13.2	Seznam obrázků	82
13.3	Seznam zkratk	83

1 ÚVOD

Invazivní plicní aspergilóza (IPA) u non-neutropenických pacientů jednotek intenzivní péče (JIP) je více než pouhá výjimka [1-5]. Nejčastěji je diagnostika IPA založena na kritériích EORTC / MSG (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) [6]. U pacientů JIP s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) nebo dekompenzovaným onemocněním jater, kteří nejeví známky imunodeficiency, může mít včas neodhalená IPA za následek nárůst mortality [7]. IPA non-neutropenických pacientů se liší od IPA neutropenických pacientů jak z hlediska epidemiologie, klinických projevů, výsledků, tak i prognózy a obecně není příliš podrobně popsána [8]. U non-neutropenických pacientů má vyšetření hrudní počítačovou tomografií (Computed Tomography, CT) relativně nízkou citlivost (5 % až 24 % odhalených případů IPA) a bronchoskopie je u non-neutropenických pacientů s IPA nespecifická a nálezy jsou často podobné s nálezy při jiných infekčních onemocněních (nodulace, ulcerace, pseudomembrány, plaky, nekrózy apod.) [9, 10]. Invazivní postupy, nezbytné k získání vzorků pro histologické vyšetření a průkaz invaze rodem *Aspergillus*, jsou prováděny pouze u části pacientů a mnohdy nevedou k průkazu invaze [11]. Mezi klasické metody mykologického vyšetření patří mikroskopie a kulturační průkaz druhu *Aspergillus fumigatus* z klinického vzorku. Nativní klinické vzorky lze po maceraci tkáně 20% roztokem KOH vyšetřovat jako preparáty obarvené běžnými mikrobiologickými postupy (Giemsa-Romanowski, Gram-Weigert) pomocí optického mikroskopu nebo preparáty obarvené fluorochromy pomocí fluorescenčního nebo konfokálního mikroskopu (viz **obrázek 1**). Nevýhodou mikroskopických metod je nízká senzi-

tivita [12]. Kultivace klinického materiálu umožní jednoznačnou identifikaci druhu a stanovení citlivosti k antimykotikům. Kultivační vyšetření má velmi nízkou senzitivitu (< 50 %) ale v případě pozitivního nálezu vysokou specifitu (až 92 %) [13]. Výše uvedené metody mají jen omezenou schopnost rozlišit mezi kolonizací epitelii rodem *Aspergillus* a transepitelovou invazí u IPA pacientů při pozitivním nálezu aspergilů v respiračním traktu. Proto jsou hledány nové přístupy, které by zvýšily spolehlivost časně diagnózy IPA a umožnily časnou iniciaci antifungální terapie [8].

A. fumigatus je všudypřítomná saprofytická vzdušná houba, která je celosvětově odpovědná za více než milion úmrtí ročně. Až 90 % všech případů invazivní aspergilózy (IA) je způsobeno *A. fumigatus* [14]. Dominantní součástí nejsvrchnější vrstvy buněčné stěny celého rodu *Aspergillus* je galaktomanan (GM). GM je termostabilní lipopolysacharid o velikosti 25-75 kDa, který se skládá z mananu a imunogenních galaktofuranozylových řetězců (viz obrázek 2). Během růstu mikromycety je GM uvolňován do okolí. V závislosti na velikosti mykotické nálože a na imunitním stavu hostitele je GM prokazatelný nejen lokálně ale například i v krevním oběhu [15].

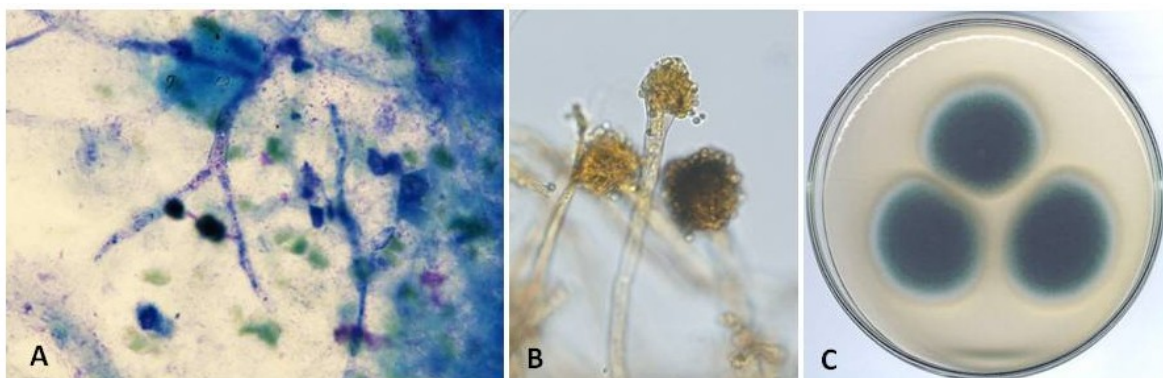
Hluběji, pod povrchovou vrstvou GM, se nachází vrstva glukanů. Dominantní složkou je polymer (1,3)- β -D-glukan (BG), který je uvolňován do okolí v průběhu počátečních fází růstu houby (viz **obrázek 2**). Jelikož BG uvolňuje i mnoho dalších mikromycet hovoříme o něm jako o tzv. panfungálním antigenu a jeho přítomnost v séru pacienta tedy signalizuje blíže neurčenou mykotickou infekci [16, 17]. V pozdějších fázích IPA můžeme v séru detekovat nárůst GM- a BG-specifických protilátek [18]. Snaha o zpřesnění diagnostiky IPA vedla k hledání nových biomarkerů, mezi něž patří i siderofory.

Siderofory jsou molekuly s nízkou molekulovou hmotností, produkované různými skupinami bakterií a hub, jejichž funkcí je chelátovat železo. Nedávný výzkum ukázal, že siderofory

představují důležité faktory mikrobiální virulence a jsou spojeny s procesem získáváním živin pro mikrobiální růst [19]. Po vazbě železa na siderofor vzniká ferrisiderofor, který je u hub vylučován specifickými receptory s transmembránovou transportní funkcí, označovanými SIT, což umožní houbě příjem železa z okolí [20]. Srovnání genomu hub ukázalo, že geny kódující transportéry sideroforů jsou přítomny u všech druhů hub. Mikromycety, které neprodukuje siderofor, používají SIT pro příjem sideroforů produkovaných jinými mikroorganismy. Použití sideroforů v diagnostice mikrobiální infekce je omezeno na houby a bakterie. Bakterie (stejně jako savci) však na rozdíl od hub nemají transportéry typu SIT [21], ale využívají strukturálně odlišné druhy sideroforových transportérů, například transportéry ABC [22]. Rozdíly mezi houbami, bakteriemi a savci v struktuře sideroforů i jejich transportérů umožňují zavedení nové diagnostické strategie ke zlepšení diagnostiky invazivních infekčních onemocnění.

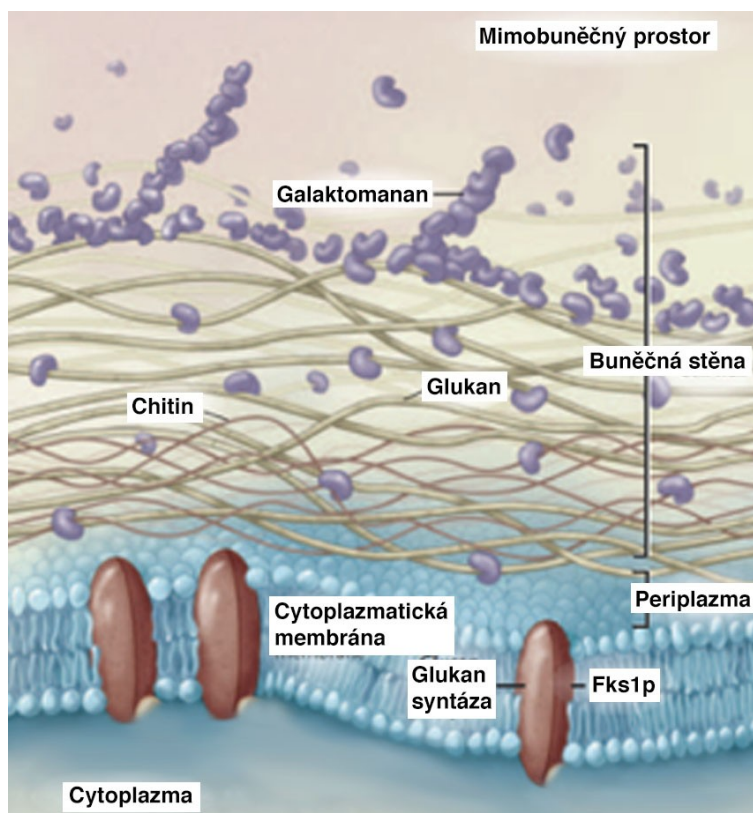
Pokud budeme schopni tyto specifické znaky aplikovat v praxi, dosáhneme velmi vysokých pozitivních prediktivních a negativních prediktivních hodnot testu, čímž se pozvedne diagnostika IPA na novou vylepšenou úroveň.

Obrázek 1: Mikroskopie a kultivace z bronchoalveolární laváže



A: Mikroskopie Giemsa-Romanowski – vlákna *A. fumigatus* (zvětšeno 1000x); **B:** Mikroskopie narostlé kultury *A. fumigatus*, detail konidioforů (zvětšeno 400x); **C:** Kultivace *A. fumigatus* na Sabouraudově agaru při teplotě 37 °C za 3 dny

Obrázek 2: Složení buněčné stěny *A. fumigatus* - upraveno podle schématu buněčné stěny hub Bennet et al. 2006 [23]



2 MOŽNOSTI ČASNÉ DIAGNOSTIKY IPA V SOUČASNÉ LABORATORNÍ PRAXI

Význam vyšetření sérového GM a BG byl dobře dokumentován pro včasnou diagnostiku IA u pacientů s neutropenií [24, 25]. Avšak významně méně studií se zaměřuje na vhodnost těchto testů u pacientů, kteří neutropenii netrpí [11, 26]. Nepřímé diagnostické testy založené na neinvazivních vyšetřeních jsou stále ve vývoji a nemohou zatím poskytnout rychlé a přesvědčivé výsledky potvrzující nebo vylučující diagnózu IA ve většině situací [8]. Z tohoto důvodu je v předložené práci testována i diagnostika IPA s využitím detekce *A. fumigatus* specifických IgA a IgG (IgAG). Práce s těmito biomarkery se vyskytují v literatuře velmi zřídka a jsou používány spíše ve skupinách pacientů s chronickou plicní aspergilózou [27, 28]. Dále

je v této práci prezentována nová cesta diagnostiky IPA využívající zástupce výše uvedených sideroforů triacetylfusarininu C (TAFC) z *A. fumigatus*.

2.1 Význam galaktomananu v diagnostice invazivní aspergilózy non-neutropenických pacientů

Test GM prokazuje vysokou citlivost a specifitu při analýze bronchoalveolární laváže (BAL) pro stanovení diagnózy IA [29]. Přestože vzorek získaný pomocí BAL je bezpečný, dobře tolerovaný postup, musí být bezpečně proveden zkušeným odborníkem a není vždy natolik komfortní, aby bylo dosaženo ideálních podmínek pro dostatečnou výtěžnost vzorku. Navíc provedení tohoto vyšetření v běžné klinické praxi není vždy možné z důvodu různých kontraindikací, např. nestability cervikální páteře, nereagující hypoxie, nestabilní anginy pectoris, krvácivé diatézy a maligní srdeční arytmie [30]. Proto je vhodné tento průkaz doplnit vhodným biomarkerem ze séra, zvláště v případech, kdy GM test provedený z BAL neposkytuje dostatečnou citlivost a specifitu pro diagnostiku IA [29].

2.2 Význam (1,3)- β -D-glukanu v diagnostice invazivní aspergilózy non-neutropenických pacientů

BG může být detekován v případě invaze do lidské tkáně většiny zástupců klinicky významných rodů mikromycetů (*Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Pneumocystis jirovecii* apod.). Výjimkou jsou druhy rodu *Cryptococcus* a zástupci oddělení Zygomycota, v jejich případě se BG uvolňuje v prakticky nedetekovatelném množství. Senzitivita a specifita testu je 64-100 %, resp. 45-92 % v závislosti na typu vyšetřované populace pacientů [16]. V diagnostice invazivních fungálních infekcí

neutropenických pacientů byl vyhodnocen přínos využití detekce BG v senzitivitě (63 %), specificitě (96 %), pozitivní prediktivní hodnotě (PPH = 79 %) a negativní prediktivní hodnotě (NPH = 91 %) a pozitivní výsledek předcházel průkazu infekce klasickými mikrobiologickými a radiologickými metodami [31]. Nedávné metaanalýzy potvrdily přínos detekce BG na široké skupině pacientů při suspektní invazivní kandidóze, invazivní aspergilóze a infekcích způsobených *Pneumocystis jirovecii* [32, 33]. Přínosem se zdá být relativně vysoká NPH tohoto testu (73-100 %), avšak PPH se v různých studiích ukázala být daleko nižší (37-89 %). Falešně pozitivní výsledky testů byly popsány při kontaktu se zdravotnickými prostředky obsahujícími D-glukany nebo celulózu (gáza, celulózová membrána při hemodialýze, podávání některých antibiotik, resp. krevních derivátů)[16]. Zvýšené koncentrace BG v séru byly také pozorovány v některých případech bakteriemií, zvláště v případě *Pseudomonas aeruginosa* [34]. Relativně nízká PPH je limitujícím faktorem testu, nicméně se zde otevírá možnost kombinace s ostatními diagnostickými metodami (GM, IgAG) v různých diagnostických strategiích použitých právě v této studii.

2.3 Význam specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* v diagnostice invazivní aspergilózy v séru non-neutropenických pacientů

Detekce IgAG specificky reagujících s antigeny *A. fumigatus* byla do studie zahrnuta s cílem otestovat a zhodnotit další možný biomarker, který by bylo možno stanovovat ze séra pacientů. Detekované protilátky by však mohly zahrnovat také ty, které byly vyvolány jinými druhy rodu *Aspergillus* vzhledem ke zkřížené vnitorodové reaktivitě povrchových antigenů [35]. Detekce specifických imunoglobulinů v časném stadiu IPA může být komplikována sekundární imunodeficiencí, která se vyskytuje u mnoha pacientů s uvedenou infekcí, což

vede k zpožděnému nástupu protilátkové odpovědi [36, 37]. Zdá se však, že test může být mnohdy užitečný pro samotné potvrzení IPA [28, 37].

2.4 Význam specifických mikrobiálních sideroforů v diagnostice invazivní aspergilózy

Zavedení detekce sideroforů v klinických vzorcích pacientů zahrnuje větší spektrum výhod než při využití ostatních metod přímé i nepřímé detekce invazivní mykotické infekce, včetně neinvazivity, rychlosti, citlivosti a potenciálu pro standardizaci při pečlivé kvantifikaci metody měření [38]. Metody na bázi metabolitů naopak neumožňují stanovení místa infekce a vyžadují přípravu a extrakci vzorku. Vysokoúčinná kapalinově chromatografická separace vzorku následovaná hmotnostně spektrometrickou analýzou s elektrosprejovou ionizací a iontovou cyklotronovou rezonancí analyzovanou pomocí Fourierovy transformace (HPLC / ESI-FTICR) je nákladná, ale zatím jediná dostupná metoda aplikovatelná pro vývoj nové diagnostické soupravy. Nákladnou HPLC / ESI-FTICR metodu by v rutinní praxi mohla v budoucnu nahradit standardní metoda založená na ionizaci laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu (MALDI-TOF), metoda v současnosti rutinně používaná pro laserovou desorpční ribozomální typizaci mikrobů. Před zhruba 12 lety tato technologie překonala své dětské nemoci a překážky, a nyní představuje společný nástroj hmotnostní spektrometrie (MS) v mnoha odděleních klinické mikrobiologie [39]. Jako metodický mezičlánek pro průkaz specifických sideroforů *A. fumigatus*, nejčastějšího původce invazivní aspergilózy v rutinní diagnostické praxi, by se dala na přechodnou dobu využít některá z enzymatických imunoesejí (EIA, ELISA).

Siderofor TAFC specifický pro *A. fumigatus* může například v kombinaci s experimentálním PET poskytnout citlivější a časnější diagnostický přístup. Předběžné výsledky naznačují, že siderofory představují skutečně životaschopný nástroj rozlišování kolonizace a invaze

[40]. Zastavení syntézy sideroforu mikromycetou tak může odrážet přechod od invazivity do stavu kolonizace a naopak. Zavedení TAFC do klinické diagnostické praxe nyní představuje novou naději pro časnou diagnostiku IPA [41]. V roce 2018 tým rakouských autorů popsal využitelnost TAFC v klinické studii IPA u hematologických pacientů v neutropenii, kdy TAFC byl detekován metodou kapilární elektroforézy (CE), elektrosprejové ionizace (ESI) a MS [42]. Na rozdíl od rakouské studie je soubor pacientů analyzovaných v této dizertační práci rozmanitější a zahrnuje nejen pacienty v neutropenii, ale také kriticky nemocné non-neutropenické pacienty.

2.5 Možnosti ostatních laboratorních testů v diagnostice invazivní plicní aspergilózy

Další metodou, která umožňuje časnou diagnostiku IPA je amplifikace genetického materiálu materiálu aspergilů přímo z klinických vzorků, která může během několika hodin zachytit sekvence 18S rDNA, 28S rDNA, 5.8 rDNA a mitochondriální DNA [43]. Nicméně tato metoda je opět závislá na kvalitě a místě odběru biologického materiálu vzhledem k fokusu infekce a při odběru tak narážíme na značnou míru invazivity postupu. Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) k průkazu IPA ještě není standardizována [44, 45] a proto chybí např. ve spektru kritérií EORTC / MSG z roku 2008 [6]. Ačkoliv data publikovaných studií jsou mnohdy zajímavá, není užitečnost PCR například u pacientů v neutropenii dosud jasná a hodnoty senzitivity a specificity ze séra a plazmy nejsou příliš přesvědčivé [46-49]. Uvedená metoda by neměla být ovlivněna ani imunitním stavem pacientů, ani přítomností jiných houbových nebo bakteriálních patogenů. Kombinace průkazu infekce způsobené druhem rodu *Aspergillus* PCR v kombinaci s výše popsaným průkazem houbových biomarkerů v séru jako je GM resp. BG, nebo GM v BAL zvyšuje diagnostickou citlivost [50]. To bylo zohledněno i v

revidované definici invazivní mykotické infekce EORTC / MSG. Zkušenosti s pacienty v neutropenii jsou ale nedostatečné [51].

Další možností pro časnější diagnostiku IPA je metoda detekce glykoproteinového antigenu v séru nebo BAL pacientů, „Lateral Flow Device“ – imunochromatografický test s postranním průtokem (LFD) [52]. Nedávná multicentrická studie hodnotící metodu LFD v BAL u 133 pacientů z JIP vykazovala senzitivitu, specifitu, PPV a NPV pro pravděpodobnou IA 80 %, 81 %, 96 % a 44 % [53]. Nicméně, i přes takto slibné výsledky, je zapotřebí dalších a větších studií před dosažením bezpečných závěrů o přínosu LFD pro diagnostiku IPA. Také je potřeba dodat, že LFD není kvantitativní metodou, což může být do jisté míry velký problém při monitorování efektivity terapie neutropenických pacientů.

Mnohé z dalších metod jsou zatím ve fázi vývoje. Například různé technologie detekce těkavých organických sloučenin v dechu pacientů infikovaných IPA se senzitivitou v rozmezí od 94 % do 100 % a specifitou 83 % až 93 % [54, 55]. Další testy detekující gliotoxin a bis methylthio-gliotoxin byly pro diagnostiku IPA zatím testovány jen experimentálně [56, 57]. Navíc je stále třeba objasnit jejich úlohu u neutropenických a non-neutropenických pacientů a je zapotřebí klinických studií s větším počtem pacientů.

