

Aus der Medizinischen Klinik I

Direktor: Herr Prof. Dr. Martin Bornhäuser

Auftreten und Kinetik falschpositiver Candida- und Aspergillus- Antigen tests nach Applikation parenteraler Ernährung und Piperacillin-Tazobactam bei Patienten auf einer hämatologisch-onkologischen Station

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Wencke Walter

aus Freiberg

Dresden 2019

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: (Verteidigungstermin)

gez.: -----

Vorsitzender der Promotionskommission

Anmerkung:

Die Eintragung der Gutachter und Tag der mündlichen Prüfung (Verteidigung) erfolgt nach Festlegung von Seiten der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden. Die oben genannten Eintragungen werden durch die Doktoranden nach der Verteidigung zwecks Übergabe der fünf Pflichtexemplare an die Zweigbibliothek Medizin in gedruckter Form oder handschriftlich vorgenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Einführung in die Thematik	5
2.1. Invasive Mykosen.....	5
2.2. Diagnostik invasiver Mykosen	5
2.3. Problemstellung	7
2.4. Bisherige Erkenntnisse zur Falschpositivität serologischer Antigentests	8
2.5. In-vitro-Bestimmung von Galactomannan und Mannan in Infusionslösungen	10
2.6. In-vivo-Bestimmung falschpositiver Antigenergebnisse	11
3. Diskussion und Ausblick	15
4. Zusammenfassung	18
5. Summary	21
6. Abbildungsverzeichnis	24
7. Tabellenverzeichnis	25
8. Literaturverzeichnis	26
9. Erster Originalartikel	29
10. Zweiter Originalartikel	30
11. Anlage 1	31
12. Anlage 2	32

1. Abkürzungsverzeichnis

C.	Candida
A.	Aspergillus
EIA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
UKD	Universitätsklinikum Dresden
IDSA	Infectious Diseases Society of America
EORTC-MSG	European Organization of Research and Treatment of Cancer- Mycoses Study Group
DMYKG	Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
AGIHO	Arbeitsgemeinschaft Infektionen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
pg	Pikogramm
et al.	und andere

2. Einführung in die Thematik

2.1. Invasive Mykosen

Hefepilze der Gattung *Candida* treten als Kommensale auf und sind damit Teil der natürlichen Haut- und Schleimhautflora. Rund die Hälfte der Candidämien wird durch *Candida albicans* verursacht, zunehmend weist man auch andere Spezies wie *C. parapsilosis*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* nach. Über den Mund- und Rachenraum gelangt der Erreger in den menschlichen Organismus. Durch Störungen des Schleimhautmilieus sind die fungistatischen Eigenschaften der Hautoberfläche, die durch die Anwesenheit von freien Fettsäuren und den damit verbundenen schwach sauren pH- Wert bedingt werden, nicht mehr gegeben. Es entsteht eine oberflächliche Candidose. Von besonderer therapeutischer Relevanz sind invasive Candidosen, die sich endogen bei bestehender Besiedlung der Schleimhäute und dem Versagen lokaler Abwehrmechanismen entwickeln können. Die Erkrankung kann auch bedingt durch eine exogene Infektion auftreten, beispielsweise über zentralvenöser Katheter als Eintrittspforte. Am häufigsten manifestiert sich eine invasive Candidose als Candidämie verbunden mit dem Auftreten von Fieber. Daneben können bei onkologischen Patienten auch akute oder chronische disseminierte Candidosen auftreten (Ruhnke, et al., 2011). Aspergillosen werden durch Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* hervorgerufen. Ubiquitär kommen sie in Erde, Staub, Luft und verrotteten Pflanzenmaterial vor und werden aerogen auf den Mensch übertragen. Im Krankenhaus können Sporen über die Luftzirkulation aus Klimaanlage und während Bauarbeiten in die Atemwege des Patienten gelangen. Am häufigsten wird eine invasive Schimmelpilzinfektion durch *Aspergillus fumigatus* hervorgerufen und manifestiert sich überwiegend als invasive pulmonale Aspergillose (Wellinghausen and Weber, 2009).

2.2. Diagnostik invasiver Mykosen

Systemische Pilzinfektionen erhöhen in immunsupprimierten Patienten Morbidität und Mortalität (Ruhnke, et al., 2011; Zhang, et al., 2015). Eine frühzeitige Diagnose kombiniert mit einer adäquaten antimykotischen Therapie kann die Überlebensrate erhöhen. Aufgrund mangelnder spezifischer Symptome ist jedoch die Diagnosestellung erschwert (Ostrosky-Zeichner, et al., 2011; Ruhnke, et al., 2012). Verschiedene diagnostische Methoden basierend auf klinischen Symptomen, radiologischen Verfahren oder mikrobiologischen Tests werden genutzt. Eine definitive Bestätigung der Diagnose wird letztendlich nur durch kulturelle Anzucht von sterilen Körperflüssigkeiten oder Geweben erreicht (Ruhnke, et al., 2012). Der mikrobiologische Erregernachweis hat den Nachteil, dass das Ergebnis für einen frühzeitigen Therapiebeginn nicht schnell genug verfügbar sein kann, die Sensitivität nur mit 40 – 68% angegeben wird und teilweise invasive Probengewinnungen wie Biopsien notwendig sind (Ruhnke, et al., 2011). Als alternatives diagnostisches Instrument arbeiten serologische

Antigentests auf dem Prinzip eines Enzym-linked Immunosorbent Assays (EIA) und weisen im Blutserum oder anderen Untersuchungsmaterialien mithilfe enthaltender Antikörper Polysaccharide nach, die typische Zellwandbestandteile von Pilzen darstellen. Der kommerziell erhältliche Platelia™ *Candida* Ag plus dient dem Nachweis des *Candida*-Antigens Mannan (Bio-Rad, 2011). Zur Bestimmung des *Aspergillus*-Antigens Galactomannan wird der Platelia™ *Aspergillus* EIA genutzt (Bio-Rad, 2009). Serologische Antigentests liefern schneller als bisherige mikrobiologische Methoden ein Ergebnis und können als Screening für Hochrisikopatienten genutzt werden. Die Sensitivität wird in der Literatur unterschiedlich angegeben, 42% – 98% für den Mannan-EIA (Ruhnke, et al., 2011) sowie 70% – 97% für den Galactomannan-EIA (Kędzierska, et al., 2007). Als Nachteil wird die moderate Spezifität angesehen, 70% – 80% für den Mannan-EIA und 85% für den Galactomannan-EIA (Müller and Weig, 2003; Ruhnke, et al., 2011). Der Platelia™ *Aspergillus* EIA findet als zweimal wöchentliches Screening bei Risikopatienten auch im Universitätsklinikum Dresden (UKD) Anwendung, da allgemein der Nachweis erbracht wurde, dass invasive Aspergillosen bei einem Großteil der Patienten dadurch einige Tage eher diagnostiziert werden können (Wellinghausen and Weber, 2009). Als Risikopatienten zählen in diesem Kontext neutropene Patienten mit Fieber unklarer Ursache. Die Leitlinie der Infectious Diseases Society of America (IDSA) empfiehlt zur Diagnostik invasiver Aspergillosen eine Kombination aus traditionellen mikrobiologischen Methoden und serologischen Antigentests zur Erhöhung von Sensitivität und Spezifität (Patterson, et al., 2016; Ruhnke, et al., 2012). Das Screening auf *Aspergillus*-Antigen im Blutserum wird jedoch gemäß der IDSA-Leitlinie bei Patienten mit antimykotischer Prophylaxe oder Therapie nicht empfohlen. Als Ausnahme gilt das Screening in Proben für eine Bronchoskopie (Patterson, et al., 2016). Zudem stellt der Test auf Galactomannan ein mikrobiologisches Kriterium nach der European Organization of Research and Treatment of Cancer- Mycoses Study Group (EORTC-MSG) zur Einteilung in gesicherte („proven“), wahrscheinliche („probable“) und mögliche („possible“) Aspergillosen dar, die vor allem in Studien Anwendung findet (De Pauw, et al., 2008; Wild, et al., 2001). Gemäß den Empfehlungen der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMYKG) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG) wird als zusätzliche diagnostische Hilfe der Platelia™ *Candida* Ag plus bei Verdacht auf hepatolienale Candidose empfohlen (Ruhnke, et al., 2011), dennoch ist laut aktueller Stellungnahme der IDSA dessen Rolle allgemein in der Diagnostik unklar (Pappas, et al., 2016). Die Leitlinie der DMYKG und PEG empfiehlt die Kombination des *Candida*-Antigentests mit dem *Candida*-Antikörpertest, um die Sensitivität des Verfahrens zu erhöhen. Die routinemäßige Untersuchung auf *Candida*-Antikörper oder -Antigene wird im Gegensatz zum *Aspergillus*-EIA bei hämatologischen Patienten laut der Arbeitsgemeinschaft Infektionen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (AGIHO) nicht empfohlen (Ruhnke, et al., 2012).

2.3. Problemstellung

Die Untersuchung falschpositiver Ergebnisse bei der Anwendung serologischer Antigentests zur Diagnostik invasiver Aspergillosen und Candidosen bei hämatologisch- onkologischen Risikopatienten ist Bestandteil dieser Arbeit. Falschpositive Antigenpiegel können invasive Mykosen vortäuschen. Als Konsequenz kann bei Hochrisikopatienten in der neutropenen Phase eine antimykotische Therapie initiiert werden. Die Identifikation von Quellen falschpositiver Ergebnisse ist notwendig, um eindeutig kranke von gesunden Patienten zu unterscheiden. Systemische Pilzinfektionen sind mit einer erhöhten Mortalität verbunden, vor allem bei verzögertem Therapiebeginn. Bei dem Einsatz von Antimykotika sollte jedoch auch patientenindividuell das Nebenwirkungs- und Wechselwirkungspotential der antimykotischen Arzneistoffe berücksichtigt werden. Antimykotika wie beispielsweise das nephrotoxische Amphotericin B weisen ein breites Spektrum an unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf. Das Interaktionspotential von Arzneistoffen wie den Azolantimykotika kann vor allem bei multimorbiden Patienten mit Polypharmazie nach allogener Stammzelltransplantation relevant sein. Pharmakoökonomisch gesehen stellt der nicht gerechtfertigte Beginn einer antimykotischen Therapie einen Kostenfaktor dar.

Einem erhöhten Risiko für invasive Mykosen sind neben Patienten nach größeren operativen Eingriffen auch hämatologisch- onkologische Patienten ausgesetzt. Durch Behandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten als auch bedingt durch die Krankheit an sich kann eine Unterdrückung des Immunsystems das Risiko für Infektionen mit *Aspergillus*- als auch *Candida*-Spezies erhöhen. Ein hohes Risiko besitzen zum einen Patienten nach Organ- oder allogener Stammzelltransplantation, zum anderen Patienten mit Leukämie, Lymphomen oder anderen soliden Tumoren. Neutropene Patienten erhalten bei dem Auftreten von Fieber Breitspektrumantibiotika wie Piperacillin-Tazobactam und müssen oftmals aufgrund von behandlungsbedingten Komplikationen wie Mukositis parenteral ernährt werden. Parenterale Ernährungszubereitungen werden in großen Volumina per Dauertropf infundiert. Es ist von großer Bedeutung, ob die Infusion dieser Lösungen eine Quelle falschpositiver Antigentests darstellt. Diese Arbeit konzentriert sich daher auf den Einfluss von parenteraler Ernährung und Piperacillin-Tazobactam auf das Ergebnis der Antigen-Assays und liefert damit einen Beitrag zum Stellenwert der EIA in der Diagnostik systemischer Pilzinfektionen. Aufgrund des breiten Einsatzes der ausgewählten Infusionslösungen bei Risikopatienten für invasive Mykosen ist das Auftreten falschpositiver Pilzantigentests ein wichtiger Informationsgewinn für die behandelnden Ärzte. Die Kenntnis von Quellen, die die Spezifität der Tests reduzieren, ist für Ärzte bei Interpretation des Testergebnisses von großer Bedeutung.

2.4. Bisherige Erkenntnisse zur Falschpositivität serologischer Antigentests

Um den aktuellen Stand falschpositiver Mannan- und Galactomannanergebnisse zu eruieren, wurde eine Literaturrecherche vorangestellt.

Ein erster Bericht zu dieser Thematik veröffentlichte 2004 das Knochenmarkzentrum Genua. Die Umstellung der empirischen Prophylaxe auf Piperacillin-Tazobactam bei Transplantationsempfängern erhöhte die Rate an falschpositiven Galactomannanspiegeln im Blutserum. Mehrere Chargen des Antibiotikums wurden in-vitro auf Galactomannan-Antigenität positiv getestet (Viscoli, et al., 2004). Weitere Studien bestätigten eine Assoziation von falschpositiven Galactomannan-Ergebnissen mit der Infusion von Piperacillin-Tazobactam (Gerlinger, et al., 2012; Machetti, et al., 2006; Walsh, et al., 2004). Zudem beschreiben auch einige Studien die Kinetik des *Aspergillus*-Antigens Galactomannan. Nach Verabreichung kumulativer Dosen Piperacillin-Tazobactam an Kaninchen über sieben Tage wurde ein Steady State zwischen Akkumulation und Clearance des Antigens Galactomannan am dritten Tag erreicht (Walsh, et al., 2004). Das Verhalten von Galactomannan bei den belasteten Beta-Lactam-Antibiotika wurde in einer Plasmakonzentrations- Zeit- Kurve grafisch dargestellt. Für Galactomannan gibt es humane In-vivo-Daten, die die positiven Ergebnisse an Kaninchen bestätigen (Walsh, et al., 2004). Retrospektive Daten von 69 hämatologischen Patienten, die eine intravenöse Behandlung mit den Beta-Lactam-Antibiotika Amoxicillin, Amoxicillin-Clavulansäure oder Piperacillin-Tazobactam erhielten, wurden auf kinetische Parameter zu Galactomannan untersucht (Aubry, et al., 2006). Die mittlere Halbwertszeit von Galactomannan wurde nach Anwendung eines nonlinear-mixed-regression-Modells auf 2,4 Tage sowie die mittlere Zeit bis zum Auftreten von negativen Antigen Spiegel auf 5,5 Tage geschätzt. In 90% der Patienten wurde Galactomannan innerhalb von drei Tagen noch nachgewiesen. Die Patienten entwickelten weder klinische noch radiologische Zeichen einer invasiven Aspergillose. Des Weiteren betont die Studie, dass sich die Kinetik des Antigens sich von der Pharmakokinetik der Antibiotika unterscheidet. Piperacillin-Tazobactam zeigt eine Plasmahalbwertszeit von lediglich 0,7 Stunden bis 1,2 Stunden (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 2016). Kinetikuntersuchungen an chirurgischen Patienten nach Verabreichung von drei Dosen Piperacillin-Tazobactam zeigten einen Anstieg an Galactomannanspiegeln innerhalb von drei Stunden nach Applikation, die jedoch innerhalb von acht Stunden wieder sanken (Machetti, et al., 2006). Ein kleiner, nicht statistisch signifikanter Trend zur Akkumulation von Galactomannan nach mehreren Dosen wurde dargestellt. Auch bei neutropenen Patienten wurden bei 23% des Patientenkollektivs falschpositive Ergebnisse direkt nach Infusion von Piperacillin-Tazobactam nachgewiesen (Orlopp, et al., 2008). Bereits nach acht Stunden wurden nur noch bei 10% der Patienten ein Galactomannanindex größer 0,5 festgestellt, der als Cut-Off-Wert für diese Studie festgelegt wurde. Eine

Antigennegativität nach Applikation kumulativer Dosen Amoxicillin (Monotherapie als auch Kombination mit dem Beta-Lactamase-Hemmer Clavulansäure), Ampicillin sowie Penicillin wurde in einer Kinetikuntersuchung bei fünf Patienten nach 24 Stunden bis 120 Stunden erreicht (Bart-Delabesse, et al., 2005). Nach Gabe von Einzeldosen betrug die Zeit lediglich zwei Stunden.

