

Laboratoriediagnostik och farmakologisk monitorering av invasiva svampinfektioner i Sverige

Ett dokument från Referensgruppen för
AntiMykotika (RAM)

Förord

Ambitionen med detta dokument är att redovisa de mikrobiologiska metoder för att diagnostisera invasiv svampsjukdom som finns tillgängliga i Sverige samt redogöra för indikationer och tolkning av koncentrationsbestämning av antimykotiska läkemedel.

Dokumentet är skrivet gemensamt av medlemmarna i Referensgruppen för AntiMykotika (RAM) som är en oberoende expertgrupp vars ledamöter utses av Svenska Läkaresällskapets nämnd efter nominering av sektioner för klinisk mikrobiologi (2), infektionssjukdomar (2), pediatrik (1), hematologi (1) och läkemedelslära (1). RAM:s huvuduppgifter är att verka för en rationell användning av antimykotiska läkemedel vid invasiv svampsjukdom genom att sprida information om antimykotiska läkemedel och kontinuerligt utveckla och uppdatera rekommendationer för användandet av antimykotiska läkemedel vid invasiv svampsjukdom. En viktig del i detta arbete är att verka för att antimykotiska läkemedel ges på rätt indikation. Invasiva svampinfektioner är generellt svåra att diagnostisera vilket riskerar att leda till överanvändning i form av så kallad empirisk svampbehandling. Spridandet av information om de i Sverige tillgängliga mikrobiologiska metoderna och i vilka sammanhang de kan användas är därför viktigt. Dokumentet innehåller tre olika delar: 1) Översikt över de tillgängliga diagnostiska metodernas bakgrund, styrkor, svagheter samt tolkning av resultatet, 2) Indikation för provtagning inom intensivvård och vid uttalad immunsuppression samt tolkning av resultaten och 3) Indikationer för koncentrationsbestämning av antimykotiska läkemedel samt tolkning av resultaten. Dokumentet avhandlar i första hand diagnostik för vuxna men principerna gäller i allmänhet även inom pediatriken.

Innehållet baseras huvudsakligen på den vetenskapliga litteraturen men avsikten med dokumentet har inte varit att ge en heltäckande litteraturgenomgång utan snarare en syntes av litteraturen och RAM:s egna erfarenheter. På så sätt hoppas vi att dokumentet blir användbart i den kliniska vardagen och kan vara till hjälp vid ställningstagande till insättning eller förändringar av antimykotisk behandling. Ambitionen är att återkomma med en uppdaterad version under andra halvåret 2022.

Förutom medlemmarna i RAM så har Helena Hammarström, infektionsläkare och klinisk mikrobiolog på Sahlgrenska Universitetssjukhuset, medverkat i avsnitten om betaglukan samt lämnat synpunkter på övrig text, och Silvia Botero och Robert Dyrdak, kliniska mikrobiologer på Karolinska Universitetssjukhuset, skrivit avsnitten om Pneumocystis-diagnostik.

För RAM 210624,

Ola Blennow (Sektionen för Infektionssjukdomar), Honar Cherif (Sektionen för Hematologi), Erja Chryssanthou (Sektionen för Klinisk Mikrobiologi), Erik Eliasson (Sektionen för Läkemedelslära), Nahid Kondori (Sektionen för Klinisk Mikrobiologi) och Jan Sjölin (Sektionen för Infektionssjukdomar)

1	Mikrobiologisk indelning av svampriket.....	7
2	Mikrobiologiska metoder tillgängliga i Sverige	8
2.1	Mikroskopi.....	8
2.1.1	Metod	8
2.1.2	Provmaterial	8
2.1.3	Prestanda.....	8
2.1.4	Indikation för provtagning.....	8
2.1.5	Svarsrutiner och tolkning	8
2.2	Odling	9
2.2.1	Metod	9
2.2.2	Provmaterial	10
2.2.3	Prestanda.....	10
2.2.4	Indikation för provtagning.....	10
2.2.5	Svarsrutiner och tolkning	10
2.2.6	Referenser	10
2.3	Galaktomannan	11
2.3.1	Metod	11
2.3.2	Provmaterial	11
2.3.3	Prestanda.....	11
2.3.4	Indikation för provtagning.....	12
2.3.5	Svarsrutiner och tolkning	12
2.3.6	Referenser	13
2.4	1,3-β-D-glukan (BDG)	14
2.4.1	Metod	14
2.4.2	Provmaterial	14
2.4.3	Prestanda.....	14
2.4.3.1	Sensitivitet	15
2.4.3.2	Specificitet	15
2.4.4	Indikation för provtagning.....	16
2.4.5	Svarsrutiner och tolkning	16
2.4.6	Referenser	17
2.5	PCR.....	17
2.5.1	Aspergillus-DNA.....	17
2.5.1.1	Metod.....	17

2.5.1.2	Provmaterial	18
2.5.1.3	Prestanda.....	18
2.5.1.4	Indikation för provtagning.....	18
2.5.1.5	Svarsrutiner och tolkning	18
2.5.1.6	Referenser	19
2.5.2	Candida DNA.....	19
2.5.2.1	Metod	19
2.5.2.2	Provmaterial och svarsrutin	19
2.5.2.3	Prestanda.....	19
2.5.2.4	Indikation för provtagning.....	20
2.5.2.5	Svarsrutiner och tolkning	20
2.5.2.6	Referenser	20
2.5.3	Kommersiell Candida-PCR: T2Candida	21
2.5.3.1	Metod	21
2.5.3.2	Provmaterial och svarsrutin	21
2.5.3.3	Prestanda.....	21
2.5.3.4	Indikation för provtagning.....	21
2.5.3.5	Svarsrutiner och tolkning	22
2.5.3.6	Referenser	22
2.5.4	Sekvensering svamp (ITS)	22
2.5.5	Metod	22
2.5.5.1	Provmaterial	22
2.5.5.2	Prestanda.....	23
2.5.5.3	Indikation för provtagning.....	23
2.5.5.4	Svarsrutiner och tolkning	23
2.5.5.5	Referenser	23
2.6	Pneumocystisdiagnostik	23
2.6.1	Immunoflouescens (IF).....	23
2.6.1.1	Metod	23
2.6.1.2	Provmaterial	24
2.6.1.3	Prestanda.....	24
2.6.1.4	Indikation för provtagning.....	24
2.6.1.5	Svarsrutin och tolkning.....	24
2.6.2	Pneumocystis: Realtids-PCR (qPCR).	25

2.6.2.1	Metod	25
2.6.2.2	Provmaterial	25
2.6.2.3	Prestanda.....	26
2.6.2.4	Indikation för provtagning.....	26
2.6.2.5	Svarsrutiner och tolkning	26
2.6.3	Referenser	27
3	Provtagning/diagnostik på IVA och efter kirurgi	29
3.1	Screening/övervakning.....	29
3.2	Diagnostik av candidainfektioner.....	29
3.2.1	Odling och mikroskopi.....	29
3.2.2	Beta-D-glukan	30
3.2.3	Övriga metoder	31
3.2.3.1	PCR.....	31
3.2.3.2	T2 Candida	31
3.2.3.3	Antigen- antikroppsanalys.....	31
3.3	Diagnostik av aspergillusinfektioner	31
3.3.1	Odling och mikroskopi.....	32
3.3.2	Galaktomannan/aspergillusantigen	32
3.3.3	Beta-D-glukan	32
3.3.4	Övriga metoder	32
3.3.4.1	PCR.....	32
3.3.4.2	Antikroppsanalys	32
3.4	Uppföljning av behandling	33
3.5	Referenser	34
4	Provtagning på hematologen	37
4.1	Screening/övervakning.....	37
4.1.1	Galaktomannan (GM).....	38
4.1.2	Betaglukan.....	38
4.1.3	Aspergillus-PCR.....	38
4.2	Diagnostik av Candidainfektioner	39
4.2.1	Odling	39
4.2.2	Betaglukan.....	39
4.2.3	PCR.....	40
4.2.3.1	Candida PCR.....	40

4.2.3.2	T2Candida.....	40
4.3	Diagnostik av aspergillusinfektion.....	40
4.3.1	Mikroskopi/odling.....	40
4.3.2	Galaktomannan.....	40
4.3.2.1	Galaktomannan i serum.....	40
4.3.2.2	Galaktomannan i bronkoalveolärt lavage (BAL).....	41
4.3.2.3	Galaktomannan i cerebrospinalvätska (CSV).....	41
4.3.3	Betaglukan.....	42
4.3.4	PCR.....	42
4.4	Mögelsvampsinfektioner andra än aspergillus.....	42
4.4.1	Sekvensering svamp (ITS).....	42
4.4.2	Pneumocystis.....	43
4.4.2.1	PCR och immunofluorescens.....	43
4.4.2.2	Betaglukan.....	44
4.5	Uppföljning av behandling.....	44
4.5.1	Mikroskopi/odling.....	44
4.5.2	Galaktomannan.....	44
4.5.3	Betaglukan.....	44
4.6	Referenser.....	45
5	Koncentrationsbestämning av antimykotika.....	47
5.1	Inledning.....	47
5.2	Flucytosin.....	47
5.3	Amfotericin B.....	48
5.4	Triazol (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, isavukonazol).....	48
5.4.1	Flukonazol.....	48
5.4.2	Itrakonazol.....	49
5.4.3	Vorikonazol.....	50
5.4.4	Posakonazol.....	51
5.4.5	Isavukonazol.....	52
5.5	Trimetoprim-sulfametoxazol.....	53
5.6	Echinocandiner (casprofungin, micafungin, anidulafungin).....	53
5.7	Sammanfattning.....	53
5.8	Tabell 1. Indikationer för koncentrationsbestämning av antimykotika.....	54
5.9	Referenser.....	55

1 Mikrobiologisk indelning av svampriket

Inom klinisk mykologi delas svamparna i jästsvampar, trådsvampar och dimorfa svampar. Jästsvampar är encelliga organismer som delar sig med knoppning och dessutom kan många arter även bilda pseudohyfer och/eller äkta hyfer (trådar). Trådsvampar växer ut som hyfer och bildar mycel. I gruppen trådsvampar ingår mögel och dermatofyter. Dimorfa svampar har jästform vid kroppstemperatur men växer som trådsvampar i naturen. De kliniskt viktiga dimorfa svamparna förekommer endemiskt i vissa geografiska platser.

Jästsvampar	Trådsvampar	Dimorfa svampar
<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>C. posadasii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>Blastomyces dermatiditis</i>
<i>Trichosporon</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Rhodotorula</i> spp.	Mucorales: <i>Rhizopus</i> spp, <i>Rhizomucor</i> spp. <i>Mucor</i> spp.	<i>Talaromyces marneffeii</i>
<i>Malassezia</i> spp.	Dermatofyter: <i>Trichophyton</i> spp. <i>Microsporum</i> spp.	<i>Sporothrix</i> spp.

2 Mikrobiologiska metoder tillgängliga i Sverige

2.1 Mikroskopi

2.1.1 Metod

Mikroskopi från kliniska prov kan ge värdefull information om vilken typ av svampinfektion patienten har. Mikroskopifynd kan bestå av jästceller och/eller jästhyfer vid *Candida*- och andra jästsvampinfektioner, septerade hyfer vid trådsvampinfektioner ex. *Aspergillus* och osepterade hyfer vid infektioner orsakade av Mucorales (zygomyceter). Endemiska dimorfa svampar har specifika strukturer som kan vara diagnostiska vid positivt mikroskopifynd, exempelvis små intracellulära *Histoplasma* jästceller, *Coccidioides sferulae*, stora *Blastomyces* jästceller med bredknoppning och *Paracoccidioides* "pilot wheel" jästceller.

Kliniskt provmaterial överförs till objektglaset, en droppe Blankophor eller Calcofluor white appliceras och täckglas läggs på. Preparatet studeras i fluorecensmikroskop med 250-400 × förstoring.

2.1.2 Provmaterial

Nedre luftvägsprov (bronkoalveolärt lavage (BAL), bronksekret, sputum, trakealsekret), sinusaspirat, normalt sterila vätskor (till exempel likvor, perikardvätska, pleuravätska), vävnadsprov.

2.1.3 Prestanda

Mikroskopi är en snabbmetod och positiva fynd kan vara till hjälp i valet av antimykotika vid svampinfektioner som kräver olika medel för behandling exempelvis aspergillos kontra mucormykos. Mikroskopi är viktig att utföra då den kan vara positiv även vid negativ odling, till exempel påvisning av icke-septerade hyfer vid mukormykos då Mucorales sällan växer fram med konventionella odlingsmetoder (1). Begränsningar med mikroskopi är att den inte kan särskilja *Aspergillus* från andra trådsvampar (exempelvis *Fusarium*) samt att den är en okänslig metod som kräver relativt mycket svampstrukturer i provet för att kunna detekteras i mikroskopin.

2.1.4 Indikation för provtagning

Misstänkt svampinfektion.

2.1.5 Svarsrutiner och tolkning

Namnet på fyndet, alternativt negativt.

Vanligaste fynd:

Candida och annan jäst: jästceller med eller utan hyfer och pseudohyfer (jästceller som efter knoppning, växer i längden och åtar sig hyf-liknande utseende)

Cryptococcus: runda kapselförsedda jästceller i varierande storlek. Som alternativ till fluorescensmikroskopi kan tusch (India ink) preparat användas för påvisning av kapsel.

Aspergillus/Fusarium/Scedosporium m.fl.: relativt smala (2–3 µm), ofärgade och septerade hyfer, ofta med dikotoma (45°) förgreningar.

Mucorales (zygomyceter): osepterade eller med få septa, relativt breda (6- >16 µm) ofärgade och oregelbundna bandliknande hyfer, förgreningar ofta i rätt, 90°, vinkel men även i 45°.

Tolkning: Mikroskopifynd från normalt sterila provmaterial är diagnostiskt och bekräftar svampinfektion. Fynd från icke-sterila provmaterial kan användas som stöd för klinisk diagnos.

2.2 Odling

2.2.1 Metod

Odling från kliniskt prov är "gold standard" för diagnostik av svampinfektion. För definitiv diagnos av svampsjukdom krävs isolering av den specifika svampen från det infekterade området. För att garantera bästa möjliga odlingsbetingelser för olika grupper av svampar som skiljer sig beträffande näringskrav och optimal odlingstemperatur, ska provmaterial odlas på olika substrat och inkuberingen utföras i olika temperaturer. Det finns flera olika generella och selektiva substrat för odling av svamp. Kliniskt provmaterial appliceras på chromagar för isolering av jästsvamp (inkubering vid 36-37 °C upp till en vecka beroende på provmaterial), på blod-dextrosagar för isolering av jäst- och trådschamp (inkubering vid 36-37 °C upp till 2 veckor beroende på provmaterial) på Sabouraudagar för isolering av jäst- och trådschamp (inkubering 30 °C, 2-3 veckor ex. biopsier, likvor), samt på potatis-dextrosagar för isolering av termofila trådschampar (*Aspergillus fumigatus*, vissa Mucorales) som växer även i högre än kroppstemperatur (inkubering vid 42-45°C upp till en vecka beroende på provmaterial).

Inkuberingstiden kan förlängas, vid behov, för prov från särskilda patientgrupper till exempel sputum med långsamt växande svampar från cystisk fibros patienter.

Odlingstiden av blododlingsflaskor förlängs till 10 dagar vid svampfrågeställning.

Odlingar för dimorfa endemiska svampar (P3 organismer) inkuberas upp till 8 veckor i säkerhetslaboratorium. För att kunna isolera svampar är det viktigt att använda selektiva substrat som innehåller antibiotika, särskilt för odling av icke-sterila provmaterial med mycket koloniserande bakterier. Eftersom det kliniska provet kan innehålla lågt antal svampceller/svamphyfer är det fördelaktigt att odla mycket material och om möjligt på flera substrat.

Optimal odlingstemperatur: Patogena jästsvampar, *Aspergillus* och Mucorales 36–37 °C. *Fusarium* och *Cryptococcus neoformans/gattii* 30 °C.

Olika tekniker kan användas för artidentifiering av det framodlade svampisolatet. Konventionell artidentifiering av trådschampar baseras på mikro- och makromorfologi. De för arten karakteristiska strukturerna studeras i mikroskopipreparat och utgör grunden för artidentifieringen tillsammans med koloniutseendet. Som första steg för artidentifiering av de vanligaste patogena jästsvamparna kan kommersiella kromogena substrat användas. Plattorna innehåller artificiella kromogena substrat

som specifika enzymer degraderar till olikfärgade kemiska föreningar beroende på *Candida*-arten. *Candida albicans*, *C. tropicalis* och *C. krusei* bildar gröna, blå respektive rosa kolonier på kromagar (Chromagar *Candida*).

Maldi-Tof är en förkortning på matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Maldi-Tof har ersatt de tidigare använda biokemiska metoderna för artidentifiering av jäst- och trådsvampar.

Sekvensering (NGS, next generation sequencing) av ITS (internal transcribed spacer som finns mellan det stora och lilla rRNA subenheter), TEF-1a (translation elongation factor) eller andra specifika gensekvenser är gold standard för artidentifiering av svampar. Klassificeringen och namngivning av svampar (taxonomin) baseras på fylogenetiska träd framtagna med hjälp av gensekvenser från besläktade arter. På grund av hög variabilitet är ITS-sekvensen väl lämpad för att differentiera olika arter inom samma släkte. Sekvensering används när Maldi-Tof och/eller morfologiska metoder inte räcker till för artidentifiering.

2.2.2 Provmaterial

Sterila vätskor, vävnad, biopsi, sekret.

Vävnad och biopsi: Vid nålbiopsi eftersträvas minst 2 mm. Materialet läggs i sterilt provrör med 0,5 mL-1,0 mL fysiologisk koksaltlösning. Förvara provet kylt. Omgående transport till laboratoriet.

Blododling: Aerob 8–10 mL blod per flaska (BacT/ALERT FA Plus och/eller Mycosis IC/F blodflaska).

2.2.3 Prestanda

Fördelen är att den specifika sjukdomsalstrande svampen kan identifieras från positiv odling.