Diagnostika IA, resp. IPA zůstává velmi náročná, protože žádný z dostupných diagnostických testů neposkytuje dostatečnou senzitivitu a specifitu, takže optimální přístup závisí na současném provedení několika diagnostických testů v různých strategiích, včetně kultivací, detekcí časných biomarkerů a molekulárních nástrojů [50]. Právě proto se tato studie ubírá směrem ke tvorbě optimální strategie diagnostických testů pro IPA, stanovovaných z klinicky nejnáze standardně odebíratelného vzorku, jakým je u non-neutropenických pacientů sérum pacienta. Dále otevírá budoucí možnosti v podobě využití specifických sideroforů typu TAFC, nadějného biomarkeru pro diagnostiku infekcí způsobených pro *A. fumigatus*,

detekovatelného v pacientově moči nadějného biomarkeru, který lze detekovat z pacientovy moči, kterou lze rovněž velmi snadno získat [42].

3 CÍLE PRÁCE

Hlavní cíle dizertační práce

1. Zhodnotit současné možnosti využití detekce fungálních biomarkerů používaných při časné diagnostice invazivní plicní aspergilózy způsobené druhem *A. fumigatus*, v séru u non-neutropenických pacientů,
2. nalézt nejvhodnější kombinaci a strategii rutinně používaných metod měření koncentrace GM, BG a specifických IgAG proti *A. fumigatus*, s cílem zvýšit specifickou, senzitivitu, PPH a NPH v diagnostice IPA
3. testovat možnost využití zcela nového přístupu detekce specifického sideroforu TAFC metodou HPLC / ESI-FTICR v moči u neutropenických i non-neutropenických pacientů.

K dosažení hlavních cílů práce byl zvolen následující postup:

1. Byl nashromážděn statisticky významný soubor vzorků sér pacientů s potvrzenou a pravděpodobnou IPA, ze kterých byly stanoveny koncentrace fungálních antigenů GM, BG a IgAG specifických pro *A. fumigatus* pomocí enzymatické imunoanalýzy (EIA). V této části studie, kde byly hodnoceny GM, BG a IgAG a jejich kombinace v diagnostice IPA byla použita diagnostická kritéria „A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients“ (AspICU) [58, 59]
2. V rámci studovaného souboru sér pacientů byly vyhodnoceny jednotlivé diagnostické kombinace testů pomocí statistických nástrojů a jednotlivé diagnostické strategie byly vyhodnoceny a následně porovnávány vzhledem k typovým skupinám pacientů (celek, JIP, resp. ostatní nemocniční oddělení).

3. Prospektivní testování močí na přítomnost TAFC bylo provedeno metodou HPLC / ESI-FTICR a následně vyhodnoceno vzhledem k jednotlivým typům non-neutropenických a neutropenických pacientů. Při hodnocení souboru suspektních pacientů s IPA vyšetřovaných na přítomnost TAFC v moči byla použita diagnostická kritéria AspICU i kritéria EORTC / MSG z důvodu přítomnosti dvou neutropenických hematologických pacientů v tomto souboru.

4 MATERIÁL A METODY

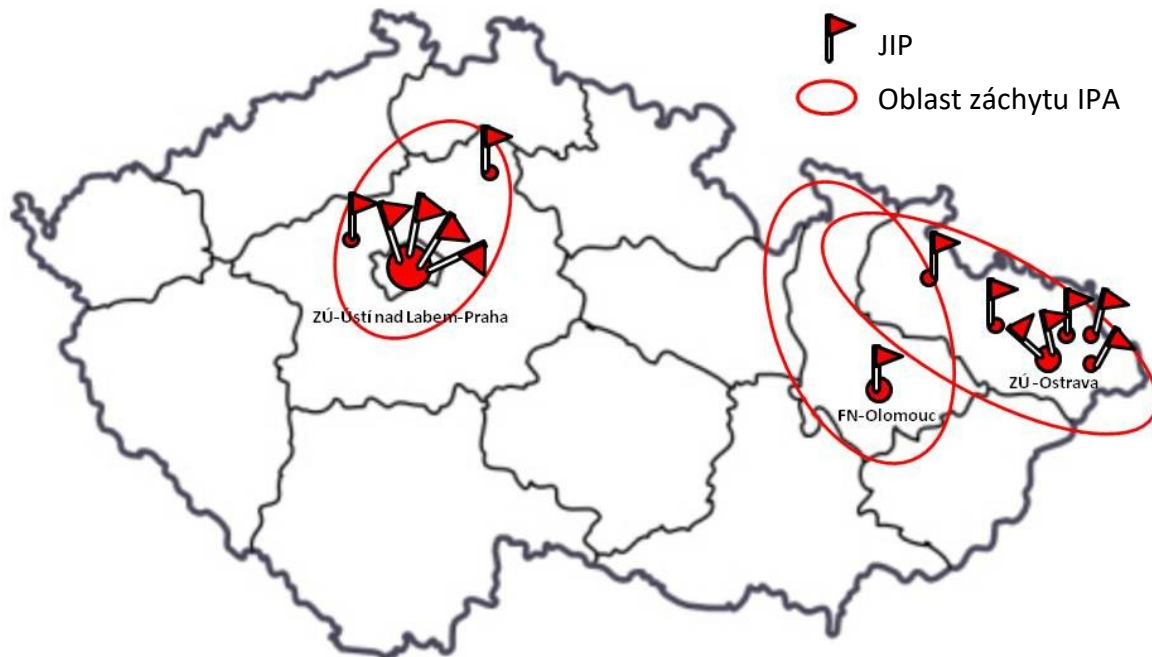
4.1 Návrh studie

Pro stanovení koncentrace fungálních antigenů (GM, BG) jako časných houbových biomarkerů ze vzorků séra byl zvolen retrospektivní typ studie, stejně jako v případě stanovení koncentrace specifických IgAG proti *A. fumigatus*. Pro detekci TAFC *A. fumigatus* ve vzorcích moče byl zvolen prospektivní typ klinické studie, schválený etickou komisí Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě pod č. j. EK2/2018.

4.1.1 Detekce galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu, specifických IgA a IgG *A. fumigatus*

Retrospektivní multicentrická studie byla provedena v období od ledna 2015 do května 2017 na oddělení bakteriologie a mykologie, Centra klinických laboratoří, Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě ve spolupráci s Lékařskou fakultou Univerzity Palackého v Olomouci, Ústavem anesteziologie a intenzivní péče Fakultní nemocnice Ostrava, Plicním oddělením Sdruženého lékařského zařízení Krnov a Oddělením parazitologie, mykologie a mykobakteriologie Praha Zdravotního ústavu se sídlem v Ústí nad Labem (viz **obrázek 3**). Do studie byli zahrnuti pacienti (starší 18 let) s nově vznikajícími respiračními obtížemi (např. produktivním kašlem nebo hemoptýzou) a pacienti s akutní exacerbací CHOPN, intersticiální plicní nemocí (IPN) nebo astmatem s nálezem stínů na rentgenových nebo počítačově tomografických (CT) snímcích plic (opacita mléčného skla, vícečetné nodulární útvary nebo znamení „halo“, resp. „půlměsíce“). Pacienti s chronickou nekrotizující plicní aspergilózou, aspergilomy nebo neutropenií nebyli do studie zařazeni.

Obrázek 3: Zdravotnická pracoviště (JIP + ostatní nemocniční oddělení) participující na této studii. Tato zdravotnická zařízení se podílela na primárním odběru všech vzorků suspektních pacientů na invazivní plicní aspergilózu zařazených do této studie.



Pro rozpoznání IPA byl v naší studii použit následující klinický algoritmus pro diagnostiku této mykózy u kriticky nemocných pacientů AspICU [58, 59]:

Diagnostická kritéria pro potvrzenou IPA:

1. mikroskopické vyšetření s nálezem septovaných hyf a pozitivní výsledek kultivace na *Aspergillus* sp. z tkáňové biopsie nebo vzorku pitvy nebo
2. pozitivní kultivace vzorku primárně sterilního materiálu získaného aseptickým invazivním způsobem.

Diagnostická kritéria pro pravděpodobnou IPA:

- 1) kompatibilní klinické příznaky a symptomy,
- 2) jakákoliv pozitivní kultura z primárně nesterilního místa, včetně sputa, dutin, nosohltanu,
- 3) abnormální rentgenologický nález na hrudníku a/nebo při vyšetření plic CT nebo přesvědčivý nález na jiných místech v těle a dále
- 4) buď
 - a) přítomnost rizikových faktorů hostitele:
 - neutropenie (absolutní počet neutrofilů menší než 500 / mm³),
 - základní hematologická nebo onkologická malignita léčená cytotoxickými látkami,
 - prodloužené užívání kortikosteroidů v minimální dávce 20 mg prednisonu nebo jeho ekvivalentu a / nebo použití kortikosteroidů v kombinaci s jinými imunosupresivy,
 - vrozená imunodeficience.nebo
 - b) pozitivní výsledky mikroskopického vyšetření a kultivace vzorku tekutiny z BAL.

Pro diagnózu předpokládané IPA musí být splněna všechna výše uvedená kritéria, tj. 1. + 2. + 3. + 4a. nebo 4b.

Diagnostická kritéria v této studii byla doplněna dalšími „rizikovými faktory“ následovně: CHOPN, syndrom získané imunodeficiencie, příjemce transplantovaných orgánů, dekompenzované onemocnění jater, toxonutritivní hepatopatie, kriticky nemocný pacient s těžkou sepsí, těžký průběh chřipky (např. H₁N₁) a kriticky nemocný pacient s mimotělní oxygenací [7]. V souladu s algoritmem AspICU byli pacienti kategorizováni jako potvrzená IPA, předpokládaná IPA, kolonizace aspergilem nebo non-IPA [59]. Pouze prokázaná a předpokládaná IPA byla považována za skutečně pozitivní a pouze non-IPA byly považována za skutečně negativní. Stanovené sérové parametry (GM, BG a IgAG) byly hodnoceny ve třech skupinách pacientů: pacienti na JIP, pacienti ostatních nemocničních oddělení (ONO) a všichni pacienti (kombinace JIP + ONO). Do studie byly zahrnuty pouze výsledky prvního odběru vzorků u pacientů s podezřením na přítomnost IPA ještě před zahájením antifungální terapie.

Alternativní postup EORTC / MSG [6] nebyl zvolen, neboť je optimalizován spíše pro onkologické pacienty s rizikem neutropenie Porovnání diagnostických kritérií AspICU a EORTC / MSG je uvedeno v **Tabulce 1**).

Tabulka 1: Srovnání diagnostických kritérií Aspicu a EORTC / MSG pro diagnostiku invazivní plicní aspergilózy (IPA)

Diagnóza IPA	Diagnostická kritéria Aspicu
Potvrzená	<p>Histopatologický a/nebo kultivační či mikroskopický průkaz</p> <p><i>Aspergillus</i> spp. v primárně sterilním materiálu (tkáň, krev apod.).</p>
Pravděpodobná	<p>Přítomnost alespoň jednoho kritéria z každé ze tří kategorií:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) kompatibilní klinické příznaky a symptomy; 2) jakákoliv pozitivní kultura z primárně ne-sterilního místa (sputum, dutiny) 3) abnormální rentgenový nález hrudníku a/nebo CT plic, přesvědčivý nález na jiných místech těla <p>a buď</p> <ol style="list-style-type: none"> a) rizikové faktory hostitele (absolutní neutropenie < 500 / mm³), b) hematologická nebo onkologická malignita léčení cytotoxickými látkami, c) prodloužené užívání kortikosteroidů d) vrozená imunodeficience <p>další rizikové faktory hostitele podle Koulenti D. et al. (2014) [7] a Bassetti M. et al (2017) [8]</p> <ol style="list-style-type: none"> e) CHOPN f) syndrom získané imunodeficience g) příjemci transplantovaných orgánů h) dekompenzované onemocnění jater i) toxonutritivní hepatopatie

	<p>j) kriticky nemocný pacient s těžkou sepsí</p> <p>k) těžký průběh chřipky (např. H1N1)</p> <p>l) kriticky nemocný pacient s mimotělní oxygenací</p> <p>nebo pozitivní výsledky mikroskopického vyšetření a kultivace vzorku BAL</p>
	Diagnostická kritéria EORTC / MSG
Potvrzená	Histopatologický a/nebo kulturační či mikroskopický průkaz <i>Aspergillus</i> spp. v primárně sterilním materiálu (tkáň, krev apod.).
Pravděpodobná	<p>Přítomnost alespoň jednoho kritéria z každé ze tří kategorií:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) rizikové faktory hostitele (např. absolutní neutropenie $< 0,5 \times 10^9 / l$ trvající déle než 10 dní, nebo dlouhodobá tj. > 3 týdny terapie kortikosteroidy); 2) klinická kritéria (známky infekce dolních cest dýchacích s přítomností jednoho ze tří nálezů na CT plic: 1) "halo sign", 2) air-crescent sign (rozpadová dutinka ve tvaru půlměsíce) a 3) kavitace; 3) mykologická kritéria, tj. kulturační pozitivita z nesterilních lokalit (BAT) a/nebo pozitivita některého z biomarkerů (GM, BG, PCR)

Diagnostická kritéria AspICU se oproti EORTC / MSG liší v kategorizaci IPA pravděpodobná a konkrétně v bodě 2 a dalších rizikových faktorech hostitele, také zde chybí část mykologických kritérií (GM, BG a PCR), která jsou v diagnostických kritériích EORTC / MSG přítomna (viz **Tabulka 1**), což umožnilo využití těchto diagnostických kritérií na souboru non-neutropenických pacientů z JIP a ONO.

4.1.2 Triacetylfusarinin C

Prospektivní multicentrická studie na vyšetřování přítomnosti sideroforů v moči pacientů s prokázanou a pravděpodobnou (EORTC / MSG) / pravděpodobnou (AspICU) IPA trvala únoru-květnu 2018 na klinických pracovištích (viz kap. č. 4.1.1. a **obrázek 3**).

Do studie byli zahrnuti pacienti (> 18 let) s nově vznikajícími respiračními obtížemi (např. kašel s vykašláním nebo hemoptýzou) nebo pacienti s akutní exacerbací (např. CHOPN, intersticiální plicní nemocí [IPN] nebo astmatem) s nálezem stínů na snímcích ze zobrazovacích metod plic, opacitou mléčného skla, vícečetných nodulárních útvarů nebo znamení „halo“ anebo „půlměsíce“). Dále pacienti, kteří byli přijati na JIP s potvrzenou invazivní infekcí nebo pacienti splňující alespoň dvě diagnostická kritéria pro rychlou diagnostiku „Sepsis Related Organ Failure Assessment“ (qSOFA), pacienti vyžadující vazopresory pro střední arteriální tlak (MAP) ≥ 65 mm Hg a laktát hladiny ≥ 2 mmol / l i navzdory dostatečné resuscitaci. Závažnost nemoci na JIP byla zdokumentována metodami Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) a SOFA [60].

IPA non-neutropenických pacientů způsobená *A. fumigatus* byla hodnocena dle kritérií AspICU (viz kap. č. 4.1.1.). Pro vyhodnocení IPA pacientů byly využity GM ze séra a bronchoalveolární laváže (BAL), jakož i sérové IgG a IgA (IgAG) specifické pro *A. fumigatus* vhodné pro diagnostiku IPA podle publikace Dobias et al., 2018 [61]. V tomto souboru pacientů se vyskytovali také dva hematologičtí pacienti, v jejichž případě byla použita kritéria zařazení pro IPA neutropenických pacientů EORTC / MSG 2008 [6].

Definice EORTC / MSG:**IPA byly hodnoceny jako potvrzená s definicí:**

Mikroskopická analýza primárně sterilního materiálu: histopatologické, cytopatologické nebo přímé mikroskopické vyšetření vzorku získaného aspirací jehlou nebo sterilní biopsií, v níž jsou pozorovány hyfy, spolu s průkazem o souvisejícím poškození tkáně. Kultivace primárně sterilního materiálu: získání kultury *Aspergillus* spp. ze vzorku získaného plicní biopsií.

Diagnostická kritéria pro pravděpodobnou IPA zahrnovala:

- 1) Faktory hostitele (jeden z následujících musí být splněn)
 - a) Nedávná neutropenie (<500 neutrofilů/mm³) po dobu 110 dní zpětně
 - b) Pacient po alogenní transplantaci
 - c) Proloužená doba užívání kortikosteroidů v minimální dávce 0,3 mg/kg/den ekvivalentu prednisonu po 13 týdnů
 - d) Terapie jinými známými imunosupresivy T-lymfocytů
 - e) Vrozená těžká imunodeficience
- 2) Klinické příznaky (jeden z následujících třech znaků na CT)
 - a) Hustá, dobře ohraničená léze s nebo bez „halo“ efektu
 - b) Léze tvaru pŕlmesíce
 - c) Dutina
- 3) Mykologická kritéria (jedno z následujících)

- a) Přímý průkaz (cytologie, přímá mikroskopie nebo kultivace) ze sputa, BAL, bronchiálního seškrabu značící přítomnost fungálních partikulí *Aspergillus* spp.
- b) Nepřímé testy (detekce antigenů nebo komponentů buněčné stěny): galaktomanan v plazmě, séru nebo BAL; (1,3)- β -D-glukan v séru.

4.1.2.1 Diagnostická strategie

Vzorky močí pacientů byly získány k detekci specifických mikrobiálních sideroforů během jednotlivých epizod IPA, před léčbou a u některých pacientů několikrát během léčby, tak aby bylo možné sledovat dynamiku koncentrace TAFC v moči. Všechny laboratorní detekce GM, BG a IgAG ze séra a BAL byly provedeny jako součást rutinního diagnostického procesu.

4.2 (1,3)- β -D-glukan, galaktomanan, specifické IgA a IgG proti *A. fumigatus* v séru

Vzorky séra byly současně testovány na přítomnost koncentrace BG, GM a IgAG. BG byla detekována pomocí Fungitell® (Associates of Cape Cod, Falmouth, USA) v souladu s pokyny výrobce. V této dizertační práci byl používán cut-off stanovený výrobcem. Všechny výsledky ze séra pacienta byly považovány za pozitivní, pokud byla koncentrace BG ≥ 80 pg / ml [62]. Detekce GM, antigenu *Aspergillus* spp. byla provedena pomocí Aspergillus EIA (Bio-Rad Platelia™) podle pokynů výrobce [63]. Z praktických důvodů byla použita široce používaná standardní hraniční hodnota indexu GM 0,5. Vzorky séra byly považovány za pozitivní, pokud hodnota indexu positivity GM byla $\geq 0,5$. Pro testování protilátek specifických k *A. fumigatus*

(IgAG) bylo využito diagnostické metody ELISA IgG / IgA *A. fumigatus* (Immunolab GmbH, Kassel, Německo) používající lyzát a testování probíhalo podle pokynů výrobce. Optimální mezní hodnota IgAG byla podobná standardní hranici IgA a IgG stanovené výrobcem. Vzorky séra byly považovány za pozitivní, jestliže hodnota indexu positivity koncentrací IgG a IgA v séru byla $\geq 1,2$. Test umožnil stanovení specifické reaktivity protilátek pro isotypy IgA a IgG odděleně.

4.3 Zpracování vzorků a HPLC / ESI-FTICR

Extrakce sideroforu z moči byla provedena podle protokolu přizpůsobeného profilování metabolitů v laboratoři Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky (prof. Ing. Vladimír Havlíček, Ph. D.). Vzorky moči (20 μ l) byly smíseny s ferrioxaminy B, D, G a E (aliquotem FOX-MIX EMC Microcollections, GmbH, Tübingen, Německo, 10 μ L, 1 μ g / ml v 5 % ACN), které sloužily jako vnitřní standard. Vzorky byly dále ředěny methanolem (110 μ l), čímž byl získán methanolický roztok přibližně 80 %. Vzorky byly jemně protřepány a inkubovány přes noc při -80 °C. Potom vzorky prošly centrifugací při 14 000 x g po dobu 10 minut (4 až 8 °C). Supernatant byl přenesen do nové 1,5-ml zkumavky, lyofilizován do sucha a skladován při -80 °C. Před analýzou HPLC / ESI-FTICR ve třech opakováních byly všechny vzorky znovu rozpuštěny v 5% acetonitrilu (60 μ l). Každý vzorek (5 μ l) byl nanesen do BCG C18 / 1,7- μ m, 2,1 x 5 mm VanGuard předkolonu (Waters, Praha, Česká republika) při průtoku 50 μ L / min. Siderofory pak byly odděleny na analytické koloně se stejnou fází. Hmotnostní spektra kladných iontů ESI byla získána pomocí hmotnostního spektrometru 12 T SolariX FTICR (Bru-

ker Daltonics, Billerica, MA, USA) v režimu CASI (continuals accumulattion of selected ions) s izolační šířou 700 - 1 000 m / z).