Galactomannan wurde zudem 2007 in Proben aus bronchoalveolärer Lavage von Lungentransplantationspatienten, bei denen keine Evidenz für Infektionen bestand, nachgewiesen (Hage, et al., 2007; Racil, et al., 2007). Als Ursache für falschpositive Antigenergebnisse nahmen die Autoren Verunreinigungen der verwendeten natriumgluconathaltigen Lösung Plasmalyte® der Firma Baxter an, die durch Fermentation in *Penicillium*-Spezies gewonnen wird. Eine weiteren Untersuchung betont, dass falschpositive Ergebnisse auf die Komponente Natriumgluconat zurückzuführen sind (Petraitiene, et al., 2011). Nach Applikation von natriumgluconathaltiger Plasmalyte®-Lösung wurden positive Serumgalactomannanspiegel noch nach 24 Stunden nachgewiesen (Racil, et al., 2007).

Eine Studie an zwölf parenteral ernährten Knochenmarktransplantatempfängern ergab 2002 keinen Hinweis darauf, dass falschpositive Galactomannanergebnisse unter Anwendung von Ernährungslösungen auftreten (Blijlevens, et al., 2002). Die eingesetzten Lösungen Nutriflex® (Braun), Kabimix® (Fresenius) und Aminomix® (Fresenius) wurden auch in-vitro negativ getestet. In einer Diplomarbeit wurden In-vitro-Untersuchungen zu Bestandteilen parenteraler Ernährung durchgeführt (Knoth, et al., 2016). Aussagen zur Halbwertszeit und zur Elimination lassen sich aus theoretischen Überlegungen und diesen Ergebnissen nicht ableiten, sodass klinische Untersuchungen erforderlich sind. Ebenso ist unklar, ob die Antigenspiegel in-vivo überhaupt im detektierbaren Bereich liegen.

Studien zum Auftreten von falschpositiven Ergebnissen des *Candida*-Antigens Mannan fehlen. Untersuchungen von Kappe et al. geben lediglich pharmakokinetische Daten zu Mannan in Kaninchen an (Kappe and Müller, 1991).

Bisher existieren keine belastbaren Ergebnisse zur Antigenbelastung in Infusionslösungen zur parenteralen Ernährung und es mangelt an Informationen zur Kinetik der Antigene im Menschen. Besonders die Falschpositivität von Mannan wurde bisher kaum untersucht.

2.5. In-vitro-Bestimmung von Galactomannan und Mannan in Infusionslösungen

Der erste experimentelle Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf die In-vitro-Bestimmung von Mannan und Galactomannan in ausgewählten Infusionslösungen mittels EIA. Stammzelltransplantierte erhalten am UKD normalerweise zur parenteralen Ernährung All-in-one-bags bestehend aus Aminosäuren, Lipiden, Kohlenhydraten und Elektrolyten, denen bedarfsgerecht auch Spurenelemente oder Vitamine zugesetzt werden können. Mehrere Chargen der am UKD eingesetzten Präparate Aminomix®, SmofKabiven® zentral, Olimel® peripher, SMOFlipid®, Addel®, Addaven® sowie das fett- und wasserlösliche FrekaVit® wurden mittels Platelia™ *Candida* Ag plus und Platelia™ *Aspergillus* EIA auf das Vorhandensein von Mannan und Galactomannan untersucht. Das bei febriler Neutropenie eingesetzte Breitspektrumantibiotikum Piperacillin-Tazobactam wurde ebenfalls in die Untersuchung einbezogen.

Sowohl FrekaVit® fettlöslich, Olimel® peripher, SmofKabiven® zentral als auch SMOFlipid® enthalten als Lipidkomponente Sojaöl. In SMOFlipid® ist es jedoch mit 60 g pro 1000 ml deutlich höher konzentriert als in Olimel® und SmofKabiven®. FrekaVit® fettlöslich gibt keine quantitative Angabe zum Gehalt an Sojaöl an. Die Zusammensetzung der beiden Spurenelementpräparate Addel® und Addaven® ist inklusive dem Gehalt an Xylitol identisch. Aminomix®- Ernährungsbeutel als reine Aminosäuren-Lieferanten sind frei von Kohlenhydraten und Lipiden. Piperacillin-Tazobactam liegt als Pulver vor und wurde im Rahmen dieser Studie mit sterilem Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert.

Bis auf die All-in-one-bags wurden die Proben in der Sterilabteilung der Klinik-Apotheke unter Bedingungen der Reinraumklasse A rekonstituiert, um eine Kontamination zu verhindern. Pro Charge wurden jeweils drei Ampullen präpariert. Aus ökonomischen Gründen wurden Proben der All-in-one-bags (Aminomix®, SmofKabiven® zentral, Olimel® peripher, SMOFlipid®) direkt nach Verabreichung am Patienten auf der Station aus den Ernährungsbeuteln gezogen. Daraus ergibt sich eine unterschiedliche Anzahl an Proben pro Charge sowie enthielten einige der untersuchten Ernährungsbeutel auch Zusätze an Spurenelementen oder Vitaminen. Enthaltene Zusätze wurden vom Pflegepersonal auf den Ernährungsbeuteln gekennzeichnet. Bis zur Testung mit den Platelia™ EIA in der mikrobiologischen Abteilung wurden die Proben kühl gelagert. Jede Probe wurde dort dreimal getestet. Als positiv gewertet wurde ein Mannanwert > 125 pg/ml, als grenzwertig wurden Mannanwerte zwischen 62,5 pg/ml und 125 pg/ml betrachtet und Antigennegativität bestand bei Mannanwerten $< 62,5$ pg/ml gemäß der Bedienungsanleitung des Herstellers Bio-Rad (Bio-Rad, 2011). Bedingt durch die Limitierung der Kalibrierungsgerade konnte eine detaillierte Bestimmung von

Mannankonzentrationen > 500 pg/ml nicht erfolgen. Bei der halbquantitativen Bestimmung des Galactomannanindex wurde ein Cut-Off-Wert von 0,5 genutzt (Bio-Rad, 2009).

Der Platelia™ *Candida* Ag plus zeigte in allen 15 getesteten Chargen von Piperacillin-Tazobactam stark positive Mannanwerte mit einem Median von 500 pg/ml. Dabei lag fast die Hälfte der Werte oberhalb des höchsten Punktes der Kalibriergerade, sodass eine genaue Bestimmung nicht möglich war. Auch zusätzlich getestete Chargen von vier anderen Herstellern bestätigten das Ergebnis. Eine Charge des Antibiotikums wurde verdünnt, um eine genaue Mannankonzentration zu bestimmen. Der Median dieser fünf Proben wurde mit 2912 pg/ml berechnet. Ebenfalls positiv auf Mannan wurden die Spurenelementpräparate Addel® und Addaven® sowie die Fettemulsion SMOFlipid® und das fettlösliche Vitaminpräparat FrekaVit® getestet. Statistisch wurden die Ergebnisse mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) in SPSS 24 überprüft. Anschließend wurde ein multipler Mittelwertvergleich nach Student-Newman-Keuls durchgeführt. Signifikante Unterschiede in den Mannankonzentrationen wurden nur zwischen den positiv getesteten Präparaten detektiert. Mannan war nicht in den All-in-one-Bags Aminomix®, Olimel® und Smofkabiven® sowie in der wasserlöslichen Vitaminzubereitung FrekaVit® nachweisbar. Kein Unterschied in der Mannankonzentration war zwischen All-in-one-bags mit und ohne Spurenelement- bzw. Vitaminzusätze feststellbar.

Alle Präparate wurden mittels Platelia™ *Aspergillus* EIA negativ auf Galactomannan getestet.

2.6. In-vivo-Bestimmung falschpositiver Antigenergebnisse

In einem zweiten Teil der Arbeit wird die klinische Relevanz der vorher geschilderten In-vitro-Ergebnisse in einer prospektiven, diagnostischen Studie untersucht. Ziel ist es, darzustellen, ob positive Antigenspiegel auch nach Infusion antigenbelasteter Präparate im Patientenblut nachgewiesen werden können, ohne dass eine systemische Pilzinfektion vorliegt.

Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor Studienbeginn vor. Die Patienten erhielten vor Einschluss in die Studie eine Aufklärung durch den Stationsarzt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme. Die Studie wurde auf der Transplantationsstation MK1-KMT des UKD durchgeführt, die sich auf die Behandlung hämatologisch- onkologischer Patienten insbesondere nach allogener Stammzelltransplantation spezialisiert hat. Zweimal wöchentlich wird auf dieser Station ein Screening auf *Candida*- und *Aspergillus*-Antigene im Blutserum bei Hochrisikopatienten für invasive Mykosen durchgeführt. Es werden Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen vor Beginn, während und nach Ende einer antibiotischen Therapie mit Piperacillin-Tazobactam bzw. parenteraler Ernährung beobachtet und das Auftreten positiver *Aspergillus*- und *Candida*-Antigenergebnisse im Patientenserum dokumentiert. Daten dreier verschiedener Patientenkollektive werden gesammelt. In der

ersten Gruppe finden sich Patienten ohne parenterale Ernährung, dafür mit Piperacillin-Tazobactam. Die zweite Gruppe beinhaltet Patienten, die parenteral ernährt werden, ohne eine Therapie mit Piperacillin-Tazobactam zu erhalten. Gruppe drei berücksichtigt beide Einflussfaktoren: parenterale Ernährung sowie antibiotische Behandlung mit Piperacillin-Tazobactam. Ein Vergleich findet dabei intraindividuell vor und nach der Intervention Piperacillin-Tazobactam bzw. parenterale Ernährung statt. Als Kontrolle wird jeder untersuchten Person das Antigenergebnis aus dem Screening vor Beginn bzw. nach Ende der Intervention zugeordnet. Zwei interessierende Zeitpunkte werden betrachtet. Der erste Zeitpunkt stellt den Beginn der Therapie mit Piperacillin-Tazobactam bzw. parenteraler Ernährung dar, der zweite Zeitpunkt das jeweilige Therapieende. Die Interventionen sind Teil des Therapieregimes und unabhängig von der Studie indiziert. Es wird auf Randomisierung und Verblindung verzichtet. Im Rahmen der Studienplanung wurde in Zusammenarbeit mit der Biometrie eine Fallzahlplanung für beide serologische Antigentests durchgeführt. Ausgehend von einem zweiseitigem Chi-Quadratstest, einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$, einer Power von $1-\beta=80\%$ sowie einer in der Literatur angegebenen Spezifität von 70% - 80% wurden 26 Patienten für die Untersuchung auf Mannan benötigt (Ruhnke, et al., 2011). Für die Untersuchung auf Galactomannan wurde eine Fallzahl von 31 Patienten bei gegebener Spezifität von 85% berechnet (Müller and Weig, 2003). Für diese Arbeit wurden die berechneten Fallzahlen verdreifacht, da wie oben beschrieben drei verschiedene Patientenkollektive ausgewertet werden. Weitere klinische Einflussfaktoren werden dokumentiert, um eine invasive Mykose auszuschließen. Besonders die mikrobiologischen, klinischen und patientenbezogenen Kriterien nach der EORTC-MSG- Einteilung werden aufgenommen, da sie eine Gliederung in mögliche, wahrscheinliche und gesicherte Mykosen ermöglichen. Als Ausschlusskriterium für diese Studie wurde eine wahrscheinliche oder gesicherte Mykose definiert, sodass alle 78 Patienten in die Untersuchung auf Mannan einbezogen wurden. Fünf dieser Patienten mussten für die Untersuchung auf Galactomannan aufgrund einer wahrscheinlichen Aspergillose ausgeschlossen werden. Wirtsfaktoren wie eine aktuelle ausgedehnte Neutropenie, eine allogene Stammzelltransplantation oder eine immunsuppressive Therapie kombiniert mit auffälligen Befunden in der Computertomographie mit klinischer Symptomatik führten in diesen fünf Patienten zur Einteilung in eine wahrscheinliche Aspergillose. Die parenterale Ernährung bestand im betrachteten Patientenkollektiv vor allem aus einer Kombination von Aminomix® und SMOFlipid® sowie dem Zusatz von Spurenelementen und Vitaminen, die im vorhergehenden Part dieser Arbeit bereits auch in-vitro mit den Antigen-EIA untersucht worden. Piperacillin-Tazobactam wurde entweder dreimal oder viermal täglich als Kurzinfusion appliziert.

Die Differenz zwischen der Serummannankonzentration während Behandlung mit Piperacillin-Tazobactam, parenteraler Ernährung oder beidem, und der Serummannankonzentration vor

dem Beginn der Intervention wurde pro Patient berechnet und aus all den Differenzen ein Median gebildet. Mit Beginn der Intervention zeigte sich keine Erhöhung der Mannankonzentration im Serum, wie es aufgrund der In-vitro-Daten zu erwarten gewesen wäre. Eine statistische Überprüfung mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wies auch zwischen den drei verschiedenen Interventionen (Piperacillin-Tazobactam, parenterale Ernährung, Piperacillin-Tazobactam plus parenterale Ernährung) keinen Unterschied auf. Mit dem Absetzen der Interventionen wurde ebenfalls die Differenz der Mannankonzentrationen im Serum bestimmt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nicht gefunden. Die Berechnung wurde zudem auch für den Galactomannanindex im Serum angewandt. Die Infusion von Piperacillin-Tazobactam oder parenteraler Ernährung führte zu keiner Erhöhung des Galactomannanindex und bestätigte damit die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchung auf das *Aspergillus*-Antigen.

Vor dem Hintergrund der stark mit Mannan belasteten Chargen von Piperacillin-Tazobactam und einem möglicherweise transienten Auftreten des Antigens im Blutserum, wurden in einer sich anschließenden Kinetikuntersuchung sechs weitere Patienten untersucht. Da das routinemäßige Screening nur zweimal wöchentlich durchgeführt wird, wurde an zufällig ausgewählten Patienten mit Piperacillin-Tazobactam eine Untersuchung auf Mannan mit häufigeren Blutabnahmen initiiert. Das Antibiotikum wird bei neutropenen Patienten alle sechs Stunden appliziert, sodass fünf Blutabnahmen direkt nach der ersten Infusion in einem Zeitraum von sechs Stunden stattfanden, bevor eine erneute Gabe erfolgte. Die Gabe von Piperacillin-Tazobactam erhöhte die Mannankonzentration im Serum von einem Patienten direkt nach Infusion, ein positiver Antigenspiegel von 170,8 pg/ml wurde detektiert. Innerhalb einer Stunde fiel die Mannankonzentration wieder in den negativen Bereich ab. Unter Berücksichtigung, dass die Kinetik sich bei kumulativen Dosen von einzelnen Gaben unterscheiden kann, wurde die Probenentnahme nach circa sieben Tagen mit identischen Abnahmezeitpunkten wiederholt. In einem Patienten wurde direkt nach Infusionsende Mannan mit einer Konzentration von 79,82 pg/ml detektiert. Gemäß der Bedienungsanleitung des Platelia™ *Candida* Ag plus wird dieser Wert als grenzwertiges Ergebnis betrachtet. Bis auf den einen positiven und einen grenzwertigen Mannanwert wurden alle anderen Mannankonzentrationen als negativ entsprechend der Einteilung des Herstellers eingestuft (Bio-Rad, 2011). Um herauszufinden, wie lange nach Absetzen des Antibiotikums Mannan noch nachweisbar ist, wurden Blutabnahmen jeweils sechs, zwölf und 24 Stunden nach der letzten Gabe durchgeführt. Mannan war bereits sechs Stunden nach der letzten Gabe des Antibiotikums nicht mehr nachweisbar.