Isolering av stammen genom odling är en förutsättning för resistensbestämning. Begränsningar med odlingsmetoder är att de är långsamma och har relativt låg känslighet.

2.2.4 Indikation för provtagning

Misstänkt svampinfektion.

2.2.5 Svarsrutiner och tolkning

Odlingsfynd svaras ut med artnamn på species-nivå om möjligt. Svampfynd från normalt sterila provmaterial är diagnostiska och bekräftar svampinfektion. Svampfynd från icke-sterila provmaterial kan användas som stöd för klinisk diagnos.

2.2.6 Referenser

1. Cornely O. A. et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. Clin Microbiol Infect. 2014 Suppl 3:5-26.

2. Cornely O. A. et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis* 2019.
3. Tortorano A. M. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect.* 2014. Suppl 3:27-46.

2.3 Galaktomannan

2.3.1 Metod

Galaktomannan (GM) tillhör en grupp polysackarider som innehåller mannos och ett varierande antal galaktofuran-sidokedjor med storlek mellan 35–200 kDa. Huvuddelen av cellväggen hos *Aspergillus*-arter består av GM och GM utsöndras in vivo under invasiv växt. Påvisning av GM har utvecklats för diagnostik av invasiv aspergillos men testet har också visat sig användbart för diagnostik av fusarios (1) och kan även vara positiv vid histoplasmos (2). Det finns ett flertal olika metoder och därmed test för påvisande av GM varav flera är på väg in på den svenska marknaden. Den vanligaste metoden i Sverige är ett ELISA-test som avhandlas nedan. Av övriga metoder så finns i skrivande stund (2021) i Sverige ett så kallat snabbtest i form av *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay (LFA). Detta är ett sandwich immunokromatografiskt test med monoklonala antikroppar riktade mot GM (3). Rent praktiskt ser kitet likadant ut som de som används för snabbtester mot grupp A streptokocker och malaria där provmaterialet droppas på testet och resultat läses av i form av bildande av streck eller ej, antigen kvalitativt eller kvantitativt med en för detta avsedd läsare. Det finns flera tillverkare av LFA med i stort sett likartad prestanda som ELISA-testen.

Den vanligaste metoden för detektion av GM är en double-sandwich enzyme immunoassay (EIA)-test som nyttjar den monoklonala antikroppen EBA-2 som är riktad mot GM (Platelia™ *Aspergillus* antigen, Bio-Rad, Frankrike). Metoden är godkänd och validerad för serum och BAL-vätska men har i studier även visats vara användbar för cerebrospinalvätska (CSV) (4). Resultat anges som index på optisk densitet som erhålls genom att räkna fram kvoten mellan absorbansvärdet på kliniska prov och referensserum.

2.3.2 Provmaterial

Provmaterial: Serum, BAL, cerebrospinalvätska (CSV).

2.3.3 Prestanda

Testning med GM har framförallt studerats för immunsupprimerade patienter eftersom det är i denna grupp som aspergillusinfektioner är vanligast och allvarligast. En Cochrane-analys från 2015 som inkluderade data från 47 artiklar fann att analys av GM i serum hos immunsupprimerade patienter (definierade som neutropeni, organtransplantation, cytostatikabehandling eller sjukdomar som påverkar T-cellsfunktion) hade en sensitivitet på 78% och specificitet på 85% vid en incidens på 11% om 0,5 användes som cut-off värde på 0,5 (5). Vid cut-off på 1,0 var motsvarande siffror 71%

och 90%. Andra meta-analyser har funnit liknande resultat (6). Om GM i serum används i patientgrupper med lägre incidens så sjunker det positiva prediktiva värdet påtagligt.

I BAL ligger känsligheten på 85–90% och specificiteten på 90–95% för immunsupprimerade patienter (7,8). För övriga patientgrupper är prestandan sämre, till stor del på grund av lägre incidens. Till exempel fann man i en studie att för patienter som inte hade genomgått organtransplantation eller hade hematologisk malignitet så var GM-värden i BAL mellan 0,5 och 1,0 falskt positiva i cirka 50% av fallen (9). Kliniska studier har visat att ett GM index $<0,5$ i BAL har ett högt ett högt negativt prediktivt värde och att index ≥ 3 har ett högt positivt prediktivt värde (10).

Även om invasiv aspergillusinfektion i CNS är en ovanligt är påvisning av GM i cerebrospinalvätska (CSV) värdefullt, och mindre studier har visat relativt hög känslighet på 88% och specificitet på 96% för GM index 0,5–2 (11).

Vissa trådsvarpar, till exempel *Penicillium* spp. och *Fusarium* spp. som är närbesläktade med *Aspergillus*, kan korsreagera i antigenestet i BAL. Falskt positiva resultat kan bland annat orsakas av blodprodukter och translokation av GM från mat och enterala näringsprodukter via tarmen ut i blodet. Däremot finns det inte längre någon risk för falskt positiva resultat på grund av samtidig behandling med piperacillin-tazobactam (12). Man har inte påvisat GM i näringslösningar för parenteral nutrition (13).

2.3.4 Indikation för provtagning

Serum: Två principiellt olika indikationer: Screening av asymtomatisk patient samt som diagnostiskt prov vid misstanke om invasiv aspergillusinfektion.

BAL: Misstanke på aspergillusinfektion i lunga.

CSV: Misstanke på aspergillusinfektion i hjärnan.

Exakt indikation och tidpunkter för provtagning är mycket beroende på individuella riskbedömningen av patienten baserad på bakomliggande sjukdom, medicinering, grad av immunbrist och pågående profylaxmedicinering mot svampinfektioner och diskuteras utförligt i avsnittet "Provtagning på IVA och efter kirurgi" samt "Provtagning på hematologen och vid tillstånd med uttalad T-cellssuppression".

2.3.5 Svarsrutiner och tolkning

Resultatet anges som index på optisk densitet som erhålls genom att räkna fram kvoten mellan absorbansvärdet på kliniska prov och referensserum. Högsta värdet som anges är 3 eller 5 beroende på metod.

Tillverkarna av testerna rekommenderar en cut-off för serum och CSV på 0,5 och för BAL 1,0. I den senaste versionen av de internationella definitionerna av invasiva svampinfektioner hos immunsupprimerade patienter rekommenderas cut-off på 1,0 för serum (och plasma), BAL och CSV, eller en kombination av $\geq 0,7$ serum/plasma och 0,8 i BAL (14). För icke-immunsupprimerade är det svårt att sätta några säkra cut-off värden eftersom "pre-test likelihood" det vill säga sannolikheten

för att patienten skall ha sjukdomen, är mycket lägre. Skulle man använda sig av samma cut-off nivåer som för immunosupprimerade skulle antalet falskt positiva bli högt och det positiva prediktiva värdet således lågt.

2.3.6 Referenser

1. Nucci et al. Earlier Diagnosis of Invasive Fusariosis with *Aspergillus* Serum Galactomannan Testing. Plos One 2014; 9: e87784
2. Gajurel et al. Histoplasmosis in transplant recipients. Clinical Transplantation 2017; 10: e13087.
3. Linder et al (2020). Performance of Aspergillus Galactomannan Lateral Flow Assay on Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. J Fungi (Basel) 2020; 6: 297.
4. Chong GM et al. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol. 2016; 54, 428-31.
5. Leeflang et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015.
6. Pfeiffer et al. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis Clin Infect Dis. 2006 May 15;42(10):1417-27.
7. Guo et al. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. Chest. 2010; 138: 817-24.
8. Zou et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. Plos One 2012; 7: e43347.
9. Farmakiotis et al. False positive bronchoalveolar lavage galactomannan: Effect of host and cut-off value. Mycosis 2019; 62: 204-213.
10. D'Haese et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. J Clin Microbiol. 2012; 50: 1258-63.
11. Chong GM et al. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol. 2016; 54, 428-31.
12. Mikulska et al. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. J Antimicrob Chemother. 2012 Jul;67(7):1746-8.
13. Knoth et al. In-vitro detection of mannan and galactomannan in components of total parenteral nutrition (TPN). Pharmazie 2016 May;71(5):238-42.
14. Donnelly et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. Clin Infect Dis. 2020 Sep 12;71(6):1367-1376.

2.4 1,3-β-D-glukan (BDG)

2.4.1 Metod

Polysackariden 1,3-β-D-glukan (BDG) är en viktig beståndsdel av cellväggen hos majoriteten av humanpatogena svampar och kan detekteras i blod hos patienter med invasiv infektion orsakade av exv. *Candida*-arter, *Aspergillus*-arter, *Pneumocystis jirovecii*, *Fusarium* och *Histoplasma*.

Cryptococcus-arter och svampar från släktet *Mucorales* har låg mängd 1,3-β-D-glukan i sina cellväggar varför patienter med infektioner orsakade av dessa svampar sällan har detekterbart BDG i blod.

Analysmetoden för BDG baseras på en enzymatisk reaktion mellan den aktiva substansen Faktor G (en koagulationsfaktor från blodceller av hästskokrabban *Limulus*) och BDG i patientprovet där resultatet av det sista reaktionssteget är ett färgomslag (kolorimetrisk analysmetod) eller en gelbildning av provet (turbidimetrisk analysmetod) beroende på vilket test som används.

Absorbansen respektive grumligheten i provet avläses sedan och tolkas mot en standardkurva för att uppskatta BDG koncentrationen i provet.

Det finns flera olika kommersiella tester för detektion av BDG. Fungitell® är det test som främst har använts i Europa och USA. Nyligen blev även det turbidimetriska BDG-testet Wako (FUJIFILM Wako Chemicals Europe, Germany), som använts under lång tid i Japan, godkänt för försäljning på den europeiska marknaden. Båda dessa metoder är baserade på samma aktiva reagens (*Limulus* Amebocyte Lysate) men skiljer sig åt i avläsningsmetodik och har något skilda mätområden för BDG-detektion.

BDG-test (GlucateLL® med viss "in-house" vidareutveckling) finns tillgängligt på klinisk mikrobiologi i Göteborg sedan 2010 och sedan 2017 finns BDG-test (Fungitell®) även tillgängligt på klinisk mikrobiologi på Karolinska. I klinisk praxis verkar valet av GlucateLL och Fungitell spela mindre roll.

2.4.2 Provmaterial

BDG är än så länge endast godkänt för serumprover, men studier har visat att BDG kan detekteras i cerebrospinalvätska hos patienter med invasiv svampinfektion i CNS (1, 2). Detektion av BDG i BAL-vätska har visat begränsad diagnostisk prestanda (3).

2.4.3 Prestanda

BDG koncentrationer i blod uppvisar stor variabilitet mellan patienter och påverkas av vilken typ av invasiv svampinfektion som föreligger, vilket/vilka organsystem som är engagerade, svampbördan i kroppen, tidpunkten för provtagning i förhållande till symptomdebut samt individrelaterade faktorer för elimination av BDG från cirkulationen. Pga av denna stora individuella variabilitet visar olika studier mycket varierande resultat avseende BDG testets diagnostiska prestanda och exakta siffror avseende sensitivitet och specificitet är svårtolkade. I en nyligen genomförd systematisk Cochrane genomgång som inkluderade 49 diagnostiska studier noterades en alltför stor heterogenitet mellan studier för att möjliggöra en formell meta-analys och siffror avseende sensitivitet, specificitet och prediktiva värden kunde inte presenteras (4).

2.4.3.1 Sensitivitet

BDG kan vara lågt om provet tas tidigt i förloppet vid en invasiv svampinfektion (4, 5). En studie visade att endast 52% av patienter med invasiv aspergillos och 62% av patienter med candidemi hade positivt BDG (>80 pg/ml) vid tidpunkten för diagnos (5). Vid upprepad provtagning under de första två veckorna efter infektionsdebut är sannolikheten för att patienten har ett positivt BDG resultat betydligt högre och sensitiviteten ökar vid provtagning senare i infektionsförloppet, även om patienten blivit insatt på antifungal behandling (6). BDG vid invasiv svampinfektion når ofta höga serumnivåer (inte sällan > 400–500 pg/ml) under de närmsta dagarna-veckorna efter infektionsdebut.

2.4.3.2 Specificitet

BDG kan detekteras i blod även hos patienter utan invasiv svampinfektion. Flera faktorer har beskrivits som möjliga källor till BDG reaktivitet i blod. Administration av olika läkemedelsprodukter kontaminerade med betaglukan är sannolikt en av de viktigaste källorna till "falskt positivt" BDG i blod. I tidiga studier sågs en korrelation mellan olika typer av intravenösa antibiotikalösningar och "falskt positivt" BDG i blod, men med förbättrade tillverkningsprocesser anses inte längre antibiotika vara en källa för BDG-reaktivitet i blod (7). Blodprodukter såsom albumin, koagulationsfaktorer och immunoglobulinlösningar har visats kunna innehålla betaglukan pga kontamination av cellulosafilter som används vid dess framställande och studier har visat förhöjda BDG nivåer i blod hos patienter utan invasiv svampinfektion som fått vissa blodprodukter (8) och intravenösa immunoglobulinlösningar (9). I den senare studien sågs förhöjda BDG-nivåer upp till 3 veckor efter givet immunoglobulin. Tidiga studier har visat att cellulosa-innehållande dialysfilter kan ge förhöjda BDG nivåer hos patienter som genomgår hemodialys, men med dagens dialysfilter verkar detta inte längre vara relevant (10). Man har spekulerat kring om *Candida* translokation över tarmslemhinnan kan ge positiva BDG nivåer i blod hos neutropena patienter, men detta verkar inte vara fallet (11). I en studie där man utvärderat BDG-nivåer i blod hos neutropena hematologpatienter med biomarkörverifierad mukositis i tarmen fann man ingen korrelation mellan mukositis och BDG-nivåer (12). En annan källa till falskt positiva BDG testresultat kan vara optisk interferens vid analys av lipemiska, hemolyserade eller bilirubinemiska serumprov (Ass. Cape Cod) och en svensk studie har visat en korrelation mellan triglyceridnivåer och BDG nivåer i blod hos patienter utan invasiv svampinfektion (6). Detta gäller kolorimetriska BDG-assays som exempelvis Fungitell. Upphetning av prover kan möjligen minska denna interferens. Betaglukan kan även finnas i miljön på laboratorier varför stringent metodik vid genomförandet av BDG test är av yttersta vikt för att minska risken för kontamination från omgivningen.

Studier har visat att specificiteten för BDG-testet förbättras om två konsekutivt positiva testresultat används för att definiera ett positivt resultat (6, 13).

I en prospektiv studie på patienter med hematologisk malignitet sågs att patienter med "falskt" förhöjda BDG-test (GlucateLL/Fungitell® assay) oftast hade BDG-nivåer <400 pg/ml och vid en cut-off nivå på 800 pg/ml var specificiteten 100%. Vidare fann man att patienter med invasiv svampinfektion tenderade att ha successivt stigande BDG nivåer i blod under perioden 2 veckor före till 2 veckor efter att diagnosen fastställdes (oavsett tidpunkt för insatt antifungal behandling) medan patienter med positiva BDG utan invasiv svampinfektion uppvisade ett mönster av enstaka positiva värden eller varierande BDG nivåer (6).

2.4.4 Indikation för provtagning

Diagnostiskt prov vid klinisk misstanke på invasiv svampinfektion exv. invasiv aspergillos, invasiv *Candida*-infektion eller *Pneumocystis pneumonia* (se ovan bakgrund).

Screeningtest för invasiv svampinfektion i en högriskpopulation.

2.4.5 Svarsrutiner och tolkning

Resultatet anges kvantitativt i pg/ml.

Cut-off nivå för ett positivt resultat varierar mellan olika BDG test. Tillverkaren för Glucatell/Fungitell® assay kit rekommenderar följande cut-off gränser: BDG koncentration <60 pg/ml = negativ, 60–79 pg/ml = obestämd, >80 pg/ml = positiv. Pga av den stora individuella variabiliteten i BDG nivåer enligt ovan (avsnitt Prestanda) är det dock svårt att bestämma exakta cut-off gränser och BDG-resultat bör tolkas utifrån den aktuella kliniska situationen.

Faktorer att beakta vid tolkning av testresultat:

- Infektioner orsakade av *Cryptococcus* eller svampar från släktet *Mucorales* ger sällan förhöjda BDG nivåer i blod.
- BDG kan vara negativt tidigt i förloppet vid en invasiv svampinfektion men stiger successivt inom loppet av 2 veckor
- Patienter med invasiv svampinfektion uppvisar ofta en kinetik med successivt stigande BDG nivåer i blod under de första veckorna av infektionen.
- Enstaka förhöjda BDG nivåer i blod med efterföljande negativa värden talar emot invasiv svampinfektion
- Minst två konsekutivt positiva BDG resultat bör användas för att definiera ett positivt testresultat

➔ *Analys av upprepade BDG test med 2–3 dagars mellanrum rekommenderas*

- Ju högre BDG-nivåer, desto större sannolikhet att invasiv svampinfektion föreligger.
- BDG-nivåer >800 pg/ml talar starkt för invasiv svampinfektion (6)

➔ *Vid höga BDG nivåer (högre än den övre detektionsgränsen) rekommenderas exakt kvantifiering av BDG-nivå.*

Faktorer såsom administration av vissa typer av blodprodukter, immunglobulinlösningar och lipemiska serumprover kan ge positiva BDG-nivåer

➔ *Beakta möjliga faktorer som kan ge upphov till förhöjda BDG nivåer i blod hos patienter utan invasiv svampinfektion.*

2.4.6 Referenser

1. Litvintseva et al. Utility of (1-3)-beta-D-glucan testing for diagnostics and monitoring response to treatment during the multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. *Clin Infect Dis*. 2014;58:622-30.
2. Lyons et al. Utility of measuring (1,3)-beta-d-glucan in cerebrospinal fluid for diagnosis of fungal central nervous system infection. *J Clin Microbiol*. 2015;53:319-22.
3. Shi et al. Diagnostic value of (1 → 3)-beta-D-glucan in bronchoalveolar lavage fluid for invasive fungal disease: A meta-analysis. *Respir Med*. 2016;117:48-53.
4. White et al. (1→3)-β-D-glucan testing for the detection of invasive fungal infections in immunocompromised or critically ill people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;7:Cd009833
5. Angebault et al. Prospective Evaluation of Serum beta-Glucan Testing in Patients With Probable or Proven Fungal Diseases. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3:ofw128.
6. Hammarstrom et al. Prospective evaluation of a combination of fungal biomarkers for the diagnosis of invasive fungal disease in high-risk haematology patients. *Mycoses*. 2018;61:623-632
7. Liss et al. 1,3-beta-d-Glucan contamination of common antimicrobials-authors' response. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:2997-9.
8. Liss et al. 1,3-ss-D-glucan concentrations in blood products predict false positive post-transfusion results. *Mycoses*. 2016;59:39-42.
9. Egger et al. False positive serum levels of (1-3)-ss-D-Glucan after infusion of intravenous immunoglobulins and time to normalisation. *J Infect*. 2018;76:206-10.
10. Prattes et al. 1,3-ss-d-Glucan testing is highly specific in patients undergoing dialysis treatment. *J Infect*. 2017;74:72-80.
11. Hammarstrom et al. How to interpret serum levels of beta-glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in adult high-risk hematology patients: optimal cut-off levels and confounding factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:917-25.
12. Prattes et al. Chemotherapy-Induced Intestinal Mucosal Barrier Damage: a Cause of Falsely Elevated Serum 1,3-Beta-d-Glucan Levels? *J Clin Microbiol*. 2016;54:798-801.
13. Ellis et al. Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol*. 2008;57:287-95.