4.4 Analýza dat

Senzitivita, specificita, pozitivní prediktivní hodnota (PPH), negativní prediktivní hodnota (NPH) a přesnost hodnot testu GM, BG a IgAG byly vypočteny s ohledem na prokázanou nebo pravděpodobnou diagnózu IPA (AspICU) s využitím výše uvedených kritérií pro diagnostiku IPA [58, 59]. Při statistickém vyhodnocení údajů byly pro charakterizaci studované skupiny použity popisné statistiky (medián, aritmetický průměr, směrodatná odchylka, min. a max. hodnota) a frekvenční tabulka. Pro hodnocení byl použit neparametrický 2-vzorkový Wilcoxonův test, chi-kvadrát test a Fisherův test přesnosti. Senzitivita, specificita, PPH, NPH a přesnost byly dále vypočteny za pomoci 95 % intervalů spolehlivosti a ROC analýzy s vyjádřením hodnoty plochy pod křivkou (AUC, area under the curve). ROC analýza je nástroj pro hodnocení a optimalizaci binárního klasifikačního systému (testu), který ukazuje vztah mezi specificitou a senzitivitou daného testu pro všechny přípustné hodnoty prahu. Je-li plocha rovná jedné, je test ideální a má 100 % senzitivitu i specificitu. Statistické testy byly hodnoceny na úrovni 5 % významnosti a $p < 0,05$ byl považován za statisticky významný údaj. Pro analýzu byl použit statistický software Stata verze 13.

5 VÝSLEDKY

5.1 Populační studie

5.1.1 Galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan, specifické IgA a IgG proti *A. fumigatus* v séru

Do studie bylo zařazeno celkem 87 pacientů. Pacienti byli klasifikováni pomocí algoritmu AspICU [8, 59] jako “proven” (potvrzená) IPA (n = 10), “putative” (pravděpodobná) IPA (n = 31) a non-IPA kolonizace (n = 46). Jejich klinické charakteristiky jsou uvedeny v **tabulce 2**. Průměrný věk byl 62,7 let (věkový rozsah pacientů, 18-85 let), přičemž 56 % pacientů bylo mužského a 44 % ženského pohlaví. Nejčastějším základním onemocněním byla nemaligní plicní onemocnění (56,3 %), následovali pacienti bez základního onemocnění (20,7 %) a pacienti vyžadující terapii kortikosteroidy (13,8 %). Dvacet osm subjektů bylo z JIP (32,2 %, podskupina I) a 59 z ONO (67,8 %, podskupina II).

Tabulka 2: Klinická charakteristika 87 pacientů testovaných kvůli podezření na IPA

	IPA (n = 41), n (%)	Non-IPA (n = 46), n (%)	Celk. pacienti (n = 87), n (%)
Věk, r., medián (rozsah)	65,5 (26-85)	65 (18-85)	62,7 (18-85)
Muži	25 (61)	24 (52)	49 (56)
Ženy	16 (39)	22 (48)	38 (44)
Základní diagnóza			
Ne-maligní plicní onemocnění	24 (58,6)	26 (56,5)	50 (56,3)
Tumor	3 (6,5)	3 (7,3)	6 (6,9)
Hepatorenální syndrom	2 (4,9)	2 (4,3)	4 (4,6)
Cardiovaskulární choroby	0	3 (6,5)	3 (3,5)
Předešlá plicní tuberkulóza	1 (2,4)	0	1 (1,2)
Diabetes mellitus	0	1 (2,2)	1 (1,2)
HIV	0	1 (2,2)	1 (1,2)
Rhabdomyolýza	1 (2,4)	0	1 (1,2)
Myelodysplastický syndrom	1 (2,4)	0	1 (1,2)
Anaplastický syndrom	1 (2,4)	0	1 (1,2)
Imunosupresivní terapie ¹	1 (2,4)	0	1 (1,2)
Glukokortikosteroidy ²	8 (19,5)	4 (8,7)	12 (13,8)
Bez základního onemocnění	8 (19,5)	10 (21,7)	18 (20,7)
JIP	13 (31,7)	15 (32,6)	28 (32,2)
ONO	28 (68,3)	31 (67,4)	59 (67,8)

¹Imunosupresivní terapie po transplantaci orgánů; ²Terapie glukokortikosteroidy equivalent prednisonu

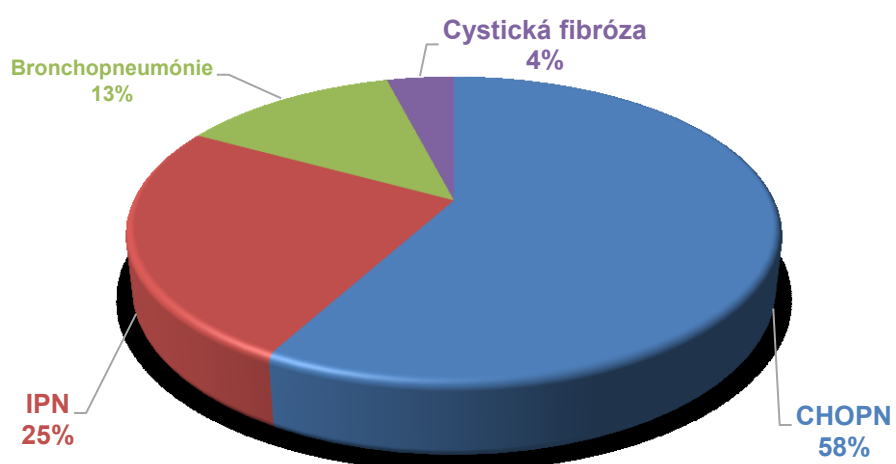
≥20 mg/den. IPA: invazivní plicní aspergilóza, JIP: jednotka intenzivní péče, ONO: ostatní nemocniční oddělení

Rozložení základních diagnóz 41 pacientů s potvrzenou (n = 10) nebo pravděpodobnou (n = 31) IPA (AspICU) jsou znázorněny na **obrázku 4**, jejich klinické charakteristiky a naměřené hodnoty GM, BG, IgAG ze séra ve **zdrojové tabulce**. Osm pacientů nemělo v anamnéze žádné základní onemocnění. Ve skupině pacientů s nemaligním plicním onemocněním se IPA vyskytovala nejčastěji (24/41), v této skupině bylo 14 pacientů s chronickou obstruktivní plicní nemocí (CHOPN), 6 mělo intersticiální plicní nemoc (IPN), 3 bronchopneumónii a jeden cystickou fibrózu (**obrázek 5**). Další 3 pacienti měli maligní orgánové onemocnění, jeden měl fulminantní ataku rabdomyolýzou a jeden byl uživatelem drog. Osm pacientů bylo před diagnózou IPA léčeno systémovou kortikosteroidní terapií (léčba glukokortikosteroidy ekvivalentu prednisonu ≥ 20 mg / den) a jeden pacient užíval imunosupresivní léčbu vzhledem ke svému základnímu onemocnění. Mortalita u pacientů s prokázanou nebo pravděpodobnou IPA (AspICU) byla 17,1 %. Avšak pouze jeden pacient zemřel v přímé souvislosti s IPA vyvolaného masivní kortikosteroidní terapií rabdomyolýzy (diseminovaná aspergilóza prokázaná sekci). Tři pacienti na JIP zemřeli v souvislosti se svým základním onemocněním (IPN, CHOPN a bronchopneumónií); podobně, 3 pacienti ONO zemřeli v souvislosti se svým základním onemocněním (IPN, CHOPN a orgánová malignita). Tři pacienti z ONO náhle zemřeli na plicní embolii a tachyarytmii před tím, než byli převezeni na JIP.

Obrázek 4: Rozložení základních diagnóz a rizikových faktorů v populaci pacientů s IPA



Obrázek 5: Rozložení základních diagnóz v populaci pacientů s Ne-maligním plicním onemocněním a IPA



5.1.2 Triacetylfusarinin C v moči

Do studie bylo zařazeno sedm pacientů z jednotek intenzivní péče, u kterých vzniklo podezření na IPA. Non-neutropeničtí pacienti byli klasifikováni pomocí algoritmu AspICU [8, 59] jako, “putative” (pravděpodobná) IPA (n = 3) a non-IPA nebo kolonizace (n = 2) a pomocí kritérií EORTC / MSG 2008 (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) [6] byli klasifikováni pacienti v neutropenii jako „probable“ (pravděpodobná) IPA (n = 2). Jejich klinické charakteristiky jsou uvedeny v **tabulce 3**.

Tabulka 3: Klinická charakteristika 8 pacientů s potvrzenou, pravděpodobnou IPA (EORTC / MSG nebo AspiCU) a non-IPA

Č.	Pohlaví	Věk (r)	Oddělení nemocnic	ZD a RF	EORTC / MSG 2008, AspiCU 2012	Rizikové faktory pro IPA	Vzorek*	T AFC ¹ (pg/ml)	IgA ² (IP≥ 1,2)	IgG ² (IP≥ 1,2)	GM ² (IP≥ 0,5)	BG ² (≥ 80pg/ml)	Úmrtí
1	M	79	JIP	Chřipka (H1N1)	Pp (AspiCU)	-	ETA	81200	4,6	0,3	5,9	276	Ano
2	Ž	75	JIP	Bronchopneumonie	Non-IPA (AspiCU)	-	-	0	0,25	0,32	0,84	203	Ne
3	M	50	JIP	Mnohočetný myelom	Pp (EORTC/MSG)	neutropenie	-	3100	-	-	1,56	501	Ne
4	M	66	JIP	CHOPN, Chřipka (H1N1)	Pp (AspiCU)	-	BAL	400	-	-	0,1	161	Ne
5	Ž	66	JIP	Buněčný lymfom	Pp (EORTC/MSG)	neutropenie	sputum	12600	-	-	3,14	115	Ano
6	M	50	JIP	bronchopneumonie	Kolonizace (AspiCU)	Diabetes mellitus 2.	sputum	1400	0,14	0,77	0,26	155	Ne
7	M	65	JIP	ARDS	Pp (AspiCU)	steroidy	sputum	100000	0,14	0,11	7,9	>523	Ano
8	Ž	29	JIP	Polytrauma	Non-IPA (AspiCU)	-	-	0	-	-	0,1	-	Ne

*Vzorek, který byl mikroskopicky a kulturačně pozitivní na *A. fumigatus*; ¹Koncentrace byly měřeny v moči;

²Koncentrace byly měřeny v séru

ZD a RF: základní onemocnění a "další rizikové" faktory [7], AspiCU 2012: klinický algoritmus pro diagnostiku invazivní plicní aspergilózy kriticky nemocných pacientů [59], EORTC / MSG 2008 [6], Pp: pravděpodobná IPA podle AspiCU nebo EORTC / MSG, IPA: invazivní plicní aspergilóza, T AFC: triacetylfusarinin C, BG: (1, 3)-β-D-glukan, GM: galaktomannan, IgA, IgG: *A. fumigatus* specifické protilátky, IP: index positivity, CHOPN: chronická obstruktivní plicní nemoc, MDS: myelodysplastický syndrom, IPN: intersticiální plicní nemoc, steroidy: Terapie glukokortikosteroidy equivalent prednisonu ≥20 mg/den, BAL: bronchoalveolární laváž, ETA: endotracheální aspirát, JIP: jednotka intenzivní péče

Průměrný věk byl 60 let (věkový rozsah pacientů, 29-79 let), přičemž soubor pacientů tvořilo pět mužů a tři ženy. Ve dvou případech byla základním onemocněním těžká chřipka (H1N1), z toho byl jeden případ na podkladě chronické obstruktivní plicní nemoci, ve třech

případech trpěli pacienti bakteriální bronchopneumonií, z toho v jednom případě se jednalo o akutní respirační selhání s kortikosteroidní terapií a ve dvou případech se jednalo o pacienty hematoonkologické JIP v neutropenii s mnohočetným myelomem a buněčným lymfomem. V tomto souboru pacientů se záměrně vyskytuje jeden pacient s polytraumatem, polybakteriálním nálezem na ranách a plicích, který nebyl suspektní z IPA.

V průběhu studie zemřeli tři pacienti, z toho dva s největší pravděpodobností v přímé souvislosti s IPA (sekce nebyla provedena). U třetího pacienta (hematoonkologie) byl nález popsán jako IPA při léčbě vorikonazolem v remisi, avšak došlo k úmrtí v souvislosti s náhle vzniklým septickým stavem (*Pseudomonas aeruginosa*) a celkovým vyčerpáním pacienta (ženy).

U pacienta s buněčným lymfomem a pravděpodobnou IPA byly navíc v deseti denních intervalech odebrány další dvě kontrolní moče pro sledování dynamiky koncentrace TAFC v průběhu terapie vorikonazolem.

5.2 Diagnostický a prognostický význam stanovení galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu, specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* v séru

Výsledky testování GM, BG a IgAG v séru jsou uvedeny v **tabulkách 4, 5, 6 a 7**.

Tabulka 4: Výsledky testování galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* jednotlivě a v kombinacích při rozpoznávání IPA ve skupině všech studovaných pacientů

Všichni pacienti									
	GM (CI %)	BG (CI %)	IgAG (CI %)	GM+IgAG (CI %)	BG+IgAG (CI %)	GM+BG (CI %)	GM+BG+ IgAG (CI %)	GM/BG (CI %)	GM/BG/ IgAG (CI %)
Sensitivita (%)	48,8 (20/41) (32,9-64,9)	82,9 (34/41) (67,9-92,8)	75,6 (31/41) (59,7-87,6)	65,9 (27/41) (49,4-79,9)	61,0 (25/41) (44,5-75,8)	46,3 (19/41) (30,7-62,6)	31,7 (13/41) (18,1-48,1)	85,4 (35/41) (70,8-94,4)	97,6 (40/41) (87,1-99,9)
Specifická (%)	91,3 (42/46) (79,2-97,6)	73,9 (34/46) (58,9-85,7)	95,7 (44/46) (85,2-99,5)	100,0 (46/46) (92,3-100,0)	100,0 (46/46) (92,3-100,0)	95,7 (44/46) (85,2-99,5)	100,0 (46/46) (92,3-100,0)	69,6 (32/46) (54,2-82,3)	65,2 (30/46) (49,8-78,6)
PPH (%)	83,3 (20/24) (62,6-95,3)	73,9 (34/46) (58,9-85,7)	93,9 (31/33) (79,8-99,3)	100,0 (14/14) (76,8-100,0)	100,0 (25/25) (86,3-100,0)	90,5 (19/21) (69,6-98,8)	100,0 (13/13) (75,3-100,0)	71,4 (35/49) (56,7-83,4)	71,4 (40/56) (57,8-82,7)
NPH (%)	66,7 (42/63) (53,7-78,0)	82,9 (34/41) (67,9-92,8)	81,5 (44/54) (68,6-90,7)	63,0 (46/73) (50,9-74,0)	74,2 (46/62) (61,5-84,5)	66,7 (44/66) (54,0-77,8)	62,2 (46/74) (50,1-73,2)	84,2 (32/38) (68,7-94,0)	96,8 (30/31) (83,3-99,9)
Přesnost (%)	71,3 (62/87) (60,6-80,5)	78,2 (68/87) (68,0-86,3)	86,2 (75/87) (77,1-92,7)	69,0 (60/87) (58,1-78,5)	81,6 (71/87) (71,9-89,1)	72,4 (63/87) (61,8-81,5)	67,8 (59/87) (56,9-77,4)	77,0 (67/87) (66,8-85,4)	80,5 (70/87) (70,6-88,2)
AUC	0,7004	0,7842	0,8563	0,5000	0,5000	0,7100	0,5000	0,7747	0,8139

GM: galaktomanan, BG: (1,3)- β -D-glukan, IPA: invazivní plicní aspergilóza; GM/BG, GM/BG/IgAG (metoda "alespoň jeden test pozitivní"): IPA byla u pacienta diagnostikována, když byl jeden ze dvou nebo ze tří biomarkerů pozitivní; GM+IgAG, BG+IgAG, GM+BG, GM+BG+IgAG: IPA byla u pacienta diagnostikována jen, pokud byly oba nebo všechny tři biomarkery pozitivní současně; PPH: pozitivní prediktivní hodnota; NPH: negativní prediktivní

hodnota; AUC: “area under the curve” (Oblast pod křivkou – ROC analýza); CI: “confidence interval” (interval spolehlivosti)

Tabulka 5: Výsledky testování galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* jednotlivě a v kombinacích při rozpoznání IPA v podskupině pacientů z jednotek intenzivní péče

Podskupina I. JIP	GM (CI %)	BG (CI %)	IgAG (CI %)	GM+IgAG (CI %)	BG+IgAG (CI %)	GM+BG (CI %)	GM+BG+IgAG (CI %)	GM/BG (CI %)	GM/BG/IgAG (CI %)
Sensitivita (%)	61,5 (8/13) (31,6-86,1)	92,3 (12/13) (64,0-99,8)	30,8 (4/13) (9,1-61,4)	15,4 (2/13) (1,9-45,4)	30,8 (4/13) (9,1-61,4)	61,5 (8/13) (31,6-86,1)	15,4 (2/13) (1,9-45,4)	92,3 (12/13) (64,0-99,8)	92,3 (12/13) (64,0-99,8)
Specifická (%)	93,3 (14/15) (68,1-99,8)	53,3 (8/15) (26,6-78,7)	100,0 (15/15) (78,2-100,0)	100,0 (15/15) (78,2-100,0)	100,0 (15/15) (78,2-100,0)	93,3 (14/15) (68,1-99,8)	100,0 (15/15) (78,2-100,0)	53,3 (8/15) (2,6-78,7)	53,3 (8/15) (26,6-78,7)
PPH (%)	88,9 (8/9) (51,8-99,7)	63,2 (12/19) (38,4-83,7)	100,0 (4/4) (39,8-100,0)	100,0 (2/2) (15,8-100,0)	100,0 (4/4) (39,8-100,0)	88,9 (8/9) (51,8-99,7)	100,0 (2/2) (15,8-100,0)	63,2 (12/19) (38,4-83,7)	63,2 (12/19) (38,4-83,7)
NPH (%)	73,7 (14/19) (48,8-90,9)	88,9 (8/9) (51,8-99,7)	62,5 (15/24) (40,6-81,2)	57,7 (15/26) (36,9-76,6)	62,5 (15/24) (40,6-81,2)	73,7 (14/19) (48,8-90,9)	57,7 (15/26) (36,9-76,6)	88,9 (8/9) (51,8-99,7)	88,9 (8/9) (51,8-99,7)
Přesnost (%)	78,6 (22/28) (59,0-91,7)	71,4 (20/28) (51,3-86,8)	67,9 (19/28) (47,6-84,1)	60,7 (17/28) (40,6-78,5)	67,9 (19/28) (47,6-84,1)	78,6 (22/28) (59,0-91,7)	60,7 (17/28) (40,6-78,5)	71,4 (20/28) (51,3-86,8)	71,4 (20/28) (51,3-86,8)
AUC	0,7744	0,7282	0,5000	0,5000	0,5000	0,7744	0,5000	0,7282	0,7282