Limitiert ist die vorliegende Untersuchung auf die begrenzte Auswahl an getesteten Infusionslösungen, die sich zudem größtenteils auf das Sortiment des UKD beschränkt.

Patienten, die sich einer allogenen Stammzelltransplantation unterziehen, erhalten eine Vielzahl parenteraler Arzneimittel, die ebenfalls eine Kreuzreaktion mit den serologischen Antigentests eingehen könnten. Trotz dass die Infusionslösungen für die In-vitro-Untersuchung unter Reinraumbedingungen rekonstituiert worden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass positive Mannanergebnisse möglicherweise von einer Kontamination mit Hefepilzen stammen könnten. Man geht davon aus, dass der im Assay enthaltene Antikörper nicht nur das aus *Candida*-Spezies stammende Polysaccharidantigen Mannan detektiert, sondern auch in Form einer Kreuzreaktion andere Antigenstrukturen erkennt. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Untersuchung wurde eine In-vitro-Kreuzreaktion mit einigen getesteten Infusionslösungen und dem Platelia™ *Candida* AG plus festgestellt. Nach Infusion mannanbelasteter Präparate konnte das *Candida*-Antigen im Blutserum nicht mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Kinetikuntersuchung sind nicht ausreichend für die Unterstützung der Hypothese, dass die Infusion mannanbelasteter Antibiotika auch positive Serummannankonzentrationen hervorruft. Die Anzahl der untersuchten Patienten ist zu gering, zudem waren nur zwei auffällige Werte zu verzeichnen. Diese könnten auch der Ungenauigkeit des Assays geschuldet sein. Einzelne positive und nicht erklärable Werte wirken sich eher auf die Verlässlichkeit des Testes aus, was die zurückhaltende Empfehlung des Platelia™ *Candida* Ag plus in Leitlinien erklärt.

3. Diskussion und Ausblick

Aktuelle Publikationen heben hervor, dass falschpositive Galactomannanergebnisse des Platelia™ *Aspergillus* EIA bedingt durch Infusion von Piperacillin-Tazobactam kein Problem mehr darstellen (Ko, et al., 2015; Metan, et al., 2010; Metan, et al., 2012; Mikulska, et al., 2012; Otting, et al., 2014; Vergidis, et al., 2014; Xavier, et al., 2009). Sowohl die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführte In-vitro-Untersuchung mehrerer Chargen von Piperacillin-Tazobactam verschiedener Hersteller als auch die klinische Studie an hämatologisch-onkologischen Patienten bestätigten dies. Das halbsynthetische Beta-Lactam-Antibiotikum wird aus *Penicillium*-Spezies gewonnen, deren Polysaccharidantigene eine hohe Ähnlichkeit mit denen von *Aspergillus*-Spezies aufweisen (Swanink, et al., 1997). Die Verschleppung von *Penicillium*-Antigenen aus dem Produktionsprozess in das Endprodukt wurde als mögliche Ursache für falschpositive Ergebnisse des Platelia™ *Aspergillus* EIA angesehen. Eine verbesserte Aufreinigung mit Entfernung von *Penicillium*-Antigenen während der Produktion des Antibiotikums könnte ein Grund sein, dass ab 2006 falschpositive Galactomannanergebnisse nicht mehr als relevant angesehen wurden (Metan, 2013). Während viele Studien zu falschpositiven Galactomannanergebnissen existieren, ist generell das Auftreten falschpositiver Mannanergebnisse kaum untersucht. Diese Dissertationsarbeit zeigt, dass Kreuzreaktivität zwischen intravenös zu verabreichenden Präparaten wie Piperacillin-Tazobactam und dem Platelia™ *Candida* AG plus in-vitro auftritt. Nach Infusion konnte jedoch kein klinisch relevanter Effekt auf den Spiegel des *Candida*-Antigens im Blutserum festgestellt werden. Die Anzahl der Patienten mit laufender Piperacillin-Tazobactam-Therapie, die in die Kinetikanalyse eingeschlossen wurden, war zu gering, um allgemeingültige Aussagen zum Verhalten von Mannan abzuleiten. Direkt nach Infusionsende von Piperacillin-Tazobactam konnte zwar bei zwei von sechs Patienten eine Erhöhung des Mannans im Blutserum festgestellt werden, jedoch kann dieser Trend auch der Ungenauigkeit des *Candida*-EIA geschuldet sein und konnte statistisch in dieser Untersuchung nicht gesichert werden. Selbst nach multiplen Dosen von Piperacillin-Tazobactam wurde keine Kumulation von Mannan im Serum beobachtet. Mannane erscheinen in der Blutzirkulation nur transient, werden mit einer Halbwertszeit von zwei Stunden über Leber und Milz eliminiert und können daher selbst bei invasiver Candidose im Blutserum nicht immer mithilfe des Assays nachgewiesen werden (Kappe and Müller, 1991). Die Literaturrecherche ergab keine Hinweise, die die hohe Mannanbelastung des getesteten Piperacillin-Tazobactams erklären konnten. Am ehesten ist von einer Kreuzreaktion der Bestandteile des Antibiotikums mit dem serologischen Assay auszugehen. Eine andere Hypothese ist, dass tatsächlich pathogene *Candida*-Spezies in den Zubereitungen enthalten sind. Aufgrund der geforderten Sterilität der intravenös zu applizierenden Präparate als auch der fehlenden klinischen Symptomatik des

untersuchten Patientenkollektivs in der In-vivo-Studie ist von dieser Hypothese Abstand zu nehmen.

Die Ergebnisse der durchgeführten In-vitro-Untersuchung zeigen, dass Kreuzreaktionen von parenteraler Ernährung mit dem Platelia™ *Aspergillus* EIA nicht auftreten. In einigen Komponenten parenteraler Ernährung wie Spurenelementen, fettlöslichen Vitaminen sowie Fettemulsionen konnte in-vitro das *Candida*-Antigen Mannan nachgewiesen werden. Spurenelemente und Vitaminzubereitungen werden jedoch nur in kleinen Mengen von 10 ml zu All-in-one-Bags der parenteralen Ernährung hinzugefügt, sodass eine Verdünnung in 1000 ml bis 2000 ml stattfindet. Zusätzliche Verdünnungseffekte in der Blutzirkulation sowie pharmakokinetische Eigenschaften lassen sich aus der In-vitro-Untersuchung schlecht ableiten, sodass eine klinische Studie abgeschlossen wurde. Statt einer dreimal täglichen Kurzinfusion wie bei Piperacillin-Tazobactam, wird bei einer parenteralen Ernährung über einen Zeitraum von zwölf Stunden bis 24 Stunden mit anschließendem Infusionsbeutelwechsel infundiert. Pharmakokinetisch betrachtet bauen sich bei solch einer Dauertropfinfusion gleichmäßige Wirkstoffspiegel in einem Steady State auf. Auf eine Kreuzreaktivität zwischen dem Platelia™ *Candida* Ag plus mit Komponenten parenteraler Ernährung weist eine dieser Arbeit vorgeschaltete Diplomarbeit hin (Knoth, et al., 2016). Positive Mannanergebnisse wurden bei einer Calciumgluconatlösung und einem Spurenelementpräparat (Tracitrans® infant) gefunden, grenzwertige Mannanergebnisse wurden bei einem zweiten Spurenelementpräparat (Tracitrans® plus) und einer Fettemulsion detektiert. Limitiert ist diese Untersuchung durch die geringe Anzahl an Proben und unterschiedlichen Chargen, was in der aktuellen Dissertationsarbeit daher ausreichend Berücksichtigung fand. Eine mögliche Quelle für falschpositive Mannanergebnisse könnte Xylitol sein. Der Zuckeralkohol wird neben katalytischer Hydrierung auch biotechnologisch über Hefepilze hergestellt (Fouad Sarrouh, et al., 2007). *Candida*-Antigene könnten die Herstellung überdauern und im Endprodukt nachgewiesen werden. Unter den getesteten Infusionslösungen dieser Arbeit enthalten beide Spurenelementpräparate Xylitol und zudem wurde in-vitro ein hoher Mannangehalt in ihnen festgestellt. Die These, dass aus der Produktion stammende Antigenstrukturen zu Kreuzreaktionen mit dem Platelia™ *Candida* Ag plus führen, wird durch den in der bereits erwähnten Diplomarbeit beschriebenen Mannangehalt in einem anderen xylitolhaltigen Spurenelementpräparat Tracitrans® plus gestützt (Knoth, et al., 2016). Allerdings erklärt dieser Umstand nicht die starke Mannanbelastung in dem xylitolfreien Tracitrans® infant. Das *Candida*-Antigen Mannan wurde sowohl in der Lipidemulsion SMOFlipid® der aktuellen Arbeit als auch in der Studie von Knoth et al. nachgewiesen (Knoth, et al., 2016). Ein 2011 veröffentlichter Fallbericht macht auf eine mögliche Kreuzreaktion von pflanzlichen Galactomannan mit dem Platelia™ *Aspergillus* EIA aufmerksam (Girmenia, et al., 2011). Im Blutserum einer enteral ernährten Patientin wurden Galactomannanindexe größer 0,5

nachgewiesen, die durch Translokation von Antigenen der enteralen Ernährung durch eine geschädigten Darmmukosa erklärt wurden. Das verwendete Nutricia Energy multi fibre enthält partiell hydrolisierte Guarkernballaststoffe und Polysaccharide aus Sojabohnen. Sojabohnenöl ist auch Bestandteil von parenteralen Ernährungsbeuteln. SMOFlipid®, SmofKabiven®, Olimel® und das fettlösliche FrekaVit®, die in dieser Arbeit auf das Vorhandensein von Pilzantigenen getestet wurden, enthalten Sojabohnenöl. Interessanterweise zeigte die In-vitro-Studie den höchsten Mannangehalt in dem Präparat mit dem höchsten Gehalt an Sojabohnenöl, SMOFlipid®. Es ist jedoch unklar, ob die für den Platelia™ *Aspergillus* EIA beschriebene Kreuzreaktion auch für den Assay auf *Candida*-Antigene zutrifft.

Diese Arbeit fokussiert sich als eine der wenigen Studien auf die Untersuchung von falschpositiven Ergebnissen des Platelia™ *Candida* Ag plus. Bisher wurden Kreuzreaktionen des Mannan-Assays mit intravenösen Zubereitungen kaum untersucht. Zudem wurden systematisch verschiedene Komponenten parenteraler Ernährung, die bei Risikopatienten für invasive Mykosen eingesetzt werden, auf Kreuzreaktivität mit dem Galactomannan- und Mannanassay untersucht. Auch wenn die hier getesteten Infusionslösungen keine belastbaren Ergebnisse hervorbrachten, sollten Ärzte sich bei der Interpretation der serologischen Antigenassays einer möglichen Kreuzreaktion mit der Medikation des Patienten bewusst sein. Das Ergebnis der Pilzantigenassays ist immer im Kontext mit klinischen Symptomen des Patienten, bildgebenden Verfahren und mikrobiologischen Methoden entsprechend der Empfehlung aktueller Leitlinien zu bewerten. Eine Wiederholung des Assays sowie Probenentnahmen vor der Applikation von Infusionslösungen können falschpositive Ergebnisse minimieren (Singh, et al., 2004; Walsh, et al., 2004). Bei Verwendung von zentralen Venenkathetern sollten jeweils verschiedene Lumina für die Applikation von Infusionslösungen und für die Blutabnahme genutzt werden (Penack, et al., 2008). Kostspielig und aufwendig ist hingegen das Testen jeder Charge von verdächtigen Infusionslösungen, die Patienten unter Risiko für invasive Mykosen verabreicht werden (Bart-Delabesse, et al., 2005; Gerlinger, et al., 2012; Machetti, et al., 2006). Der Einsatz des Platelia™ *Aspergillus* EIA, für den keine Beeinflussung durch Infusionslösungen in dieser Dissertationsarbeit nachgewiesen wurde, wird in Leitlinien positiv bewertet. Keine explizite Empfehlung gibt es für die Anwendung des Platelia™ *Candida* Ag plus, der in dieser Arbeit durch in-vitro-Wechselwirkungen mit Infusionslösungen auffiel.

4. Zusammenfassung

Hintergrund. Invasive Mykosen sind bei immunsupprimierten Patienten mit erhöhter Morbidität und Mortalität verbunden. Ein frühzeitiger Beginn einer systemischen antimykotischen Therapie kann die Letalität senken, doch unspezifische Symptome wie Fieber oder pulmonale Infiltrate in der Bildgebung erschweren die Diagnosestellung. Das Screening auf das *Aspergillus*-Antigen Galactomannan wird routinemäßig bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation durchgeführt, die einem erhöhten Risiko für systemische Pilzinfektionen ausgesetzt sind. Der Stellenwert des Assays auf das *Candida*-Antigen Mannan ist hingegen unklar. Serologische Antigentests auf Mannan und Galactomannan liefern ein schnelleres Ergebnis als traditionelle mikrobiologische Methoden, weisen eine adäquate Sensitivität auf und eignen sich zum Monitoring von Hochrisikopatienten sowie zum Überprüfen des Therapieerfolgs unter laufender antimykotischer Therapie. Falschpositive Ergebnisse vor allem des Platelia™ *Aspergillus* EIA sind bekannt. Einerseits verbessert ein frühzeitiger Therapiebeginn bei Verdacht auf invasive Mykosen die Prognose der Patienten, andererseits kann der ungerechtfertigte Einsatz von Antimykotika das Nebenwirkungs- und Interaktionsrisiko erhöhen sowie zu steigenden Kosten im Gesundheitssystem führen. Faktoren, die zu falschpositiven Ergebnissen beitragen, sind daher für die Interpretation des Ergebnisses der Antigentests unerlässlich. Parenterale Ernährung wird bei Patienten nach Stammzelltransplantation bei behandlungsbedingten Komplikationen wie Mukositis begonnen. Piperacillin-Tazobactam wird als Breitspektrumantibiotikum leitliniengerecht bei febriler Neutropenie eingesetzt. Beides kann damit Bestandteil der Therapie eines Risikopatienten für invasive Mykosen sein und ein Einfluss dieser Infusionslösungen auf die Spezifität der Antigenassays gilt es zu untersuchen.

Fragestellung/ Hypothese. Diese Arbeit untersucht das Auftreten falschpositiver Mannan- und Galactomannanergebnisse bei hämatologischen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, die parenteral ernährt werden müssen oder eine antibiotische Therapie mit Piperacillin-Tazobactam erhalten. Die Kenntnis von Quellen, die die Spezifität des Platelia™ *Candida* Ag plus und den Platelia™ *Aspergillus* EIA beeinflussen, ist ein wichtiger Beitrag zur Diagnostik systemischer Pilzinfektionen.