2.5 PCR

2.5.1 *Aspergillus*-DNA

2.5.1.1 *Metod*

Påvisande av *Aspergillus*-DNA kan användas som komplement till galaktomannan (GM) och beta-D-glucan för att stärka misstanken om en invasiv aspergillos. Påvisande av *Aspergillus*-DNA görs med en PCR reaktion som riktar sig mot för *Aspergillus*-släktet unika DNA-sekvenser. Standardiserade kommersiella metoder finns inte på samma sätt som för GM och beta-D-glucan varför in house PCR ofta används. Målsekvensen är oftast belägen inom rDNA, dvs gener som kodar för ribosomalt RNA (vanligen 18S eller ITS). Fördelen med att välja ribosomala gener är att de oftast är multipla vilket ökar metodens känslighet. En väl utvecklad PCR-reaktion blir både känslig och specifik. *Aspergillus* förekommer dock i den omgivande miljön varför risk för kontamination finns både vid provtagning och analys. I nuläget erbjuds *Aspergillus*-DNA analys i Sverige endast vid Karolinska laboratoriet.

2.5.1.2 Provmaterial

EDTA-blod, BAL, cerebrospinalvätska, biopsi.

2.5.1.3 Prestanda

European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) som är en internationell arbetsgrupp under ISHAM och EORTC publicerade en utvärdering av det diagnostiska värdet av *Aspergillus*-DNA 2015 (1). Man inkluderade 15 prospektiva studier med en genomsnittlig incidens av invasiv aspergillos på 14% och fann en sensitivitet på 82 % och specificitet på 92 % för PCR i serum. För BAL beräknade man sensitiviteten till 77 % - 80 % och specificiteten till 94 % - 95 %. Sammantaget gjorde man bedömningen att detektion av *Aspergillus*-DNA hade en liknande sensitivitet och specificitet som GM. Man fann dock att valet av procedur för DNA extraktionen var avgörande för ett gott resultat.

Det diagnostiska värdet av *Aspergillus* PCR i serum undersöktes även i en Cochrane-analys publicerad 2019 (2). Analysen inkluderade immunsupprimerade patienter från 29 studier genomförda under perioden 2000–2018 med en genomsnittlig incidens av invasiv aspergillos på 11 %. Man fann en sensitivitet och specificitet på 79% respektive 80% för ett enskilt positivt test och 60 % respektive 95 % för två konsekutivt positiva test (2).

I den senaste versionen av de internationella definitionerna av invasiva svampinfektioner hos immunsupprimerade patienter har man inkluderat *Aspergillus* PCR som ett godkänt mykologiskt test i form av två konsekutivt positiva test i blod/serum/plasma eller två positiva PCR test i BAL (i publikationen anges duplikat test utan någon närmare specifikation, varför detta kriterium är svårbedömt) eller en kombination av ett positivt test i blod/serum/plasma och ett positivt test i BAL (3).

Analys av *Aspergillus* PCR i blod har, när den använts tillsammans med GM och beta-D-glukan, även visat sig vara användbart för att styra empirisk antimykotikabehandling (4).

2.5.1.4 Indikation för provtagning

Internationellt är indikation för provtagning antingen screening av patienter med hög risk för invasiv aspergillos, då i kombination med GM och/eller BDG (se avsnitt Provtagning på hematologen), eller vid misstanke på etablerad invasiv infektion. I Sverige är dock erfarenheterna av *Aspergillus* PCR begränsade då testet inte använts systematiskt och några tydliga rekommendationer avseende indikationer för provtagning kan därför inte ges. Det har på några ställen i landet ingått i BAL-analyser hos immunsupprimerade patienter med nytillkomna lunginfiltrat, där nyttan upplevts vara varierande. Internationellt bedöms prestandan dock vara så bra att testet numera ingår i de reviderade definitionerna för invasiv svampinfektioner hos immunsupprimerade patienter (3).

2.5.1.5 Svarsrutiner och tolkning

Svarsrutin: Positivt, Negativt.

I Sverige har *Aspergillus* PCR i blod inte använts systematiskt och erfarenheterna är därför begränsade varför några tydliga tolkningsrekommendationer inte kan ges. Enligt internationella publicerade data (se ovan) har två konsekutivt positiva analyser i blod visats ha ett högt positivt prediktivt värde. Prestandan för PCR i BAL har angetts vara lik den för GM (1, 2).

2.5.1.6 Referenser

1. Lewis White et al. *Aspergillus* Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. *Clin Infect Dis*. 2015; 61: 1293-303.
2. Cruciani et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019.
3. Donnelly et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020 Sep 12;71(6):1367-1376.
4. Morrissey et al. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13: 519-28.

2.5.2 Candida DNA

2.5.2.1 Metod

Påvisande av *Candida* -DNA kan användas som ett komplement till blododling och beta-D-glukan för att stärka misstanken om en invasiv *Candida* infektion. Påvisande av *Candida* -DNA görs med en PCR-reaktion som riktas mot för *Candida* -släktet unika DNA-sekvenser. Målsekvensen är oftast belägen inom rDNA, dvs gener som kodar för ribosomalt RNA (vanligen 18S, 28S eller ITS) men även andra gener kan förekomma. Fördelen med att välja ribosomala gener är att de oftast är multipla vilket ökar metodens känslighet. Ett antal kommersiella metoder finns tillgängliga på marknaden men också in-house metoder förekommer. Vissa av testerna är artspecifika, dvs de känner igen de vanligaste *Candida* arterna (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* och *C. krusei*). Andra tester detekterar endast *Candida* som genus utan att särskilja arter. I nuläget erbjuds in-house *Candida* -DNA analys i Sverige endast vid Karolinska laboratoriet med målsekvensen är 18S rDNA.

2.5.2.2 Provmaterial och svarsrutin

EDTA-blod, cerebrospinalvätska, biopsi.

2.5.2.3 Prestanda

Prestanda varierar med metod, typ av infektion och vilken patientpopulation som studerats. I en metaanalys av det diagnostiska utbytet av *Candida* PCR, innefattande totalt 54 olika publikationer, fann man en god sensitivitet och specificitet för patienter med misstänkt candidemi (1). Hos totalt 85 % av dessa patienter kunde *Candida*-DNA detekteras medan motsvarande siffra för blododling var 38 %. Prestandan förefaller bättre vid candidemi än vid djupa infektioner. I en studie på

intensivvårdspatienter som genomgått olika typer av bukkirurgi och som följdes prospektivt med avseende på abdominal candidainfektion fann man en sensitivitet på 0,85 och en specificitet som var <0,5 och lägre ju mer koloniserad patienten var (2). En senare studie har visat klart lägre sensitivitet än i metaanalysen (3) och många anser att dokumentationen ännu inte är tillräcklig för att använda metoden i rutinbruk (4).

Sammanfattningsvis kan in-house *Candida* PCR eventuellt ge ett bättre utbyte än blododling och skulle kunna vara ett värdefullt tillskott i diagnostiken vid candidemi, särskilt med tanke på den snabbare "turn around" tiden. Fördelen med in-house metoden jämfört med den kommersiella metod som beskriv nedan är att den går att köra även på annat material än blod såsom cerebrospinalvätska och biopsi. Ytterligare karaktärisering av prestanda skulle dock öka metodens värde.

2.5.2.4 Indikation för provtagning

I Sverige har *Candida* PCR inte använts systematiskt och erfarenheterna är begränsade varför några tydliga rekommendationer inte kan ges. En brist är att det inte är standardiserad metod. Avseende provtagning i blod är det möjligt att metoden på sikt kommer att ersättas av T2Candida (se nedan). För vävnadsdiagnostik har analysen fortfarande en plats i dagsläget men det är möjligt att metoden här kan komma att ersättas av svampsekvensering (ITS) (se längre ned) i framtiden.

2.5.2.5 Svarsrutiner och tolkning

Positivt, negativt.

I Sverige har *Candida* PCR i blod inte använts systematiskt och erfarenheterna är begränsade varför några tydliga tolkningsrekommendationer inte kan ges.

2.5.2.6 Referenser

1. Avni et al. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):665-70.
2. Léon et al. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Critical Care.* 2016; 20: 149.
3. Nieto et al. Polymerase Chain Reaction Versus Blood Culture to Detect *Candida* Species in High-Risk Patients with Suspected Invasive Candidiasis: The MICAFEM Study. *Infect Dis Ther.* 2019; 8: 429–4.
4. Clancy CJ, Nguyen MH. Rapid diagnosis of invasive candidiasis: ready for prime-time? *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32:546-52.

2.5.3 Kommersiell Candida-PCR: T2Candida

2.5.3.1 Metod

Påvisande av *Candida*-DNA med T2Candida kan användas som komplement till blododling och betaglukan för att stärka misstanken om en invasiv *Candida* infektion. T2Candida är en helt automatiserad PCR-metod där DNA-extraktion, amplifiering och detektion görs i ett slutet system. T2-metodiken bygger på en ny unik metod där man påvisar *Candida* DNA med hjälp av PCR-amplifiering direkt i provröret (målsekvenser inom ribosomalt-DNA) följt av påvisning av amplifikatet med magnetiska nano-partiklar (1, 2). Finns det amplifierat *Candida* DNA i provröret binder de magnetiska nano-partiklarna in till detta vilket orsakar en magnetisk förändring som kan avläsas. Svarstiden är 4–6 timmar och svaras ut som *Candida albicans/tropicalis*, *Candida parapsilosis* eller *Candida glabrata/krusei*. Metoden kan således inte skilja på *albicans* och *tropicalis*, inte heller på *glabrata* och *krusei*. Metoden finns att beställa rutinmässigt på Karolinska Universitetssjukhuset, Stockholm sedan sommaren 2021.

2.5.3.2 Provmaterial och svarsrutin

Blod (EDTA-rör).

2.5.3.3 Prestanda

I en studie av 1801 kliniska prover tagna på sjukhusvårdade patienter i samband med blododlingar, varav 250 prover sedan spikades med *Candida* (det vill säga *Candida* tillfördes i provrören), fann man en specificitet på 99,4% och en sensitivitet på 92,3% (2). I en annan studie följde man upp patienter med positiv blododling med provtagning med *Candida* med T2Candida och nya blododlingar efter det att antimykotisk behandling påbörjats och fann att T2Candida var positiv i 50% av fallen mot 21% för nya blododlingarna (mediantid för given antimykotisk behandling vid tidpunkten för provtagningen var 12,5 timmar) (3). I en studie från Danmark av 126 IVA patienter med hög risk för candidainfektion fann man att inklusion av T2Candida i diagnostiken ökade sannolikheten för att nå diagnos från knappt 30% med enbart blododling till drygt 50% med kombinationen T2Candida och blododling (4). I en metaanalys från 2019 inkluderande 8 studier fann man relativt likartade resultat avseende sensitivitet, sammanlagt värde på 0,94, men ett mer heterogent resultat avseende specificitet, troligen på grund av svårigheter att definiera sann candidainfektion, med värden mellan 0,59 och 1,00, sammanlagt 0,91 (5).

2.5.3.4 Indikation för provtagning

I nuläget saknas tillräckligt med data för att fastslå T2Candidas plats i diagnostiken och därmed indikation för provtagning. Av det som finns publicerat ter sig en potentiell indikation vara provtagning av patienter som redan blivit insatta på empirisk behandling mot *Candida* eftersom T2Candida visats vara positiv längre tid än blododlingar efter insatt behandling mot verifierad candidemi (3). Ett annat möjligt scenario är som komplement till blododlingar för svårt sjuka patienter med förhöjd risk för invasiv candidainfektion, såsom komplicerade postoperativa bukinfektioner, för att nå snabbare diagnos (en studie av T2Candidas värde vid postoperativa bukinfektioner i Sverige är slutförd och data väntas under 2021).

2.5.3.5 Svartsrutiner och tolkning

Positivt, negativt. Positiva resultat svaras ut som positiv PCR för *Candida albicans/tropicalis*, *Candida parapsilosis* eller *Candida glabrata/krusei*.

T2Candida har bara använts i studieform i Sverige och därmed saknas erfarenhet som hur svaret skall tolkas. Som nämnts ovan har både sensitiviteten och specificiteten rapporterats vara god men precis som för övriga mykologiska tester måste patientens risk för invasiv candidainfektion, den så kallade pre-test sannolikheten, tas med vid tolkningen av resultatet.

2.5.3.6 Referenser

1. Neely et al. T2 Magnetic Resonance Enables Nanoparticle-Mediated Rapid Detection of Candidemia in Whole Blood. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 182.
2. Mylonakis et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin Infect Dis*. 2015; 60: 892-99.
3. Clancy et al. Detecting Infections Rapidly and Easily for Candidemia Trial, Part 2 (DIRECT2): A Prospective, Multicenter Study of the T2Candida Panel. *Clin Infect Dis*. 2018; 17: 1678-86.
4. Arendrup et al. Diagnostic Performance of T2Candida Among ICU Patients With Risk Factors for Invasive Candidiasis. *Open Forum Infectious Diseases*. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019; 6: Volume 6, ofz136.
5. Tang et al. Pooled analysis of T2 Candida for rapid diagnosis of candidiasis. *BMC Infectious Diseases*. 2019; 19: 798.

2.5.4 Sekvensering svamp (ITS)

2.5.5 Metod

Next Generation Sequencing (NGS) används för påvisande av svamp-DNA. Vid sekvensering utförs i ett första steg en PCR reaktion mot ITS-regionen inom den delen av svampgenomet som innehåller ribosomalt DNA. ITS-regionen är belägen mellan generna för 18S och 28S vilka kodar för ribosomens subenheter. Eftersom denna ITS region finns i genomet hos alla svamparter och dessutom har visat sig vara hypervariabel är den ett användbart verktyg för att detektera och särskilja olika svamparter. Vid PCR amplifiering av ITS-regionen inkluderas adaptorsekvenser för efterkommande Ion Torrent sekvensering. De erhållna sekvenserna mappas mot en sekvensdatabas. Alla sekvenseringsreaktioner innehåller även mycket låga nivåer intern positiv kontroll av syntetiskt DNA vilket möjliggör semikvantitativ bedömning av ITS DNA. NGS sekvensering har i jämförelse med klassisk Sangersekvenseringsteknik även fördelen att kunna hantera fynd av flera olika svamparter i samma prov. NGS sekvensering finns sedan 2020 att tillgå vid Karolinska laboratoriet. Utveckling av likvärdig teknik pågår vid andra universitetslaboratorier.

2.5.5.1 Provmaterial

BAL (2–3 ml), cerebrospinalvätska (2 ml), vävnad, biopsi, övrigt provmaterial (normalt sterila vätskor). Använd sterilt provrör/burk utan tillsats.

2.5.5.2 *Prestanda*

Sensitivitet och specificitet går inte att beräkna för sekvensering då resultatet skulle vara beroende av vilken svampart som förväntas påvisas i provet. Fördelen med sekvensering är att det möjliggör fynd av svårodslade species. I laboratoriet används också sekvenseringsteknik för artbestämning av svampisolat som är svåra att typa morfologiskt.

2.5.5.3 *Indikation för provtagning*

Sekvensering bör övervägas vid misstanke om djup svampinfektion där annan svampdiagnostik är negativ alternativt direkt som ett komplement till annan svampdiagnostik vid invasiv provtagning hos patienter med hög risk för invasiv svampinfektion. Sådana situationer kan vara när BAL genomförs på grund av att annan svampdiagnostik varit negativ eller direkt, som ett komplement till annan svampdiagnostik, vid provtagning av sterila lokaler som biopsier och CSV.

2.5.5.4 *Svarsrutiner och tolkning*

Svarsrutin: Detekterad art alternativt Svamp-DNA har inte kunnat påvisas med sekvensering. Ofta medföljer det en svarskommentar om vad för sorts svamp det handlar om.

Den begränsade erfarenhet som finns i Sverige är att det är relativt vanligt med fynd av omgivningssvampar vid svampsekvensering av icke-sterila prover som BAL. I kombination med att det är en förhållandevis ny metod betyder det att resultatet av svampsekvensering måste värderas noggrant mot klinik och andra mykologiska fynd.

2.5.5.5 *Referenser*

1. Bellemain et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* 2010; 10; 189.
2. Kommedal et al. Direct 16S rRNA Gene Sequencing from Clinical Specimens, with Special Focus on Polybacterial Samples and Interpretation of Mixed DNA Chromatograms. *J Clin Microbiol.* 2009; 47; 3562–3568.