GM: galaktomanan, BG: (1,3)- β -D-glukan; IPA: invazivní plicní aspergilóza; GM/BG, GM/BG/IgAG (metoda “alespoň jedentest pozitivní”): IPA byla u pacienta diagnostikována, když byl jeden ze dvou nebo ze tří biomarkerů pozitivní; GM+IgAG, BG+IgAG, GM+BG, GM+BG+IgAG: IPA byla u pacienta diagnostikována jen, pokud byly oba nebo všechny tři biomarkery pozitivní současně; PPH: pozitivní prediktivní hodnota; NPH: negativní prediktivní hodnota; AUC: “area under the curve” (Oblast pod křivkou – ROC analýza); CI: “confidence interval” (interval spolehlivosti)

Tabulka 6: Výsledky testování galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* jednotlivě a v kombinacích při rozpoznání IPA v podskupině pacientů z ostatních nemocničních oddělení

Podskupina II. ONO	GM (CI %)	BG (CI %)	IgAG (CI %)	GM+IgAG (CI %)	BG+IgAG (CI %)	GM+BG (CI %)	GM+BG+IgAG (CI %)	GM/BG (CI %)	GM/BG/IgAG (CI %)
Sensitivita (%)	42,9 (12/28) (24,5-62,8)	78,6 (22/28) (67,9-92,8)	96,4 (27/28) (81,7-99,9)	42,9 (12/28) (24,5-62,8)	61,0 (21/28) (55,1-89,3)	39,3 (11/28) (21,5-59,4)	39,3 (11/28) (21,5-59,4)	82,1 (23/28) (63,1-93,9)	100 (28/28) (87,7-100,0)
Specifická (%)	90,3 (28/31) (74,2-98,0)	83,9 (26/31) (58,9-85,7)	93,5 (29/31) (78,6-99,2)	100,0 (31/31) (88,8-100,0)	100,0 (31/31) (88,8-100,0)	96,8 (30/31) (83,3-99,9)	100,0 (31/31) (88,8-100,0)	77,4 (24/31) (58,9-90,4)	71,0 (22/31) (52,0-85,8)
PPH (%)	80,0 (12/15) (51,9-95,7)	81,5 (22/27) (58,9-85,7)	93,1 (27/29) (77,2-99,2)	100,0 (12/12) (73,5-100,0)	100,0 (21/21) (83,9-100,0)	91,7 (11/12) (61,5-99,8)	100,0 (11/11) (71,5-100,0)	76,7 (23/30) (57,7-90,1)	75,7 (28/37) (58,8-88,2)
NPH (%)	63,6 (28/44) (47,8-77,6)	81,3 (26/32) (67,9-92,8)	96,7 (29/30) (82,8-99,9)	66,0 (31/47) (50,7-79,1)	74,2 (31/38) (65,7-92,3)	63,8 (30/47) (48,5-77,3)	64,6 (31/48) (49,5-77,8)	82,8 (24/29) (64,2-94,2)	100,0 (22/22) (84,6-100,0)
Přesnost (%)	67,8 (40/59) (54,4-79,4)	81,4 (48/59) (68,0-86,3)	94,9 (56/59) (85,9-98,9)	72,9 (43/59) (59,7-83,6)	81,6 (52/59) (77,1-95,1)	69,5 (41/59) (56,1-80,8)	71,2 (42/59) (57,9-82,2)	79,7 (47/59) (67,2-89,0)	84,7 (50/59) (73,0-92,8)
AUC	0,6659	0,8122	0,9499	0,5000	0,5000	0,6803	0,5000	0,7978	0,5000

GM: galaktomanan, BG: (1,3)- β -D-glukan; IPA: invazivní plicní aspergilóza; GM/BG, GM/BG/IgAG (metoda “alespoň jedentest pozitivní”): IPA byla u pacienta diagnostikována, když byl jeden ze dvou nebo ze tří biomarkerů pozitivní; GM+IgAG, BG+IgAG, GM+BG, GM+BG+IgAG: IPA byla u pacienta diagnostikována jen, pokud byly oba nebo všechny tři biomarkery pozitivní současně; PPH: pozitivní prediktivní hodnota; NPH: negativní prediktivní hodnota; AUC: “area under the curve” (Oblast pod křivkou – ROC analýza); CI: “confidence interval” (interval spolehlivosti)

Ze sledované populace pacientů ($n = 87$) byly pozitivní hodnoty GM, BG a IgAG stanoveny ve 24, 46 a 33 případech. Nejméně jeden z testů byl pozitivní u 46, oba testy současně byly pozitivní u 34 a všechny tři testy byly současně pozitivní u 13 pacientů.

Ze 41 pacientů s pravděpodobnou (AspiCU) nebo prokázanou IPA mělo pozitivní výsledek 20 na GM, 34 pozitivních testů bylo při stanovení BG a 31 pozitivních výsledků v případě IgAG. Ve strategii “nejméně jeden pozitivní výsledek” (GM / BG) byl pozorován u 34 ze 41 pacientů s pravděpodobnou (AspiCU) nebo prokázanou IPA; 19 pacientů bylo v GM a BG pozitivní v obou testech a 13 pacientů bylo v GM, BG a IgAG pozitivní ve všech třech testech, z nichž šest bylo považováno za prokázané IPA. 15 pacientů, kteří byli pozitivní v případě BG, byli negativní na GM, zatímco pouze jeden pacient pozitivní na GM byl v případě BG negativní. Šest případů, které byly pozitivní na GM, bylo negativních při testování IgAG a 15 případů, které byly pozitivní v testování na IgAG, byly negativní na GM, z nichž pouze pět bylo negativních na BG. Z 10 pacientů s prokázanou IPA byly tři případy negativní na GM, jeden případ byl negativní na BG, jeden negativní na IgAG a devět pacientů pozitivních na alespoň dva ze tří testů současně (GM, BG nebo IgAG).

5.2.1 Detekce galaktomananu ze séra

V podskupině I (pacienti na JIP, **tabulka 5**) byla použitím GM testu dosažena zvýšená senzitivita (61,5 %) a specifická (93,3 %) a také lepší hodnota plochy pod křivkou (AUC = 0,7744) ve srovnání se skupinou všichni pacienti a podskupinou pacientů ONO (viz **tabulka 4**). V podskupině II (ONO, **tabulka 6**) byly dosaženy horší výsledky senzitivity testu (senzitivita 42,9 %, specifická 90,3 % a AUC = 0,6659) než u skupiny všichni pacienti (JIP + ONO).

5.2.2 Detekce (1,3)- β -D-glukanu ze séra

Srovnáním testu BG se standardizovaným hodnocením IPA byla stanovena senzitivita testu na 82,9 % a specifická na 73,9 % (AUC = 0,7842) ve skupině všichni pacienti (JIP + ONO, **tabulka 4**). U pacientů podskupiny I (JIP, **tabulka 5**) byla citlivost testu 92,3 % a specifická pouze 53,3 % (AUC = 0,7282). V podskupině II (ONO, **tabulka 6**) byla citlivost testu BG 78,6 % a specifická 83,9 %, přičemž dosahovala nejlepších hodnot v ploše pod křivkou (AUC = 0,8122) ve srovnání se skupinou všichni pacienti (JIP + ONO) a podskupinou I (JIP).

5.2.3 Detekce specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* ze séra

U non-neutropenických pacientů dosahovala senzitivita a specifická testu IgAG ve skupině všichni pacienti (JIP + ONO) 75,6 % a 95,7 %, přičemž hodnota plochy pod křivkou byla vyšší (AUC = 0,8563, **tabulka 4**). V případě pacientů v podskupině I (JIP) byla však míra senzitivity a specifický 30,8 % a 100 %, s velmi slabou hodnotou plochy pod křivkou (AUC = 0,5, **tabulka 4**).

5.2.4 Laboratorní diagnostika IPA založená na pozitivitě galaktomananu a (1,3)- β -D-glukanu současně

Strategie pozitivita obou testů GM a BG současně pro diagnózu IPA u non-neutropenických pacientů ve skupině všichni pacienti (JIP + ONO, **tabulka 4**) vykazovala senzitivitu 46,3 % a specifický 95,7 %; PPH se zvýšila na 90,5 % (AUC = 0,7100). U pacientů v podskupině I (JIP) přináší tato strategie horší výsledky než individuálně použité testy BG nebo GM (**tabulka 5**). Senzitivita detekce BG použité samostatně byla mnohem vyšší než senzitivita obou testů kombinovaných do strategie, a to 92,3 % (AUC = 0,7282) a 61,5 % (AUC = 0,7744). Strategie založená na pozitivitě obou testů GM i BG současně u pacientů podskupi-

ny II (ONO) ukázala senzitivitu pouhých 39,3 % a velmi slušnou specificitu 96,8 %; PPH se zvýšila na 91,7 % (AUC = 0,6803, **tabulka 6**).

5.2.5 Laboratorní diagnostika IPA založená na pozitivitě více testů současně v různých kombinacích (galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus*)

Hodnoty senzitivity, specificity, PPH a NPH testů GM a BG v kombinačních strategiích s testem IgAG jsou uvedeny v **tabulkách 4-6**. Nejnižší senzitivita těchto kombinací byla zjištěna v podskupině pacientů I (JIP). Zvýšení specificity a PPH pro diagnostiku IPA na hodnotu 100 % bylo dosaženo ve všech třech skupinách pacientů, pokud byla interpretace založena na strategii současně pozitivních testů GM a IgAG nebo BG a IgAG (**tabulka 4-6**).

5.2.6 Laboratorní diagnostika IPA založená na strategii "alespoň jeden pozitivní test" (galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan, specifické IgAG)

U pacientů v podskupině I (JIP) dosáhla strategie "alespoň jednoho pozitivního testu" v kombinaci BG a GM vyšší senzitivity 92,3 %, ale specificita poklesla na 53,3 % (AUC = 0,7282, **tabulka 5**). U pacientů v podskupině II (ONO) tato strategie vykazovala senzitivitu 82,1 % a specificitu 77,4 % (AUC = 0,7978, **tabulka 6**). Při použití strategie „alespoň jeden pozitivní test“ pro všechny tři biomarkery (GM, BG a IgAG) bylo v podskupině II (ONO) dosaženo senzitivity 100 %, zatímco u pacientů podskupiny I (JIP) byla senzitivita 92,3 % a NPH činila pouze 88,9 %. Ve skupině všichni pacienti (JIP + ONO) byla senzitivita 97,6 % a NPH 96,8 % (**tabulka 4**).

5.2.7 Statisticky významná zjištění

Průměrné hodnoty rozdílu GM a BG u přeživších a nepřeživších pacientů mezi skupinami (JIP, ONO) nebyly statisticky významné (IP = 0,43 vs. IP = 1,14, P = 0,307 a 185,5 pg / mL oproti 225,0 pg / mL, P = 0,303). Jediný statisticky signifikantní rozdíl mezi přeživšími a zemřelými pacienty s IPA byl v koncentracích specifického IgA, přičemž přeživší pacienti měli naměřené koncentrace IgA vyšší (IP = 2,16 vs IP = 1,10, P = 0,017, **tabulka 7**).

Tabulka 7: Prognostický význam galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgAG z hlediska IPA a mortality

	Přeživší pacienti (n=34)	Zemřelí pacienti (n=7)	hodnota p
GM [medián IP (range)]	0,43 (0,11-9,80)	1,14 (0,16-6,18)	0,307
BG [medián pg/ml (range)]	185,5 (0,0-523,0)	225,0 (0,0-523,0)	0,303
IgA [medián IP (range)]	2,16 (0,32-11,17)	1,1 (0,24-3,08)	0,017
IgG [medián IP (range)]	2,88 (0,26-8,41)	2,26 (0,47-4,15)	0,268

GM: galaktomanan, BG: (1,3)- β -D-glukan, IP: index positivity, IPA: invazivní plicní aspergilóza, IgA: *A. fumigatus* specifický izotyp IgA, IgG: *A. fumigatus* specifický izotyp IgG

5.3 Detekce triacetylfusarininu C v moči

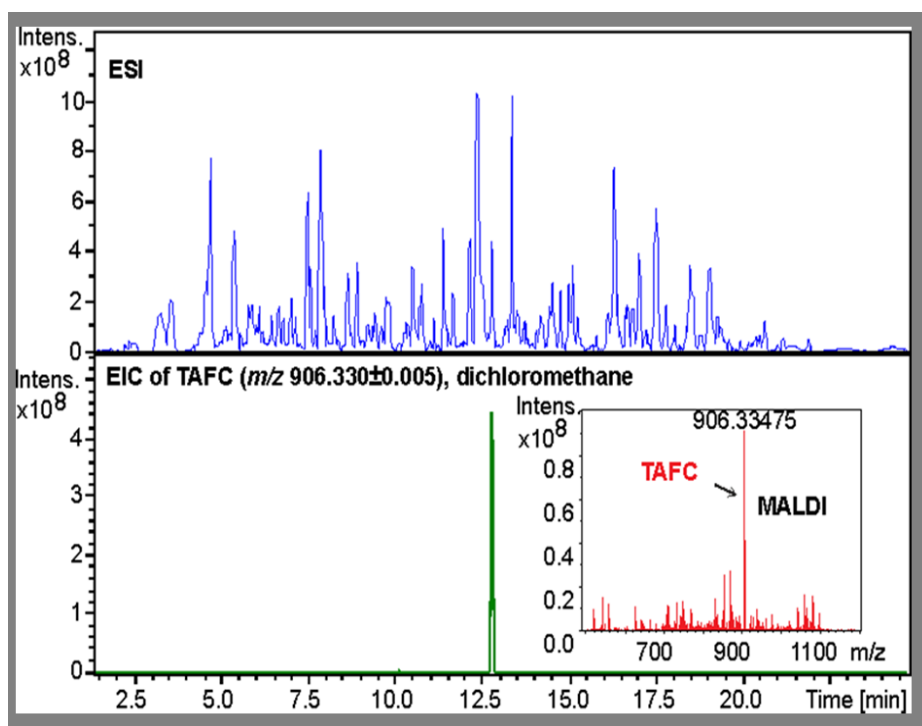
Osm pacientů bylo prospektivně vyšetřováno na přítomnost sideroforů v moči od února do května 2018. V souboru pacientů různých typů se záměrně vyskytuje jeden pacient s polytraumatem, polybakteriálním nálezem na ranách a plicích, který nebyl suspektní z IPA. U všech pacientů byly rovněž rutinně stanoveny koncentrace GM a BG ze vzorků séra, test specifického IgAG nebyl stanoven ve dvou případech pro neutropenii pacientů a ve dvou případech pro nedostatek séra. Hmotnostní spektrometrie byla pro IPA citlivějším nástrojem než detekce GM ve dvou případech. Pro IPA způsobenou *A. fumigatus* byl TAFC dominantním biomarkerem, který mohl být snadno detekován metodou HPLC / ESI-FTICR (**obrázek 6**). Hmotnostní spektrum s TAFC se ukázalo být velmi průkazné a je uvedeno v detailu na **obrázku 6**. Pokusně byly testovány i vzorky séra těchto osmi pacientů, avšak chemický šum vznikající z izobarických molekul byl natolik komplikující, že testovat TAFC přímo ze sér pacientů není prozatím možné (data nejsou uvedena). U vzorků moči je situace opačná.

U pacienta, který sloužil jako negativní kontrola (polytrauma bez suspekce IPA) byly detekovány nulové koncentrace TAFC v moči. V souboru osmi typových pacientů byl zachycen široký rozptyl hodnot (**tabulka 3, obrázek 7**). U pacientů s hematoonkologickou malignitou v neutropenii a pravděpodobnou IPA (EORTC / MSG) dosahoval rozsah koncentrace TAFC v moči daleko nižších hodnot (3100 – 12600 pg/ml) než v případě pacientů s pravděpodobnou IPA (AspICU) bez neutropenie a hematoonkologického onemocnění (400 – 100 000 pg/ml). V této skupině non-neutropenických pacientů se vyskytují dva případy suspektní IPA, z nichž jeden byl vyhodnocen dle algoritmu AspICU 2012 [59] jako kolonizace *A. fumigatus* s hodnotou koncentrace TAFC v moči 1400 pg/ml a druhý případ byl hodnocen

jako pravděpodobná IPA (AspICU) o koncentraci TAFC v moči 400 pg/ml. U non-IPA pacientky s bakteriální bronchopneumonií nebyla detekována žádná koncentrace TAFC v moči.

U pacientky s buněčným lymfomem a pravděpodobnou IPA, byl zjištěn klesající trend koncentrace TAFC v moči ve dvou následujících odběrech po deseti dnech od zahájení terapie vorikonazolem (12600 pg/ml – 1300 pg/ml – 100 pg/ml, **obrázek 8**).

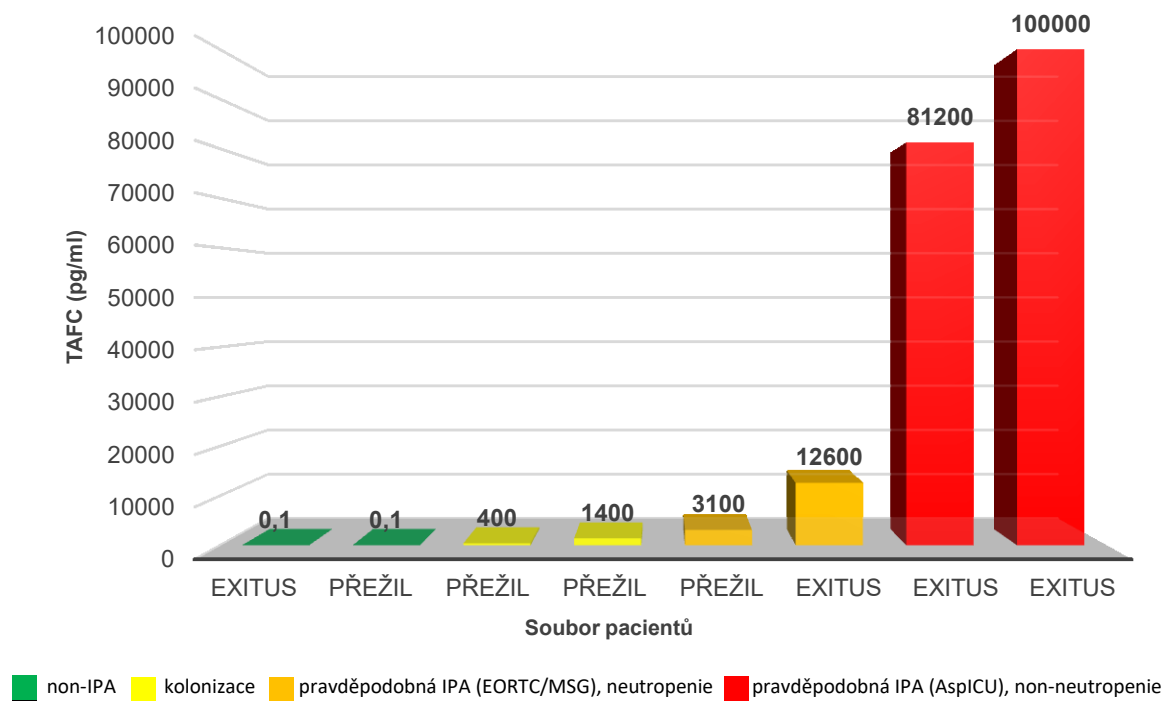
Obrázek 6: Průkaz TAFC v moči pacienta



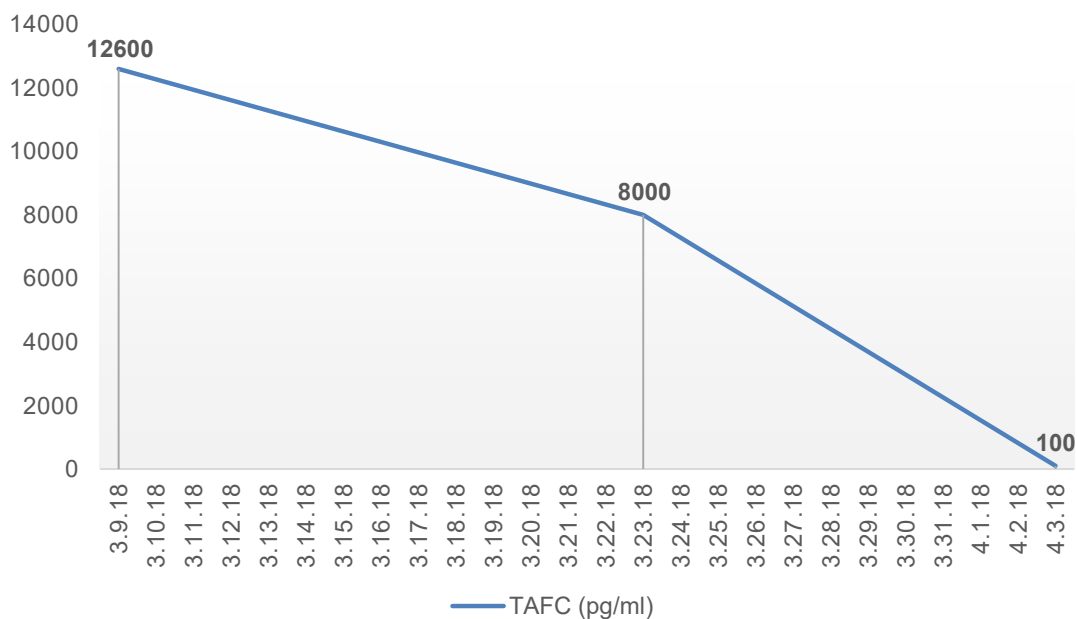
TAFC detekovaný MALDI-FTICR (vložený obrázek) a stopovou analýzou HPLC/ESI-FTICR (906.330 s 0.01 oknem).