Material und Methoden. In einem ersten Teil der Studie wurden verschiedene Chargen von Piperacillin-Tazobactam und Komponenten parenteraler Ernährung in-vitro auf das Vorhandensein von Mannan und Galactomannan untersucht. Die Rekonstitution der Proben fand unter Reinraumbedingungen statt. Die Testung erfolgte analog zu der von Serumproben in der Abteilung für Mikrobiologie. Insgesamt wurden 380 Proben von 83 Chargen mit dem Platelia™ *Candida* Ag plus und Platelia™ *Aspergillus* EIA untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die klinische Relevanz antigenbelasteter Infusionslösungen an Risikopatienten

für invasive Mykosen anhand einer prospektiven, diagnostischen Studie auf einer hämatologischen Station untersucht. Eingeschlossen wurden nach positivem Votum durch die zuständige Ethikkommission und schriftlicher Einwilligung 84 Patienten, die sich einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen. Blutserum wurde vor Beginn, während und nach Ende parenteraler Ernährung und antibiotischer Therapie mit Piperacillin-Tazobactam auf Mannan und Galactomannan untersucht. Beide Interventionen waren im Rahmen der Behandlung der Patienten und damit unabhängig von dieser Studie indiziert. Intraindividuell wurde die Differenz der Serummannankonzentration und des Serumgalactomannanindex zwischen laufender Behandlung mit parenteraler Ernährung bzw. Piperacillin-Tazobactam und der Abwesenheit beider Behandlungen bestimmt. Zur Auswertung wurden drei Patientenkollektive gebildet: Patienten mit Piperacillin-Tazobactam-Gabe, Patienten mit parenteraler Ernährung, Patienten mit gleichzeitiger parenteraler Ernährung und Piperacillin-Tazobactam-Verabreichung. Sechs Patienten mit Piperacillin-Tazobactam-Behandlung wurden einer Kinetikanalyse unterzogen, um die Mannanbelastung der in-vitro-getesteten Präparate eingehender zu studieren. Häufigere Blutabnahmen zu definierten Zeitpunkten erlaubten die Aufstellung einer Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Mannan. Fünf Blutabnahmen erfolgten innerhalb von sechs Stunden zwischen der ersten und der zweiten Gabe von Piperacillin-Tazobactam. Eine Wiederholung der Blutabnahmen fand nach circa sieben Tagen antibiotischer Therapie sowie sechs, zwölf und 24 Stunden nach der letzten Gabe von Piperacillin-Tazobactam statt.

Ergebnisse. Das *Aspergillus*-Antigen Galactomannan wurde in keiner der getesteten Infusionslösungen nachgewiesen. Dagegen waren eine Lipidemulsion, zwei verschiedene Spurenelementpräparate, eine fettlösliche Vitaminzubereitung und das Antibiotikum Piperacillin-Tazobactam mit dem *Candida*-Antigen Mannan belastet. Der Gehalt an Mannan in Piperacillin-Tazobactam war größer als 500 pg/ml und damit größer als der höchste Punkt der Kalibriergeraden. Unabhängig von Charge und Hersteller blieb die Mannanbelastung von Piperacillin-Tazobactam durchgehend positiv. Eine invasive Candidose konnte bei allen 84 Patienten der klinischen Studie anhand der Kriterien der European Organization for Research and Treatment of Cancer- Mycoses Study Group ausgeschlossen werden. Fünf Patienten mit möglicher Aspergillose mussten gemäß dieser Kriterien bei der klinischen Studie auf Galactomannan ausgeschlossen werden. Sowohl die Infusion mit Komponenten parenteraler Ernährung als auch die Antibiotikabehandlung mit Piperacillin-Tazobactam führte zu keiner signifikanten Erhöhung von Mannan und Galactomannan im Blutserum der Patienten. Ein Mannanwert aus der mit sechs Patienten durchgeführten Kinetikuntersuchung war als grenzwertig mit einer Mannankonzentration zwischen 62,5 und 125 pg/ml einzuordnen und ein anderer als positiv mit einer Konzentration größer 125 pg/ml. Beide Werte wurden

jeweils kurz nach Infusionsende gemessen. Alle anderen Werte befanden sich im als negativ gewerteten Bereich mit einer Konzentration kleiner 62,5 pg/ml.

Schlussfolgerung. Übereinstimmend mit aktuellen Publikationen führt die Infusion von Piperacillin-Tazobactam nicht zu falschpositiven Galactomannanergebnissen. Kreuzreaktionen des Platelia™ *Aspergillus* EIA mit parenteraler Ernährung traten in dieser Studie sowohl in-vitro als auch in-vivo nicht auf. Einige Zubereitungen wiesen jedoch eine in-vitro festgestellte Belastung am *Candida*-Antigen Mannan auf, die in der nachfolgenden In-vivo Untersuchung nach intravenöser Infusion an hämatologischen Patienten keine klinische Relevanz zeigte. Aus Literaturrecherchen ist bekannt, dass eine Mannanantigenämie transient vorkommen kann. Die Kinetikuntersuchung mit häufigeren Blutabnahmen nach Infusion von Piperacillin-Tazobactam sowohl als Einzelgabe als auch nach kumulativen Dosen konnte jedoch keine belastbaren Ergebnisse für eine In-vivo-Relevanz liefern. Auch wenn die getesteten Infusionslösungen nach intravenöser Infusion nicht zu einem Anstieg von Mannan oder Galactomannan im Serum führten, sollten Ärzte bei der Interpretation serologischer Antigentests eine mögliche Kreuzreaktion in Betracht ziehen. Dank einer verbesserten Aufreinigung bei der Herstellung des semisynthetischen Piperacillin-Tazobactams konnte eine in-vivo-relevante Kreuzreaktion mit dem Platelia™ *Aspergillus* EIA vermindert werden. Die Anwendung des Antigentests auf Galactomannan wird in verschiedenen nationalen und internationalen Leitlinien als nützlich hervorgehoben. Eine Beeinflussung des Galactomannantestes durch gleichzeitige Infusion anderer Lösungen und damit eine Auswirkung auf die Spezifität als wichtigen Güteparameter konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dagegen wird der Einsatz des Platelia™ *Candida* Ag plus in den Leitlinien nicht explizit in der Diagnostik invasiver Candidosen empfohlen, wenn dann nur in Kombination mit dem dazugehörigen Test auf *Candida*-Antikörper, um die Sensitivität zu erhöhen. Limitiert ist diese Arbeit durch die geringe Auswahl an untersuchten Infusionslösungen. Neben parenteraler Ernährung und Piperacillin-Tazobactam erhalten stammzelltransplantierte Patienten weitere intravenöse Infusionslösungen, die teilweise auch einem halbsynthetischen Ursprung entstammen. Die Erkenntnisse dieser Studie beziehen sich daher nur auf die explizit getesteten Präparate. Um Klarheit über Falschpositivität zu erhalten, müssten weitere intravenös zu verabreichende Arzneimittel auf Kreuzreaktionen mit den Antigentests untersucht werden. Da falschpositive Ergebnisse chargenabhängig auftreten können, ist in zukünftigen Studien die Einbeziehung mehrerer Chargen in die Testung notwendig.

5. Summary

Background. Invasive fungal infections in immunocompromised patients are associated with increased morbidity and mortality. An early start of antifungal treatment can reduce lethality but unspecific symptoms like fever and radiological signs are difficult to handle. Screening of *Aspergillus*-antigen galactomannan is usually performed in stem cell recipients at high risk for invasive fungal infections. The status of the mannan assay to detect the *Candida*-antigen mannan remains unclear. The results of serological antigen assay can be faster available than those from the culture-based microbiological test. Both can be used with sufficient sensitivity to monitor patients at high risk and to survey the therapeutic response. False-positivity especially of the Platelia™ *Aspergillus* EIA is known. On the one hand early start of antifungal treatment can improve the outcome of patients; on the other hand, the unjustified use of antifungal drugs can elevate the risk of adverse events and interactions as well as costs in the health care system. Sources of false-positivity are essential for interpretation of antigen assays. Parenteral nutrition is used for stem cell recipients in case of insufficient alimentation like mucositis. The broad-spectrum antibiotic piperacillin-tazobactam is started at the onset of febrile neutropenia. Both are applied in the treatment of patients at high risk for invasive fungal infections and their influence on the specificity of antigen assays has to be investigated.

Hypothesis. This study investigates the occurrence of false-positive mannan and galactomannan results in hematological patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation with current parenteral nutrition or antibiotic treatment with piperacillin-tazobactam. The knowledge of sources influencing specificity of Platelia™ *Candida* Ag plus and Platelia™ *Aspergillus* EIA contributes to the diagnosis of invasive fungal infections.

Material and Methods. The first part of the study investigates several batches of piperacillin-tazobactam and components of parenteral nutrition on the presence of mannan and galactomannan in vitro. The samples were reconstituted under sterile conditions. Measurement with the assays in the department of microbiology were similar to the handling of serum samples. In total, 380 samples of 83 batches were analyzed with the Platelia™ *Candida* Ag plus and the Platelia™ *Aspergillus* EIA. In the second part of the study, a prospective diagnostic study on a hematological ward was performed in order to investigate the clinical relevance of infusion solutions containing fungal antigens. After approval from the local Ethics Committee and giving written informed consent, in total 84 patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation were included. Serum samples were collected before start, during and after parenteral nutrition and antibiotic treatment with piperacillin-tazobactam and analyzed on the occurrence of mannan and galactomannan. Both were initiated in the context of the regular treatment and independent of this study. Differences of serum mannan concentration and serum galactomannanindex were calculated between

current treatment with parenteral nutrition or piperacillin-tazobactam and the absence of them, respectively. Three patient groups were formed for analysis: patients with piperacillin-tazobactam, patients with parenteral nutrition and patients with concurrent parenteral nutrition and piperacillin-tazobactam. Six patients with piperacillin-tazobactam were investigated closely in a kinetic analysis in order to study the mannan burden of the in vitro tested infusion solutions. More frequent blood sampling led to a plasma concentration-time-curve of mannan. Five blood samples were drawn within six hours between the first and the second administration of piperacillin-tazobactam. Resampling of blood was planned after approximately seven days of antibiotic treatment as well as six, twelve and 24 hours after last administration of piperacillin-tazobactam.

Results. The *Aspergillus*-antigen galactomannan was not detected in any of the tested infusion solutions. In contrast, a lipid emulsion, two different trace element preparations, a fat-soluble vitamin preparation and the antibiotic piperacillin-tazobactam were burdened with the *Candida*-antigen mannan. Mannan concentration in piperacillin-tazobactam was higher than 500 pg/ml and in consequence higher than the highest point of the calibration line. Mannan levels in piperacillin-tazobactam were consistent positive, independent of batch or manufacturer. Invasive candidosis was excluded in all 84 patients of the clinical study in accordance to the criteria of the European Organization for Research and Treatment of Cancer- Mycoses Study Group. Five patients with probable aspergillosis according to these criteria had to be excluded for the clinical study of galactomannan. The infusion with components of parenteral nutrition and the antibiotic treatment with piperacillin-tazobactam increased significantly mannan and galactomannan in blood serum of patients. One single mannan value originated from the kinetic analysis was considered as borderline with a mannan concentration between 62.5 pg/ml and 125 pg/ml and another as positive with a concentration higher than 125 pg/ml. Both were measured directly at the end of infusion. All other values were negative with a mannan concentration lower than 62.5 pg/ml.

Conclusion. Concordant to recent publications, the infusion of piperacillin-tazobactam does not lead to false-positive galactomannan results. In vitro and in vivo cross-reactivity of Platelia™ *Aspergillus* EIA with parenteral nutrition does not occur in this study. Some preparations contained the *Candida*-antigen mannan in vitro but intravenous infusion in hematological patients showed no clinical relevance in the subsequent in vivo study. According to literature research, mannan antigenemia can occur transient. The kinetic analysis with more frequent blood sampling did not prove in vivo relevance after single dose and multiple doses of piperacillin-tazobactam. Physicians should be aware of possible cross-reactivity of antigen assays in the interpretation of the results although the tested infusion solutions did not lead to elevation of mannan and galactomannan in serum. Due to improved purification in the

manufacturing process of piperacillin-tazobactam, cross-reactivity of Platelia™ *Aspergillus* EIA could be reduced. Measuring of galactomannan is emphasized in national and international guidelines as a useful diagnostic tool. This study could not demonstrate an influence of infusion solutions on the galactomannan assay and in consequence an impact on specificity. In contrast, Platelia™ *Candida* Ag plus is not recommended in the diagnosis of invasive candidosis. Only the combination with the *Candida*-antibody test turn out to be beneficial because of increased sensitivity. This study is limited to the small selection of tested infusion solutions. Stem cell recipients are given additional intravenous infusion solutions partly originated from semisynthetic manufacturing. Findings of this study refer only to the tested preparations. Further research on other intravenous drugs is necessary in order to get clarity about false-positivity with antigen assays. Future studies should include testing of several batches to avoid false-positivity, which is depending on the batch.

6. Abbildungsverzeichnis

Figure 1.1. Mannan concentration c_{mannan} in examined preparations applied on the bone marrow transplantation ward.....	Erster Originalartikel S.29/ 933
Figure 1.2. Galactomannan index (GMI) in examined preparations applied on the bone marrow transplantation ward..	Erster Originalartikel S.29/ 934
Figure 2.1. Number (no.) of patients in relation to the development of mannan serum concentration (c_{mannan}) with the initiation of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP.....	Zweiter Originalartikel S.30/ 579
Figure 2.2. Number (no.) of patients in relation to the development of mannan serum concentration (c_{mannan}) with the termination of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP.....	Zweiter Originalartikel S.30/ 580
Figure 2.3. Number (no.) of patients in relation to the development of galactomannan index (GMI) with the initiation of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP.....	Zweiter Originalartikel S.30/ 580
Figure 2.4. Number (no.) of patients in relation to the development of galactomannan index (GMI) with the termination of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP.....	Zweiter Originalartikel S.30/ 580
Figure 2.5. Kinetics of serum mannan of patients receiving piperacillin-tazobactam (TZP) after the first dose on day 1 (A), after a dose in the steady state (B) and after the last dose (C)...	Zweiter Originalartikel S.30/ 581

7. Tabellenverzeichnis

Table 1.1. Examined infusion solutions applied on the bone marrow transplantation ward.....	Erster Originalartikel S.29/ 932
Table 1.2. Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc multiple comparative test for mannan concentration (c_{mannan}) in different drugs.....	Erster Originalartikel S.29/ 934
Table 1.3. Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc multiple comparative test for galactomannan index (GMI) in different drugs.....	Erster Originalartikel S.29/ 935
Table 2.1. Patient and treatment characteristics of study population.....	Zweiter Originalartikel S.30/ 578
Table 2.2. Median difference of c_{mannan} in pg/mL (95% CI).....	Zweiter Originalartikel S.30/ 579
Table 2.3. Median difference of GMI (95% CI).....	Zweiter Originalartikel S.30/ 580

8. Literaturverzeichnis

- Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, Rousselot P, Raffoux E, Menotti J, Derouin F and others. 2006. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 44(2):389-94.
- Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, Souville D, Gay F, Philippe B, Bossi P, Danis M, Vernant JP, Datry A. 2005. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol* 43(10):5214-20.
- Bio-Rad. 2009. Instruction Manual Platelia *Aspergillus* EIA.
- Bio-Rad. 2011. Instruction Manual Platelia *Candida* Ag Plus.
- Blijlevens NMA, Donnelly JP, Meis JF, Verweij PE, De Pauw B. 2002. *Aspergillus* galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl Infect Dis* 4:64-65.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA and others. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46(12):1813-21.
- Fouad Sarrouh B, Tresinari Dos Santos D, Silvério da Silva S. 2007. Biotechnological production of xylitol in a three-phase fluidized bed bioreactor with immobilized yeast cells in Ca-alginate beads. *Biotechnology journal* 2(6):759-763.
- Fresenius Kabi Deutschland GmbH. 2016. Fachinformation Piperacillin/ Tazobactam Kabi 4 g/ 0,5 g. Bad Homburg.
- Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, Billon C, Touratier S, Castaigne S, Eloy O. 2012. False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Med Mal Infect* 42(1):10-4.
- Girmentria C, Santilli S, Ballarò D, Del Giudice I, Armiento D, Mauro FR. 2011. Enteral nutrition may cause false-positive results of *Aspergillus* Galactomannan assay in absence of gastrointestinal diseases. *Mycoses* 54(6):e883-e884.
- Hage CA, Reynolds JM, Durkin M, Wheat LJ, Knox KS. 2007. Plasmalyte as a cause of false-positive results for *Aspergillus* galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 45(2):676-7.
- Kappe R, Müller J. 1991. Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. *J Clin Microbiol* 29(8):1665-1669.
- Kędzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, Kędzierska J. 2007. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1→3)-β-D-glucan antigens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26(11):755-766.
- Knoth H, Maywald D, Walter W. 2016. In-vitro detection of mannan and galactomannan in components of total parenteral nutrition (TPN). *Pharmazie* 71:238–242.
- Ko JH, Peck KR, Lee WJ, Lee JY, Cho SY, Ha YE, Kang CI, Chung DR, Jung CW, Kang ES and others. 2015. Generic piperacillin/tazobactam is not associated with galactomannan false-positivity in adult patients with cancer: a case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(7):1437-41.
- Machetti M, Majabo MJ, Furfaro E, Solari N, Novelli A, Cafiero F, Viscoli C. 2006. Kinetics of galactomannan in surgical patients receiving perioperative piperacillin/tazobactam prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 58(4):806-10.
- Metan G. 2013. The interaction between piperacillin-tazobactam and *Aspergillus* galactomannan antigenemia assay: is the story over? *Infection* 41(1):293-4.