2.6 Pneumocystisdiagnostik

2.6.1 Immunofluorescens (IF)

2.6.1.1 *Metod*

Luftvägsinfektioner med *Pneumocystis jirovecii* (Pj) börjar alltid med kolonisering av lungalveolerna och vid rätt förutsättningar, främst i form av att individens immunstatus är nedsatt, kan Pj växa till och eventuellt orsaka pneumocystis-pneumoni, PCP (1). Diagnostiken i Sverige utförs med immunofluorescensfärgning (IF) och realtids-PCR (qPCR). IF är diagnostisk "gold standard" för att verifiera PCP: Positiv IF tolkas som en säkerställd PCP medan negativ IF inte utesluter en klinisk signifikant infektion (2). IF-metodens otillfredsställande kliniska känslighet samt svårighet att

upprätthålla mikroskoperingskompetens hos laboratoriepersonalen gör att det endast finns några få laboratorier i Sverige som utför metoden, för närvarande Karolinska Universitetssjukhuset och Folkhälsomyndigheten i Stockholm samt vid Norrlands Universitetssjukhus i Umeå.

Immunofluorescens utförs genom mikroskopisk påvisning med fluorescenskonjugerade monoklonala antikroppar mot *Pj* ascus (tidigare kallad cysta) och ascosporen (trofisk form). Olika antikroppar finns tillgängliga som del av färdiga kit eller som reagens. Efter centrifugering undersöks immunofärgat cellsediment med UV-ljus som synliggör de fluorescenskonjugerade antikropparna bundna till svampens yta. De olika monoklonala antikropparnas specificitet avgör om de kan binda till svampens båda former eller endast en av dem men de bästa alternativ ska färga båda. Metodens prestanda är avhängig påvisning av svampstrukturer med karakteristisk morfologi och kräver erfaren mikroskopist och tillgång till positiva kontroller. Infektion med *Pj* uppvisar en naturlig gradient där den högsta svampbördan förekommer i lungalveolerna med minskande antal organismer högre upp i luftvägsträdet (2). Det mest representativa provmaterialet är således bronksköljvätska (BAL) följt av inducerat sputumprov och i sista hand vanlig sputum.

2.6.1.2 Provmaterial

BAL, inducerat sputum, sputum, lungbiopsi.

Infektion med *Pj* uppvisar en naturlig gradient där den högsta svampbördan förekommer i lungalveolerna med minskande antal organismer högre upp i luftvägsträdet (2). Det mest representativa provmaterialet är således bronksköljvätska (BAL) följt av inducerat sputumprov och i sista hand vanlig sputum. Luftvägsprov från övre luftvägar, munsköljvätska och nasofarynxaspirat innehåller vanligtvis lägre mängder av morfologiskt igenkännliga pneumocystis-strukturer varför analys med IF inte rekommenderas.

2.6.1.3 Prestanda

IF-metoden uppvisar en hög klinisk specificitet för PCP men den rapporterade kliniska sensitiviteten kan variera mellan ca 50 – 70% beroende på metod och typ av studie (3, 4).

2.6.1.4 Indikation för provtagning

Lunginfiltrat hos immunsupprimerade patienter.

2.6.1.5 Svarsrutin och tolkning

Positiv IF eller negativ IF.

Positivt IF-svar verifierar PCP. Negativt IF-svar ska alltid kompletteras med ett qPCR resultat eftersom PCP ej kan uteslutas.

2.6.2 Pneumocystis: Realtids-PCR (qPCR).

2.6.2.1 Metod

Till skillnad från IF - som är en kvalitativ analys – är qPCR en semikvantitativ diagnostik vilket, åtminstone teoretiskt, skulle kunna ge en möjlighet att skilja mellan kolonisering och kliniskt signifikant infektion. I praktiken finns det dock olika många variabler som försvårar bedömningen såsom typ och mängd av provmaterial, om provet är representativt för de nedre luftvägarna, om behandling har hunnit sättas in samt patientens bakgrundssjukdom. Infektion med Pj uppvisar en naturlig gradient där den högsta svampbördan förekommer i lungalveolerna med minskande antal organismer högre upp i luftvägsträdet (2). Det mest representativa provmaterialet är således BAL följt av inducerat sputum prov och sputum, men Pj kan även påvisas med qPCR i prov från övre luftvägar som till exempel nasofarynxaspirat och munsköljvätska (5, 6).

Pj DNA påvisas genom amplifiering av *Pneumocystis*-specifika målsekvenser, antingen från "singel copy" gener (till exempel beta-tubulin eller di-hydropteroatsyntas genen (DHPS)) eller från "multiple copy" gener (till exempel den stora subenheten av mitokondriellt ribosomalt RNA (LSU mt rRNA) eller gensekvenser för det större ytglykoproteinet, (MSG)). I svenska laboratorier används oftast målsekvensen LSU mt rRNA i egenutvecklade qPCR-metoder men det finns också kommersiella qPCR-metoder som använder samma målsekvenser. Metoder som baseras på detektion av "multiple copy" gener har en *teoretiskt* högre känslighet än de baserade på "singel copy" gener (7). Kvantifiering av målsekvensen, uttryckt i antal kopior per milliliter provmaterial, kan göras genom användning av en standardkurva i form av en spädningsserie av målsekvensen (8). Som ett grövre kvantifieringsmått kan cykeltröskelvärdet (CT-värdet) användas. För att kunna tolka semikvantitativa resultat måste laboratoriet utföra en validering av sin metod där qPCR-resultat (antal genkopior/ml eller CT-värde) jämförs med respektive IF-resultat och korreleras med patienternas kliniska bild avseende Pj infektion i en representativ samling kliniska prov. Anledningen till behovet av lokal validering är att kvantifieringen är avhängig av lokala variabler i utförandet såsom effektiviteten av extraktionen eller i PCR.

2.6.2.2 Provmaterial

BAL är mest representativt, följt av inducerat sputum och i sista hand vanligt sputum (2). Gällande övriga provmaterial från de nedre luftvägarna (till exempel trakealsekret) finns inte lika många publicerade studier men man kan naturligtvis analysera även dessa med qPCR även tolkningen av det negativa resultatet kommer att vara mer ovisst (9). Lungbiopsimaterial är ett representativt prov men används oftast inte pre-mortem. Prov från skyddad borste har tidigare rapporterats som mindre representativt än andra provmaterial från nedre luftvägarna och brukar inte rekommenderas (10). Övre luftvägsprover, som till exempel nasofarynxaspirat och munsköljvätska, rekommenderas enbart om djupare prover som BAL och/eller sputum inte kan erhållas (5, 6). Fynd av DNA i dessa provmaterial tyder på förekomst av högre svampmängder i de nedre luftvägarna men signifikansen är oftast svårvärderad.

I en svensk retrospektiv studie från Göteborg på patienter med HIV kunde Pj DNA påvisas i serumprov från 26/26 patienter med *Pneumocystis* pneumoni (11). På klinisk mikrobiologi, Sahlgrenska, är serum därmed ett accepterat provmaterial vid klinisk misstanke om PCP hos

patienter med HIV. På grund av begränsad dokumentation får provresultat dock tolkas med försiktighet.

2.6.2.3 *Prestanda*

Väl validerade qPCR-metoder har en analytisk känslighet och specificitet nära 100%. Den kliniska känsligheten och negativa prediktiva värdet är höga i BAL och inducerat sputum men lägre för mindre invasiva provmaterial (12).

Det undersökta materialet utgörs av koncentrerat cellsediment. Förutom provtagningslokal kan även andra faktorer som till exempel spädning, homogenitet och provvolym påverka utbytespotentialen. Utöver inhibitionskontroll i qPCR används i vissa studier humana genssekvenser som kontroll för förekomst av humancellinnehållet i prov med misstänkt tveksam representativitet. Det är dock inte lätt att kunna skilja mellan nedre och övre luftvägscellsinnehåll med endast DNA-baserade humana cellmarkörer.

2.6.2.4 *Indikation för provtagning*

Lunginfiltrat hos immunsupprimerade patienter.

2.6.2.5 *Svarsrutiner och tolkning*

Positivt eller negativt fynd av Pj DNA.

De flesta qPCR-metoder använder 45 amplifikationscykler. Vanligtvis tolkas CT-värden ≤ 40 som positivt resultat. Det finns en inverterad korrelation mellan CT-värde och mängd av Pj-DNA i det undersökta provet: Ju lägre CT-värde desto större DNA mängd i provet. En del laboratorier i Sverige har valt att ange qPCR-resultaten som kvalitativa svar, det vill säga negativt eller positivt (för närvarande Halmstad, Jönköping, Göteborg, Folkhälsomyndigheten). Andra har valt att ange ett semikvantitativt svar (Lund, Umeå, Karolinska Universitetssjukhuset i Stockholm). I Lund används två qPCR-metoder samtidigt med olika analytiska känsligheter (med målgenerna beta-tubulin och LSU mt rRNA). Svaret är semikvantitativt och baseras på en sambedomning av de olika metodernas delresultat och anges som negativt, svagt positivt eller positivt (Wasserström L., personlig kommunikation). Umeå och Karolinska Universitetssjukhuset i Stockholm svarar ut ett semikvantitativt resultat utifrån CT-värde i intervaller fastställda genom validering och jämförelse mellan qPCR och IF-resultat (Umeå, Rönström H., personlig kommunikation) och genom validering och jämförelse mellan qPCR, IF-resultat och klinisk bild (Karolinska Universitetssjukhuset). Svaret anges i en tregradigskala (högt/starkt, intermediärt, lågt/svagt).

I publicerade studier finns det en - oavsett typ av provmaterial - bra korrelation mellan en stark klinisk misstanke och radiologisk bild förenlig med PCP, positiv IF och fynd av ett lågt CT-värde vid qPCR (4, 12–14). Ett högt/starkt positivt resultat, det vill säga lågt CT-värde, bedöms därför vanligen som kliniskt relevant och därmed diagnostiskt för PCP.

I andra ändan av skalan gör qPCRs höga sensitivitet att ett negativt prov i BAL i princip utesluter PCP medan ett negativt prov i representativt sputum talar starkt mot (11).

Osäkerheten av huruvida det föreligger infektion eller bara kolonisering ligger främst vid intermediära och svagt positiva qPCR resultat. Här måste många faktorer vägas vid tolkningen såsom typ, mängd och kvalitet av det analyserade provmaterialet, patientens kliniska bild och riskfaktorer samt resultatet av andra laboratorie- och kliniska undersökningar. Det är således svårt att fastställa exakta brytpunkter för bedömning av klinisk relevans vid intermediära och svagt positiva resultat av qPCR-analyser.

2.6.3 Referenser

1. Alanio, A. et al. Pneumocystis jirovecii detection in asymptomatic patients: what does its natural history tells us? F1000Res. 2017; 6:739.
2. Alanio A. et al. ECIL guidelines for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 2386-2396.
3. Moodley et al. Comparison of quantitative real-time PCR and direct immunofluorescence for the detection of Pneumocystis jirovecii. PLoS One. 2017;12: 603-607.
4. Unnewehr M. et al. High Diagnostic Value of a New Real-Time Pneumocystis PCR from Bronchoalveolar Lavage in a Real-Life Clinical Setting. Respiration 2016; 92:144-149
5. Guigue, N. et al. Utility of adding Pneumocystis jirovecii DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. Med Mycology 2015; 53:241-247.
6. Goterris, L. et al. Molecular diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia using oral wash samples in immunocompromised patients: usefulness and importance of the DNA target. J Clin Microbiol 2019; doi:10.1128/JCM.01287-19.
7. Valero, C et al. Copy-Number Variation of Mitochondrial DNA-Genes in Pneumocystis jirovecii According to the Fungal Load in BAL Specimens. Frontiers in Microbiology 2016, 7, article 1413.
8. Linssenet CFM. et al. Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of Pneumocystis jirovecii in bronchoalveolar lavage fluid samples. J Med Microbiol. 2006 Sep;55(Pt 9):1229-35.
9. Choi, JS. et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) PCR-negative conversion predicts prognosis of HIV-negative patients with PCP and acute respiratory failure. PLOS One 2018; 13:1-12.
10. Metersky ML. et al. Lack of Utility of Bronchial Brush Biopsy in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. Chest 1992; 101:680-683
11. Hammarström et al. Serum-based diagnosis of Pneumocystis pneumonia by detection of Pneumocystis jirovecii DNA and 1,3-β-D-glucan in HIV-infected patients: a retrospective case control study. BMC Infect Dis 2019;19:658
12. Alanio, A. et al. Real-time assay-based strategy for differentiation between active Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1531-1537.
13. Fauchier, T. et al. Detection of Pneumocystis jirovecii by Quantitative PCR To Differentiate Colonization and Pneumonia in Immunocompromised HIV-Positive and HIV-Negative patients. J Clin Microbiol 2016; 54: 1487-1495.

14. Filaux, J. et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. J Microbiol Methods. 2008; 75: 258-261.

3 Provtagning/diagnostik på IVA och efter kirurgi

Vanligaste invasiva svampinfektion hos patienter inom intensivvården eller som nyligen opererats orsakas av olika candidaarter. Under senare år har en ökad förekomst av mögelsvampinfektioner, främst orsakade av *Aspergillus*, noterats hos patienter utanför de traditionella riskgrupperna vanligen definierade som hematologpatienter med neutropeni eller nedsatt T-cellsfunktion och patienter som genomgått organtransplantation och som på grund av rejektionsproblematik står på kraftig immunsuppression.

En viktig riskfaktor för invasiv candidainfektion är genomgången kirurgi och särskilt då bukkirurgi. Tunga riskfaktorer är även allvarlighetsgrad och omfattning av trauma- eller sepsisinducerad organdysfunktion och kolonisationsgrad (1). Andra tillstånd och faktorer som visats associerade med ökad risk är pankreatit, diabetes, dialys, centrala infarter samt steroid- och antibiotikabehandling. Främsta riskfaktorer för mögelsvampinfektioner är neutropeni och nedsatt T-cellsfunktion och inte sällan vårdas patienter med hematologisk sjukdom eller som genomgått organtransplantation på intensivvårdsavdelning. Utöver dessa högriskgrupper kan kliniskt relevanta aspergillusinfektioner ses hos intensivvårdspatienter med kronisk obstruktiv lungsjukdom, levercirrhos, steroidbehandling, diabetes, njursvikt, influensa, SARS-CoV-2 eller den immunsuppression som man ibland ser hos patienter med långvarig IVA-vård (2,3).

3.1 Screening/övervakning

Screening av patientgrupper utan misstänkta symtom för invasiv svampsjukdom på samma sätt som inom hematologin har inte varit aktuellt inom intensivvården. Övervakning med beta-D-glukan av högriskgrupper som patienter med komplikationer efter bukkirurgi, återkommande tarmläckage eller nekrotiserande pankreatit har visserligen föreslagits (4) men underlaget är bräckligt.

3.2 Diagnostik av candidainfektioner

Symtombilden vid candidemi är ofta ospecifik och består i feber med eller utan sepsisinducerad organpåverkan. Sekundärt till candidemin kan svampen slå sig ned i andra organ som öga, lunga, njurar, skelett, leder, hjärtklaffar och kärlproteser. *Candida* kan också orsaka en lokalt invasiv infektion i samtliga organ, oftast dock i buk eller pleura med utveckling av abscess/empyem, eventuellt med sekundär candidemi som följd. Den kliniska bilden vid dessa lokalt invasiva infektioner skiljer sig inte från den som orsakas av bakterier.

Misstanke om invasiv candidainfektion föreligger vid klinisk bild hos patient med riskfaktorer.

3.2.1 Odling och mikroskopi

Vid misstänkt invasiv candidainfektion har blododlingar en central plats. Mängden candidaorganismer i blodet är låg och ligger ofta i närheten av detektionsgränsen (5). Detta gör blododlingar känsliga för antimykotika, varför det är av synnerlig vikt att blododlingar tas innan behandling med antimykotika startar. Minst två blododlingar bör tas, en via central och en via perifer infart. Tidigare växt i den centralt tagna odlingen kan indikera en kateterassocierad candidemi, även om detta inte studerats på samma sätt som för koagulasnegativa stafylokocker (KNS) och ingen

dokumenterad tidsgräns har kunnat fastställas. I fall där svampinfektionen misstänks utgå från en intravaskulär kateter kan det ibland vara av värde att odla vid insticksstället eller på kateterspetsen om denna dras.

Vid lokalt invasiv infektion tas om möjligt odling via punktion för att undvika kontamination. Odling från kvarliggande drän är att betrakta som kolonisationsodling men positiv odling tagen inom 24 timmar efter att dränet lagts in indikerar infektion (6). Odlingar på punktat från sterila organ och peroperativa biopsier är viktiga och här kan även mikroskopering vara av stort värde. Växt av *Candida* i bronkoalveolärt lavage (BAL), annat luftvägssekret, sår och kateterurin är att betrakta som kolonisation och kolonisationsgraden utgör en riskfaktor för invasiv svampsjukdom. Positiv urinodling hos patient utan kateter kan däremot indikera invasiv candidasjukdom med nedslag i njuren.

3.2.2 Beta-D-glukan

Den relativt låga sensitiviteten hos odlingar vid candidemi gör att icke-odlingsbaserade tester är av stort värde, särskilt om de är kvantitativa. Beta-D-glukan (BDG) är en sådan test som har utvärderats i ett stort antal studier med varierande resultat. Metaanalyser visar en sensitivitet på 65–85% och specificitet på 75–85% (7–9). Candidemier orsakade av *C. albicans* har högre BDG-värden, vilket leder till högre sensitivitet, medan candidemier orsakade av *C. parapsilosis* har lägre än de som orsakas av andra candidaarter (10). Hos IVA-patienter med hög risk för invasiv candidainfektion är risken för falskt positiva resultat större, vilket leder till att specificiteten ligger i den lägre delen av metaanalysernas intervall (11, 12). Falskt positiva reaktioner kan orsakas av bukdukar, plasmaprodukter som albumin, koagulationsfaktorer och immunglobuliner (13,14). Bakteriemier och antibiotika har även rapporterats som orsak till falskt positivt resultat men är troligen av mindre betydelse (15). Hos IVA patienter tyder resultaten på att kolonisationsgraden spelar en väsentlig roll (11). Viktigt att också tänka på att förhöjda halter av BDG kan orsakas av andra BDG-innehållande svampar som t ex *Aspergillus*.