Vzorek byl extrahovaný dichlorometanem z moči pacienta přítomného v datasetu této studie.

Obrázek 7: Soubor pacientů ve studii rozdělený podle koncentrace triacetylfusarininu C v moči a diagnostických kritérií IPA



Obrázek 8: Kinetika triacetylfusarininu C v průběhu léčby hematoonkologického pacienta s pravděpodobnou IPA



6 DISKUZE

6.1 Detekce galaktomananu

Galaktomanan (GM) je rodově specifický antigen který *Aspergillus* uvolňuje během růstové fáze z povrchové vrstvy buněčné stěny. Tento biomarker je běžně využívaný pro diagnostiku invazivní aspergilózy (IA), zejména u pacientů s hematologickými malignitami nebo po transplantaci hematopoetických kmenových buněk [24]. Situace u nehematologických a non-neutropenických pacientů je však odlišná. Nedávné studie ukázaly, že rozsah citlivosti GM testu u takovýchto pacientů je 23,1 % - 57,9 % a rozsah specifity je 76,1 % - 94,1 % při použití cut-off $\geq 0,5$ [64-66]. Příčinou snížené senzitivity tohoto jevu jsou cirkulující neutrofilové antigeny, které vyvazují antigen a příčinou zvýšeného rozsahu specifity falešné pozitivní vzorků různého původu [8]. V této studii na našem souboru pacientů byly hodnoty senzitivity a specifity testu obdobné (48,8 % a 91,3 %, AUC = 0,7004) ve skupině všichni pacienti (JIP + ONO, **tabulka 4**). Výsledky naznačují, že test GM může být méně užitečný pro diagnostiku IPA u non-neutropenických pacientů (**obrázek 9**), což je ve shodě s recentními studiemi jiných skupin autorů [11, 65].

6.2 Detekce (1,3)- β -D-glukanu

(1,3)- β -D-glukan (BG) je další biomarker používaný pro diagnostiku invazivních houbových onemocnění. BG může být detekován v séru pacientů infikovaných oportunními houbovými patogeny v počáteční fázi infekce, s výjimkou *Cryptococcus neoformans* a mikromycet

z oddělení Zygomycota [67]. Z literatury je patrné, že senzitivita a míra specifity testu BG v případě pacientů s hematologickými malignitami a IPA dosahují širšího rozsahu 66 % - 90 % a 75,5 % - 85 %, přičemž za pozitivní vzorky jsou považovány ty, které se rovnají nebo přesahují hodnotou 80 pg / ml [68-70]. Ve studii Cai et al., [11], vykazoval BG test při diagnostice IPA u non-neutropenických pacientů senzitivitu 48,1 % a specifitu 78,8 %. Další studie provedená u imunosuprimovaných, uměle ventilovaných kriticky nemocných pacientů uvedla senzitivitu a specifitu testu BG 88 % a 82 % [71].

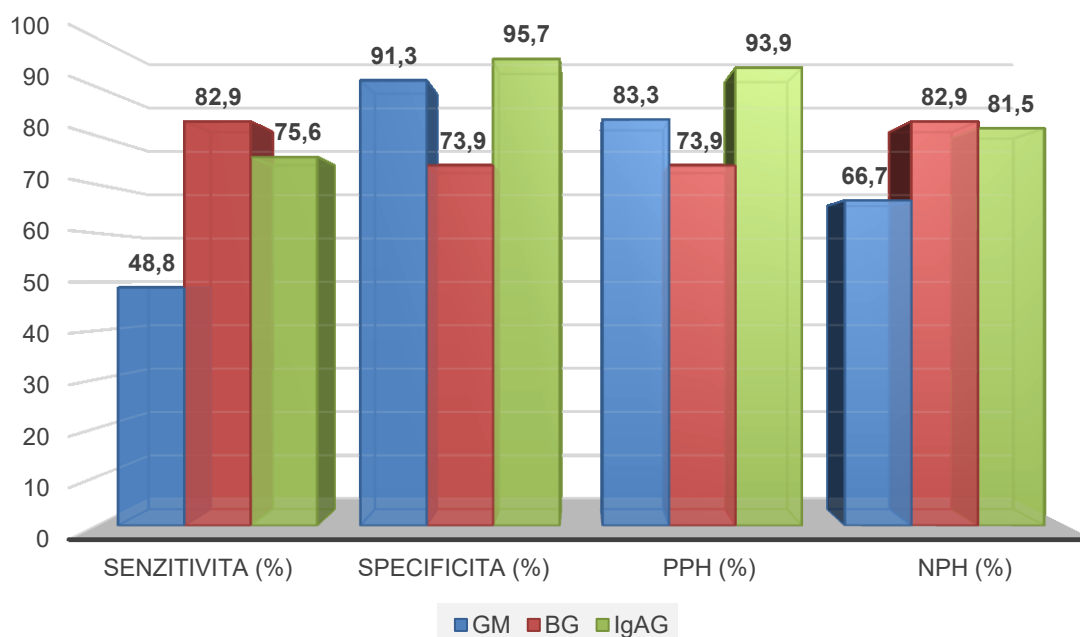
Na základě výsledků naší studie může být u pacientů podskupiny I (JIP, **tabulka 5**) vyloučena pravděpodobná diagnóza IPA (AspICU), pokud je hodnota BG v séru nižší než 80 pg / ml. Podobné závěry byly zaznamenány u invazivní mykotické infekce ve studii pacientů, po transplantaci jater [72]. Z výsledků můžeme uzavřít, že u non-neutropenických pacientů je pro vyloučení diagnózy IPA sérologický průkaz BG vhodnější než GM.

6.3 Detekce specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* v séru

Další cílem předložené studie bylo stanovení koncentrací imunoglobulinů specifických k *A. fumigatus* v izotypech IgA a IgG měřených a hodnocených současně. Stanovení koncentrace specifických IgA a IgG v séru pacientů s podezřením na infekce způsobené jednotlivými zástupci rodu *Aspergillus* bylo použito v již dřívějších studiích. Tyto studie potvrdily, že změny koncentrací specifických IgA mohou být více informativní než změny koncentrací specifických IgG [28]. Detekce protilátek specifických k aspergilovým antigenům není zařazena mezi kritéria EORTC / MSG, a to hlavně proto, že v minulosti byly tyto analýzy zaměřeny převážně na neutropenické pacienty, u kterých je rozvoj protilátkové odpovědi spíše záležitostí až post

neutropenické doby, což je v rámci časně diagnózy IPA téměř nepoužitelné. V posledních letech se spektrum pacientů ohrožených IPA a IA rozšiřuje i na non-neutropenické pacienty [73] vzhledem k nárůstu invazivních zákroků a dalších nových rizikových faktorů zmíněných výše v **tabulce 1**. Předložená studie je proto poměrně ojedinělá. Test IgAG může být velkým přínosem u non-neutropenických pacientů nejen z podskupiny II (ONO) s pravděpodobnou IPA (AspICU), protože senzitivita a specifita dosahovala 96,4 % a 93,5 % (AUC = 0,9499, **tabulka 6**). Test může také pomoci zvýšit specifitu testů GM a BG pacientů v podskupině I (JIP) (**tabulka 5**).

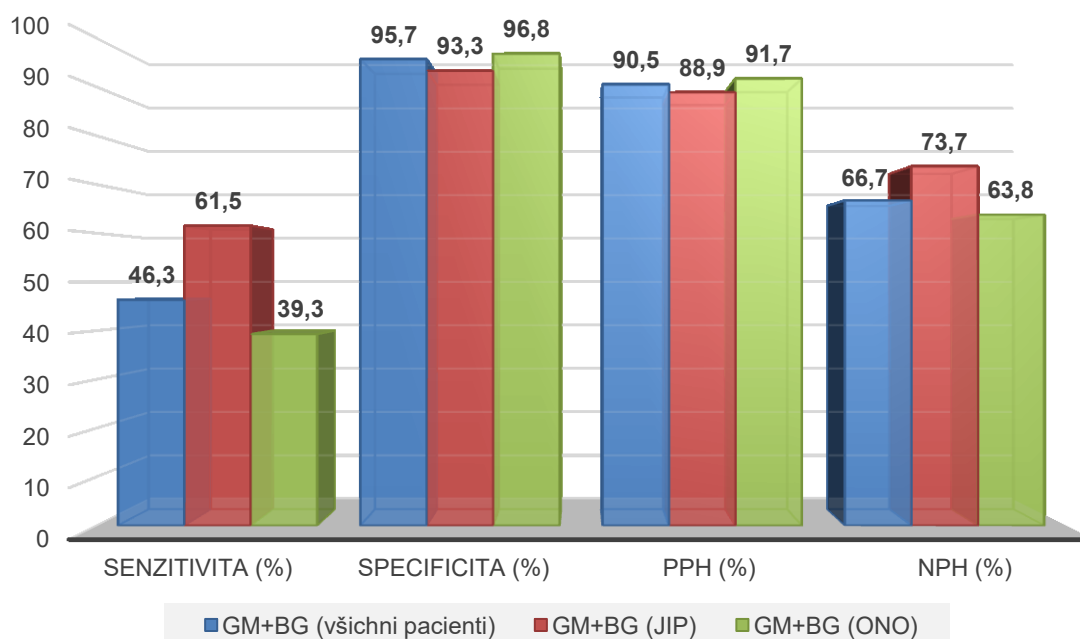
Obrázek 9: Srovnání senzitivity, specifity, PPH a NPH testů GM, BG a IgAG ve skupině všichni pacienti



6.4 Dvojitá pozitivita detekcí galaktomananu a (1,3)- β -D-glukanu

Vzhledem k tomu, že sérologický průkaz BG vykázal vysokou senzitivitu a průkaz GM vysokou specificitu, ale nízkou PPH zapříčiněnou falešnými pozitivitami, někteří autoři navrhli, že by kombinace obou testů mohla zlepšit diagnostiku IA u pacientů s hematologickými malignitami [74, 75]. Jak je popsáno výše, situace byla u naší skupiny non-neutropenických pacientů složitější, a to vzhledem k nižší sérové hladině GM. Nicméně současné vyhodnocení BG a GM nezvýšilo senzitivitu stanovení IPA ani u non-neutropenických pacientů. Naopak, stanovení na základě současné positivity BG a GM u non-neutropenických pacientů zvýšilo pouze PPH pro diagnózu IPA u pacientů v podskupině II (ONO), což je patrné při porovnání obrázku 9 a 10.

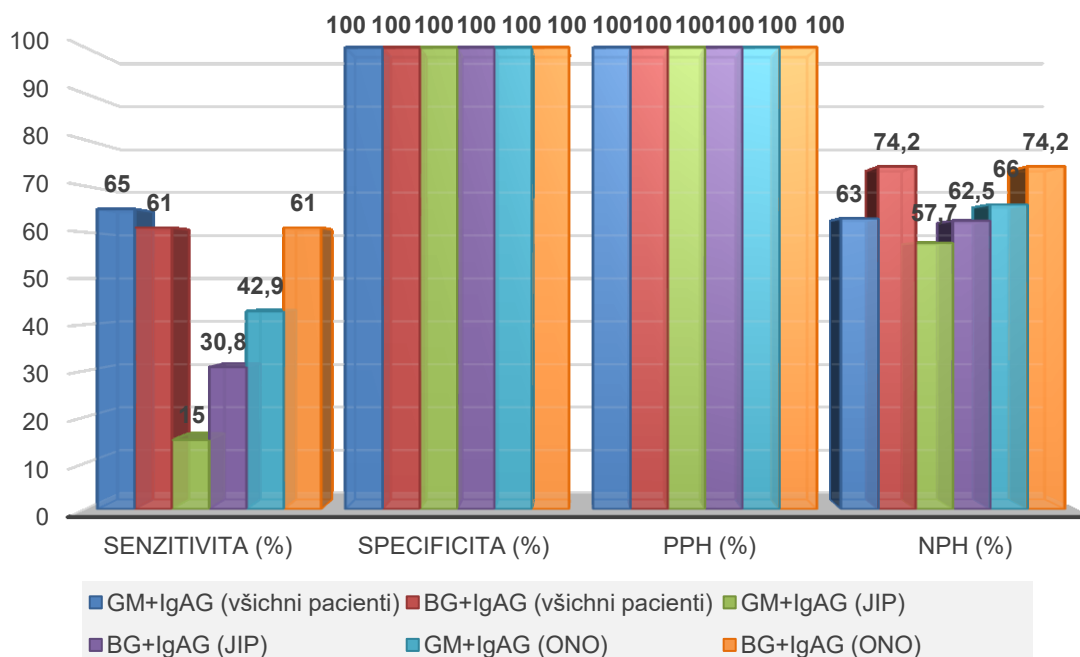
Obrázek 10: Srovnání senzitivity, specificity, PPH a NPH testů GM + BG ve skupině všichni pacienti, JIP a ONO



6.5 Dvojitá pozitivita detekcí galaktomananu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* nebo (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* nebo trojitá pozitivita galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus*

Kombinace testů GM a BG s testy specifického IgAG v žádné z testovaných podskupin nezvýšila senzitivitu a pro rutinní praxi není tato strategie příliš přínosná. Naopak při diagnostice IPA kombinace testu specifického IgAG s GM nebo BG zvyšuje specificitu a PPH na 100 %. Toto zjištění platí pro všechny tři skupiny pacientů ve studii (**Obrázek 11**). Kombinací málo senzitivních testů se jejich senzitivita nezvýší, zatímco výsledná specifita v kombinacích testů stoupá.

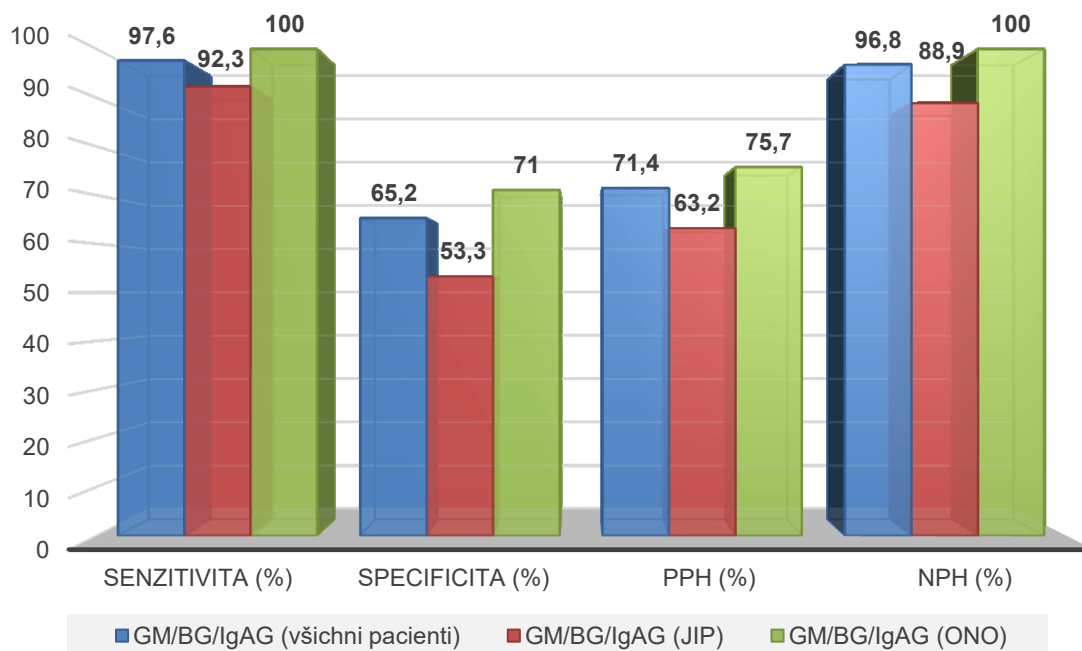
Obrázek 11: Srovnání senzitivity, specifity, PPH a NPH testů GM + IgAG a BG + IgAG ve skupině všichni pacienti, JIP a ONO



6.6 Strategie “alespoň jeden pozitivní test” (galaktomanan a (1,3)- β -D-glukan nebo galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan a specifické IgA a IgG proti *A. fumigatus*)

Cai a kol. [11] uvádějí, že strategie alespoň jednoho pozitivního výsledku dvou testů (GM, BG) pro diagnostiku IPA u non-neutropenických pacientů může mít poměrně vysokou senzitivitu (70,4 %) a specifitu (75,8 %). Podobné údaje byly zjištěny v rámci předložené studie. Při vyhodnocení testu GM a BG metodou “alespoň jeden pozitivní test” bylo dosaženo senzitivity (85,4 %) a specifity (69,6 %, AUC = 0,7747) u skupiny všichni pacienti (skupina JIP + ONO, **tabulka 4**). Aby se zvýšila senzitivita a NPH analýzy, byl test IgAG v této studii přidán do metody hodnocení „alespoň jeden pozitivní test“ k testu GM a BG, protože u některých skupin pacientů není použití testování koncentrace IgA a IgG specifických k *Aspergillus* spp. samostatně vhodné nebo jsou jeho interpretace nejasné [36, 76]. Data z naší studie potvrdila, že vyhodnocení testů GM a BG v kombinaci s testem IgAG metodou “alespoň jeden pozitivní test” je pro diagnostiku IPA u non-neutropenických pacientů vhodné, neboť zvyšuje senzitivitu na 92,3 % - 100 %, což je patrné na **obrázku 12** v porovnání s **obrázky 9, 10 a 11**.