- Metan G, Agkus C, Buldu H, Koc AN. 2010. The interaction between piperacillin/tazobactam and assays for *Aspergillus* galactomannan and 1,3-beta-D-glucan in patients without risk factors for invasive fungal infections. *Infection* 38(3):217-21.
- Metan G, Agkus C, Nedret Koc A, Elmali F, Finkelman MA. 2012. Does ampicillin-sulbactam cause false positivity of (1,3)-beta-D-glucan assay? A prospective evaluation of 15 patients without invasive fungal infections. *Mycoses* 55(4):366-71.
- Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola AM, Ratto S, Bacigalupo A, Viscoli C. 2012. Piperacillin/tazobactam (Tazocin) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother* 67(7):1746-8.
- Müller FM, Weig M. 2003. Systemic Fungal Infections – New Approaches for Diagnosis and Treatment. *Klinikerzt* 32(2):53-60.
- Orlopp K, von Lilienfeld-Toal M, Marklein G, Reiffert SM, Welter A, Hahn-Ast C, Purr I, Gorschluter M, Molitor E, Glasmacher A. 2008. False positivity of the *Aspergillus* galactomannan Platelia ELISA because of piperacillin/tazobactam treatment: does it represent a clinical problem? *J Antimicrob Chemother* 62(5):1109-12.
- Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ, Bow EJ, Hadley S, Leon C, Nucci M, Patterson TF, Perfect JR. 2011. Early treatment of candidemia in adults: a review. *Med Mycol* 49(2):113-20.
- Otting KA, Stover KR, Cleary JD. 2014. Drug-laboratory interaction between beta-lactam antibiotics and the galactomannan antigen test used to detect mould infections. *Braz J Infect Dis* 18(5):544-7.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ and others. 2016. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 62(4):e1-50.
- Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Nguyen MH and others. 2016. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*.
- Penack O, Rempf P, Graf B, Thiel E, Blau IW. 2008. False-positive *Aspergillus* antigen testing due to application of piperacillin/tazobactam--is it still an issue? *Diagn Microbiol Infect Dis* 60(1):117-20.
- Petratiene R, Petratis V, Witt JR, 3rd, Durkin MM, Bacher JD, Wheat LJ, Walsh TJ. 2011. Galactomannan antigenemia after infusion of gluconate-containing Plasma-Lyte. *J Clin Microbiol* 49(12):4330-2.
- Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J. 2007. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia *Aspergillus* test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol* 45(9):3141-2.
- Ruhnke M, Bohme A, Buchheidt D, Cornely O, Donhuijsen K, Einsele H, Enzensberger R, Hebart H, Heussel CP, Horger M and others. 2012. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology--guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO). *Ann Oncol* 23(4):823-33.
- Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, Buchheidt D, Glockner A, Heinz W, Hohl R, Horre R, Karthaus M, Kujath P and others. 2011. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* 54(4):279-310.
- Singh N, Obman A, Husain S, Aspinall S, Mietzner S, Stout JE. 2004. Reactivity of platelia *Aspergillus* galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum. *Antimicrob Agents Chemother* 48(6):1989-92.
- Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, Donnelly JP, Verweij PE. 1997. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol* 35(1):257.
- Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, Estes L, Caliendo AM, Baden LR, Wingard JR, Baddley J, Assi M, Norris S and others. 2014. Reduction in false-positive *Aspergillus* serum

- galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States. *J Clin Microbiol* 52(6):2199-201.
- Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, Bacigalupo A. 2004. Falsepositive galactomannan platelia aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* 38 (6):913-916.
- Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaher A, Murray H, Mya-San C, Bacher J, Petraitis V. 2004. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol* 42(10):4744-8.
- Wellinghausen N, Weber U. 2009. Aspergillus-Antigen-Nachweis als diagnostischer Marker einer invasiven Schimmelpilz-Infektion. *LaboReport* 45.
- Wild C, Jonas S, Frank W, Traunmüller F. 2001. Aspergillose Stand des Wissens zu Diagnose, Therapie, Therapie, Umweltbedingungen. *Österreichische Akademie der Wissenschaften*.
- Xavier MO, Pasqualotto AC, Aquino VR, Sukienni TCT, Severo LC. 2009. Galactomannan detection from piperacillin-tazobactam brands available in the brazilian market. *Braz J Infect Dis* 13(5):352-355.
- Zhang S, Wang S, Wan Z, Li R, Yu J. 2015. The diagnosis of invasive and noninvasive pulmonary aspergillosis by serum and bronchoalveolar lavage fluid galactomannan assay. *Biomed Res Int* 2015:943691.

9. Erster Originalartikel

Walter W, Bornhäuser M, Stölzel F, Zeidler A, Knoth H. 2018. In vitro detection of Candida and Aspergillus antigen in parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. *Mycoses* 61 (12): 931-937.

In vitro detection of *Candida* and *Aspergillus* antigen in parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam

Wencke Walter¹  | Martin Bornhäuser² | Friedrich Stölzel² | Anne Zeidler¹ | Holger Knoth¹

¹Klinik-Apotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Dresden, Germany

²Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Dresden, Germany

Correspondence

Wencke Walter, Klinik-Apotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Dresden, Germany.
Email: wencke.walter@uniklinikum-dresden.de

Funding information

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Summary

Background: Screening for *Aspergillus* (Asp-AG) and *Candida* antigen (Ca-AG) with immunoassays is established for stem cell recipients at high risk for invasive fungal infections (IFI). While parenteral nutrition (PN) will be applied in case of complications leading to insufficient alimentation, piperacillin-tazobactam (TZP) is started at the onset of febrile neutropenia.

Objectives: The aim of this study was to investigate drug-laboratory interactions between PN and TZP and both immunoassays which could affect the specificity of the assays and lead to the false assumption of an IFI.

Methods: Batches of TZP and PN were tested with both assays in vitro. In total, 380 samples of 83 batches were analysed.

Results: None of the examined preparations were tested positive with Asp-AG assay. Measurable amounts of Ca-AG were detected in a lipid emulsion, two different trace element supplements, a fat-soluble vitamin preparation and all tested brands of TZP.

Conclusions: We conclude that false positivity of Asp-AG assay due to TZP and PN does not occur. Cross reactions with Ca-AG assay have been detected in some preparations. The in vivo relevance of Ca-AG positivity has to be reviewed in further studies considering an effect of dilution. Physicians should be aware of a possible cross reaction with Ca-AG assays which could lead to false-positive results.

KEYWORDS

Aspergillus, *Candida*, enzyme-linked immunosorbent assay, galactomannan, mannans, parenteral Nutrition, piperacillin

1 | INTRODUCTION

Invasive fungal infections remain a major cause for morbidity and mortality in immunocompromised patients.^{1,2} Early diagnosis is necessary to increase survival rates, but confirming the diagnosis is challenging due to the lack of specific symptoms.³ Recent guidelines recommend the use of traditional culture-based methods combined with nonculture diagnostic tests such as antigen

detection assays to improve sensitivity and early diagnosis.^{4,5} The disadvantage of those antigen tests is the moderate specificity, 70%-80% for the *Candida* antigen (Ca-AG) assay and 85% for the *Aspergillus* antigen (Asp-AG) assay also depending on the patient population.^{2,6} Studies reported false-positive test results for the Asp-AG galactomannan in serum samples in patients receiving beta-lactam antibiotics especially piperacillin-tazobactam (TZP).⁷⁻¹⁰ Apart from that, false positivity of Asp-AG appeared in

bronchoalveolar lavage fluid by using sodium gluconate for bronchoscopy and after infusion of intravenous sodium gluconate.^{11,12} There is little information about false-positivity of the Ca-AG mannan in serum samples. In the department of haematology of the university hospital, Dresden routine screening of Ca-AG and Asp-AG is performed for patients after allogeneic stem cell transplantation. The aim of this in vitro study was to investigate the occurrence of positive antigen test results in parenteral nutrition (PN) and TZP. Parenteral nutrition is often required for patients with mucositis, a frequent complication after transplantation. It is administered over hours and characterised by the infusion of high volumes. On the onset of fever, an antibiotic treatment with TZP is usually started in neutropenic patients. Recent studies have determined a reduction in false-positive Asp-AG test results in TZP, and the aim of this study was to either confirm or falsify these results.¹³⁻¹⁸ For obvious reasons, physicians need to know whether the infusion of PN or TZP will influence the specificity of the antigen tests. This knowledge will help to avoid the unjustified use of antifungal drugs which have severe side effects and represent an important cost factor in the healthcare system.

2 | MATERIALS AND METHODS

On the bone marrow transplantation (BMT) ward, all-in-one-bags (AIO-bags) are commonly used for PN in adult patients. AIO-bags contain a variable mixture of amino acids, lipid emulsions, carbohydrates and electrolytes. If necessary, trace elements or vitamins can be added. During this study, we have focused on the preparations which are applied in our hospital. We have tested certain infusion solutions in vitro over a period of 15 months (October 2015-January 2017) by using the antigen assays with the same procedure as the patient serum samples were handled. The examined preparations are presented in Table 1. Several batches of parenteral nutrition compounds (Aminomix[®] n = 15, SmofKabiven[®] n = 8, Olimel[®] n = 7, SMOFlipid[®] n = 4) were tested for the presence of mannan and galactomannan. Supplements with trace elements (Addel[®], Addaven[®]) and vitamins (FrekaVit[®] water-soluble Novum, FrekaVit[®] fat-soluble) are usually added to AIO-bags, so they were also chosen for the in vitro study. After testing of two different batches, Addel[®], the pharmacy department of our hospital, made an exchange to another trace element product named Addaven[®], so both preparations were considered in the study. To investigate the influence of false-positive tests due to beta-lactam antibiotics, we tested also different batches of TZP. After pretesting of several batches TZP and detecting high mannan concentrations (c_{mannan}) in the preparations, we decided to analyse additional samples from four other manufacturers. Samples from Addel[®]/Addaven, FrekaVit and TZP were taken under conditions of Good Manufacturing Practice at the pharmacy department. Five different vials from every batch were used for analysis. The bottles from which the samples were tested were unused in contrast to the AIO-bags which were already in-use. Due to economic reasons,

TABLE 1 Examined infusion solutions applied on the bone marrow transplantation ward

Drug (manufacturer)	No. of batches (n = 83)	No. of samples (n = 380)	Diluent
AIO-bags			
Aminomix [®] 1 Novum (Fresenius Kabi)	15	102	-
Olimel Peri 2.5% E (Baxter)	7	12	-
SmofKabiven [®] zentral (Fresenius Kabi)	8	11	-
SMOFlipid [®] 200 mg/mL (Fresenius Kabi)	4	10	-
Supplements to AIO-bags			
Addel [®] N (Baxter)	2	10	-
Addaven [®] (Fresenius Kabi)	11	55	-
FrekaVit [®] fat-soluble (Fresenius Kabi)	10	50	-
FrekaVit [®] water-soluble Novum (Paesel und Lorei)	6	30	10 mL WFI
Piperacillin-tazobactam			
Piperacillin/tazobactam 4 g/0.5 g (Fresenius Kabi)	15	75	20 mL WFI
Piperacillin/tazobactam 4 g/0.5 g (Hexal)	1	5	20 mL WFI
Piperacillin/tazobactam 4 g/0.5 g (Stragen)	1	5	20 mL WFI
Piperacillin/tazobactam 4 g/0.5 g (Teva)	1	5	20 mL WFI
Piperacillin plus tazobactam (Eberth)	2	10	20 mL WFI

Every sample was tested three times.
WFI, Water for injection; AIO-bags, All-in-one-bags.

samples were drawn from AIO-bags after administration was completed. In this case, sampling was performed directly on the BMT ward yielding a diverse number of samples per batch. Some of them already contained trace elements or vitamins because sampling happened after administration. According to the summary of product characteristics, the water-soluble vitamin preparation FrekaVit[®] was solved in 10 mL of water for injection (WFI).¹⁹ The vials of TZP were reconstituted in 20 mL WFI at the concentration used for intravenous administration in accordance with the manufacturer's instructions.²⁰ Samples of all other preparations are used undiluted. Until measurement with the antigen assay in the department of microbiology, all samples were stored in a cool place at a temperature of 2-8°C protected from light. Approval from the local Ethics committee for this study has been given (no. of approval EK 482112015).

For the detection of the antigens, commercial enzyme-linked immunosorbent assays (EIA) were applied. Antigens are polysaccharide constituents of the fungal cell wall which react with specific antibodies of the EIA. Platelia™ Candida AG plus was performed for the analysis

of mannan and Platelia™ Aspergillus EIA for the analysis of galactomannan referred to the manufacturer's recommendations (Bio-Rad, France).^{21,22} The Ca-AG assay test result is determined by photometric measurement and expressed as c_{mannan} in pg/mL. The determination is limited to 500 pg/mL conditioned by the calibration line. Ca-AG results were considered as positive for samples with a $c_{\text{mannan}} > 125$ pg/mL, borderline with a c_{mannan} between 62.5 pg/mL and 125 pg/mL and negative with a $c_{\text{mannan}} < 62.5$ pg/mL.²² Values above the maximum of the calibration line (>500 pg/mL) are included in the analysis with a value of 500 pg/mL. The Asp-AG test results were determined as the galactomannan index (GMI) between the optical density of the sample and the optical density of the threshold positive control. A photometric measurement was applied. A cut-off point of 0.5 was assessed. Over the cut-off point, a test result was considered as positive.²¹ Test positivity cut-offs are similar to those used for the assessment of serum samples. Every sample was tested three times in the microbiology department of our hospital. An aliquot of 300 μ L was used.