Vid BDG-koncentrationer >200–400 pg/ml förbättras specificiteten och det positiva prediktiva värdet utan att sensitiviteten försämras nämnvärt. Två konsekutiva positiva provresultat förbättrar specificitet och PPV ytterligare och ingår som en mykologisk parameter i begreppet sannolik candidainfektion som nyligen föreslagits av en grupp som arbetar med diagnosgradering på IVA (6). Det negativa prediktiva värdet av BDG-nivåer <80 pg/ml är högt, >90–95%, särskilt i situationer med låg eller måttlig risk (4) men uppges även kunna vara användbart i situationer med högre risk för invasiv svampsjukdom (11, 13, 16, 17). Observationsstudier som undersökt om negativt BDG kan användas som en indikator för utsättning av empirisk svampbehandling på IVA pekar mot att en biomarkörbaserad algoritm där BDG ingår troligen kan användas som guidning till utsättning av empirisk behandling (18–21). I en prospektiv studie på IVA där ca 100 patienter med empirisk svampbehandling pga misstänkt invasiv candidainfektion randomiserades till antingen biomarkörbaserad övervakning, inkluderande BDG och mannan/anti-mannan, eller ordinarie klinisk rutin fann man att svampbehandling kunde sättas ut tidigare i gruppen som övervakades med biomarkörer utan negativ påverkan på det kliniska utfallet (22). Studien var dock liten och internationella guidelines inväntar större prospektiva och randomiserade studier innan en biomarkör-baserad strategi för empirisk svampbehandling kan överföras till klinisk praxis (23–25).

3.2.3 Övriga metoder

3.2.3.1 PCR

Det föreligger en mängd publikationer, där olika PCR-metoders prestanda redovisas (26). Känsligheten verkar vara ungefär den samma som för odling men resultatet påverkas inte i samma grad av insatt antimykotikabehandling. Det stora problemet jämfört t ex med BDG-analysen är bristen på en standardiserad metod som kunnat testas i flera olika patientpopulationer. Många av metoderna visar på sjunkande specificitet hos koloniserade patienter (11, 26, 27), varför analys i blod troligen inte tillför så mycket i denna patientgrupp. PCR kan dock vara av värde vid misstänkt lokalt invasiv infektion, särskilt om patienten behandlats med antimykotika.

3.2.3.2 T2 Candida

T2Candida är en ny PCR-baserad metod för att snabbt påvisa *Candida* i helblod utan inkubation. Svar inklusive artbestämning erhålls redan efter 4–6 timmar. Metoden detekterar de fem vanligaste arterna, *C. albicans/tropicalis*, *C. parapsilosis* och *C. glabrata/krusei*. Och har utvärderats kliniskt i olika grupper, inklusive intensivvårdspatienter (27,28). Känsligheten är ungefär densamma som för blododlingar men synes vara högre om antimykotisk behandling redan har getts. Således torde T2Candida kunna bli ett tillskott och det snabba svaret utgör en väsentlig fördel. Metoden är från 2021 tillgänglig på Karolinska Universitetssjukhuset. En nackdel är dock den höga analyskostnaden.

3.2.3.3 Antigen- antikroppsanalys

Olika analyser av candidaantigen och antikroppar var för sig eller i kombination har studerats i ett antal studier med varierande resultat. En kommersiell metod med kombination av antigen och antikroppsbestämning (mannan/anti-mannan) har studerats mer (29) och rekommenderas i vissa internationella guidelines (13). Dokumentationen i olika patientgrupper är dock relativt begränsad. I Sverige finns i dagsläget metoden inte uppsatt för rutinbruk.

3.3 Diagnostik av aspergillusinfektioner

Infektioner med *Aspergillus* hos intensivvårdspatienter är i det stora flertalet av fallen lokaliserad till lungan men kan också ses i buken, CNS, endovaskulärt och enstaka gånger i sinus och hud (30). Diagnostiken vid aspergillusinfektioner försvåras av problemen med att skilja kolonisation från infektion och att den kliniska bilden hos patienter utanför patientgrupperna med hematologisk sjukdom eller som genomgått organtransplantation oftast saknar de aspergillustypiska radiologiska förändringarna (30). Kavernbildning och "air crescent sign" kan ses i en mindre del av fallen medan halofenomenet inte är att räkna med hos icke-neutropena patienter samtidigt som det i denna patientgrupp blir mer ospecifikt. I de flesta fall är bilden okaraktäristisk och förenlig med en komplicerad bakteriell infektion. Definitionen av aspergillusinfektion som gäller för kraftigt immunsupprimerade (31) är i de flesta fall inte tillämplig på intensivvårdspatienter då värdfaktor saknas. För närvarande pågår ett internationellt projekt med syfte att arbeta fram en användbar definition av aspergillusinfektioner inom intensivvården (6, 32). Misstanke om aspergillusinfektion föreligger hos intensivvårdspatienter med aspergillustypiska

radiologiska förändringar eller nekrotiska infektioner men bör också misstänkas hos patienter med riskfaktorer och en infektion som inte synes orsakas av bakterier.

3.3.1 Odling och mikroskopi

Prov för odling och mikroskopi utgör grundpelare vid diagnostik av aspergillusinfektion och bör alltid tas vid misstanke om aspergillusinfektion. Påvisande av *Aspergillus* i prov från sterila lokaler är diagnostiskt medan fynd från luftvägssekret och andra icke-sterila lokaler är mer svårtolkade. Växt av aspergillus i BAL-vätska tillsammans med fynd av hyfer i mikroskopin talar för att det också föreligger en djupare infektion jämfört med enbart positiv odling (33), vilket även validerats i en prospektiv multicenterstudie (34). Negativ odling och mikroskopi från luftvägssekret utesluter inte aspergillusinfektion.

3.3.2 Galaktomannan/aspergillusantigen

Sensitiviteten för galaktomannan (GM)-testen i serum är hos organtransplanterade och intensivvårdspatienter lägre än hos neutropena patienter (35–37). Däremot har GM-test i BAL hos icke-neutropena patienter en liknande sensitivitet och specificitet som hos neutropena, eventuellt på grund av att neutrofila granulocyter inte har samma möjlighet att eliminera frisatt galaktomannan (GM) i lungan som i blodet (37). Analys av GM i BAL-vätska har visats ha ett bra tilläggsvärde till odling och mikroskopi (38).

3.3.3 Beta-D-glukan

BDG stiger vid aspergillusinfektioner och kan vara ett komplement till diagnostiken (6, 32) men specifika studier som utvärderar BDG nivåer vid aspergillusinfektioner hos olika icke-neutropena intensivvårdspatienter saknas. Även om förhöjda värden i denna patientgrupp kan orsakas av många olika skäl (se ovan under candidainfektioner) kan analys av BDG vara av värde.

3.3.4 Övriga metoder

3.3.4.1 PCR

Studier som värderar PCR i aspergillusdiagnostiken hos intensivvårdspatienter är få men indikerar ett möjligt tilläggsvärde (39).

3.3.4.2 Antikroppsanalys

Bestämning av precipiterande antikroppar kan vara av värde vid aspergillom och vissa former av kronisk aspergillos men saknar värde vid de aspergillusinfektioner som förekommer hos intensivvårdspatienter.

3.4 Uppföljning av behandling

Vid candidemier bestäms behandlingstidens längd i första hand efter tidpunkten för första negativa odling, varför uppföljande blododlingar initialt minst varannan dag rekommenderas. I övriga fall följs kliniken och mykologisk uppföljning är sällan aktuell. I utvalda komplicerade fall kan uppföljning med BDG vara tänkbart men nivåerna efter insatt behandling sjunker endast långsamt (40), varför BDG i detta sammanhang inte kan betraktas som någon snabb markör.

3.5 Referenser

1. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 2015;373:1445-56.
2. Meersseman W, et al. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2007;45:205-16.
3. Koehler P, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis*. 2021;21:e149-e162.
4. Lamoth F, et al. Assessment of the Role of 1,3- β -D-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Adults. *Clin Infect Dis*. 2021;72(Suppl 2):S102-8.
5. Pfeiffer CD, et al. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2879-83.
6. Bassetti M, et al. EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Diseases: Summary of Activities of the Intensive Care Unit Working Group. *Clin Infect Dis*. 2021;72:S121-7.
7. Karageorgopoulos DE, et al. Beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;52:750–70.
8. 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 metaanalysis. *J Clin Microbiol* 2012;50:7–15.
9. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing Invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e01909-17.
10. Mikulska M, et al. Lower sensitivity of serum (1,3)- β -d-glucan for the diagnosis of candidaemia due to *Candida parapsilosis*. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:646.e5-8.
11. León C, et al. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Crit Care*. 2016;20:149.
12. Persat F, et al. Contribution of the (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1009-13.
13. Cuenca-Estrella M, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 (Suppl 7):9-18.
14. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*. 2013;56:1284-92.
15. Hammarström H, et al. How to interpret serum levels of beta-glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in adult high-risk hematology patients: optimal cut-off levels and confounding factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:917-25.
16. Posteraro B, et al. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. *Crit Care*. 2011;15:R249.
17. Cornely OA, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 (Suppl 7):19-37.
18. Nucci M, et al. Discontinuation of empirical antifungal therapy in ICU patients using 1,3-beta-d-glucan. *Antimicrob Chemother*. 2016;71:2628-33.
19. Prattes J, et al. Serum 1,3-beta-d-glucan for antifungal treatment stratification at the intensive care unit and the influence of surgery. *Mycoses*. 2014;57:679-86.
20. Martínez-Jiménez MC, et al. Combination of *Candida* biomarkers in patients receiving empirical antifungal therapy in a Spanish tertiary hospital: a potential role in reducing the duration of treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:3107-15.

21. Posteraro B, et al. (1,3)- β -d-Glucan-based antifungal treatment in critically ill adults at high risk of candidaemia: an observational study. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:2262-9.
22. Rouz  A, et al. Biomarker-based strategy for early discontinuation of empirical antifungal treatment in critically ill patients: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med.* 2017;43:1668-77.
23. Bassetti M, et al. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2017;43:1225-38.
24. Pappas PG, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62:e1-50.
25. Martin-Loeches I, et al. ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2019;45:789-805.
26. Nguyen MH, et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2012;54:1240-8.
27. Clancy CJ, et al. Detecting Infections Rapidly and Easily for Candidemia Trial, Part 2 (DIRECT2): A Prospective, Multicenter Study of the T2Candida Panel. *Clin Infect Dis.* 2018;66:1678-86.
28. Steuber TD, et al. Comparison of blood cultures versus T2 *Candida* Panel in management of candidemia at a large community hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40:997-1001.
29. Mikulska M, et al. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care.* 2010;14:R222.
30. Taccone FS, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care.* 2015;19:7.
31. Donnelly JP et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 2020;71:1367-76.
32. Bassetti M, et al. Developing definitions for invasive fungal diseases in critically ill adult patients in intensive care units. Protocol of the FUNgal infections Definitions in ICU patients (FUNDICU) project. *Mycoses.* 2019;62:310-9
33. Vandewoude KH, et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care.* 2006;10:R31
34. Blot SI, et al. A clinical algorithm to diagnose Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:56-64.
35. Kwak EJ, et al. Efficacy of galactomannan antigen in the *Platelia Aspergillus* enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004;42:435-8.
36. Husain S, et al. Prospective assessment of *Platelia Aspergillus* galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:796-802.
37. 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;177:27-34.
38. Schroeder M, et al. Does galactomannan testing increase diagnostic accuracy for IPA in the ICU? A prospective observational study. *Crit Care.* 2016;20:139.
39. Steinmann J, et al. Detection of *Aspergillus fumigatus* in blood samples from critically ill patients in intensive care units by use of the SeptiFast assay. *J Clin Microbiol* 2016;54:918-21.

40. Koo S, et al. Post-diagnostic kinetics of the (1 → 3)-β-D-glucan assay in invasive aspergillosis, invasive candidiasis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E122-7.

4 Provtagning på hematologen

Patienter som behandlas för hematologiska maligniteter löper en ökad risk för att drabbas av invasiva svampinfektioner (IFD, Invasive Fungal Disease). Risken varierar markant beroende på grunddiagnos och given behandling. För hela hematologipopulationen är risken att drabbas av en IFD i olika studier cirka 1–2% att jämföra med patienter som får induktionsbehandling med intensivcytostatika för behandling av akut leukemi där risken är 7–10 %. Frekvensen är betydligt lägre när det gäller enbart invasiv *Candida* (0,1% respektive 1%) (1–2). IFD är fortfarande förknippade med hög morbiditet och mortalitet och leder inte sällan till fördröjd behandling av grundsjukdomen. Olika strategier med antimykotika används idag för att förebygga och/eller behandla IFD. Dessa kan variera mellan primär profylax, sekundär profylax, empirisk behandling, pre-emptiv behandling eller behandling enbart vid påvisad infektion. Val av strategi beror på patientpopulation, riskfaktorer och lokala epidemiologiska data.

De vanligaste infektionerna är mögelsvampsorsakad pneumoni och/eller sinuit. Andra manifestationer såsom spridning av mögelsvampinfektion till CNS är inte ovanligt. Candidemi och hepato-splenisk *Candida* förekommer men är betydligt mindre vanliga.

Tidig utredning och diagnostik har avgörande betydelse för en adekvat handläggning av IFI hos patienter med hematologiska maligniteter eftersom infektionen kan progrediera snabbt och ge permanenta och/eller livshotande komplikationer. Det är oftast svårt att ställa en definitiv diagnos av IFD och ofta får man göra en sammanvägning av ett flertal faktorer som den kliniska bilden, riskfaktorer för att få IFD, radiologisk diagnostik (framförallt datortomografi av bihålor, torax och buk) och mikrobiologiska analyser (direktmikroskopi, odlingar, antigenest och DNA-analyser). De vanligaste kliniska tillstånden där utredning av IFD påbörjas är ihållande neutropen feber trots pågående adekvat antibakteriellbehandling, progress eller utebliven förbättring av pneumoni eller sinuit under adekvat antibakteriellbehandling, samt lunginfiltrat eller andra röntgenfynd med utseende som ger misstanke för svampinfektion. Utredning av IFD är också ofta aktuellt för patienter som planeras för allogen stamcellstransplantation och som bedöms vara högrisk för IFD eller tidigare haft IFD.

Valet av mikrobiologiska analyser beror på målet med utredningen, dvs screening, utredning av misstänkt infektion eller uppföljning av konstaterad infektion.

4.1 Screening/övervakning

Till skillnad från många center i Europa är screening av högriskpatienter med biomarkörer ovanligt i Sverige, sannolikt på grund av en kombination av att incidensen av aspergillusinfektion bedömts vara lägre än i Europa och användning av profylax till högrisk-patienter. Det saknas dock större prospektiva studier av incidensen av aspergillusinfektion hos hematologiska patienter i Sverige och retrospektiva sådana har gett blandade resultat. De biomarkörer som är vanligast att använda är galaktomannan (GM) och betaglukan. *Aspergillus* PCR har också använts i en del studier.

4.1.1 Galaktomannan (GM)

Screening med GM i serum kan användas som en strategi för tidig identifiering av aspergillusinfektion hos högriskpatienter. Tanken är att identifiera aspergillusinfektionen i ett tidigt skede, helst redan innan symtom har utvecklats, och därmed kunna sätta in behandling tidigt och så sätt minska mortalitet och morbiditet. I de större studier som har publicerats med detta förfarande har GM i serum tagits 2–3 gånger i veckan. Blir GM positivt, i form av ett värde $>0,7$ eller två $>0,5$, görs en datortomografi (DT) av thorax. Visar denna infiltrat görs en diagnostisk bronkoalveolärt lavage (BAL) varefter behandling påbörjas. Är DT thorax negativ fortsätter screeningen med GM och om resultatet är/blir positiv igen så börjar processen om med en ny DT thorax. Detta koncept introducerades mer brett i en studie 2005 där man fann att GM screening 3 ggr/vecka minskade empirisk svampbehandling utan att några aspergillusinfektioner missades (3). I en nyligen publicerad randomiserad studie med högrisk pediatrika neutropena patienter man såg att pre-emptiv behandling baserad på röntgen och antigendiagnostik var minst lika effektiv som empirisk behandling och ledde samtidigt till betydligt mindre användning av antimykotika. Det finns i nuläget inga stora randomiserade studier med vuxna patienter som har provat konceptet. En pågående multinationell studie förväntas bli klar inom kort.

GM-screening är främst testad under neutropeniperioderna för patienter som genomgår remissionssyftande behandling av akuta leukemier och som inte får mögelaktiv profylax. Om mögelaktiv profylax används så ger screening med GM ett oacceptabelt lågt positivt prediktivt värde (12%) på grund av låg pre-test sannolikhet, dvs en låg incidens av aspergillusinfektion. Detsamma gäller i andra situationer med låg incidens av aspergillusinfektion vilket gör att screening med GM i praktiken endast är aktuellt vid förväntad neutropeni >7 –10 dagar i frånvaro av mögelaktiv profylax.

4.1.2 Betaglukan

Studier som utvärderat betaglukan (BDG) som screening markör för IFD på hematologen är heterogena och pre-test probabiliteten för IFD i den specifika gruppen som provtagits har varit avgörande för utfallet av prediktiva värden. Generellt visar dessa studier att det negativa prediktiva värdet när BDG användes som screening markör 1–3 ggr per vecka var $>85\%$ (4–6) Det positivt prediktiva värdet var 44–89% vid screening av hematologpatienter med antibiotikarefraktär neutropen feber eller klinisk misstanke på IFD men endast 12–27% när screening utförts på symptomfria högriskpatienter (5–6) varför ett positivt BDG resultat vid denna typ av provtagningsförfarande är svårbedömt. I internationella konsensusdokument ges endast en svag rekommendation för användandet av BDG som screeningmarkör pga lågt positivt prediktivt värde för IFD i denna patientgrupp (6).

4.1.3 Aspergillus-PCR

Screening med *Aspergillus* PCR har främst studerats i kombination med GM och/eller BDG i observationella studier med varierande resultat.