Obrázek 12: Srovnání senzitivity, specifity, PPH a NPH testů metodou hodnocení výsledků „alespoň jeden pozitivní test“ GM/BG/IgAG ve skupině všichni pacienti, JIP a ONO



6.7 Význam koncentrace specifických IgA proti *A. fumigatus* v mortalitě pacientů při invazivní aspergilóze

Řada nedávných klinických případů a monocentrických studií ukázala, že CHOPN je rizikovým faktorem pro IPA, pokud jsou kortikosteroidy podávány déle než 3 měsíce a IPA je silným prediktorem úmrtí u kriticky nemocných pacientů s CHOPN [50, 77, 78]. V předkládané studii byla nejběžnější primární diagnózou u pacientů s pravděpodobnou (AspICU) nebo prokázanou IPA právě CHOPN (34,1 % pacientů) s úmrtností 14,3 %. Žádný z pacientů s CHOPN nebyl léčen glukokortikosteroidy ekvivalentu prednisonu ≥ 20 mg / den. Největší skupinu pacientů s diagnózou CHOPN, následovala skupina pacientů s diagnózou IPN (14,6 % pacientů), s úmrtností 33 % a skupina pacientů s orgánovou malignitou (7,3 %) s 33 % úmrtností. V předkládané studii bylo sledováno osm pacientů (19,5 %) s prokázanou nebo pravděpodobnou aspergilózou (AspelCU), kteří neměli žádnou základní predispozici pro IPA, po-

dobně jako u jiných studií [10, 11] . Pouze jeden ze studovaných 8 pacientů pocházel z podskupiny II (ONO), zatímco zbývajících 7 pacientů (87,5 %) pocházelo z podskupiny I (JIP). Žádný z pacientů bez základní predispozice pro IPA nezemřel. Vysvětlení statisticky významně rozdílných koncentrací izotypu IgA specifického pro *A. fumigatus* ve skupině přeživších a nepřeživších pacientů (IP = 2,16 vs IP = 1,10, P = 0,017, tabulka 6) může být založeno na obecném vyčerpání pacienta zahrnující vyčerpání systémového a slizničního imunitního systému. Rozdíl v izotypové odezvě IgG může být spojen s rozpoznáváním odlišných antigenů *A. fumigatus* a s odlišným přínosem izotypů IgA nebo IgG při kontrole infekce *A. fumigatus*, jak bylo prokázáno v jiných případech bronchopulmonální aspergilózy [28, 36]. Není zřejmé, zda snížení IgA specifického pro *A. fumigatus* přímo souvisí s fulminantním výsledkem IPA, ale rozdíly ve vývoji hladin IgG a IgA podporují hypotézu o dominantní roli IgA při kontrole progresu onemocnění u našich pacientů.

6.8 Detekce triacetylfusarininu C v moči pacientů s pravděpodobnou (EORTC / MSG) / pravděpodobnou (AspICU) IPA

Recentní práce uvádějí, že siderofory jsou chelatační látky syntetizované mikroorganismy sloužící pro vyloučení volného železa [22, 79], celá řada mikroorganismů vytváří tyto látky jako druhově specifické molekuly *A. fumigatus* [20, 80, 81]. Vzhledem k esenciální roli volného železa pro metabolismus mikroorganismů jsou siderofory jedním z faktorů virulence [80]. Z toho vyplývá, že tvorba sideroforů mikroorganismy je existenční nutností, a proto by měly být tyto siderofory využitelné pro diagnostiku invazivních infekcí včetně aspergilóz, což potvrzují studie na myších modelech [41]. Nízkomolekulární povaha sideroforů je na jednu stranu výhodná pro MS analýzy na druhou stranu však představuje technologickou výzvu pro

klinicko-diagnostické aplikace, neboť v komplexním vzorku, jakým je moč a zejména sérum dosud nebyly siderofory u pacientů analyzovány. V této práci prezentované analýzy TAFC s použitím vysoce citlivých metod hmotnostní spektrometrie jako (HPLC, ESI-FTICR) navazují na studie provedené na myších modelech týmem prof. Ing. Vladimíra Havlíčka, Ph. D. (MBÚ AVČR) [82]. Zjištění, že TAFC je vysoce specifický pro *A. fumigatus*, dominantního původce IPA (90 %), je patrné i na vzorcích moči sedmi typových pacientů v předložené práci (prospektivní studie provedená v období únor – květen 2018). Lidská moč se zatím jeví jako neideálnějším biologický materiál pro stanovení TAFC v porovnání se sérem, kde je metodika dosud použitelná pouze u 28 % vzorků [83]. Příčinou je vysoký chemický šum vznikající z izobarických molekul, které je natolik kritické, že testovat TAFC přímo ze sér pacientů není prozatím spolehlivé.

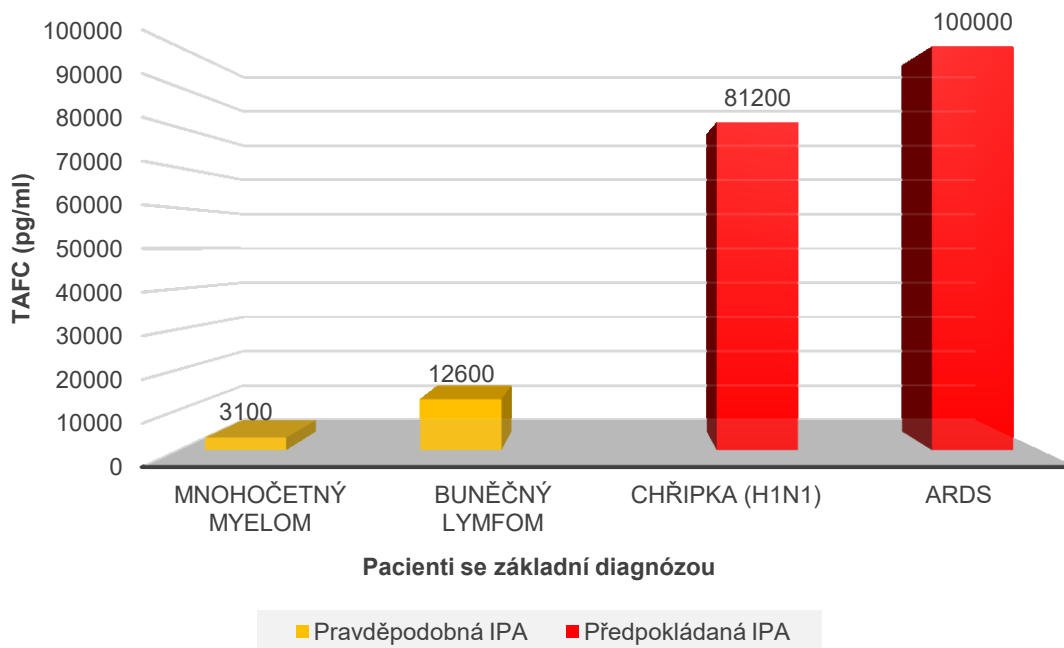
Výsledky předkládané studie ukazují slibnou cestu vývoje budoucí diagnostiky IPA. Hoenigl et al. (2018) ve své práci předkládá budoucí využití TAFC jako biomarkeru pro časnou diagnostiku IA z moči pacientů. V této práci bylo testováno 44 vzorků moči od 24 hematologických pacientů (pravděpodobná, možná a non-IA) na přítomnost TAFC metodou kapilární elektroforézy následné elektrosprej ionizace a konečné hmotnostní spektrometrie. Ze studie je patrné, že senzitivita a specifita TAFC v moči je podobná jako senzitivita a specifita GM v séru a BAL, přičemž GM slouží jako standard pro mykologická kritéria IA [42]. Oproti studii Hoenigl et al. (2018) provedené pouze u pacientů s hematologickými malignitami (neutropenický pacient nebo pacient v nedávné neutropenii)[42] byl náš pilotní prospektivně studovaný soubor pravděpodobných (AspICU) a pravděpodobných (EORTC / MSG) IPA složen ze šesti non-neutropenických pacientů a dvou pacientů s maligním hematologickým onemocněním. Z výsledků lze předpokládat, že až bude soubor pacientů robustnější (klinická studie dále pokračuje) projeví se lepší výsledky detekce TAFC v diagnostice IPA

oproti ostatním biomarkerům se statistickou významností. Budeme moci kalkulovat senzitivitu, specificitu, NPH, PPH a prokázat, že TAFC daleko senzitivnějším a specifitějším biomarkerem hlavně pro skupinu non-neutropenických kriticky nemocných pacientů s předpokladem IPA z jednotek intenzivní péče. Toto tvrzení dokládá fakt, že námi provedený průkaz TAFC z moči non-neutropenických pacientů pomocí HPLC / ESI-FTICR byl citlivějším nástrojem než detekce GM ze séra ve dvou případech. Přítomnost čistoty hmotnostního spektra (detail viz výše, **obrázek 4**), který je porovnatelný s výsledky ve studii Hoenigla et al. [42] naznačuje velký potenciál v možnosti úspěšného přenosu tohoto diagnostického přístupu do rutinní laboratorní praxe.

V našem souboru neutropenických a non-neutropenických pacientů s pravděpodobnou (EORTC / MSG) a pravděpodobnou (AspICU) IPA byl naměřen poměrně široký rozsah hodnot koncentrací TAFC (0 – 100 000 pg / ml, **tabulka 3, obrázek 7**), což je velmi dobrým znamením pro budoucí vyhodnocování robustnějšího celku pacientů s IPA v pokračující studii ve smyslu nastavení hodnot (cut-off) pro diferenciaci kolonizace od IPA. V naší studii jsme zaznamenali zásadní rozdíl v rozsahu koncentrací TAFC v moči neutropenických a non-neutropenických pacientů (3100 – 12600 pg / ml; 400 – 100 000 pg / ml), což je patrné z **obrázku 13**. Pozorovaný rozdíl je zásadní pro využitelnost metody pro včasnou diagnostiku IPA u obou skupin pacientů. Čím vyšší byly koncentrace TAFC v moči pacientů, tím vyšší byla pravděpodobnost úmrtí (viz **obrázek 7**), zdá se, že biomarker TAFC může úzce souviset s mortalitou pacientů na IPA. Na případu pravděpodobné IPA pacientky s hematologickou malignitou léčené vorikonazolem byla naměřena přímá souvislost koncentrace TAFC s efektivitou léčby IPA, kdy koncentrace TAFC v moči se po cca 20-ti dnech úspěšné léčby blížila téměř k nule (viz **obrázek 8**). Klesající koncentrace při antifungální léčbě IPA jsou patrné i v práci Hoenigla et al. (2018) [42].

Nejdůležitějším zjištěním naší studie je nález u dvou non-neutropenických pacientů se suspektní IPA, kdy první byl diagnostikován dle algoritmu AspICU 2012 [59] jako kolonizace *A. fumigatus* s hodnotou koncentrace TAFC v moči 1400 pg/ml a druhý případ byl hodnocen jako pravděpodobná IPA (AspICU) s koncentrací TAFC v moči 400 pg/ml. Samozřejmě se zde jedná o předběžná data, ale pokud se tato metoda potvrdí na robustních datech, jako vysoce specifická mohla by v budoucnu rozdělit nejasnou a šedou zónu klinických kritérií AspICU [59] a EORTC / MSG na pozitivní a negativní případy [6], přičemž by mohla pomoci vyřešit klinické dilema IPA a non-IPA. V nejnovějším souhrném článku Bassetti M. et al. (2018) bylo uvedeno, že nová kritéria pro diagnózu IA u non-neutropenických pacientů jsou potřebná, protože se jejich počet stále zvyšuje a neurčitost diagnózy hraničních případů nabývá na významu. Podle předložených zjištění by mohla detekce TAFC v moči a v budoucnu i v séru přispět k minimalizaci šedé zóny současných kritérií, a tak zásadním způsobem ovlivnit mykologická kritéria v diagnostice IA potažmo IPA.

Obrázek 13: U pacientů s hematologickou malignitou v neutropenii a pravděpodobnou IPA dosahoval rozsah koncentrace TAFC v moči daleko nižších hodnot (3100 – 12600 pg/ml) než v případě pacientů s pravděpodobnou IPA (AspICU) bez neutropenie a hematologického onemocnění (400 – 100 000 pg/ml)



7 Limity studie

První omezení této studie je zdánlivě malý počet shromážděných vzorků pro robustní statistické hodnocení. Je nutné zdůraznit, že tento soubor pacientů s prokázanou a pravděpodobnou IPA (AspICU) dostatečně vyjadřuje výskyt invazivních aspergilóz v populaci non-neutropenických pacientů celé oblasti severní moravy a části Středočeského kraje. Za druhé, PPH mohla být ovlivněna prevalencí IPA. Na druhé straně dostupné údaje o prevalenci IPA pro tuto populaci pacientů jsou poněkud rozmanité; například IA na JIP se vyskytuje v rozmezí od 0,3 % do 5,8 % [84, 85], Diagnóza IPA je problematická a skutečný výskyt IPA je ob-

tížné odhadnout z důvodu nespecifické klinické prezentace [7]. I kdybychom vypočítali střední hodnotu prevalence IPA ve vzorci pro výpočet PPH a NPH, hodnoty by nebyly realističtější a pro tyto účely by byla vhodnější metaanalýza řady podobných studií. Za třetí, i když byly ve studii stanovovány specifické isotypy IgA a IgG pro *A. fumigatus*, marginálně se vyskytly pozitivní koncentrace IgA a IgG také v případech pozitivních kultivačních nálezů non-*A. fumigatus* (viz zdrojová tabulka). Vysvětlením může být vnitro rodová zkřížená reaktivita založená na podobnosti exoantigenů druhů *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* a *A. terreus*, který byl také popsán jinými autory [35] nebo se pod pozitivním nálezem non-*A. fumigatus* ukrýval *A. fumigatus*, který nebyl prokázán pomocí kultivace. Za čtvrté, diagnostika IPA u pacientů v septickém stavu je komplikována potenciální falešnou pozitivitou některých testů způsobenou bakteriemií nebo kandidemií, zvláště v případě zvýšených koncentrací BG v séru. Také z těchto důvodů byly měřeny GM a IgAG současně s BG. Výsledky vypadají slibně, ale skupina kriticky nemocných pacientů byla příliš malá a další aplikace strategií GM/BG + IgAG v studiích obdobného typu je pro ověření těchto výsledků nezbytná.

Hlavním limitem druhé části práce zaměřené na detekci TAFC v moči neutropenických a non-neutropenických pacientů s pravděpodobnou (EORTC / MSG) a pravděpodobnou IPA (AspICU) je omezená velikost souboru studovaných pacientů, nicméně studie stále pokračuje a v současné době máme takovýchto pacientů okolo 30-ti a za nedlouho se jistě podaří tento unikátní soubor pacientů vyhodnotit a výsledky publikovat.

8 ZÁVĚR

8.1 Galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan a specifické IgA a IgG proti *A. fumigatus*

Diagnostické testování koncentrace GM a BG v séru u non-neutropenických pacientů je méně užitečné pro diagnostiku IPA ve srovnání s údaji u neutropenických pacientů ve studiích podobného typu. V případě non-neutropenických pacientů je testování IgAG v kombinaci s testy GM a BG výhodou za použití metody "alespoň jeden pozitivní test" a může zlepšit citlivost diagnostiky IPA u tohoto typu pacientů. Největší zdokonalení pro diagnostiku IPA bylo dosaženo, když byly testy GM nebo BG kombinovány s využitím metody "alespoň jeden test pozitivní" a v případě pochybností byl rozhodujícím faktorem pozitivní test IgAG.

8.2 Triacetylfusarinin C

Výsledky předložené pilotní studie diagnostiky IPA pomocí průkazu TAFC ukazují možnou budoucí cestu, kterou se diagnostika IA, respektive IPA může do budoucna ubírat. Tento nadějný biomarker umožní včas reagovat na možnost hrozby IPA nejen u kriticky nemocných pacientů, ale také u pacientů v neutropenii, zejména umožní adekvátní a včasné nasazení terapie neutropenických i non-neutropenických pacientů v riziku IPA. Stanovení koncentrace TAFC z moči může být užitečné v diagnostice IPA jako adekvátní specifický test k současně hojně využívanému průkazu GM v séru u neutropenických pacientů a v případě non-neutropenických pacientů by měl průkaz TAFC v moči lépe, časněji a citlivěji identifikovat IPA.

9 SOUHRN

Detekce sérových galaktomananů (GM) a (1-3)- β -D-glukanů (BG) je považována za užitečnou pro diagnostiku invazivní plicní aspergilózy (IPA) u neutropenických pacientů. Doposud pouze několik studií hodnotilo tyto biomarkery u non-neutropenických pacientů, kteří byli v podezření z IPA. Cílem této studie bylo vyhodnotit přínos obou testů společně s testem detekce IgA a IgG (IgAG) specifických k *Aspergillus fumigatus* pro sérologickou diagnostiku IPA u non-neutropenických pacientů. Dalšími intra a extracelulárními biomarkery hub, které byly využity v této práci jsou siderofory. Siderofory jsou molekuly s nízkou molekulovou hmotností které chelatují železo a jsou vylučované různými skupinami bakterií a hub. Tyto molekuly by mohly být využity jako časný vysoce specifický biomarker IPA.

GM, BG, IgAG: Séra 87 pacientů s podezřením na IPA byla analyzována retrospektivně. Pacienti byli zařazeni do skupin s prokázanou IPA (n = 10), pravděpodobnou IPA (n = 31), pacienti bez IPA nebo kolonizovaní *A. fumigatus* (n = 46). Při použití testů GM, BG a IgAG u pacientů zařazených do studie byla senzitivita / specifická / pozitivní prediktivní hodnota (PPH) / negativní prediktivní hodnota (NPH) 48,8 % / 91,3 % / 83,3 % / 66,7 %, 82,9 % / 73,9 % / 73,9 % / 82,9 % a 75,6 % / 95,7 % / 93,9 % / 81,5 %. Nejvyšší specifická a PPH byla dosažena stanovením IgAG. Zvýšení senzitivity a NPH bylo dosaženo pomocí metody "alespoň jeden pozitivní test" s testy GM a BG, přičemž hodnoty senzitivity / specifické / PPH / NPH byly 85,0 % / 69,6 % / 71,4 % / 84,2 %. Nicméně nejvyšší senzitivita a NPH byla dosažena metodou "alespoň jeden pozitivní test" při kombinaci testů GM, BG a IgAG (97,6 % a 96,8 %).

Zapojení testu IgAG vylepšuje diagnostiku IPA u non-neutropenických pacientů tím, že zvýší senzitivitu a NPH analýzy v kombinaci s testováním GM nebo BG, zejména v případě, když existují pochybnosti v diagnóze IPA.

T AFC: Do studie bylo zařazeno osm pacientů z jednotek intenzivní péče s podezřením na IPA. Hmotnostní spektrometrie byla pro IPA citlivějším nástrojem než detekce GM ve dvou případech. Pro IPA způsobenou *A. fumigatus* byl T AFC dominantním biomarkerem, který prokázán metodou HPLC / ESI-FTICR.

Stanovení koncentrace T AFC z moči může být užitečné v diagnostice IPA jako test suplementární či alternativní k v současnosti hojně využívanému průkazu GM v séru u neutropenických pacientů. V případě non-neutropenických pacientů by měl průkaz T AFC v moči lépe, časněji a citlivěji identifikovat IPA než je tomu v případě GM.

10 SUMMARY

Detection of serum galactomannan (GM) and (1-3)- β -D-glucan (BG) is considered useful for non-culture diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in neutropenic patients. Only few studies evaluated these seromarkers in non-neutropenic patients suspected for having IPA. The aim of this study was to evaluate both tests together with the *Aspergillus fumigatus*-specific serum IgG and IgA (IgAG) test for serological IPA diagnosis in non-neutropenic patients. Other intracellular and extracellular fungi biomarkers used in this work are siderophores. Siderophores are low molecular weight chelating molecules secreted by various groups of bacteria and fungi that could be used as an early highly specific biomarker of IPA.

GM, BG, IgAG: Sera from 87 patients suspected of having IPA were retrospectively analyzed. Patients were categorized into groups of proven IPA (n=10), pravděpodobná (AspICU) IPA (n=31), and non-IPA colonization (n=46). When the GM, BG, and IgAG assays were used for patients included in the study, the sensitivity/specificity / positive predictive value (PPV) / negative predictive value (NPV) were 48.8 %/91.3 %/83.3 %/66.7 %, 82.9 %/73.9 %/73.9 %/82.9 %, and 75.6 %/95.7 %/93.9 %/81.5 %, respectively. Thus, the highest specificity and PPV were confirmed for the IgAG assay. Improvements in the sensitivity and NPV were achieved by “at least one positive” analysis with the GM and BG assays, with the sensitivity/specificity/PPV/NPV values being 85.0 %/69.6 %/71.4 %/84.2 %. Nevertheless, the highest sensitivity and NPV were achieved by the “at least one positive” analysis combining the GM, BG, and IgAG tests (97.6 % and 96.8 %, respectively).

The involvement of the IgAG assay could improve IPA diagnosis in non-neutropenic patients by increasing the sensitivity and NPV when combined with the GM or BG assays. Fur-

ther improvement was achieved by combining the GM, BG, and IgAG assays using the “at least one positive test” strategy, especially if doubt exists.