Statistical analysis was performed using SPSS 24. Median and interquartile range (IQR) were used as descriptive methods. Differences between the means of c_{mannan} from preparations studied in vitro were evaluated statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) and analysed post hoc by Student-Newman-Keuls (SNK). Similarly, differences between the means of GMI from the tested preparations were also assessed statistically by ANOVA with subsequent SNK analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Mannan assay

All subsequent results of the Platelia™ Candida Ag plus are shown as c_{mannan} in pg/mL. The summary of all examined preparations is displayed in Figure 1. The conclusion of the SNK analysis testing for significant differences among the applied drugs is given in Table 2. Cross-reactivity with the mannan assay was seen in all 15 TZP batches of Fresenius Kabi and in all tested batches of the other four manufacturers (median 500; IQR 412.91-500.00). According to the SNK analysis, the mean c_{mannan} differed significantly to the mean of the other tested drugs (Table 2); 152 values were higher than 500 pg/mL and thus located above the maximum concentration of the calibration line. One batch of them was examined more closely. Five samples with lot number 0009855 were tested at dilution so that a median c_{mannan} of 2912.2 pg/mL was calculated (not shown in Figure 1). Apart from TZP, the highest c_{mannan} was found in Addaven® (median 264.46; IQR 222.19-454.98) followed by the lipid formulation SMOFlipid® (median 225.96; IQR 174.42-306.86). Also, Addel®, a trace element supplement from another manufacturer than Addaven®, showed a high c_{mannan} (median 194.29; IQR 67.68-320.51) as well as the vitamin emulsion FrekaVit® fat-soluble (median 143.96; IQR 69.28-444.21). c_{mannan} of the mentioned infusion solutions was higher than 125 pg/mL and was considered as positive.²² We recognised that 35 values of Addaven® samples were higher than the highest point of the calibration line (500 pg/mL) and could not be determined further. Negative

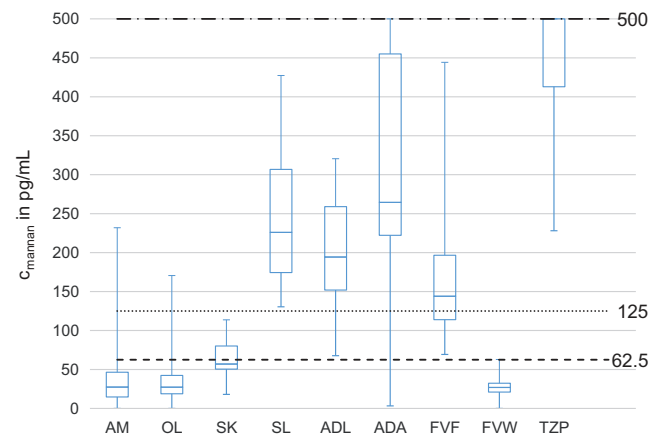


FIGURE 1 Mannan concentration c_{mannan} in examined preparations applied on the bone marrow transplantation ward. c_{mannan} : Candida antigen/mannan concentration; AM, Aminomix; OL, Olimel; SK, SmofKabiven; SL, SMOFlipid; ADL, Addel; ADA, Addaven; FVF, FrekaVit fat-soluble; FVW, FrekaVit water-soluble; TZP, piperacillin-tazobactam. $c_{\text{mannan}} < 62.5$ pg/mL: negative; 62.5-125 pg/mL: borderline; >125 pg/mL: positive; 500 pg/mL: end of calibration line. Boxes represent median and interquartile range. The whiskers indicate minimum and maximum of data

test results with a median c_{mannan} below 62.5 pg/mL were found in Aminomix® (median 27.42; IQR 14.73-46.47), FrekaVit® water-soluble (median 26.90; IQR 21.03-32.35), Olimel (median 27.26; IQR 18.79-42.41) and SmofKabiven® (median 57.01; IQR 50.44-80.20). SNK analysis detected significant differences only between the means of the positive tested preparations (Table 2).

3.2 | Galactomannan assay

No galactomannan index higher than 0.5 was detected in the compounds of PN as well as in the antibiotic TZP. Consequently, they were all considered as negative according to the definitions of the Platelia™ Aspergillus EIA.²¹ The results of the in vitro investigation are summarised in Figure 2. The median GMI of TZP was 0.12 with an IQR of 0.11-0.15. Results were consistent even when testing different batches. The highest GMI was measured in the trace element supplement Addel® with a median of 0.17 (IQR 0.11-0.19). Testing of 11 batches Addaven® showed a lower median GMI than Addel® (0.11; IQR 0.09-0.13). The lowest GMI was found in the parenteral nutrition Olimel® PERI 2.5% with a median index of 0.09 (IQR 0.09-0.10). Testing of the other PN compounds showed similar low GMI: Aminomix® (median 0.11; IQR 0.08-0.12), SmofKabiven® (median 0.10; IQR 0.08-0.11), SMOFlipid® (median 0.10; IQR 0.09-0.13), FrekaVit® fat-soluble (median 0.13; IQR 0.11-0.16) and FrekaVit® water-soluble (median 0.11; IQR 0.10-0.12). Table 3 depicts the results of the statistical analysis.

4 | DISCUSSION

In the present analysis, we could not detect Asp-AG in the examined preparations applied for PN. However, high statistically

TABLE 2 Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc multiple comparative test for mannan concentration (c_{mannan}) in different drugs

Drug	No. of values	Mean of c_{mannan} in subsets for $\alpha = 0.05$						
		1	2	3	4	5	6	7
FrekaVit [®] water-soluble	90	27.02						
Aminomix [®]	295	34.12	34.12					
Olimel Peri	36	38.87	38.87					
SmofKabiven [®]	33		62.25					
FrekaVit [®] fat-soluble	150			162.20*				
Addel [®]	30				198.82*			
SMOFlipid [®]	30					249.34*		
Addaven [®]	164						321.81*	
Piperacillin/tazobactam	298							449.96*
Significance		0.617	0.067	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means of c_{mannan} [in pg/mL] for groups in homogeneous subsets are displayed. Values in one column do not differ statistically significant. Significantly different means stand alone in a column and are additionally highlighted with an asterisk. Test uses harmonic mean sample size = 57.927 and significance level $\alpha = 5\%$.

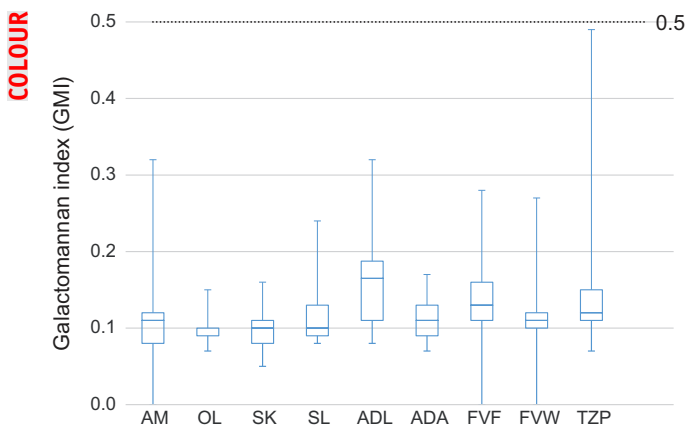


FIGURE 2 Galactomannan index (GMI) in examined preparations applied on the bone marrow transplantation ward. AM, Aminomix; OL, Olimel; SK, SmofKabiven; SL, SMOFlipid; ADL, Addel; ADA, Addaven; FVF, FrekaVit fat-soluble; FVW, FrekaVit water-soluble; TZP, piperacillin-tazobactam. GMI > 0.5: positive; GMI < 0.5: negative. Boxes represent median and interquartile range. The whiskers indicate minimum and maximum of data

significant Ca-AG amounts were found in some supplements for PN (Addel[®], Addaven[®], FrekaVit[®] fat-soluble) and in a lipid emulsion (SMOFlipid[®]). In contrast, AIO-bags like Aminomix[®], Olimel[®] and SmofKabiven[®] continuously administrated in high volumes were tested negative with the Ca-AG assay. Testing of several lots suggests that Ca-AG positivity persists independent of the batch and in case of trace element supplements independent of the brand. Vitamin and trace element supplements with a well-defined volume of 10 mL are added to AIO-bags, respectively. This volume is diluted in 1000-2000 mL (except 250 mL in case of SMOFlipid[®]) of the AIO-bag. The bag size will be chosen depending on the needs of the patient. Due to the effect of dilution, the amount of Ca-AG might be lower after adding to the bags. Some

of the tested Aminomix[®], Olimel[®], SmofKabiven[®] and SMOFlipid[®] bags contained already trace elements or the vitamin mixture at the time of sampling, but no difference between the mixed and the straight infusion solutions was seen. We hypothesised that false-positivity of Ca-AG in Addel[®]/Addaven[®] and the fat-soluble FrekaVit[®] might not be clinically relevant due to a strong effect of dilution. The lipid emulsion SMOFlipid[®] is infused with a volume of 250 mL, so the intake of Ca-AG could be higher than assumed by the supplements. These hypotheses can only be reviewed in an in vivo investigation considering the dilution in the blood circulation. Effects of distribution, metabolism and elimination can be poorly predicted from these in vitro data.

There is little information regarding the influence of PN on the antigen assays and possible causes for false-positive results. The drug-laboratory interaction between infusion solutions applied for PN and the antigen assays was initially described by Knoth et al²³ in 2016. Components for the production of individual PN were examined, but the investigation of AIO-bags was not part of the study. Among the tested preparations, calcium gluconate solution and Tracitrans[®] infant were tested positive for Ca-AG with $c_{\text{mannan}} > 500$ pg/mL. SMOFlipid[®] and Tracitrans[®] plus showed borderline test results with c_{mannan} between 62.5 and 125 pg/mL. Similarly to our study, they demonstrated negative Asp-AG assay results in their analysis. The study of Knoth et al analysed only one batch of each preparation, so general conclusions are difficult to make. Several studies indicated that sodium gluconate could be a possible source for false-positivity with the Asp-AG assay.^{11,12,24,25} The sodium gluconate containing solution Plasmalyte[®] is produced by fermentation in *Aspergillus niger*.¹¹ Galactomannan from *Aspergillus* sp. remains from the manufacturing process and could cause false-positivity. However, this does not explain the high amount of Ca-AG and the negative Asp-AG test result of calcium gluconate solution in the above-mentioned study.²³ A recent study by Spriet et al²⁶ stated that current Plasmalyte[®] solutions do not cause false-positive

TABLE 3 Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc multiple comparative test for galactomannan index (GMI) in different drugs

Drug	No. of values	Mean of GMI in subsets for $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	4
Olime! Peri	36	0.10			
SmofKabiven®	33	0.11			
Aminomix®	303	0.11			
Addaven®	164	0.11			
SMOFlipid®	30	0.12	0.12		
FrekaVit® water-soluble	90	0.12	0.12		
Piperacillin/tazobactam	311		0.13	0.13	
FrekaVit® fat-soluble	150			0.14	0.14
Addel®	30				0.15
Significance		0.085	0.071	0.262	0.069

Means of GMI for groups in homogeneous subsets are displayed. Values in one column do not differ statistically significant. Significantly different means stand alone in a column and are additionally highlighted with an asterisk. Test uses harmonic mean sample size = 58.013 and significance level $\alpha = 5\%$.

Asp-AG test results. Furthermore, our examined preparations do not contain any gluconate compound. A discussed cause for false positivity of the Ca-AG assay is Xylitol. Apart from catalytic hydrogenation, Xylitol is produced by a biotechnological method using a yeast like *Candida* spp.²⁷ Ca-AG originated from the manufacturing process could be detected in the final product. Among the examined preparations, only the trace element solutions contain Xylitol. The amount of Ca-AG in the trace element preparations Addel® and Addaven® could be explained by the content of Xylitol and the carried antigens of the manufacturing process. This hypothesis is supported by the study of Knoth et al²³ which figured out measurable mannan amounts in Tracitrans® plus. This trace element supplement also contains Xylitol. In addition, we were able to confirm the detection of Ca-AG in SMOFlipid® like outlined above.²³ After testing several batches, we determined a higher c_{mannan} in the lipid emulsion as assumed until now. A case report of Girmenia et al²⁸ described an association between enteral nutrition and false-positive galactomannan antigenemia. The applied enteral nutrition (Nutricia Energy Multi Fibre) showed GMI > 5. The preparation contains partially hydrolysed guar gum fibres and soya bean polysaccharides.^{28,29} The plant-derived galactomannan might cause cross-reactivity with the Asp-AG assay. Soya bean oil is a constant component of lipid emulsions for PN and obtained by pressing or extraction of soya beans.³⁰ Among our tested preparations, it is contained in SMOFlipid®, SmofKabiven®, Olime!® and FrekaVit® fat-soluble with the highest level in SMOFlipid (60 g/1000 mL). In SMOFlipid®, we determined also the highest amounts of Ca-AG among the soya bean oil containing AIO-Bags. Though cross-reactivity of soya beans is only described for the Asp-AG assay, it is not known whether it also appears using the Ca-AG assay.

This in vitro study confirms the results of recent publications regarding Asp-AG in beta-lactam antibiotics.^{13-18,31} No detectable galactomannan was found in TZP similar to the results of Xavier et al from 2009.^{13,16} Until 2006, clinical relevant false-positivity

of galactomannan due to beta-lactam infusion was reported from various authors.^{7,9,32,33} Beta-lactam antibiotics derived from *Penicillium* sp. contained in the cell wall galactofuranosyl molecules, an antigen structure similar to the one in the genus *Aspergillus*.^{34,35} The false positivity of the assay was explained by a cross reaction between galactomannan passed through the manufacturing process and the EB-A2 antibody of the Platelia™ *Aspergillus* EIA. A modification in the manufacturing process might be a reason for the diverse study results. Some authors stated a better purification which results in less galactomannan contamination.^{14,36} In contrast, false-positivity of Ca-AG persisted in all batches of TZP listed in our hospital as well as in the other four tested generics of TZP. The amount of mannan in numerous samples was above the maximum of the calibration line which indicates a high contamination with Ca-AG. The occurrence of false positivity can vary depending on the batch, but our applied batches showed positive Ca-AG results.⁹

Some limitations of this study have to be discussed. First, only in vitro testing was performed. In vivo levels do not always correlate with antigen contamination tested in vitro. Second, we focussed on the formulations applied in our hospital. Therefore, the study is limited to the small amount of batches of TZP from other manufacturers except for Fresenius Kabi. Third, an exact calculation of c_{mannan} in TZP and Addaven® was not possible due to the fact that numerous values were above the maximum of the calibration line. In practice, the real concentration would be higher than assessed in this study similarly to the analysis of the one diluted batch TZP indicates. Fourth, assessments whether Ca-AG amounts originate from contamination by yeasts, even though the preparations were handled in a sterile environment, were not performed.

This study is the first which analyses positive Ca-AG test results in TZP and AIO-bags used for PN. In order to better understand the occurrence of the Ca-AG mannan in some intravenous formulations for PN and TZP, further investigations concerning in vivo relevance

are necessary. Physicians should be aware of false-positivity of the Ca-Ag assay which has not been addressed in most studies until now.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the nursing staff for assistance on the transplantation ward, the colleagues of the pharmacy department for reconstitution of the samples under sterile conditions and the Department of Microbiology of the UKD for performance of the antigen tests. We also thank Dino Bellmann for checking the English.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interests.

ETHICAL APPROVAL

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

INFORMED CONSENT

This article does not contain any studies with human performed by any of the authors.