4.2 Diagnostik av Candidainfektioner

Risken för invasiv candidainfektion hos hematologpatienter beror till största delen på val av profylaxstrategi. De flesta patienter i Sverige med hög risk för invasiv candidainfektion, såsom långvarig neutropeni eller allogen stamcellstransplantation, får systemisk candida-aktiv profylax, vanligen med flukonazol eller posakonazol, och har därmed generellt låg risk att drabbas av en infektion. Om flukonazol används kan infektioner med flukonazolresistenta arter som *C. glabrata* och *C. krusei* uppstå men är relativt ovanligt.

4.2.1 Odling

Precis som på IVA har blododlingar en viktig plats vid misstänkt invasiv candidainfektion hos hematologpatienter. Ofta står patienterna dock redan på någon form av antimykotika varför sensitiviteten för blododlingar riskerar att bli låg. Om behandling inte har getts är det viktigt att blododlingar tas innan behandling med antimykotika startar. Minst två blododlingar bör tas, en via central och en via perifer infart. Tidigare växt i den centralt tagna odlingen kan indikera en kateterassocierad candidemi även om detta inte studerats på samma sätt som för KNS och ingen dokumenterad tidsgräns har kunnat fastställas. Vid candidemier som uppstår under neutropeni är det dock vanligast att candidemin uppkommer via genomvandring av *Candida* från tarmen och inte representerar en CVK-infektion. Någon gång kan hepato-lienal *Candida* ses sekundärt till hematogen utsädd av *Candida* under neutropen fas. Diagnostiskt bör man i dessa fall försöka få till odling och mikroskopi (samt PCR) på biopsier. Växt av *Candida* i BAL eller annat luftvägssekret, sår eller kateterurin är att betrakta som kolonisation och det finns ingen entydig korrelation mellan kolonisationsgrad och risk för invasiv candidainfektion hos hematologpatienter.

4.2.2 Betaglukan

Diagnostiska studier med BDG hos patienter med hematologiska maligniteter kännetecknas av stora variationer i patientmaterial, studieupplägg, screeningstrategier och kriterier för definitionen av ett positivt prov. På grund av den stora heterogeniteten kunde Cochranegruppen i en nyligen publicerad genomgång 47 av studier, varav hälften inkluderade patienter med cancer och hematologiska maligniteter, inte komma fram till några slutsatser eller rekommendationer avseende provtagning med BDG (7). I en annan nyligen publicerad genomgång av samtliga studier och metaanalyser kunde man dock redovisa robusta data som stödjer BDG:s plats i diagnostiken (8). BDG kan användas för påvisande av *Aspergillus*, *Candida* och några icke-aspergillus mögelsvampar såsom *Fusarium*, dock inte vid mukormykos eller cryptokockos. Screening av patienter under neutropeniperioden och andra högrisk-situationer med upprepade BDG mätningar (en eller två gånger per vecka) kan övervägas men på grund av den begränsade känsligheten bör BDG-testning inte användas för att utesluta IFD hos hematologi-patienter med tanke på den relativt höga prevalensen av IFD hos denna population. I internationella konsensusdokument anser man att BDG bör användas vid diagnostik av misstänkt IFD hos hematologiska riskpatienter i kombination med andra mikrobiologiska diagnostiska metoder och DT-undersökning (8-9).

4.2.3 PCR

4.2.3.1 *Candida* PCR

Candida PCR är främst aktuellt på prov från sterila lokaler som biopsier, punktat och CSV. Erfarenheter av PCR i blod/serum/plasma på denna patientgrupp är begränsad.

4.2.3.2 *T2Candida*

Data avseende nyttan med T2Candida vid hematologisk maligniteter är begränsad och bör för närvarande begränsas till studier.

4.3 Diagnostik av aspergillusinfektion

4.3.1 Mikroskopi/odling

Prov för odling och mikroskopi utgör grundpelare vid diagnostik av mögelinfektion inkluderande aspergillusinfektion och bör alltid tas vid misstanke om invasiv mögelinfektion. Påvisande av *Aspergillus* spp i prov från sterila lokaler är diagnostiskt medan fynd från luftvägssekret och andra icke-sterila lokaler är mer svårtolkade. Växt av *Aspergillus* i BAL-vätska tillsammans med fynd av hyfer i mikroskopin talar starkt emot kontamination och talar för att det föreligger en djupare infektion jämfört med enbart positiv odling (10). Negativ odling och mikroskopi från luftvägssekret utesluter inte aspergillusinfektion. Majoriteten av patienter med hematologiska maligniteter kan optimeras med transfusioner och korrigeringar av koagulationsrubbingar inför en invasiv utredning med till exempel BAL, nålaspirat eller biopsi. Det är viktigt att utredningen utförs i god tid innan patientens tillstånd försämras med till exempel respiratorisk insufficiens. För biopsitagning från lunga hos denna patientgrupp behöver man noga överväga risker med allvarliga komplikationer mot nyttan av diagnostiken.

4.3.2 Galaktomannan

4.3.2.1 *Galaktomannan* i serum

Sensitivitet för GM i serum hos immunsupprimerade patienter har visats ligga kring 82% och specificiteten kring 81% (vid cut-off värdeindex 0,5) (11). Sensitiviteten verkar dock bero på graden av neutropeni, där man funnit högre GM värden i serum vid aspergillos (bevisad eller sannolik) om neutropeni förelegat (12). Möjliga förklaringar inkluderar att frånvaro av vita blodkroppar gör att aspergillusinfektionen är svårare att avgränsa och växer angioinvasivt vilket leder till mer GM frisättning till blodbanan samt minskad fagocytos av det GM som når blodbanan.

GM i serum tas alltid vid utredning av misstänkt svampinfektion, vanligen långdragen neutropen feber och/eller oklara lunginfiltrat hos immunsupprimerade patienter. GM i serum kan fungera diagnostiskt hos neutropena symtomatiska patienter men sensitiviteten minskar påtagligt om mögelaktiv profylax har getts (13). Vid tolkningen av GM är det viktigt att tänka på att frisättning av GM vid invasiv aspergillusinfektion är en dynamisk process. En tydlig ökning av GM kan därmed peka mot tidig aspergillusinfektion även om det faktiska värdet ligger under eller marginellt över cut-off nivån (0,5 för serum). Enstaka höga värden (>3) och flera positiva värden oavsett nivå talar starkt för

invasiv aspergillusinfektion, särskilt om faktorer som är kända att ge förhöjd GM-nivå i serum inte föreligger. Omvänt har enstaka, inte reproducerbara, värden strax över 0,5 tveksam signifikans.

En icke-infektiös orsak till förhöjd nivå av GM i serum, och därmed orsak till "falskt positivt" prov, är translokation av GM genom tarmen in i blodet via GM i föda och näringsprodukter. Infektioner med *Fusarium* spp är ofta GM-positiva eftersom de också har GM i cellväggen. I enstaka fall kan *Penicillium* spp och *Histoplasma* spp ge upphov till korsreaktion. Tidigare var betalaktamantibiotika, främst piperacillin/tazobaktam, en viktig felkälla men detta verkar nu inte längre vara ett problem.

4.3.2.2 Galaktomannan i bronkoalveolärt lavage (BAL)

GM skall alltid tas när en diagnostik BAL genomförs på immunsupprimerade patienter, inklusive de med hematologiska sjukdomar. Sensitiviteten och specificitet för GM vid diagnostisk BAL hos patienter med hematologisk malignitet har visats vara god. I en metaanalys av 16 studier inkluderande 783 patienter fann man en hög sensitivitet på 92% men med relativt stort konfidensintervall (95% CI 48%–99%), och en mycket hög specificitet, 98% med relativt litet konfidensintervall (95% CI 78%–100%) för bevisad eller sannolik invasiv lungaspergillos (14). Det har gjorts många studier för att finna en optimal cut-off nivå hos hematologiska patienter och man har funnit att värden över 1 talar för infektion och att värden över 3 har högt positivt prediktivt värde medan värden under 0,5 har ett högt negativt prediktivt värde. Detta avspeglas i nyligen uppdaterade internationella definitioner där ett värde >1,0 i BAL (eller > 0,8 om även positiv i plasma med ett värde > 0,7) definieras som signifikant (15). Det finns en osäkerhet kring betydelsen av värden mellan 0,5 och 1,0 och resultatet måste vägas mot andra viktiga faktorer såsom graden av immunsuppression (långvarig neutropeni och/eller uttalad T-cellssuppression), andra mykologiska fynd och den kliniska bilden (typiska DT-fynd, pågående mögelaktiv behandling, förekomst av annan möjlig förklaring).

En viktig orsak till falskt negativa resultat har visats vara mögelaktiv behandling vid tidpunkten för BAL. I den kliniska vardagen är insättning av empirisk behandling i väntan på BAL ett vanligt scenario varför det är viktigt att komma ihåg att GM nivåerna sjunker signifikant redan efter två dygns behandling. En annan möjlig felkälla är variationer i spädningen av BAL-vätskan. Många studier är gjorda på BAL-vätska från så kallade "mini-BAL" eller "infektions-BAL" där endast mindre mängd vätska använts för sköljning. Om en mer konventionell BAL görs, där flera hundra milliliter vätska kan användas, finns det risk för utspädning av GM och "falskt" lågt värde. Vid perifera infiltrat eller om BAL görs i annan lob än det där infiltratet sitter så kan det också finnas risk för lågt GM.

Falskt positiva resultat kan orsakas av korsreaktion med andra mögelsvampar, främst *Fusarium* spp. Hos patienter med hematologiska maligniteter är det oklart om kolonisation med *Aspergillus* kan ge upphov till positivt GM.

4.3.2.3 Galaktomannan i cerebrospinalvätska (CSV)

Värdet av GM analys i CSV är inte kartlagt i några välkontrollerade stora studier men provet anses ha mycket stort värde vid diagnos av cerebral aspergillusinfektion där GM i princip alltid är positivt. Samtidigt har man rapporterat att patienter med invasiva svampinfektioner som inte engagerar hjärnan nästan alltid har ett negativt CSV prov. Publicerade studier tyder således på en hög

specificitet och sensitivitet varför analys av GM i CSV rekommenderas starkt vid utredning av misstänkt cerebral aspergillusinfektion (16).

4.3.3 Betaglukan

Det saknas specifika data avseende användbarheten av BDG för att diagnostisera invasiva aspergillusinfektioner hos hematologpatienter. BDG ingår inte idag i definitionen av invasiv svampinfektion men provet kan vara av värde vid utredning av hematologpatienter för diagnos av invasiv aspergillos, *Candida* och några icke-aspergillus mögelsvampar såsom *Fusarium*, dock inte vid mukormykos eller cryptokockos. Cochranegruppen reviderade nyligen 47 studier varav hälften inkluderade patienter med cancer och hematologiska maligniteter men kunde inte komma fram till några slutsatser eller rekommendationer på grund av för stor heterogenitet (7). I en nyligen publicerad genomgång av samtliga studier och metaanalyser kunde man redovisa robusta data som stödjer provets plats vid diagnostiken (8). I internationella konsensusdokument anser man att BDG bör användas vid diagnostik av misstänkt IFD hos hematologiska riskpatienter i kombination med andra mikrobiologiska diagnostiska metoder och DT-undersökning (17). Ett positivt prov motiverar dels omtagning av provet för att öka det positiva prediktiva värdet, dels initiering av svamputredning. Provet har begränsad värde hos patienter som får intravenös immunoglobulinbehandling vilket ger falskt positiva BDG resultat.

4.3.4 PCR

Vid den senaste och största studiegenomgången som utfördes av Cochrane för att belysa metodens roll vid *Aspergillus* screening/diagnostik inkluderades 29 studier från år 2000–2018 (18). Majoriteten av inkluderade patienter i dessa studier var patienter behandlade för hematologiska maligniteter där median prevalensen av IFD var 11%. Sensitiviteten och specificiteten var 79 % och 80 % för ett prov, och 60 % och 95 % för två konsekutiva prov med positiv resultat. Författarna konkluderade att om man utreder 100 högriskpatienter med PCR, kommer man att missa tre fall med *Aspergillus* samtidigt som kommer att behandla eller vidare utreda 17 patienter i onödan. Liksom antigenest, har PCR fördelen med en pålitlig negativ prediktivt värde dock med större variation beroende på metodik. I Sverige analyseras PCR för *Aspergillus* enbart på Karolinska.

4.4 Mögelsvampsinfektioner andra än aspergillus

De invasiva mögelsvampsinfektioner som är aktuella förutom *Aspergillus* är främst infektioner med *Mucorales* och *Fusarium* spp. Exempel på kliniska situationer när en icke-aspergillusinfektion kan misstänkas är genombrott på aspergillus-aktiv profylax (posakonazol, vorikonazol, echinocandiner), DT-thorax fynd av reversed (inversed) halo-sign, negativt BDG och GM i blod/plasma samt när aspergillusdiagnostiken är negativ i BAL trots mögelmisstänkta röntgenförändringar i lunga/or.

4.4.1 Sekvensering svamp (ITS)

Eftersom odling har låg känslighet rekommenderas att alla invasiva prover som biopsier och punktat skickas för svampsekvensering av ITS samt att BAL skickas för sekvensering om icke-aspergillus

infektion misstänks. I nuläget finns det bara en "in-house" metod i Sverige för sekvensiering av ribosomalt svamp DNA, på Karolinska Universitetssjukhuset. Det saknas i nuläget en kommersiell PCR metod för diagnostik av mögelsvampsinfektioner annat än *Aspergillus*, men att PCR har en stark potential har resultaten med en nedlagt kommersiell metod, IRIDICA, tydligt visat. Troligen kommer det inom en snar framtid, i samband med övergång till NGS-teknik, finnas PCR uppsatt på de flesta universitetssjukhusen.

4.4.2 Pneumocystis

Risken för pneumocystispneumoni beror till största delen på graden av T-cellspåverkan. Störst risk har patienter med T-cells lymfom och efter allogen stamcellstransplantation. I allmänhet ges profylax när incidensen närmar sig 5%, och majoriteten av alla hematologpatienter med risk för pneumocystispneumoni får adekvat profylax. Genombrottsinfektion vid trimsulfaproylax är mycket ovanligt men förekommer vid profylax med pentamidinhalationer. Viktigt att tänka på är att pneumocystispneumoni hos hematologpatienter kan förlöpa snabbt och mer likna en vanlig bakteriell infektion är den typiska långdragna infektionsbild som ses vid pneumocystispneumoni som hos HIV-och reumatologpatienter

4.4.2.1 PCR och immunofluorescens

PCR-svaret måste vägas mot provtagningsmaterialet (BAL >trachealsekret>sputum>munsköljvätska) och tid efter eventuell insättning av behandling. Pneumocystis finns i störst mängd i lungalveolerna varför BAL är det bästa provet och negativ PCR i BAL utesluter i princip pneumocystispneumoni. Positiv immunofluorescens (IF) var en gång golden standard för att sätta diagnos pneumocystispneumoni men IF görs nu bara på tre ställen i Sverige, Folkhälsomyndigheten, Karolinska Universitetssjukhuset och Norrlands Universitetssjukhus. PCR-metoden skiljer sig mellan laboratorerna i Sverige och några svarar bara ut positivt/negativt medan några rapporterar någon form av uppskattning av DNA-mängden. Anges ingen uppskattning av DNA-mängden går det inte att bedöma om det handlar om kolonisering eller infektion, svaret får då bedömas i relation till klinik, röntgenbild och BDG-nivå (se nedan).

Några laboratorier svara ut en semi-kvantitativ uppskattning av mängden DNA i provet. Vid en genomgång av provtagning på hematologiska patienter på Karolinska Universitetssjukhuset 2012–2017 var 87% av proverna med "hög mängd DNA" även positiva i IF och uppfyllde därmed definition för pneumocystispneumoni (Blennow, personlig kommunikation). Omvänt uppvisade patienter med låg mängd DNA sällan kliniska tecken på pneumocystispneumoni (88%). Däremot var intermediär mängd svårbedömt och kunde stå både för kolonisation och klinisk infektion. Ett annat frågetecken vid tolkning av PCR-svaren är hur insatt behandling eller profylax påverkar svaren. Gamla studier har visat att IF kan vara positivt länge efter insatt behandling men det finns inga data för hur länge PCR-positivitet kvarstår.

4.4.2.2 Betaglukan

Studier på BDG för diagnostik av pneumocystispneumoni hos hematologpatienter visar generellt hög diagnostisk prestanda med sensitivitet på 90–92% och specificitet på 84–89%. I internationella rekommendationer från European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-5) rekommenderas BDG som kompletterande diagnostisk markör för pneumocystispneumoni och som metod för att utesluta PCP vid negativt resultat (bevisgradering A-II) (19) .

4.5 Uppföljning av behandling

4.5.1 Mikroskopi/odling

Det är ofta svårt att nå etologisk diagnos för icke-aspergillus mögelsvampsinfektioner. Den mikrobiologiska diagnostiken bygger i första hand på mikroskopi och odling av luftvägsprover och/eller biopsier. Undantaget är *Fusarium* som även kan växa i blododling. Generellt är sensitivitet för odling relativt låg och speciellt infektioner med *Mucorales* kan bli negativ i odling även vid positiv mikroskopi. Bäst diagnostiskt utbyte brukar det bli vid biopsier, främst av invasiva infektioner i sinus orsakade av *Mucorales*. Vid mögelmisstänkta röntgenförändringar av lungorna skall alltid BAL utföras för mikroskopi och odling.

4.5.2 Galaktomannan

Galaktomannan (GM) har i studier förslagits som uppföljningsprov för att monitorera svar på given antimykotika eftersom koncentrationen förväntas minska vid minskad infektionsbörda. Patienter där GM nivåerna inte sjunker eller stiger efter någon veckas behandling har mycket dålig prognos. Samtidigt är rapporterade studieresultat inte enhetliga och sjunkande värden kan även ses vid sviktande behandling. I en studiegenomgång kunde man identifiera nio kliniska studier och en meta-analys (totalt ca 900 patienter studerade där majoriteten hade hematologiska sjukdom) där nytta av provet vid monitoreringen av behandlingssvar studerats. Gemensamt tydde dessa studier till att stigande värden talar för terapivikt och är relaterad till hög mortalitet. Samtidigt saknas robusta jämförande prospektiva interventions-studier och någon tydlig brytpunkt/värde för behandlingssvikt finns inte. Därför beslut gällande fortsatt behandling med antimykotika kan inte baseras på GM-värden och rutinmonitorering efter insatt behandling rekommenderas inte (20–21).