T AFC: The study included seven patients from intensive care units that were suspected of IPA. Results of T AFC detection by Mass spectrometry was more sensitive to IPA than GM detection in two cases. For the *A. fumigatus*-induced IPA, T AFC was the dominant biomarker that could easily be detected by HPLC / ESI-FTICR.

Determination of T AFC concentration from urine may be useful in the diagnosis of IPA as an adequate specific test for the currently widely used serum GM in neutropenic patients, and in the case of non-neutropenic patients, urinary T AFC should be better, more timely and more sensitive to IPA.

11 LITERATURA

1. Bao, Z., et al., *Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a case report and review of the literature*. *Oncotarget*, 2017. **8**(23): p. 38069-38074.
2. Chotirmall, S.H. and M.T. Martin-Gomez, *Aspergillus Species in Bronchiectasis: Challenges in the Cystic Fibrosis and Non-cystic Fibrosis Airways*. *Mycopathologia*, 2017.
3. Ader, F., et al., *Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease: an emerging fungal pathogen*. *Clin Microbiol Infect*, 2005. **11**(6): p. 427-9.
4. Guinea, J., et al., *Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome*. *Clin Microbiol Infect*, 2010. **16**(7): p. 870-7.
5. Kousha, M., R. Tadi, and A.O. Soubani, *Pulmonary aspergillosis: a clinical review*. *Eur Respir Rev*, 2011. **20**(121): p. 156-74.
6. 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*, 2008. **46**(12): p. 1813-21.
7. Koulenti, D., J. Garnacho-Montero, and S. Blot, *Approach to invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients*. *Curr Opin Infect Dis*, 2014. **27**(2): p. 174-83.
8. Bassetti, M. and E. Bouza, *Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions*. *J Antimicrob Chemother*, 2017. **72**(suppl_1): p. i39-i47.

9. Greene, R., *The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis*. Med Mycol, 2005. **43 Suppl 1**: p. S147-54.
10. Dai, Z., et al., *Invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients with and without underlying disease: A single-centre retrospective analysis of 52 subjects*. Respirology, 2013. **18**(2): p. 323-331.
11. Cai, X., et al., *Diagnostic value of the serum galactomannan and (1, 3)-beta-D-glucan assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients*. Intern Med, 2014. **53**(21): p. 2433-7.
12. Arendrup, M.C., et al., *ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(8): p. 1030-45.
13. Rickerts, V., et al., *Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(8): p. 1078-83.
14. Serrano, R., et al., *Rapid identification of Aspergillus fumigatus within the section Fumigati*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 82.
15. Mennink-Kersten, M.A., J.P. Donnelly, and P.E. Verweij, *Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(6): p. 349-57.
16. Marchetti, O., et al., *ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(6): p. 846-54.

17. Ostrosky-Zeichner, L., et al., *Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(5): p. 654-9.
18. Denning, D.W., et al., *Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management*. Eur Respir J, 2016. **47**(1): p. 45-68.
19. Goncalves, S.M., et al., *The microbiome-metabolome crosstalk in the pathogenesis of respiratory fungal diseases*. Virulence, 2017. **8**(6): p. 673-684.
20. Schrettl, M. and H. Haas, *Iron homeostasis--Achilles' heel of Aspergillus fumigatus?* Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(4): p. 400-5.
21. Haas, H., M. Eisendle, and B.G. Turgeon, *Siderophores in fungal physiology and virulence*, in *Annual Review of Phytopathology*. 2008, Annual Reviews: Palo Alto. p. 149-187.
22. Schalk, I.J. and L. Guillon, *Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways*. Amino Acids, 2013. **44**(5): p. 1267-77.
23. Bennett, J.E., *Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia*. N Engl J Med, 2006. **355**(11): p. 1154-9.
24. Pfeiffer, C.D., J.P. Fine, and N. Safdar, *Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(10): p. 1417-27.
25. Karageorgopoulos, D.E., et al., *beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(6): p. 750-70.

26. Guinea, J., et al., *Value of a single galactomannan determination (Platelia) for the diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients with clinical isolation of Aspergillus spp.* Med Mycol, 2008. **46**(6): p. 575-9.
27. Page, I.D., et al., *Receiver operating characteristic curve analysis of four Aspergillus-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2018. **91**(1): p. 47-51.
28. van Rens, M.T., et al., *Detection of immunoglobulins G and A to Aspergillus fumigatus by immunoblot analysis for monitoring Aspergillus-induced lung diseases.* Eur Respir J, 1998. **11**(6): p. 1274-80.
29. Meersseman, W., 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**(1): p. 27-34.
30. Collins, A.M., et al., *Bronchoalveolar lavage (BAL) for research; obtaining adequate sample yield.* J Vis Exp, 2014(85).
31. Senn, L., et al., *1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(6): p. 878-85.
32. Onishi, A., et al., *Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis.* J Clin Microbiol, 2012. **50**(1): p. 7-15.
33. Karageorgopoulos, D.E., et al., *Accuracy of beta-D-glucan for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia: a meta-analysis.* Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(1): p. 39-49.

34. Mennink-Kersten, M.A., D. Ruegebrink, and P.E. Verweij, *Pseudomonas aeruginosa as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1930-1.
35. Sekhon, A.S., et al., *Grouping of Aspergillus species with exoantigens*. Diagn Immunol, 1986. **4**(2): p. 112-6.
36. Centeno-Lima, S., et al., *Follow-up of anti-Aspergillus IgG and IgA antibodies in bone marrow transplanted patients with invasive aspergillosis*. J Clin Lab Anal, 2002. **16**(3): p. 156-62.
37. Kappe, R. and D. Rimek, *[Antibody detection in patients with invasive aspergillosis]*. Mycoses, 2004. **47 Suppl 1**: p. 55-9.
38. Savelieff, M.G. and L. Pappalardo, *Novel cutting-edge metabolite-based diagnostic tools for aspergillosis*. PLoS Pathog, 2017. **13**(9): p. e1006486.
39. Havlicek, V., K. Lemr, and K.A. Schug, *Current trends in microbial diagnostics based on mass spectrometry*. Anal Chem, 2013. **85**(2): p. 790-7.
40. Skriba, A., et al., *Early and Non-invasive Diagnosis of Aspergillosis Revealed by Infection Kinetics Monitored in a Rat Model*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2356.
41. Pluhacek, T., et al., *Aspergillus infection monitored by multimodal imaging in a rat model*. Proteomics, 2016. **16**(11-12): p. 1785-92.
42. Hoenigl, M., et al., *Triacetylfusarinine C: A urine biomarker for diagnosis of invasive aspergillosis*. J Infect, 2018.
43. Maertens, J.A., et al., *The current management landscape: aspergillosis*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(suppl 2): p. ii23-ii29.
44. White, P.L., et al., *Aspergillus PCR: one step closer to standardization*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1231-40.

45. Arvanitis, M., et al., *PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(10): p. 3731-42.
46. White, P.L., et al., *Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(9): p. 2832-7.
47. Loeffler, J., et al., *Analytical Comparison of In Vitro-Spiked Human Serum and Plasma for PCR-Based Detection of Aspergillus fumigatus DNA: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(9): p. 2838-45.
48. Springer, J., et al., *Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of Aspergillus DNA in high-risk hematological patients*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(5): p. 1445-50.
49. Springer, J., et al., *Comparison of Performance Characteristics of Aspergillus PCR in Testing a Range of Blood-Based Samples in Accordance with International Methodological Recommendations*. J Clin Microbiol, 2016. **54**(3): p. 705-11.
50. Bassetti, M., M. Peghin, and A. Vena, *Challenges and Solution of Invasive Aspergillosis in Non-neutropenic Patients: A Review*. Infect Dis Ther, 2018. **7**(1): p. 17-27.
51. Imbert, S., et al., *Aspergillus PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(6): p. 562.e1-8.
52. Held, J., et al., *Comparison of a novel Aspergillus lateral-flow device and the Platelia(R) galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation*. Infection, 2013. **41**(6): p. 1163-9.
53. Eigl, S., et al., *Multicenter evaluation of a lateral-flow device test for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients*. Crit Care, 2015. **19**: p. 178.

54. de Heer, K., et al., *Electronic nose technology for detection of invasive pulmonary aspergillosis in prolonged chemotherapy-induced neutropenia: a proof-of-principle study*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(5): p. 1490-5.
55. Koo, S., et al., *A breath fungal secondary metabolite signature to diagnose invasive aspergillosis*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(12): p. 1733-40.
56. Domingo, M.P., et al., *Bis(methyl)gliotoxin proves to be a more stable and reliable marker for invasive aspergillosis than gliotoxin and suitable for use in diagnosis*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **73**(1): p. 57-64.
57. Vidal-Garcia, M., et al., *Clinical validity of bis(methylthio)gliotoxin for the diagnosis of invasive aspergillosis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016. **100**(5): p. 2327-34.
58. Vandewoude, K., et al., *Invasive aspergillosis in critically ill patients: analysis of risk factors for acquisition and mortality*. Acta Clin Belg, 2004. **59**(5): p. 251-7.
59. Blot, S.I., et al., *A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(1): p. 56-64.
60. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 801-10.
61. Dobias, R., et al., *Diagnostic value of serum galactomannan, (1-3)-beta-D-glucan, and Aspergillus fumigatus-specific IgA and IgG assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients*. Mycoses, 2018.
62. Pickering, J.W., et al., *Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(12): p. 5957-62.
63. Lai, C.C., et al., *Assessment of Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis*. J Microbiol Immunol Infect, 2007. **40**(2): p. 148-53.

-
64. Ku, N.S., et al., *Diagnostic value of the serum galactomannan assay for invasive aspergillosis: it is less useful in non-haematological patients*. Scand J Infect Dis, 2012. **44**(8): p. 600-4.
 65. Lin, P.C., et al., *[The diagnostic performance of galactomannan detection for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic hosts]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2016. **39**(12): p. 929-933.
 66. He, H., et al., *Value of consecutive galactomannan determinations for the diagnosis and prognosis of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill chronic obstructive pulmonary disease*. Med Mycol, 2011. **49**(4): p. 345-51.
 67. Marty, F.M. and S. Koo, *Role of (1-->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis*. Med Mycol, 2009. **47 Suppl 1**: p. S233-40.
 68. Metan, G., et al., *What should be the optimal cut-off of serum 1, 3-β-d-glucan for the detection of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies?* Scandinavian journal of infectious diseases, 2012. **44**(5): p. 330-336.
 69. Sulahian, A., et al., *Use and limits of (1-3)-beta-d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia Aspergillus), for diagnosis of invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(7): p. 2328-33.
 70. Lahmer, T., et al., *Comparison of Serum Galactomannan and 1,3-Beta-D-Glucan Determination for Early Detection of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients with Hematological Malignancies and Septic Shock*. Mycopathologia, 2016. **181**(7-8): p. 505-11.
 71. Lahmer, T., et al., *Comparison of 1,3-beta-d-glucan with galactomannan in serum and bronchoalveolar fluid for the detection of Aspergillus species in immunosuppressed mechanical ventilated critically ill patients*. J Crit Care, 2016. **36**: p. 259-264.

-
72. Levesque, E., et al., *Detection of (1,3)-beta-d-Glucan for the Diagnosis of Invasive Fungal Infection in Liver Transplant Recipients*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(4).
73. Mallatova, N., *[Mycological diagnosis of pulmonary Aspergillus infections with a focus on serological methods]*. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2017. **66**(4): p. 174-181.
74. Hachem, R.Y., et al., *Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for Aspergillus fumigatus infection in hematologic malignancy patients*. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(1): p. 129-33.
75. Racil, Z., et al., *[Detection of 1,3-beta-D glucan for diagnosis of invasive fungal infections in hematooncological patients: usefulness for screening of invasive mycosis and for confirmation of galactomannan positive results]*. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, 2009. **15**(2): p. 48-57.
76. Kappe, R., A. Schulze-Berge, and H.G. Sonntag, *Evaluation of eight antibody tests and one antigen test for the diagnosis of invasive aspergillosis*. *Mycoses*, 1996. **39**(1-2): p. 13-23.
77. Trof, R.J., et al., *Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients*. *Intensive Care Med*, 2007. **33**(10): p. 1694-703.
78. Delsuc, C., et al., *Putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with chronic obstructive pulmonary disease: a matched cohort study*. *Crit Care*, 2015. **19**: p. 421.
79. Cuiv, P.O., P. Clarke, and M. O'Connell, *Identification and characterization of an iron-regulated gene, chtA, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2006. **152**(Pt 4): p. 945-54.

-
80. Haas, H., *Iron - A Key Nexus in the Virulence of Aspergillus fumigatus*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 28.
 81. Haas, H., *Fungal siderophore metabolism with a focus on Aspergillus fumigatus*. Nat Prod Rep, 2014. **31**(10): p. 1266-76.
 82. Luptakova, D., et al., *Non-invasive and invasive diagnoses of aspergillosis in a rat model by mass spectrometry*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16523.
 83. Carroll, C.S., et al., *Detection of a Serum Siderophore by LC-MS/MS as a Potential Biomarker of Invasive Aspergillosis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151260.
 84. Garnacho-Montero, J., et al., *Isolation of Aspergillus spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome*. Crit Care, 2005. **9**(3): p. R191-9.
 85. Meersseman, W., et al., *Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(6): p. 621-5.

12 PUBLIKAČNÍ ČINNOST V PRŮBĚHU DSP

12.1 Publikace v časopisech s impakt faktorem

1. Hubka, V., S. Dobiašova, **R. Dobiaš**, and M. Kolařík. 2014. 'Microsporium aenigmaticum sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of tinea corporis', *Med Mycol*, 52: 387-96.
2. Lyskova, P., Hubka, V., Petricakova, A., **Dobias, R.**, Cmokova, A., & Kolarik, M. (2015). Equine Dermatophytosis due to *Trichophyton bullosum*, a Poorly Known Zoophilic Dermatophyte Masquerading as *T. verrucosum*. *Mycopathologia*, 180(5-6), 407-419.
3. Kocmanová I., Lysková P., Chrenkova V., Olišarová P., **Dobiáš R.**, Janouškovcová H., Soukupová H., Mallátová N., Svobodová L., Hamal P., Skružná M., Bartoníková N, Nozokomiální kandidémie v České republice v letech 2012–2015: výsledky mikrobiologické multicentrické studie *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2018, 67, (1), 3-10
4. Lyskova, P., Hubka, V., Svobodova, L., Barrs, V., Dhand, N. K., T. Yaguchi, T. Matsuzawa, Y. Horie, M. Kolarik, **R. Dobias**, and P. Hamal (2018). Antifungal susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* complex: comparison of two in vitro methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-01927.
5. **Dobias, R.**, Jaworska, P., Tomaskova, H., Kanova, M., Lyskova, P., Vrba, Z., ... & Raska, M. (2018). Diagnostic value of serum galactomannan,(1-3)- β -D-glucan, and *Aspergillus fumigatus*-specific IgA and IgG assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients. *Mycoses*.
6. **Dobias, R.**, M. Filip, K. Vragova, D. Dolinska, P. Zavodna, A. Dujka, P. Linzer, P. Jurek, B. Studena, E. Cerna, J. Mrazek, P. Jaworska, M. Kantorova, P. Lyskova, E. Krejci, and

V. Hubka. 2018. 'Successful surgical excision of cerebral abscess caused by *Fonsecaea monophora* in an immunocompetent patient and review of literature', *Folia Microbiol (Praha)*.

12.2 Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

1. Hubka V, Větrovský T, Dobiasova S, Skorepova M, Lyskova P, Mencil K, Mallatova N, Janouškovcova H, Hanzlickova J, **Dobias R**, Čmoková A, Stará J, Hamal P, Svobodová L, Kolařík M. Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie. *Československá dermatologie* 2014;89(4):167-174.
2. Hubka, V., Čmoková, A., Skořepová, M., Mallátová, N., Dobiášová, S., Lysková, P., **Dobiáš R.**, ... & Kolařík, M. (2014). Současný vývoj v taxonomii dermatofytů a doporučení pro pojmenovávání klinicky významných druhů. *Čes-slov Derm*, 89, 151-165.
3. **Dobiáš R**, Kantorová M, Jaworská P, Hamal P, Mrázek J – Využití PCR-HRMA při přímé detekci a identifikaci původců dermatofytóz z klinických vzorků. *Československá dermatologie* 2018; 93(6): 259-265
4. Lux J, **Dobiáš R**, Scholtz V., Khun J., Soušková H., Mrázková E., Julák J. - Možnosti terapie onychomykózy nízkoteplotním plazmatem. *Čes-slov Derm*, 93 (6), 266-271.
5. Lysková P., **Dobiáš R.**, Kuklová I., Mallátová N., Čmoková A., Kolařík M., Vojtíšková V., Karpetová L., Hubka V. (2018) Pět případů lidských dermatofytóz vyvolaným zoofiliím druhem *Trichophyton erinacei* přeneseným z ježků. *Čes-slov Derm*, 93 (6), 237-243.
6. Hubka V., Čmoková A. , Peano A., Větrovský T., **Dobiáš R.**, Mallátová N., Lysková P., Mencil K., Janouškovcova H., Stará J., Kuklová I., Doležalová J., Hamal P. Svobodová L.,

Koubková J., Kolařík M. (2018) Zoonotické dermatomykózy: klinický obraz, diagnostika, etiologie, léčba a epidemiologická situace u nás. *Čes-slov Derm*, 93 (6): 208-236.

12.3 Přednášky a postery s abstraktem

1. **DOBIÁŠ, Radim**, Pavel SCHWARZ, Tana RYSKOVA, Jakub MRAZEK, Michaela KANTOROVA a Petr HAMAL. Maxillary sinus infection due to *Schizophyllum commune*. *Mycoses* [online]. 2015, **58**: 51-226 [cit. 2016-01-05]. DOI: 10.1111/myc.12372. ISSN 09337407. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12372>
2. **DOBIÁŠ, Radim**, Ivana JANÍČKOVÁ, Zbyněk VRBA, Pavlína LYSKOVÁ, Petr HAMAL. Pohled na mykotické infekce (*Aspergillus sp.*, *Cryptococcus neoformans*) s využitím kombinací moderních diagnostických metod. In: *Časopis Slovenskej spoločnosti klinickej mikrobiológie, Slovenskej lekárskej spoločnosti a Sekcie klinickej mikrobiológie Slovenskej lekárskej komory ročník XV. – program a zborník abstraktov*. Nový Smokovec, 2015, s. 20. ISSN 1338-645X a ISSN 1335-8219.
3. **DOBIÁŠ, Radim**, Zbyněk VRBA, Pavlína LYSKOVÁ, Milan RAŠKA, Petr HAMAL. Diagnostický význam protilátek IgA a IgG specifických k antigenům *Aspergillus fumigatus* při invazivní plicní aspergilóze u non-neutropenických pacientů. In: *Programový sborník kongresu klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie – KMINE 2015*. Špindlerův Mlýn, 2015, s. 57. ISBN 978-80-906155-3-3.
4. **DOBIÁŠ, Radim**, Táňa RYŠKOVÁ. Sledování výskytu antropofilních a zoofilních dermatofyt v populaci Moravskoslezského kraje za období 2010-2014. In: *Slezské dny preventivní medicíny 2015 – Sborník abstrakt a prezentací konference*. Darkov-Karviná, 2015, ISBN 978-80-260-7796-1

5. **DOBIÁŠ, Radim.** Diagnostické možnosti invazivních procesů mykotického původu (Aspergilózy, Kandidózy, Mukormykózy, Kryptokokózy a Pneumocystové pneumonie). In: *Pediatric dneš 4 – Pediatrický den*. Ostrava, 2015, s. 28. ISBN 978-80-906002-7-0.
6. **DOBIÁŠ, Radim, NĚMEČEK O., MRÁZEK J., KANTOROVÁ M., JAWORSKÁ P., LYSKOVÁ P., HUBKA V., KOLAŘÍK M., HAMAL P.** *Scedosporium apiospermum* jako původce chronické maxilární sinusitidy. In: *XX. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech*. 2016. ISBN 978-80-260-9741-9.
7. **DOBIÁŠ, Radim, SEKANINA Z., KŘIŽÁKOVÁ L., MASLÍKOVÁ A., JAWORSKÁ P., LYSKOVÁ P., HAMAL P.** Přínos moderních sérologických metod v diagnostice kandidových infekcí u hospitalizovaných pacientů. In: *XX. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech*. 2016. ISBN 978-80-260-9741-9.
8. LYSKOVÁ, Pavlína, KUBÁNEK M., HUBKA V., STICOVÁ E., VOSKA L., KAUTZNEROVÁ D, KOLAŘÍK M., HAMAL P., **DOBIÁŠ R.**, KOČKOVÁ I., LEDVINKOVÁ P., SLOBODOVÁ J., VAŠÁKOVÁ M. Případ vzácné mykotické infekce: diseminovaná alternarióza. In: *XX. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech*. 2016. ISBN 978-80-260-9741-9.
9. **DOBIÁŠ, Radim, JAWORSKÁ P., RAŠKA M, HAMAL P.** Praktický přínos měření afinity/avidity specifických IgG *Aspergillus fumigatus* u non-neutropenických pacientů. In: 27. Pečenkovy epidemiologické dny. 2016. ISBN 978-80-87735-26-8
10. **DOBIÁŠ, Radim, Jaworská P., Mrázek J., Kantorová M.** Mykotické infekce paranasálních dutin. In: *Mykologické listy*. 135. Praha, 2016, s. 69-72. ISSN 12135887.
11. LYSKOVÁ, Pavlína, Kubánek M., Hubka V., Sticová E., Voska L., Kautznerová D., Kolařík M., Hamal P., **Dobiáš R.**, Kočková I., Šramková B., Cimková E., Vašáková M. Phaeohyfyomykóza – diseminovaná alternarióza (kazuistika). In: *Mykologické listy*. 135. Praha, 2016, s. 87-89. ISSN 12135887.