ORCID

Wencke Walter  <http://orcid.org/0000-0003-1800-2330>

REFERENCES

- Zhang S, Wang S, Wan Z, Li R, Yu J. The diagnosis of invasive and noninvasive pulmonary aspergillosis by serum and bronchoalveolar lavage fluid galactomannan assay. *Biomed Res Int*. 2015;2015:943691.
- Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, et al. Diagnosis and therapy of Candida infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses*. 2011;54(4):279-310.
- Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ, Bow EJ, et al. Early treatment of candidemia in adults: a review. *Med Mycol*. 2011;49(2):113-120.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-e50.
- Patterson TF, Thompson 3rd GR, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):e1-e60.
- Müller FM, Weig M. Systemic fungal infections – new approaches for diagnosis and treatment. *Klinikerzt*. 2003;32(2):53-60.
- Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False-positive galactomannan platelia aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):913-916.
- Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4744-4748.
- Machetti M, Majabo MJ, Furfaro E, et al. Kinetics of galactomannan in surgical patients receiving perioperative piperacillin/tazobactam prophylaxis. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(4):806-810.
- Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, et al. False positive galactomannan platelia due to piperacillin-tazobactam. *Med Mal Infect*. 2012;42(1):10-14.
- Hage CA, Reynolds JM, Durkin M, Wheat LJ, Knox KS. Plasmalyte as a cause of false-positive results for Aspergillus galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):676-677.
- Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia Aspergillus test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):3141-3142.
- Xavier MO, Pasqualotto AC, Aquino VR, Sukienni TCT, Severo LC. Galactomannan detection from piperacillin-tazobactam brands available in the brazilian market. *Braz J Infect Dis*. 2009;13(5):352-355.
- Metan G, Agkus C, Buldu H, Koc AN. The interaction between piperacillin/tazobactam and assays for Aspergillus galactomannan and 1,3-beta-D-glucan in patients without risk factors for invasive fungal infections. *Infection*. 2010;38(3):217-221.
- Ko JH, Peck KR, Lee WJ, et al. Generic piperacillin/tazobactam is not associated with galactomannan false-positivity in adult patients with cancer: a case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(7):1437-1441.
- Otting KA, Stover KR, Cleary JD. Drug-laboratory interaction between beta-lactam antibiotics and the galactomannan antigen test used to detect mould infections. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(5):544-547.
- Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, et al. Piperacillin/tazobactam (Tazocin) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1746-1748.
- Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, et al. Reduction in false-positive Aspergillus serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2199-2201.
- Paesel+Lorei. Fachinformation FrekaVit wasserlöslich Novum. 2014.
- Fresenius Kabi Deutschland GmbH. Fachinformation Piperacillin/Tazobactam Kabi 4 g/0,5 g. 2016;Zulassungsnummer 67720.00.00.
- Bio-Rad. Instruction Manual Platelia Aspergillus EIA. 2009.
- Bio-Rad. Instruction Manual Platelia Candida Ag Plus. 2011.
- Knöth H, Maywald D, Walter W. In-vitro detection of mannan and galactomannan in components of total parenteral nutrition (TPN). *Pharmazie*. 2016;71:238-242.
- Guigue N, Menotti J, Ribaud P. False positive galactomannan test after ice-pop ingestion. *N Engl J Med*. 2013;369(1):97-98.
- Petratiene R, Petraitis V, Witt 3rd JR, et al. Galactomannan antigenemia after infusion of gluconate-containing Plasma-Lyte. *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4330-4332.
- Spriet I, Lagrou K, Maertens J, Willems L, Wilmer A, Wauters J. Plasmalyte: no longer a culprit in causing false-positive galactomannan test results. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):795-797.
- Fouad Sarrouh B, Tresinari Dos Santos D, Silvério da Silva S. Biotechnological production of xylitol in a three-phase fluidized bed bioreactor with immobilized yeast cells in Ca-alginate beads. *Biotechnol J*. 2007;2(6):759-763.
- Girmenia C, Santilli S, Ballarò D, Del Giudice I, Armiento D, Mauro FR. Enteral nutrition may cause false-positive results of Aspergillus Galactomannan assay in absence of gastrointestinal diseases. *Mycoses*. 2011;54(6):e883-e884.
- Ansorg R, Van den Boom R, Rath P. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997;40:353-357.

30. Hehenberger H. Fettemulsionen-Kompatibilität in Komplettlösungen und TPN-Regimen. *Krankenhauspharmazie*. 1992;12:575-579.
31. Metan G, Agkus C, Nedret Koc A, Elmali F, Finkelman MA. Does ampicillin-sulbactam cause false positivity of (1,3)-beta-D-glucan assay? A prospective evaluation of 15 patients without invasive fungal infections. *Mycoses*. 2012;55(4):366-371.
32. Aubry A, Porcher R, Bottero J, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus galactomannan* test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):389-394.
33. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, et al. Detection of *Aspergillus galactomannan* antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5214-5220.
34. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, Donnelly JP, Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J Clin Microbiol*. 1997;35(1):257.
35. Singh N, Obman A, Husain S, Aspinall S, Mietzner S, Stout JE. Reactivity of platelia *Aspergillus galactomannan* antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):1989-1992.
36. Metan G. The interaction between piperacillin-tazobactam and *Aspergillus galactomannan* antigenemia assay: is the story over? *Infection*. 2013;41(1):293-294.

How to cite this article: Walter W, Bornhäuser M, Stölzel F, Zeidler A, Knoth H. In vitro detection of *Candida* and *Aspergillus* antigen in parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. *Mycoses*. 2018;61:931–937. <https://doi.org/10.1111/myc.12841>

10. Zweiter Originalartikel

Walter W, Bornhäuser M, Stölzel F, Knoth H. 2019. False-positive Candida and Aspergillus antigen testing in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplantation due to administration of parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. *Mycoses* 62 (7): 576-583.

False-positive *Candida* and *Aspergillus* antigen testing in recipients of allogeneic haematopoietic cell transplantation due to administration of parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam

Wencke Walter¹  | Martin Bornhäuser² | Friedrich Stölzel² | Holger Knoth¹

¹Klinik-Apotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Dresden, Germany

²Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Dresden, Germany

Correspondence

Wencke Walter, Klinik-Apotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden, Germany.
Email: wencke.walter@uniklinikum-dresden.de

Summary

False positivity of antigen immunoassays used as an early diagnostic tool to detect invasive fungal infections is known. Interpretation of the assay needs the identification of sources which could affect the specificity of the test. We focused on the influence of parenteral nutrition (PN) and piperacillin-tazobactam (TZP) on fungal immunoassays. Measurable amounts of *Candida* antigen mannan were detected in several compounds of PN and TZP in a previous in vitro study. In the current study, 84 patients undergoing allogeneic haematopoietic cell transplantation receiving either TZP, PN or both were monitored with *Aspergillus* and *Candida* antigen assay. Six patients were analysed closer in a kinetic analysis with more frequent blood sampling to detect mannan. PN in diverse compositions as well as TZP did not increase significantly the amount of mannan and the *Aspergillus* antigen in serum. We could not confirm the positive results of the in vitro study. Physicians should be aware that mannan antigenemia due to drug infusion could be a transient issue and should be considered in the interpretation of fungal immunoassays, although we could not find clinically relevant effects on mannan levels.

KEYWORDS

Aspergillus, *Candida*, galactomannan, Mannans, parenteral nutrition, piperacillin

1 | INTRODUCTION

Invasive fungal infections (IFI) are life-threatening complications in immunocompromised patients after allogeneic haematopoietic cell transplantation (HCT).^{1,2} Most symptoms of these opportunistic infections are non-specific particularly in early stages of the disease. A combination of diverse diagnostic tools based on clinical, radiological and mycological methods is required, but a definite diagnosis is only possible by invasive procedures.¹ Early diagnosis with the use of appropriate antifungal therapy can improve morbidity and mortality.³ Current guidelines recommend the *Aspergillus* antigen galactomannan (GM) assay as a supplement to standard culture-based

methods.^{1,4} Enzyme-linked immunosorbent assays (EIAs) can be applied as a screening in patients at high risk for IFI. The GM EIA may be positive before clinical suspicion of an invasive aspergillosis. The guideline from the Infectious Diseases Working Party of the German Society of Hematology and Oncology emphasises its usefulness in monitoring the therapeutic response.¹ False-positive test results are reported in the literature with a moderate specificity, 85% for the GM assay and 70%-80% for the *Candida* antigen (mannan) assay.^{5,6} In the Department of Hematology of the University Hospital Dresden (UKD), routine screening of GM and mannan is performed for patients after allogeneic HCT. In a previous study, we have investigated drug-laboratory interaction between parenteral nutrition (PN) as

well as piperacillin-tazobactam (TZP) and both immunoassays.⁷ No false positivity of the GM assay due to TZP and PN was seen, but cross-reactions with the mannan assay were detected in some formulations for PN and in all examined brands and batches of TZP. PN and TZP are often applied in haematological patients. PN has to be administered in case of insufficient oral food intake like mucositis, a frequent complication after HCT. The administration is characterised by the infusion of high volumes over a long period of several hours. An anti-infective treatment with broad-spectrum antibiotics like TZP is usually started on the onset of fever in neutropenic patients. False-positive GM test results due to TZP infusion are well studied.⁸⁻¹¹ TZP is produced by a semi-synthetic procedure from *Penicillium* spp. which have similar antigen structures compared to those of *Aspergillus* spp.¹² Carried antigens originated from the manufacturing process could be detected in the final product. Recent publications have demonstrated that GM false positivity is no longer a problem in commonly used TZP preparations.¹³⁻¹⁸ However, little is known about the kinetics of mannan in serum derived from preparations for intravenous application. The aim of this study was to investigate the clinical relevance of the positive test results of the above-mentioned in vitro study.⁷ Physicians need to know whether the infusion of TZP or PN will reduce the specificity of the EIA. The knowledge will help them to handle with false positivity of the assay. False-positive test results could lead to the unjustified use of antifungal drugs which also represent a cost factor in the healthcare system. Furthermore, antifungal drugs can show severe side effects and interactions, which is particularly an issue in allogeneic transplant recipients with polypharmacy.

2 | SUBJECTS AND METHODS

2.1 | Study population

This prospective diagnostic study was approved from the local Ethics Committee (EK 482112015). Between March 2016 and March 2018, 84 sequential patients admitted to the HCT ward of the UKD were included after giving written informed consent to participate in the trial. In the first part of the study, 78 patients were included and six in the subsequent kinetic analysis. Patient and transplant characteristics are summarised in Table 1. Inclusion criteria were age of 18 years and older, haematological malignancies and an initiation of TZP or PN during the hospital stay. The prescription of the antibiotic or the PN was part of the therapy and independent of this study. Patients with current probable or proven aspergillosis (study of GM) and candidiasis (study of mannan) according to the definitions of the European Organization for Research and Treatment of Cancer—Mycoses Study Group (EORTC-MSG) were excluded from this study.^{19,20}

2.2 | Antigen assay

All patients were monitored twice weekly for the occurrence of mannan antigen delivered from *Candida* spp. and GM antigen

originated from *Aspergillus* spp. in serum. In the context of monitoring, blood samples for antigen determination were taken from a central venous catheter. Serum samples were tested in the Department of Microbiology of the UKD at the day of sampling. Selected batches of TZP and PN applied in the investigation period were tested in vitro with the same assays. The results of the in vitro investigation were presented in a previous publication.⁷ For the detection of antigens, commercial EIAs were applied. Platelia™ *Candida* AG plus was performed for the analysis of mannan and Platelia™ *Aspergillus* EIA for the analysis of GM according to the manufacturer's recommendations (Bio-Rad Laboratories).^{21,22} The mannan assay result is expressed as mannan concentration (c_{mannan}) in pg/mL. To increase the readability, the unit was omitted in the text from here on. The upper range is limited to 500 conditioned by the calibration line. Mannan results were considered as positive for samples with a $c_{\text{mannan}} > 125$, values with a c_{mannan} between 62.5 and 125 were borderline and $c_{\text{mannan}} < 62.5$ were negative. The GM assay result was determined as index (GMI) between the optical density of the sample and the optical density of the threshold positive control. A cut-off point of 0.5 was used for our investigation. Above the cut-off point, a test result was considered as positive. The appraisal in positive, negative and borderline test results is based on the specifications of the manufacturer Bio-Rad.^{21,22}

Patient sera from 78 patients before, during and after treatment with TZP or PN were analysed in the first part of the study. Three different treatment groups were regarded: TZP alone, PN alone, both TZP plus PN simultaneously. An intra-individual comparison of c_{mannan} and GMI between two time points was performed for each patient. The first time point is set at the time of initiation and the second time point at the time of termination of the therapy. Before the start of therapy (time point T0), one single value was used for calculation. During (T1, T2) and after termination (TE) of therapy, several values were available depending on the duration of therapy. In this case, the median of all values of each patient was estimated. Timepoint T1 can be equivalent to T2 but can also differ if the initial therapy (TZP, PN, TZP plus PN) changed during the stay. The difference of c_{mannan} and GMI between the two time points T1 minus T0 and T2 minus TE was calculated and assessed statistically. In case of missing data of either T0 or T1, T2 or TE, the patient had to be excluded from particular analyses. Missing data occurred due to short duration of TZP or PN therapy combined with the lack of monitoring in this time and due to transfer to the intensive care unit or death of the patient. The surveillance period of the patients began with the initiation of therapy and ended at discharge.

In a second part of the study, kinetics of mannan after infusion of TZP were examined closely. Six patients of the study population were selected randomly. After the first TZP infusion on day 1, blood samples were taken directly after infusion and after 1, 2, 4 and 6 hours. Blood sampling was repeated on day 7. Three further samples were collected at 6, 12 and 24 hours after the last dose of TZP. Samples were analysed by using the mannan assay as outlined above.

TABLE 1 Patient and treatment characteristics of study population

Patient characteristics	No. of patients
Total no. of patients	84
Sex	
Males	59
Females	25
Median age (range)	55 (19-74)
Underlying disease	
AML	40
MDS/MPS	12
B-cell lymphoma	11
Multiple myelomas	8
Acute lymphocytic leukaemia	7
SAA	3
Others	3
GvHD (acute or chronic)	26
Mucositis	69
Diabetes/chronic pulmonary diseases	12
Invasive aspergillosis	
None	64
Possible	15
Probable	5
Invasive candidiasis	
None	67
Possible	17
Probable	0
Treatment characteristics	No. of patients
Stem cell transplantation	
Allogeneic PBSCT	74
Autologous PBSCT	1
Allogeneic BMT	2
Currently none	7
Conditioning regimen	
MAC	36
RIC	41
Other chemotherapy	4
None	3
GvHD prophylaxis	
Calcineurin inhibitor based	75
ATG based	28
Cyclophosphamide based	11
Other	5
None	4
Antifungal prophylaxis/treatment	
Fluconazole	38
Posaconazole	22

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Treatment characteristics	No. of patients
Voriconazole	11
Micafungin	7
Liposomal Amphotericin B	2
Caspofungin	2
None	1
Therapy received	
PN	17
TZP	33
Concurrently/sequentially TZP + PN	34

Note: The median age is shown in years with the range given in brackets. Classification of invasive aspergillosis and candidiasis is according to the criteria of the European Organization of Research and Treatment of Cancer–Mycosis study group (EORTC-MSG).

Abbreviations: AML, Acute myeloid leukaemia; ATG, Antithymocyte globulin; BMT, Bone marrow transplantation; GvHD, Graft-vs-Host disease; MAC, Myeloablative conditioning; MDS, Myelodysplastic syndrome; MPS, Myeloproliferative syndrome; PBSCT, Peripheral blood haematological cell transplantation; PN, Parenteral nutrition; RIC, Reduced-intensity conditioning; SAA, Severe aplastic anaemia; TZP, Piperacillin-tazobactam.

2.3 | Statistical analysis

Categorical data are presented as counts. Differences in c_{mannan} and GMI between two time points are indicated as medians with 95% confidence interval (95% CI). Statistical analysis was performed using ANOVA (SPSS 25.0).