4.5.3 Betaglukan

Många studier har undersökt om BDG kan användas för att följa behandlingseffekten vid IFD, men resultaten är heterogena. I några observationsstudier där man följt BDG nivåer under behandlingsförloppet vid invasiv candidainfektion respektive blandade IFD har man sett att en nedåtgående trend av BDG korrelerade med positivt behandlingssvar medan stigande BDG nivåer korrelerade med behandlingssvikt. Andra studier har inte kunnat visa någon korrelation mellan BDG nivåer och behandlingseffekt vid IFD (22). Några studier har specifikt undersökt BDG nivåer vid behandling av *Pneumocystis* pneumoni och här har man inte kunnat se någon korrelation till behandlingssvar (23).

Flera studier visar på att BDG, trots sjunkande nivåer, kan kvarstå positivt långt efter klinisk utläkning av svampinfektionen (ibland flera månader).

4.6 Referenser

1. Gamaletsou et al. A prospective, cohort, multicentre study of candidaemia in hospitalized adult patients with haematological malignancies. *Clin Microb Infect.* 2014.
2. Cornely et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Eng J Med.* 2007.
3. Maertens J et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *CID.* 2015.
4. Hammarstrom et al. Prospective evaluation of a combination of fungal biomarkers for the diagnosis of invasive fungal disease in high-risk haematology patients. *Mycoses.* 2018.
5. Furfaro et al. Performance of serum (1,3)- β -d-glucan screening for the diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with haematological malignancies. *Mycoses.* 2018.
6. Ullmann et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microb Infect.* 2018.
7. Sandra K W et al. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan testing for the detection of invasive fungal infections in immunocompromised or critically ill people. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020.
8. F Lamoth et al. Assessment of the Role of 1,3- β -d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Adults. *Clin Infect Dis.* 2021.
9. Marchetti 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.
10. Vandewoude et al. Clinical relevance of Aspergillus isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care.* 2006.
11. Leeflang et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane.* 2015.
12. Cordonnier et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microb Infect.* 2009.
13. Durate et al. Serum galactomannan-based early detection of invasive aspergillosis in hematology patients receiving effective antimold prophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2014.
14. Heng et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2015.
15. Donnelly et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *CID.* 2020.
16. Chong et al. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microb.* 2016.
17. Ullmann et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet infect dis.* 2019.

18. Cruciani et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane*. 2019.
19. Alanio et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemo*. 2016.
20. Sehgal et al. Monitoring treatment response in chronic pulmonary aspergillosis: role of clinical, spirometric and immunological markers. *Clin Microbiol infect*. 2019.
21. Kovanda et al. Prognostic value of galactomannan: current evidence for monitoring response to antifungal therapy in patients with invasive aspergillosis. *J Phramacokinet Pharmacodyn*. 2017.
22. Koo et al. Diagnostic performance of the (1-->3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *CID*. 2009.
23. Held et al. β -d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2011.

5 Koncentrationsbestämning av antimykotika

5.1 Inledning

Koncentrationsbestämningar av läkemedel i blod, serum eller plasma kan vara av stort värde som vägledning för dosering, underförstått att exponeringsnivån på samma dos varierar på ett svåröversägbart sätt mellan olika patienter och behandlingssituationer. Frågeställningen kan gälla om individuell exponeringsnivå är tillräcklig för god behandlingseffekt liksom användas för dosjustering vid biverkningsproblematik eller läkemedelsinteraktioner. För ett flertal antimykotika varierar farmakokinetiken avsevärt mellan individer beroende på skillnader i antingen peroralt upptag, levermetabolism eller njurfiltration. Som framgår nedan kan det alltså för specifika preparat och patientgrupper finnas god anledning att analysera nivån i plasma/serum. Detta görs numera med högkänslig och specifik metodik baserad på vätskekromatografi i kombination med tandem masspektrometrisk detektion (LC-MS/MS) på Klinisk Farmakologi, Medicinsk Diagnostik Karolinska (MDK/KUL).

5.2 Flucytosin

Flucytosin (5-fluorocytosin, 5-FC) associeras med en koncentrationsberoende risk för benmärgsdepression liksom levertoxicitet, och man har definierat ett tröskelvärde på 100 µg/mL för maximala serumkoncentrationer som inte bör överskridas (enstaka höga koncentrationer sannolikt av mindre betydelse) (1,2,31). Toppkoncentrationer fångas i prover tagna 60 min efter avslutad infusion (två timmar vid eventuell licensbehandling peroralt).

Flucytosin omsätts i mindre utsträckning till cytotoxiskt fluorouracil (5-FU), vilket i sin tur inaktiveras av det polymorfa enzymet dihydropyrimidin dehydrogenas som kodas av *DPYD*-genen (3). Frågan om *DPYD*-typning behövs inför behandling med 5-FU, capecitabin eller flucytosin - i syfte att identifiera patienter med kraftigt förhöjd risk för benmärgstoxicitet – har nyligen utretts av European Medicines Agency. Till skillnad mot 5-FU och capecitabin rekommenderas inte *DPYD* genotypning *inför* behandling med flucytosin bla eftersom det riskerar fördröja behandlingsstart (svarstid genotypning en vecka). Analysen bedöms dock vara av värde för patienter som drabbats av benmärgstoxicitet under pågående behandling med flucytosin. Genotypning av *DPYD* erbjuds idag på universitetssjukhuslaboratorierna i Uppsala, Stockholm och Göteborg.

Flucytosin elimineras huvudsakligen renalt (halveringstid 3–4 tim vid normal njurfunktion) och används regelmässigt i kombination med erkänt nefrotoxiskt amfotericin B. Därför finns det en stark indikation för koncentrationsbestämning av flucytosin under behandling eftersom exponeringsnivån snabbt förändras vid försämrad njurfunktion. Vanligen använd startdos är 25–50 mg/kg iv x 4 för njurfriska, men detta justeras alltså vid sänkt njurfunktion (3). I Sverige finns endast den intravenösa beredningsformen registrerad, medan peroral behandling förekommer i andra länder.

Det har även föreslagits att dalvärdet på plasmakoncentrationen, dvs inför ny dos, kan relateras till antimykotisk effekt, men detta är inte särskilt väl underbyggt med kliniska data (5). För dalvärden rekommenderas dock att plasmakoncentrationen överstiger 25 µg/mL pga risken för subterapeutisk effekt därunder, liksom risken för resistensutveckling (3). Vid klinisk dosering är det relativt vanligt att man finner dalkoncentrationer <25 µg/mL liksom toppvärden > 100 µg/mL (2).

5.3 Amfotericin B

Det råder enighet i litteraturen att koncentrationsbestämningar av amfotericin B inte rekommenderas i klinisk praxis. Farmakokinetiken i plasma/serum anses relativt förutsägbar men saknar uppenbart samband med individuell behandlingseffekt och biverkningsrisk (5, 6, 7, 32).

5.4 Triazoler (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, isavuconazol)

Triazoler utövar sin antimykotiska effekt genom att blockera ett svampspecifikt cytokrom P450 (CYP) vilket leder till minskad bildning av ergosterol och instabilt cellmembran i svampen. Alla triazoler har samtidigt en hög potential för kliniskt betydelsefulla läkemedelsinteraktioner, eftersom leverns läkemedelsomsättande CYP-enzym kan hämmas av triazolerna i olika utsträckning. En rad triazoler har utvecklats för kliniskt bruk och här nedanför diskuteras just de triazoler som för närvarande är registrerade för systemiskt bruk vid invasiva mykoser.

5.4.1 Flukonazol

Flukonazol har vanligen en relativt förutsägbar farmakokinetik med hög peroral biotillgänglighet och god vävnadsdistribution (8,33). Koncentrationer i CNS avspeglar plasma (10). Flukonazol elimineras huvudsakligen renalt i oförändrad form. Över hela dosintervallet (50 - 800 mg) finns ett proportionellt förhållande mellan dos och uppnådd exponeringsnivå i plasma (8). Dosjustering rekommenderas vid nedsatt njurfunktion men preparatet förefaller vältolererat. Ett särskilt observandum vad gäller kombinationen med andra läkemedel är dock att flukonazol associeras med QT-förlängning (8).

Flukonazol har en omfattande dokumentation gällande klinisk användning som även inkluderar särskilda riskgrupper, tex barn i alla åldrar ned till neonatalperioden där förvisso varierande njurfunktionsmognad komplicerar individuell dosering (9). Halveringstiden är drygt 30 timmar vid normal njurfunktion och ett dostillfälle per dygn är ofta tillräckligt för att säkerställa terapeutisk effekt. Rekommenderad dosering vid invasiv candidainfektion är 400 mg/d till vuxna, eller 6 mg/kg - vilket även gäller för barn (förutsatt att man tar hänsyn till omogen njurfunktion i neonatalperioden). Ibland förekommer högre dygnsdoser (800 mg/d vuxna eller 12 mg/kg barn) vid särskilt allvarliga tillstånd. Vid andra behandlingsindikationer än invasiv *Candida*, tex kryptokockmeningit, rekommenderas vanligen lägre doser men laddningsdos tillämpas regelmässigt pga substansens relativt långa halveringstid i plasma (8). Lägre systemiska nivåer av flukonazol noteras under samtidig behandling med rifampicin liksom under kontinuerlig njurersättningsbehandling (CRRT, framförallt CVVHD). Det finns en relativt omfattande farmakokinetisk interaktionsproblematik med andra läkemedel genom att flukonazol hämmar metabolismen genom framförallt CYP2C9 och CYP2C19, men även CYP3A4 (8).

Data från experimentella djurmodeller på candidemier liksom retrospektiva data från mindre patientstudier indikerar att den genomsnittliga exponeringsnivån över dosintervallet, eller

summaexponeringen över dygnet (AUC), i förhållande till svampens MIC (AUC/MIC) är bäst korrelerat till antimykotisk effekt. Ett dalvärde som överskrider MIC är i princip liktydigt med ett AUC/MIC på > 25, vilket har pekats ut som ett målvärde för exponeringsnivån (6,7,10) men även ännu högre kvoter och motsvarande högre dalvärden har diskuterats (34).

Rutinmässig koncentrationsbestämning av flukonazol rekommenderas inte (32). Analysen har istället efterfrågats vid särskilt svårbedömda dosval, tex för patienter inom intensivvården med varierande eller intensiv elimineringskapacitet tex förklarad av kontinuerlig njurersättningsterapi, CRRT (4, 6, 11). Provtagning görs inför ny dos, eller vid uppskattning av AUC; före dos kombinerat med 1, 2, 4 timmar efter ny dos, och helst vid steady state (vanligen minst en vecka efter nyinsättning eller senaste dosändring). Rapporterade dalvärden hos njurfriska vid upprepad dosering är 13 - 24 µg/mL vid 400 mg/d medan AUC (24 h) på samma dos uppskattas till ca 300 - 450 µg x h/mL vid normal njurfunktion (11, 12).

5.4.2 Itrakonazol

Itrakonazol har en varierande peroral biotillgänglighet och förknippas med relativt hög förekomst av biverkningar, framförallt gastrointestinala besvär, leverpåverkan och hudreaktioner. Substansen används alltmer sällan. Inget tydligt samband har observerats mellan exponeringsnivå och biverkningsrisk, men däremot mellan uppnådd serumkoncentration och antimykotisk effekt.

Rekommenderad underhållsdos vid invasiv aspergillos är 200 mg x 2 per os kapsel till vuxna, Av produktresumén framgår att det saknas tillräcklig information för behandling av barn (13) men amerikanska FDA har godkänt en barndos motsvarande 3 - 5 mg/kg/d.

Upptaget av itrakonazol från kapselformuleringen varierar stort och är beroende av surt pH, så samtidig behandling med antacida eller syrasekretionshämmare minskar den perorala biotillgängligheten (5, 6, 13).

Man har alltså noterat stor interindividuell variation i plasmakoncentration (36). Itrakonazol metaboliseras fullständigt (framförallt till aktivt hydroxi-itrakonazol), men ändå relativt långsamt genom CYP3A4/5. Itrakonazol ger upphov till många läkemedelsinteraktioner genom kraftig hämning av flera CYP-enzym (inklusive CYP3A4/5) liksom läkemedelstransportören P-glykoprotein vilket sammantaget ofta leder till förhöjda systemiska koncentrationer av andra läkemedel. Enzyminducerande läkemedel som tex vissa antiepileptika kan däremot sänka koncentrationen av itrakonazol (4, 13).

Sammanfattningsvis finns det starka motiv för rutinmässig koncentrationsmätning av itrakonazol, liksom att detta ofta behöver upprepas under pågående behandling (5, 6, 7, 32). Provtagning görs före ny dos vid steady state vilket brukar anses gälla efter 5 - 7 d behandling. Avseende målområde för plasmakoncentrationen kompliceras litteraturen av olika fynd som ofta har att göra med mätmetod och att man inledningsvis använde mikrobiologiska metoder men numera har gått över till LC-MS/MS. Den senare tekniken fokuserar oftast på modersubstansen och att dalvärden för itrakonazol på minst 0,5 µg/mL förknippas med bättre behandlingsutfall (32) men en högre gräns på 1 µg/mL har också diskuterats (4, 32, 35). I analysmetoden ingår även kvantifiering av aktiv hydroxi-metabolit, även om tillhörande bedömningsgrund är oklar.

5.4.3 Vorikonazol

Vorikonazol påminner strukturellt om flukonazol och preparaten har även vissa farmakokinetiska likheter som god peroral biotillgänglighet och vävnadsdistribution, inklusive CNS. Men vorikonazol elimineras genom lever- och tarmmetabolism vars kapacitet varierar stort mellan olika patienter, delvis pga genetisk polymorfism i inblandade enzymvägar, framförallt CYP2C19 (16, 17, 18). Dessutom uppvisar vorikonazol en icke-linjär kinetik, åtminstone bland vuxna patienter, vilket innebär att dosjusteringar kan ge en oproportionerligt stor påverkan på plasmakoncentrationen (14, 15).

Man insåg tidigt att olika patienter uppnår mycket varierande koncentrationer på den rekommenderade standarddosen (200 mg x 2 eller 4 mg/kg x 2 för patienter med kroppsvikt över 40 kg) (20, 23). Flera rapporter beskrev att förekomsten av patienter med låga eller närmast omätbara nivåer av vorikonazol var överraskande hög (ca 10 - 15%) vilket också förknippades med ökad risk för terapivikt (20, 21, 22). I produktresumén förespråkas nu därför 50% ökad dygnsdos vid tecken på bristande effekt vilket skulle förväntas ge 2,5 ggr högre plasmanivåer (OBS mättnadskinetik hos vuxna) (15). Likaså har dosering för barn (2 - 12 år) höjts till 8 mg/kg iv (9 mg/kg per os). Pediatriska patienter når högre exponeringsnivå efter iv dosering jämfört per os dosering (15) vilket tolkas som att barn har ökad första passage-effekt jämfört vuxna vilket möjligen förklaras av betydande metabolism i tarmväggen vilket i sin tur skulle kunna 'skydda' mot mättnadskinetik.

En rad systematiska litteraturgenomgångar har allt bättre ringat in ett terapeutiskt målområde för god behandlingseffekt mot olika patogener, balanserat mot risken för koncentrationsberoende biverkningar (23, 28). Bland de senare noteras i synnerhet neuropsykiatriska biverkningar som tex synstörningar (framförallt timmarna efter dos) och hallucinationer (14, 23) liksom leverpåverkan.

Den nu etablerade rekommendationen är att nå koncentrationer innan ny dos motsvarande $> 1 \mu\text{g/mL}$ i plasma för att optimera effekten mot framförallt *Aspergillus* (19, 20, 23). I en relativt ny metaanalys gav dalvärden $> 1 \mu\text{g/mL}$ ett OR på 2 för lyckad behandling jämfört lägre koncentrationer (38). I kritiska fall med svårt sjuka patienter har ännu högre målområde ($> 2 \mu\text{g/mL}$) föreslagits (39). Aktuella sammanställningar ger även stöd för att koncentrationer överskridande 5 - 6 $\mu\text{g/mL}$ associeras med ökad risk för biverkningar som CNS-toxicitet eller leverpåverkan (4, 7, 14, 38) men sambandet mellan uppmätt plasmakoncentration och biverkningar var inte lika tydligt som kopplingen mellan plasmakoncentration och behandlingseffekt (38).

Problematiken med läkemedelsinteraktioner är relativt bred för vorikonazol, innefattande både ett flertal enzymhämmande- eller enzyminducerande läkemedel som påverkar vorikonazol-nivåerna, och att många andra läkemedel kan stiga i koncentration om vorikonazol hämmar omsättningen av dessa (15).

Eftersom vorikonazol helt elimineras genom levermetabolism förutses inga omedelbara problem vid behandling av patienter med njursvikt förutom det viktiga faktum att bärarmolekylen i den intravenösa beredningsformen (cyklodextrin) ackumulerar, vilket har befarats kunna ge toxiska effekter (14, 15). Vid terminal njursvikt har man förstått att levermetabolismen av läkemedel kan försämrats (det finns framförallt data på att CYP3A tappar i aktivitet) (40) men om den metabola elimineringskapaciteten för just vorikonazol påverkas av uremi är ännu oklart. Vid leverinsufficiens

krävs stor försiktighet i doseringen och koncentrationsbestämningar blir särskilt användbart. Vid uttalad leversvikt (Child C) saknas dokumentation och exempelvis är risken för encefalopati inte studerad.