12. **DOBIAS, R.**, JAWORSKA, P., MRAZEK, J., KANTOROVA, M., LYSKOVA, P., and HAMAL, P.
Use of PCR for direct detection of rDNA of agents causing dermatomycosis from samples of the skin and its adnexa. In *Mycoses*, 2017, s. 205-206.
13. LYSKOVA, P., HUBKA, V., SVOBODOVA, L., BARRS, V., YAGUCHI, T., MATSUZAWA, T., HORIE, Y., KOLARIK, M., DUDOVA, Z., **DOBIAS, R.**, and HAMAL, P. Antifungal susceptibility patterns of opportunistic pathogens from the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*) determined by the EUCAST E. DEF 9.3 method and Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel. In *Mycoses*, 2017, s. 71-71.
14. **DOBIÁŠ, R.**, JAWORSKÁ, P., MRÁZEK, J., KANTOROVÁ, M., LYSKOVÁ, P., HAMAL, P., 2017. Využití PCR při přímé detekci rDNA původců dermatomykóz ze vzorků kůže a jejích adnex. In: *VI. Kongres mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie, KMINE 2017*, Praha 25. – 27. října 2017: konferenční centrum CITY, Sborník abstrakt
15. **DOBIÁŠ, R.**, RICHTEROVÁ, L., KULICHOVÁ, J., JAWORSKÁ, P., MRÁZEK, J., KANTOROVÁ, M., 2017. Histoplazmóza u pacienta s AIDS – Kazuistika. In: *XXV. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny*, Ostrava 23. – 25. listopadu 2017: hotel Imperial, Sborník abstrakt ISBN 978-80-906887-0-4, s. 52
16. **DOBIÁŠ, R.**, 2017. Mykotické infekce nohou – pohled klinického mykologa. In: *8. Konference zdravotníků – Diabetologický a Podiatrický den*, Ostrava 22. dubna 2017: apartmánový dům Landek, Sborník abstrakt
17. JAWORSKÁ, P., KANTOROVÁ, M., **DOBIÁŠ, R.**, MRÁZEK, J., 2017. Využití PCR při přímé detekci rDNA původců dermatomykóz ze vzorků kůže a jejích adnex. In: *XXV. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny*, Ostrava 23. – 25. listopadu 2017: hotel Imperial, Sborník abstrakt ISBN 978-80-906887-0-4, s. 58

13 SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A ZKRATEK

13.1 Seznam tabulek

Tabulka 1: Srovnání diagnostických kritérií AspICU a EORTC / MSG pro diagnostiku invazivní plicní aspergilózy (IPA)

Tabulka 2: Klinická charakteristika 87 pacientů testovaných kvůli podezření na IPA

Tabulka 3: Klinická charakteristika 8 pacientů s potvrzenou, pravděpodobnou IPA (EORTC / MSG nebo AspICU) a non-IPA

Tabulka 4: Výsledky testování galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* jednotlivě a v kombinacích při rozpoznávání IPA ve skupině všech studovaných pacientů

Tabulka 5: Výsledky testování galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* jednotlivě a v kombinacích při rozpoznání IPA v podskupině pacientů z jednotek intenzivní péče

Tabulka 6: Výsledky testování galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgA a IgG proti *A. fumigatus* jednotlivě a v kombinacích při rozpoznání IPA v podskupině pacientů z ostatních nemocničních oddělení

Tabulka 7: Prognostický význam galaktomananu, (1,3)- β -D-glukanu a specifických IgAG z hlediska IPA a mortality

Zdrojová tabulka: Soubor všech 87 studovaných pacientů testovaných na galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan a specifické IgA a IgG proti *Aspergillus fumigatus*

13.2 Seznam obrázků

Obrázek 1: Mikroskopie a kultivace z bronchoalveolární laváže

Obrázek 2: Složení buněčné stěny *Apergillus fumigatus* - upraveno podle schématu buněčné stěny hub Bennet et al. 2006 [23]

Obrázek 3: Zdravotnická pracoviště (JIP + ostatní nemocniční oddělení) participující na této studii. Tato zdravotnická zařízení se podílela na primárním odběru všech vzorků suspektních pacientů na invazivní plicní aspergilózu zařazených do této studie.

Obrázek 4: Rozložení základních diagnóz a rizikových faktorů v populaci pacientů s IPA

Obrázek 5: Rozložení základních diagnóz v populaci pacientů s Ne-maligním plicním onemocněním a IPA

Obrázek 6: Průkaz TAFC v moči pacienta

Obrázek 7: Soubor pacientů ve studii rozdělený podle koncentrace triacetylfusarininu C v moči a diagnostických kritérií IPA

Obrázek 8: Kinetika triacetylfusarininu C v průběhu léčby hematologického pacienta s pravděpodobnou IPA

Obrázek 9: Srovnání senzitivity, specifity, PPH a NPH testů GM, BG a IgAG ve skupině všichni pacienti

Obrázek 10: Srovnání senzitivity, specifity, PPH a NPH testů GM + BG ve skupině všichni pacienti, JIP a ONO

Obrázek 11: Srovnání senzitivity, specifity, PPH a NPH testů GM + IgAG a BG + IgAG ve skupině všichni pacienti, JIP a ONO

Obrázek 12: Srovnání senzitivity, specifity, PPH a NPH testů metodou hodnocení výsledků „alespoň jeden test pozitivní“ GM/BG/IgAG ve skupině všichni pacienti, JIP a ONO

Obrázek 13: U pacientů s hematologickou malignitou v neutropenii a pravděpodobnou IPA dosahoval rozsah koncentrace TAFC v moči daleko nižších hodnot (3100 – 12600 pg/ml) než v případě pacientů s pravděpodobnou IPA (AspICU) bez neutropenie a hematologického onemocnění (400 – 100 000 pg/ml)

13.3 Seznam zkratek

ARDS: syndrom akutního respiračního selhání

AspICU: A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients – klinický algoritmus pro diagnostiku invazivní plicní aspergilózy u kriticky nemocných pacientů

AUC: „area under the curve“ – oblast pod křivkou

BAL: bronchoalveolární laváž

BG: (1,3)- β -D-glukan

CE: kapilární elektroforéza

CI: interval spolehlivosti

EIA: enzymatická imuno esej

EORTC / MSG: 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 – Definice invazivního houbového onemocnění evropské organizace pro výzkum a léčbu rakoviny / studijní skupiny, spolupracující skupiny pro invazivní houbové infekce a národního institutu pro alergie a mykotické infekce

ETA: endotracheální aspirát

GM: galaktomanan

HPLC / ESI-FTICR: Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací a zařízením s iontovou cyklotronovou rezonancí Fourier-transform

CHOPN: chronická obstruktivní plicní nemoc

IA: invazivní aspergilóza

IgAG: *Aspergillus fumigatus* specifické IgA a IgG

IPA: invazivní plicní aspergilóza

IPN: intersticiální plicní nemoc

JIP: jednotka intenzivní péče

LFD: „Lateral Flow Device“ metoda detekce glykoproteinového antigenu v séru nebo BAL pacientů

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption/ionization v kombinaci s detektorem doby letu – time of flight

MDS: myelodysplastický syndrom

MS: hmotnostní spektrometrie

NPH: negativní prediktivní hodnota

ONO: ostatní nemocniční oddělení

PCR: polymerázová řetězová reakce

PET: pozitronová emisní tomografie

PPH: pozitivní prediktivní hodnota

RF: další rizikové faktory

ROC: „reciever operating characteristic“

SIT: transportní dopravci sideroforu

TAFC: triacetylfusarinin C

ZD: základní onemocnění

Zdrojová tabulka: Soubor všech 87 studovaných pacientů testovaných na galaktomanan, (1,3)- β -D-glukan a specifické IgA a IgG proti *Aspergillus fumigatus*

Č.	P.	Věk		Rizikový	IgA	IgG	GM	BDG	Úmrtí				
		(r)	Oddělení ZD a RF										
		AspICU	faktor IPA	Vzorek*	Rod	Druh	(IP \geq 1.2)	(IP \geq 1.2)	(IP \geq 0.5)	(\geq 80pg/ml)			
1	Ž	41	JIP	Rhabdomyolýza	potvrzená	Steroidy	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.8	4.15	6.18	523	ano
2	Ž	75	ONO	MDS	potvrzená	Steroidy	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.15	8.412	0.717	179	Ne
3	M	65	ONO	CHOPN	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.08	2.258	1.135	523	Ano
4	M	71	ONO	CHOPN	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.05	2.63	1.019	113	Ne
5	Ž	22	ONO	Anaplastický lymfom	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.42	4.38	0.52	523	Ne
6	M	70	ONO	Toxikománie	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6.23	8.4	0.208	192	Ne
7	M	50	ONO	CHOPN	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.4	3.49	0.169	0	Ne
8	M	60	ONO	CHOPN	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus niger</i>	1.73	1.35	5.327	268	Ne
9	M	67	ONO	CHOPN	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.42	5.14	0.35	366	Ne
10	M	66	ONO	Tumor	potvrzená	-	Tkáň	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.39	3.32	4.28	523	Ano
11	M	58	JIP	IPN	pravděpod.	-	BAL	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.66	0.89	0.19	0	Ano

12	M	47	JIP	-	pravděpod.	Steroidy	BAL	Aspergillus	fumigatus	0.741	0.259	0.51	107	Ne
13	M	71	JIP	-	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	1.31	2.177	0.25	381	Ne
14	M	66	JIP	CHOPN	pravděpod.	Steroidy	BAL	Aspergillus	fumigatus	1.1	1.2	0.25	206	Ano
15	M	75	JIP	-	pravděpod.	Steroidy	BAL	Aspergillus	fumigatus	0.45	0.515	5.1	523	Ne
16	M	62	ONO	CHOPN	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	2.76	1.46	0.156	128	Ne
17	M	46	ONO	Tumor	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	1.53	3.55	1.014	82	Ne
18	M	64	ONO	IPN	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	5.86	1.63	0.24	110	Ne
19	M	82	ONO	IPN	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	1.28	2.85	0.16	225	Ano
20	Ž	57	ONO	IPN	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	1.564	6.515	0.17	82	Ne
21	M	42	JIP	TPL jater	pravděpod.	Steroid. IST	BAL	Aspergillus	fumigatus	10.8	7.65	0.3	523	Ne
22	Ž	61	ONO	TBC	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	1.29	1.732	0.89	519	Ne
23	M	79	ONO	CHOPN	pravděpod.	-	BAL	Aspergillus	fumigatus	0.75	1.16	0.38	523	Ne
24	Ž	67	JIP	Legionářská nemoc	pravděpod.	Steroidy	ETA	Aspergillus	fumigatus	0.32	0.33	0.81	102	Ne
25	M	55	JIP	Bronchopneumonie	pravděpod.	Steroidy	ETA	Aspergillus	fumigatus	0.235	0.472	3.38	213	Ano
26	Ž	41	JIP	-	pravděpod.	Steroidy	ETA	Aspergillus	fumigatus	0.383	0.695	0.4	217	Ne

27	Ž	63	JIP	-	pravděpod.	-	ETA	Aspergillus	fumigatus	8.22	8.11	0.5	350	Ne
28	Ž	47	JIP	-	pravděpod.	-	ETA	Aspergillus	fumigatus	5.11	1.5	0.573	523	Ne
29	M	44	JIP	-	pravděpod.	Steroidy	ETA	Aspergillus	fumigatus	0.73	0.77	2.572	523	Ne
30	Ž	18	ONO	Cystická fibróza	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	3.79	2.99	0.27	452	Ne
31	Ž	65	ONO	-	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	4.15	3	0.5	0	Ne
32	Ž	62	ONO	IPN	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	1.663	7.452	0.119	100	Ne
33	Ž	44	ONO	CHOPN	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	2.27	3.65	0.113	115	Ne
34	M	38	ONO	Intracraniální absces	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	1.86	2.86	0.733	523	Ne
35	M	40	ONO	Tumor	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	4.4	2.9	9.8	105	Ne
36	Ž	32	ONO	CHOPN	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus niger		7	4.7	0.131	35	Ne
37	M	61	ONO	CHOPN	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	1.625	1.51	0.163	40	Ne
38	M	65	ONO	CHOPN	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	1.58	5.97	0.2	0	Ne
39	Ž	35	ONO	IPN	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	6.37	4.41	1.43	250	Ne
40	M	68	ONO	Bronchopneumonie	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	11.17	1.81	0.12	350	Ne
41	Ž	54	ONO	CHOPN	pravděpod.	-	Sputum	Aspergillus	fumigatus	3.79	1.52	0.45	0	Ne

42	M	37	ONO	-	non-IPA	-	BAL	Aspergillus fumigatus	0.52	0.34	0.12	0	Ne
43	M	46	ONO	Bronchopneumonie	non-IPA	-	BAL	Aspergillus flavus	0.5	0.93	0.22	265	Ne
44	Ž	39	ONO	Emfyzém	non-IPA	-	BAL	Aspergillus fumigatus	0.52	1.81	0.133	0	Ne
45	M	52	ONO	-	non-IPA	-	BS	Aspergillus fumigatus	1.04	0.68	0.643	64	Ne
46	Ž	46	ONO	IPN	non-IPA	-	BS	Aspergillus fumigatus	0.57	0.64	0.17	12	Ne
47	M	48	ONO	-	non-IPA	-	BS	Aspergillus fumigatus	2.615	0.988	0.207	0	Ne
48	M	91	JIP	Tumor	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.42	0.44	0.153	523	Ano
49	Ž	41	JIP	ARDS	non-IPA	Steroidy	ETA	Aspergillus fumigatus	0.7	0.21	0.087	139	Ne
50	M	66	JIP	Hepatorenál. syndrom	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.95	0.34	0.14	0	Ne
51	Ž	53	JIP	CHOPN	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.37	0.92	0.15	214	Ne
52	Ž	65	JIP	Kardiovaskul. onem.	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.2	1	0.208	0	Ne
53	M	66	JIP	-	non-IPA	Steroidy	ETA	Aspergillus fumigatus	1.04	1.01	0.16	13	Ne
54	Ž	44	JIP	CHOPN	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.144	0.483	0.332	226	Ne
55	M	64	JIP	-	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.37	0.54	0.75	523	Ne
56	M	64	JIP	-	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.46	0.992	0.16	13	Ne

57	M	68	JIP	Cirhóza jater	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.64	0.716	0.21	523	Ne
58	M	78	JIP	-	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	1.14	0.47	0.22	188	Ne
59	M	54	JIP	-	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.367	0.154	0.174	79	Ne
60	Ž	40	JIP	Kardiovaskul. Onem.	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.418	1.349	0.17	0	Ne
61	M	62	JIP	Bronchopneumonie	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.58	0.8	0.094	0	Ne
62	M	74	JIP	-	non-IPA	-	ETA	Aspergillus fumigatus	0.24	0.59	0.285	0	Ne
63	Ž	81	ONO	Bronchitída	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	2.34	0.83	0.23	0	Ne
64	Ž	54	ONO	Astma	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.73	1.94	0.17	0	Ne
65	Ž	56	ONO	Diabetes	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.496	0.601	0.175	0	Ne
66	Ž	41	ONO	Tumor	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.35	0.38	0.147	0	Ne
67	M	46	ONO	Kardiovaskul. Onem.	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus nidulans	0.21	0.27	0.16	0	Ne
68	M	80	ONO	HIV	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	1.96	1.76	0.12	0	Ne
69	Ž	72	ONO	Astma	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus niger	0.31	0.68	0.14	0	Ne
70	Ž	86	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.218	0.518	8.2	523	Ne
71	M	65	ONO	Astma	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.368	0.264	0.124	0	Ne

72	Ž	56	ONO	Bronchopneumonie	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.29	0.75	0.166	0	Ne
73	Ž	80	ONO	Bronchiektázie	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.4	2.19	0.437	71	Ne
74	Ž	42	ONO	Bronchitída	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	1.484	1.619	0.137	0	Ne
75	M	30	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.58	1.04	0.182	0	Ne
76	M	56	ONO	Tumor	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.54	0.51	0.172	91	Ne
77	Ž	40	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.42	3.43	0.182	111	Ne
78	Ž	45	ONO	Astma	non-IPA	Steroidy	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.29	0.42	0.138	0	Ne
79	M	48	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.73	3.37	0.31	41	Ne
80	M	62	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus niger	0.65	1.59	0.156	30	Ne
81	Ž	43	ONO	CHOPN	non-IPA	Steroidy	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.55	1.98	1.441	65	Ne
82	M	34	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.264	0.784	0.33	25	Ne
83	Ž	56	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.23	0.37	0.135	25	Ne
84	M	81	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.23	0.525	0.17	15	Ne
85	Ž	47	ONO	Astma	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.35	0.72	0.323	0	Ne
86	M	67	ONO	-	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.85	1.432	0.11	301	Ne

87	Ž	53	ONO	CHOPN	non-IPA	-	Sputum	Aspergillus fumigatus	0.18	0.29	0.148	75	Ne
----	---	----	-----	-------	---------	---	--------	-----------------------	------	------	-------	----	----

*Vzorek, který byl mikroskopicky a kulturačně pozitivní na *Aspergillus* spp.

ZD a RF: základní onemocnění a "další rizikové" faktory[7], AspICU 2012: klinický algoritmus pro diagnostiku invazivní plicní aspergilózy kriticky nemocných pacientů[59], IPA: invazivní plicní aspergilóza, BG: (1, 3)- β -D-glukan, GM: galaktomanan, IgA, IgG: *Aspergillus fumigatus* specifické protilátky, IP: index positivity, CHOPN: chronická obstruktivní plicní nemoc, MDS: myelodysplastický syndrom, IPN: intersticiální plicní nemoc, Steroidy: Terapie glukokortikosteroidy equivalent prednisonu ≥ 20 mg/den, TPL jater: transplantace jater, IST: imunosupresivní terapie, BAL: bronchoalveolární laváž, ETA: endotracheální aspirát, JIP: jednotka intenzivní péče, ONO: ostatní nemocniční oddělení