Vid en svensk sammanställning på LäkeMedelsverket 2011 listades en rad specifika provtagningsindikationer för koncentrationsbestämning av vorikonazol (a) tveksam klinisk effekt (b) signifikant leverpåverkan (c) neuropsykiatriska biverkningar (d) övergång från intravenös till peroral behandling vid standarddosering i de fall som medför stora förändringar i dygnsdos (e) vid läkemedelsinteraktioner där vorikonazolnivåerna påverkas (tex av karbamazepin) samt (f) vid leversvikt (41). Men litteraturen är idag rikare på information (tex gällande målområden för plasmakoncentration) och det finns numera ett starkt stöd för generös koncentrationsbestämning av flertalet patienter som behandlas med vorikonazol (tabell 1) (32).

5.4.4 Posakonazol

Ursprungligen fanns en stor problematik som gällde mycket varierande peroral biotillgänglighet för posakonazol, med en absorption som bland annat var beroende av dosregim och matintag (22, 24, 25). Resultatet blev en osäkerhet i klinisk praxis kring uppnådda exponeringsnivåer i det enskilda fallet och om dessa vore tillräckliga för aktiv behandling vid invasiv mykos liksom profylax vid cytostatikainducerad leukopeni eller annan starkt immunsupprimerande behandling. För beredningsformen oral suspension kvarstår problemet med varierande upptag medan en senare introducerad enterotablett medfört säkrare behandling efter förbättrat upptag och minst tre ggr högre plasmakoncentrationer (41). Även för tablettformen ökar förvisso upptaget vid samtidigt matintag, men endast 1,5 ggr jämfört med 4 ggr för den orala suspensionen (42).

Den rekommenderade standarddosen är 300 mg/d för både enterotablett och iv infusion (24). Den fettlösliga substansen uppvisar hög proteinbinding i plasma (98%) men trots det en avsevärd fördelningsvolym ut i kroppen. Vid fetma saknas specifika dosrekommendationer och den tillhörande osäkerheten kring uppnådd plasmakoncentration motiverar koncentrationsbestämning.

För den orala suspensionen ses genomsnittlig exponering vid steady state på cirka 0,7 µg/mL (OBS ej dalvärden). Plasmanivåerna vid behandling med enterotablett är som sagt betydligt högre med dalvärden på cirka 2 - 3 µg/mL, men även här noteras avsevärd interindividuell variation (42). Posakonazol metaboliseras inte av CYP-enzymen men kan till viss del konjugeras direkt av glukuronosyltransferas i levern eller annars utsöndras i oförändrad form i tarmen. Potentialen för läkemedelsinteraktioner är därför lägre än för andra triazoler men det bör ändå noteras att enzyminducerande substanser som karbamazepin och rifampicin sänker posakonazolnivåerna. Dessutom får man inte bortse från att posakonazol hämmar CYP3A4/5 vilket kan öka exponeringsnivåerna för flera andra läkemedel (22, 24, 25). Ingen dosjustering rekommenderas vid njursvikt och substansen lär inte avlägsnas med hemodialys pga hög proteinbinding och stor distributionsvolym (24).

Ett terapeutiskt målområde för plasmakoncentrationen av posakonazol har ännu inte definierats, men vid en retrospektiv analys av två registreringsstudier på oral suspension fanns ett samband mellan exponeringsnivå och risken för terapivikt under profylaxbehandling; en genomsnittlig koncentration kring 0,7 µg/mL föreföll vara en brytpunkt med betydligt fler behandlings-

misslyckanden därunder (43). Trots tveksamheter bakom denna tolkning bland annat beroende på få behandlingsmisslyckanden i studiematerialet så har plasmakoncentrationer $>0,7 \mu\text{g/mL}$ kommit att användas som mål för dalvärden under profylaxbehandling med den orala suspensionen (27, 32). Detta exponeringsmål överträffas alltså i regel (men inte alltid) under behandling med enterotabletter. Misstänkt genombrottsinfektion under pågående profylax är en av de starkaste indikationerna för koncentrationsbestämning. Avseende aktiv behandling av pågående infektion har föreslagits att dalvärden i plasma bör vara minst $1,25 \mu\text{g/mL}$ men detta baseras på mindre patientmaterial och får anses vara en osäker rekommendation (13).

Sammanfattningsvis råder alltså ännu viss osäkerhet kring vad som är adekvat koncentration av posakonazol för säkerställande av antimykotisk effekt och i vilka situationer som koncentrationsbestämning bör bli aktuellt (28, 44). Rekommendationen blir att överväga detta framförallt vid (a) misstänkt genombrottsinfektion under pågående profylax (b) aktiv behandling men tveksam effekt (c) vid läkemedelsinteraktioner som förväntas påverka posakonazolnivån (d) fetma, samt (e) vid profylaxbehandling med oral suspension.

5.4.5 Isavukonazol

Sannolikt ger normal dosering av isavukonazol vanligen tillfredsställande terapeutisk marginal i plasmaexponering avseende antimykotisk effekt (45). En mer väldefinierad plats för koncentrationsbestämningar är ännu inte etablerad (se nedan). Preparatet utgörs av en prodrug (isavukoniumsulfat) i både den perorala och intravenösa beredningsformen men denna omsätts snabbt till aktiv substans (isavukonazol) som i sin tur har lång terminal halveringstid (56–123 timmar) vilket förklarar varför laddningsdos rekommenderas (46). Isavukonazol genomgår CYP3A4/5-beroende metabolism till inaktiva metaboliter (46, 47). Det finns en proportionalitet mellan given dos och uppnått AUC, och det skiljer inte nämnvärt mellan peroral och intravenös dosering. Dalvärden på ca $3 \mu\text{g/mL}$ observeras vanligen på standarddosen $200 \text{ mg} \times 1$, och motsvarande AUC över dygnet kring $100 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ (45). Men som förväntat av CYP3A-beroende eliminering förekommer interindividuell variation och dessutom läkemedelsinteraktioner som påverkar isavukonazolkoncentrationen i plasma. Fas 3-data från 350 patienter visade underhållskoncentrationer på $3,4 \pm 1,5$ (SD) $\mu\text{g/mL}$ med relativt låg inomindividsvariation (CV 23%) över tid, och utan koppling till behandlingseffekt eller biverkningar (48). Mukosit verkar inte påverka upptag och exponeringsnivå (49). En senare retrospektiv sammanställning på 110 patienter med *Aspergillus* visade plasmanivåer på $4,6 \pm 1,4$ (SD) $\mu\text{g/mL}$ på $200 \text{ mg} \times 1$, och i denna studie noterades något högre koncentrationer hos de med biverkningar grad 2–3 (förekomst $<10\%$), där den presumtiva brytpunkten för högre risk var just $4,6 \mu\text{g/mL}$ (50).

Sedan 2019 erbjuds plasmakoncentrationsbestämning vid Klinisk Farmakologi, Karolinska. Detta syftar till att i kliniska undantagsfall identifiera unika dosbehov. Provtagningsindikationerna gäller oförklarad behandlingssvikt, läkemedelsinteraktioner eller vid starkt kliniskt behov av off-label användning på bristfälligt studerade patientgrupper inklusive patienter under 18 år.

Provtagning rekommenderas inför ny dos (dalvärde) då det sker snabba förändringar i plasmanivån efter ny dos pga en polyfasisk eliminering.

5.5 Trimetoprim-sulfametoxazol

Trots att detta kombinationspreparat (förkortat TMP-SMX) sedan många årtionden är ett förstahandsmedel vid *Pneumocystis*-pneumonier (51) är kunskaperna om sambanden mellan serumkoncentration och antimikrobiell effekt liksom toxicitet förvånansvärt begränsade. Immunologiska mekanismer verkar involverade vid svåra biverkningar vilket försvårar studier på koncentrations-effektsamband. Emellertid är dock huvudindikationen för serumkoncentrationsbestämning att utesluta just ackumulering av TMP-SMX vid nedsatt njurfunktion, vilket alltså kan kräva upprepade analyser under pågående högdosbehandling. TMP-SMX elimineras till 80% oförändrat genom njurarna medan en mindre andel omsätts metaboliskt och delvis till instabila produkter vilket föreslagits vara relevant för toxicitet (51).

För *dalvärden* av SMX vid steady state, under behandling med 75 mg/kg/d uppdelat på tre doser/d, noterades serumkoncentrationer på ca 640 ± 172 $\mu\text{mol/L}$ medan motsvarande TMP-koncentrationer uppmättes till 18 ± 6 $\mu\text{mol/L}$ (52). Vad gäller antimikrobiell effekt vid *Pneumocystis* har det föreslagits att toppkoncentrationer av SMX och TMP bör nå intervallet 400 - 800 $\mu\text{mol/L}$, respektive 17 - 28 $\mu\text{mol/L}$ (53), men här råder uppenbarligen brist på evidens både mikrobiologiskt och kliniskt.

5.6 Echinocandiner (caspofungin, micafungin, anidulafungin)

Denna grupp av antimykotika har inbördes stora likheter i farmakokinetik, bland annat minimal peroral biotillgänglighet (intravenös administrering krävs), mycket hög proteinbindning i plasma, eliminering genom levermetabolism (ej CYP) i kombination med spontan nedbrytning, och uppenbarligen låg risk för läkemedelsinteraktioner (29). Idag görs inga kliniska koncentrationsbestämningar av dessa substanser, däremot i forskningssammanhang för att karakterisera kinetik i särskilda patientgrupper. Möjliga, framtida tillämpningar skulle kunna gälla patienter med förändrad proteinbindning eller svårbedömd distributionsvolym tex för intensivvårdspatienter med leverpåverkan (30).

5.7 Sammanfattning

Det kliniska behovet av plasmakoncentrationsbestämning av antimykotika skiljer mellan olika preparat och behandlingsindikationer. Som framgår ovan och i tabellform nedan, bör koncentrationsbestämning rutinmässigt ske vid behandling med flucytosin och itrakonazol, liksom regelmässigt övervägas för vorikonazol. Serumkoncentrationsbestämning av trimetoprim-sulfametoxazol bör komma ifråga vid högdosbehandling och samtidigt nedsatt njurfunktion. För posakonazol bör koncentrationsbestämning användas framförallt vid misstänkt genombrottsinfektion under profylax, medan analys av flukonazol respektive isavuconazol kommer ifråga endast i undantagsfall. För echinocandiner och amfotericin B finns idag ingen klinisk plats för koncentrationsbestämningar.

5.8 Tabell 1. Indikationer för koncentrationsbestämning av antimykotika

Antimykotiskt läkemedel	Koncentrationsbestämning	Särskilda analysindikationer	Provtagning (plasmarör)
Flucytosin	Rutinmässigt	-	Före dos och en timma efter
Amfotericin B	Nej	-	-
Flukonazol	I undantagsfall	a) kontinuerlig hemodialys b) särskilt svårvärderade fall inom neonatalvården	Före dos alternativt vid AUC-bestämning; före dos (0) och 1, 2, 4 timmar efter dos
Itrakonazol	Rutinmässigt	-	Före dos
Vorikonazol	Bör alltid övervägas, och rekommenderas rutinmässigt på särskilda indikationer	a) terapivikt b) signifikant leverpåverkan c) neuropsykiatriska biverkningar d) betydande förändringar i dygnsdos vid tex övergång från iv till po behandling e) behandling vid leversvikt f) läkemedelsinteraktion som förväntas påverka vorikonazolkoncentrationen	Före dos

Tabell 1 fortsätter på nästa sida.

Fortsättning Tabell 1

Antimykotiskt läkemedel	Koncentrationsbestämning	Särskilda analysindikationer	Provtagning (plasmarör)
Posakonazol	På specificerad indikation	a) misstänkt genombrottsinfektion under profylax b) terapivikt under aktiv behandling c) läkemedelsinteraktioner som förväntas påverka koncentrationen av posakonazol d) fetma e) profylaxbehandling med oral suspension	Före dos
Isavukonazol	I undantagsfall	a) terapivikt b) läkemedelsinteraktioner som förväntas påverka koncentrationen av isavukonazol c) Off-label användning på bristfälligt studerade patientpopulationer	Före dos
Trimetoprim-sulfametoxazol	På specificerad indikation	a) utelsuta ackumulering vid högdosbehandling och nedsatt njurfunktion b) terapivikt	a) Före dos b) Efter ny dos
Echinocandiner	Nej	-	-

5.9 Referenser

1. Vermes et al., Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity, and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:171-9
2. Pasqualotto et al., Flucytosine therapeutic monitoring: 15 years experience from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:791-3
3. Produktresumé Ancotil nedladdad 2021-06-21:
<https://www.fass.se/LIF/product?userType=2&nplId=19780609000042&docType=6&scrollPosition=0>
4. Andes et al., Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:24-34

5. Smith and Andes, Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamics considerations. *Ther Drug Monit* 2008;30:167-72
6. Hope et al., Therapeutic drug monitoring for triazoles. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:580-86
7. Goodwin and Drew, Antifungal serum concentration monitoring: an update. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:17-25
8. Produktresumé Diflucan nedladdad 2021-06-21:
<https://www.fass.se/LIF/product?userType=2&nplId=19910517000067&docType=6&scrollPosition=324>
9. Schwarze et al., Administration of fluconazole in children below 1 year of age. *Mycoses* 1999;42:3-16
10. Manosuthi et al., Monitoring and impact of fluconazole serum and cerebrospinal fluid concentration in HIV-associated cryptococcal meningitis-infected patients. *HIV Medicine* 2010; 11:276-81
11. Playford et al., Management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Drugs* 2010;70:823-839
12. Guo et al., The pharmacokinetics of fluconazole in healthy Chinese adult volunteers: influence of ethnicity and gender. *J Clin Pharmacy Ther* 2010;35:231-237
13. Produktresumé Sporanox nedladdad 2021-06-21:
<https://www.fass.se/LIF/product?userType=2&nplId=19930904000012&docType=6&scrollPosition=0>
14. Brüggeman et al., Therapeutic drug monitoring of voriconazole. *Ther Drug Monit* 2008;30:403-11
15. Produktresumé Vfend nedladdad 2021-06-21:
<https://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=20020319000021&docType=6&scrollPosition=0>
16. Ikeda et al., Pharmacokinetics of voriconazole and cytochrome P450 2C19 genetic status. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:587-88
17. Wang et al., The CYP2C19 ultra-rapid metabolizer genotype influences the pharmacokinetics of voriconazole in healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:281-5
18. Weiss et al., CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole. *J Clin Pharm* 2009;49:196-204
19. Theuretzbacher et al., Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet* 2006;45:649-63
20. Trifilio et al., Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer* 2007;109:1532-1535
21. Denning et al., Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2002;34:563-571
22. Lipp. Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of the antifungal extended-spectrum triazole posaconazole: an overview. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70:471-80
23. Pascual et al., Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *CID* 2008;46:201-11
24. Produktresumé Noxafil nedladdad 2021-06-21:
<https://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=20130410000162&docType=6&scrollPosition=0>

25. Torres et al., Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis* 2005;5:775-85
27. Thompson III et al., Posaconazole therapeutic drug monitoring: a reference laboratory experience. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2223-2224
28. Smith et al., Posaconazole's impact on prophylaxis and treatment of invasive fungal infections: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;165-81
29. Sucher et al., Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother* 2009;43:1647-57
30. Kurland et al., Pharmacokinetics of caspofungin in critically ill patients in relation to liver dysfunction: Differential impact of plasma albumin and bilirubin levels. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 May 24;63(6). pii: e02466-18.
31. Stamm et al., Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *Am J Med* 1987;83:236-4232. Ashbee et al., Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1162-76
33. Debruyne., Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. *Clin Pharmacokinet* 1997;33:52-77
- 35 Stockmann et al., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children and their clinical implications. *Ther Drug Monitor* 2014;53:429-454
36. Marumo et al., Plasma concentration of itraconazole in patients with hematologic malignancies treated with itraconazole oral solution. *Ther Drug Monitor* 2017;39:229-234
37. Wiederhold et al., A reference laboratory experience of clinically achievable voriconazole, posaconazole, and itraconazole concentrations within the bloodstream and cerebral spinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;59:424-31
38. Luong et al., Utility of voriconazole therapeutic drug monitoring: a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1786-99
39. Job et al., Pharmacodynamic studies of voriconazole: informing the clinical management of invasive fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016;14:731-46
40. Velenosi et al., Decreased nuclear receptor activity and epigenetic modulation associates with down-regulation of hepatic drug-metabolizing enzymes in chronic kidney disease. *FASEB J*. 2014;28:5388-97
41. Eliasson. Koncentrationsbestämning av antimykotika. Information från Läkemedelsverket 2011;22: 62-66
42. Stelzer et al., Posaconazole liquid vs tablet formulation in lung transplant recipients. *Mycoses* 2018;61:186-94
42. Dekkers et al., Therapeutic drug monitoring of posaconazole: An update. *Curr Fungal Infect Rep* 2016; 10:51-61
43. Jang et al., Exposure-response of posaconazole used for prophylaxis against invasive fungal infections: evaluating the need to adjust doses based on drug concentrations in plasma. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88:115-9
44. Dolton et al., Posaconazole exposure-response relationship: evaluating the utility of therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2806
45. Desai et al., Population Pharmacokinetics of Isavuconazole from Phase 1 and Phase 3 (SECURE) Trials in Adults and Target Attainment in Patients with Invasive Infections Due to *Aspergillus* and Other Filamentous Fungi. *Antimicrob Agents Chemother*.2016;60:5483-91

46. Produktresumé Cresemba nedladdad 2021-06-21:
<https://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=20140902000068&docType=6&scrollPosition=486>
47. McCarthy et al., Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Isavuconazole. *Clin Pharmacokinet* 2018;57:1483-91
48. Kaindl et al. Variability and exposure–response relationships of isavuconazole plasma concentrations in the Phase 3 SECURE trial of patients with invasive mould diseases. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 761–767
49. Kovanda et al., Impact of mucositis on absorption and systemic drug exposure of isavuconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61 Issue 6 e00101-17
50. Kosmidis et al. Isavuconazole Therapeutic Drug Monitoring during Long-Term Treatment for Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;65:e01511-20.
51. Huang et al. Treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: a review *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15:873-892.
52. Joos et al. Monitoring of co-trimoxazole concentrations in serum during treatment of *pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:2661-6
53. Brown GR. Cotrimoxazole - optimal dosing in the critically ill. *Annals of Intensive Care* 2014;4:13