3 | RESULTS

3.1 | Participants

Patients' and treatment characteristics are shown in Table 1. At the time of data collection, 74 patients underwent an allogeneic peripheral blood HCT (PBSCT), one patient received an autologous PBSCT and two a bone marrow transplantation. Seven patients with no current HCT were admitted to the haematological ward because of treatment of severe GvHD or other reasons, six had a previous PBSCT and one PBSCT was cancelled, three of them showed neutropenia. Patients were prepared either with a myeloablative ($n = 36$) or with a reduced-intensity regimen ($n = 41$) prior to HCT. Three patients were given a hospital treatment because of chronic GvHD so no chemotherapy was currently administered. GvHD prophylaxis was realised with a combination of a calcineurin inhibitor (cyclosporin A or tacrolimus) and other immunosuppressive agents (methotrexate, mycophenolate mofetil or post-transplant cyclophosphamide) in 75 patients. Antithymocyte globulin was added for patients who received a graft from a mismatched unrelated donor ($n = 28$). In the case of haploidentical allogeneic transplantation or matched unrelated donor, cyclophosphamide was applied additionally in 11 patients. Only four patients did not

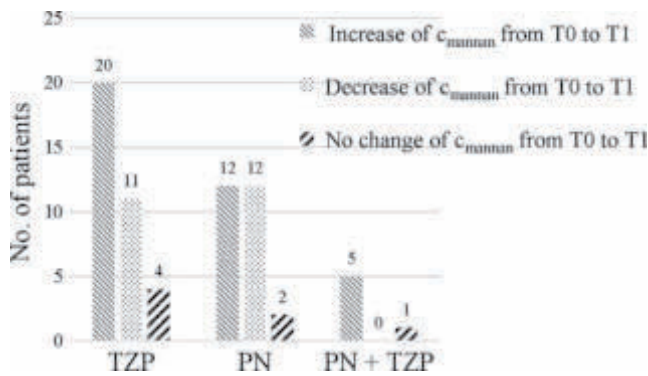


FIGURE 1 Number (no.) of patients in relation to the development of mannan serum concentration (c_{mannan}) with the initiation of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP. Time point T0 is before start of therapy and time point T1 is during therapy

receive any immunosuppressant because of an autologous PBSCT or no recent PBSCT.

Piperacillin-tazobactam was infused with a dose of 4.5 g over 30 minutes three or four times a day. PN consisted of Aminomix[®] (n = 43), SMOFlipid[®] (n = 29), SMOFkabiven[®] (n = 4) or Olimel[®] (n = 2). In case of all 29 patients, who were given SMOFlipid[®], Aminomix[®] was added. The all-in-one-bags were administered partly in combination with vitamins (FrekaVit[®] fat soluble n = 36, FrekaVit[®] water-soluble n = 43) or trace elements (Adde![®]N/Addaven[®] n = 39).

3.2 | Mannan assay

No patient with probable or proven invasive candidiasis according to the EORTC criteria had to be excluded for the study of mannan antigen. Figure 1 shows the results of initiation of therapy with

TZP, PN and PN plus TZP. Table 2 presents the median difference (diff_{med}) of serum mannan concentration c_{mannan} between two time points. Sera from 67 patients (263 serum samples) were available for analysis. With the initiation of TZP, an increase in mannan was seen in 20 (57.1%) of 35 patients. The diff_{med} of c_{mannan} was 8.63 (95% CI 4.85-14.68) between both time points. Only 12 (46.1%) of 26 patients with PN showed a higher c_{mannan} at T1 than T0 (diff_{med} 5.05; 95% CI 3.82-9.31). An increase in c_{mannan} was seen in five of six patients, who received PN and TZP at the same time (diff_{med} 5.62; 95% CI 1.92-11.83). Fifty-four patients (288 serum samples) were included for analysis of relationship between cessation of therapy and mannan results, which is illustrated in Figure 2. A decrease in c_{mannan} with the termination of TZP was observed in 16 (61.5%) of 26 patients (diff_{med} 11.52; 95% CI 5.9-15.44). In 14 (51.9%) of 27 patients, c_{mannan} during PN was higher in comparison with the termination of PN (diff_{med} 6.59; 95% CI 5.93-8.97). Only one patient with concurrent PN and TZP could be considered in this part of the study, and the median c_{mannan} after the termination of both infusion solutions was lower than before (diff_{med} 15.69). Statistical analysis could not find a significant difference among TZP, PN and PN plus TZP with $P_{\text{init}} = 0.198$ for initiation and $P_{\text{cess}} = 0.486$ for cessation, in case of PN among the applied all-in-one-bags ($P_{\text{init}} = 0.484$, $P_{\text{cess}} = 0.821$) and also in case of PN among the added vitamin or trace element supplements ($P_{\text{init}} = 0.115$, $P_{\text{cess}} = 0.692$). All serum samples tested with the mannan EIA were considered as negative except for one borderline value (113.71 at TE after PN infusion).

3.3 | Galactomannan assay

Of the 78 patients that were observed for this study, five patients did not fulfil the inclusion criteria for the GM part of this study because of a current probable invasive aspergillosis relating to the

TABLE 2 Median difference of c_{mannan} in pg/mL (95% CI)

	TZP	PN	PN + TZP
From T0 to T1			
Increase in c_{mannan}	8.63 (4.85-14.68)	5.05 (3.82-9.31)	5.62 (1.915-11.825)
Decrease in c_{mannan}	10.80 (5.48-14.11)	9.41 (5.15-11.69)	-
No change of c_{mannan}	0 (-)	0 (-)	0 (-)
From T2 to TE			
Increase in c_{mannan}	11.56 (3.29-16.30)	6.23 (5.74-12.66)	-
Decrease in c_{mannan}	11.52 (5.90-15.44)	6.59 (5.93-8.97)	15.69 (-)
No change of c_{mannan}	0 (-)	0 (-)	-

Note: Median difference (diff_{med}) of mannan serum concentration (c_{mannan}) in pg/mL with 95% confidence interval (95% CI) given in brackets for therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP. Absolute values of diff_{med} are displayed. Time point T0 is before the start of therapy, time points T1 and T2 are during therapy, time point TE is after termination of therapy. In case of only one value, no 95% CI is indicated.

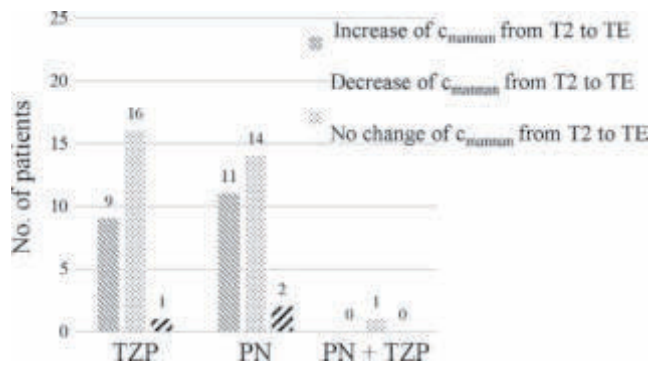


FIGURE 2 Number (no.) of patients in relation to the development of mannan serum concentration (c_{mannan}) with the termination of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP. Time point TE is after termination of therapy, and time point T2 is during therapy

classification of EORTC-MSG. In all five cases, a combination of host factors (recent history of neutropenia, receipt of an allogeneic stem cell transplant or treatment with immunosuppressants) and clinical criteria (chest CT findings with/without cough, dyspnoea) led to the classification in a probable fungal infection.¹⁹ Similar to the mannan assay, two different assessments of GMI were made: The relationship between the GMI and the initiation of therapy with either TZP, PN or PN plus TZP is demonstrated in Figure 3, and the relationship between the GMI and the termination of therapy is displayed in Figure 4. The diff_{med} of GMI is indicated in Table 3. A total of 250 serum samples of 64 patients were collected for the first analysis which regards the start of therapy. Nineteen (54.3%) of 35 patients with TZP showed a higher GMI at T1 compared to T0 (diff_{med} 0.03). In 14 (58.3%) of 24 patients with PN, GMI at T1 was higher (diff_{med} 0.04; 95% CI 0.01-0.05). An increase in GMI was noted in two of five patients who received PN plus TZP (diff_{med} 0.08). For the second analysis of GMI which focused on the termination of therapy, 284 serum samples of 53

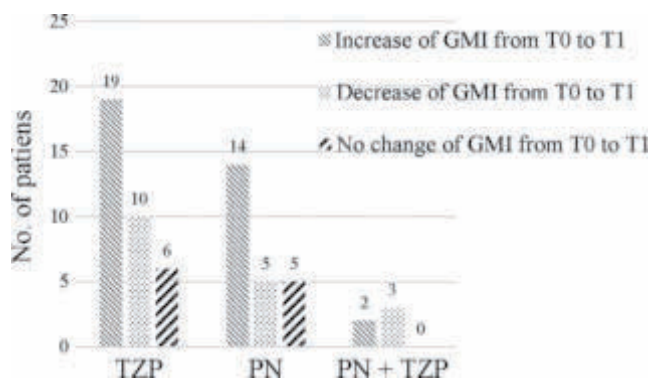


FIGURE 3 Number (no.) of patients in relation to the development of galactomannan index (GMI) with the initiation of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP. Time point T0 is before start of therapy, and time point T1 is during therapy

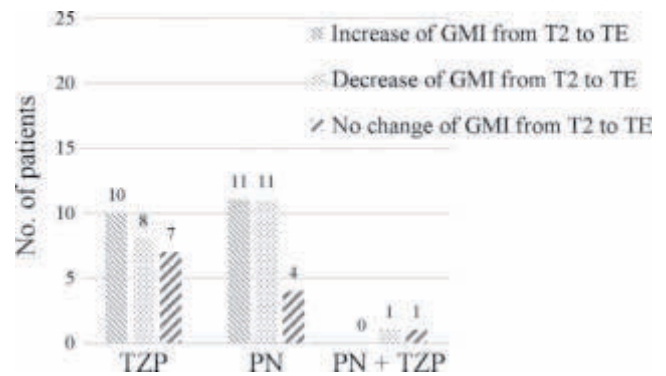


FIGURE 4 Number (no.) of patients in relation to the development of galactomannan index (GMI) with the termination of therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP. Time point TE is after termination of therapy, and time point T2 is during therapy

patients were analysed. A decrease in GMI with the termination was seen in eight (32%) of 25 patients with TZP (diff_{med} 0.04; 95% CI 0.03-0.04), in 11 (42.3%) of 26 patients with PN (diff_{med} 0.03; 95% CI 0.01-0.05) and in one of two patients with PN plus TZP (diff_{med} 0.06). However, the statistical test did not identify any significant differences among TZP, PN and PN plus TZP (P_{init} = 0.695, P_{cess} = 0.741).

3.4 | Kinetic analysis

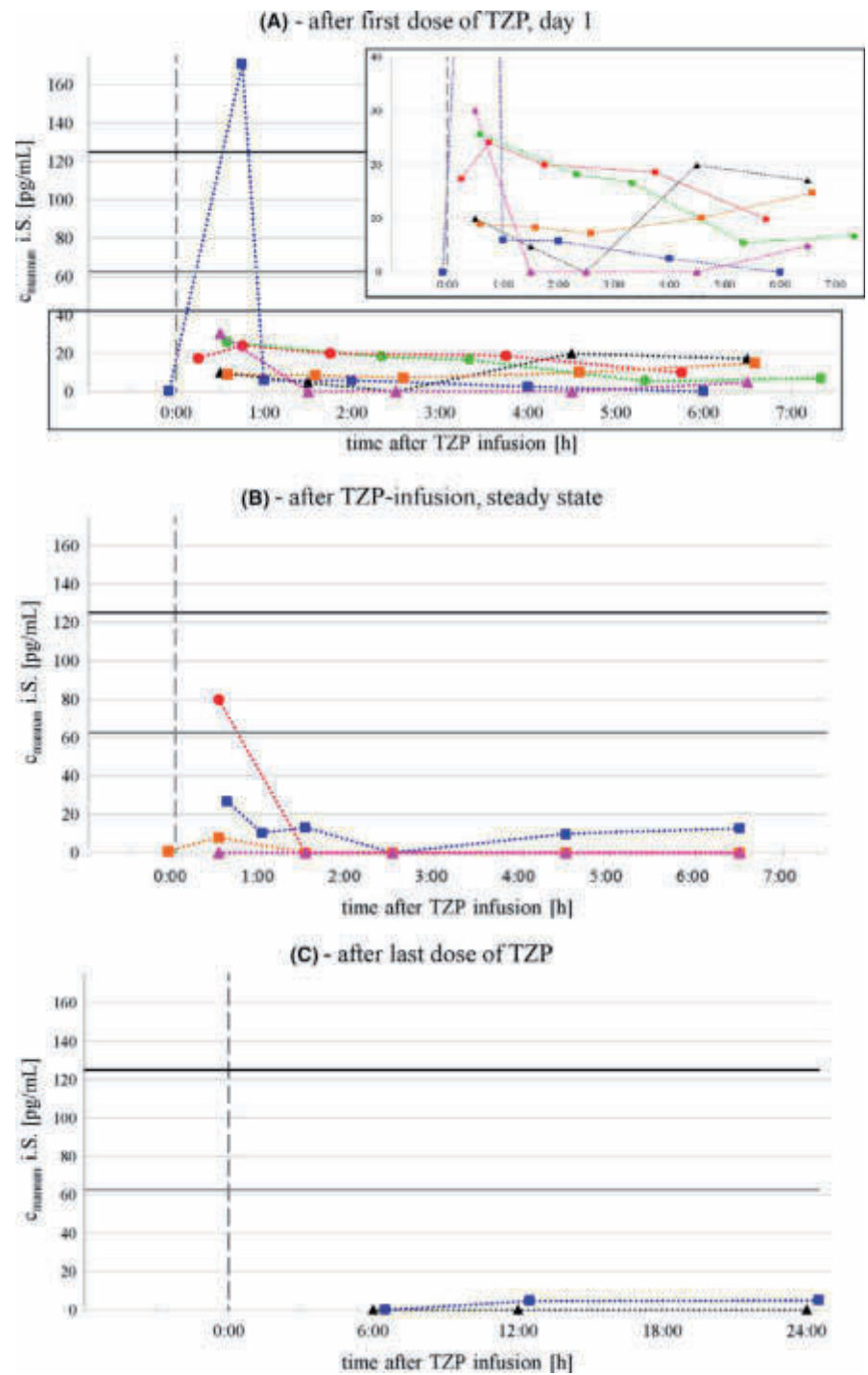
Four male and two female patients with acute myeloid leukaemia, who underwent an allogeneic HCT, were included in the kinetic analysis of mannan after initiation of TZP. TZP was given either three times ($n = 4$) or four times daily ($n = 2$, patient 4 + 6). Serum samples were available for all six patients after the first dose of TZP, for

TABLE 3 Median difference of GMI (95% CI)

	TZP	PN	PN + TZP
From T0 to T1			
Increase in GMI	0.03 (0.025-0.03)	0.04 (0.01-0.05)	0.08 (-)
Decrease in GMI	0.03 (0.02-0.04)	0.03 (-)	0.05 (-)
No change of GMI	0 (-)	0 (-)	-
From T2 to TE			
Increase in GMI	0.02 (0.02-0.03)	0.02 (0.01-0.06)	-
Decrease in GMI	0.04 (0.025-0.04)	0.03 (0.01-0.05)	0.06 (-)
No change of GMI	0 (-)	0 (-)	0 (-)

Note: Median difference (diff_{med}) of galactomannan index (GMI) with 95% confidence interval (95% CI) given in brackets for therapy with piperacillin-tazobactam (TZP), parenteral nutrition (PN) and PN plus TZP. Absolute values of diff_{med} are displayed. Time point T0 is before the start of therapy, time points T1 and T2 are during therapy, time point TE is after termination of therapy. In case of only one value, no 95% CI is indicated.

FIGURE 5 Kinetics of serum mannan of patients receiving piperacillin-tazobactam (TZP) after the first dose on day 1 (A), after a dose in the steady state (B) and after the last dose (C). The range of serum mannan from 0 to 40 pg/mL in (A) is also shown separately. c_{mannan} = mannan concentration, green circles = patient 1, blue squares = patient 2, black triangles = patient 3, red circles = patient 4, orange squares = patient 5, pink triangles = patient 6, vertical dashed line = TZP infusion, horizontal black line = positivity cut-off at 125 pg/mL, horizontal grey line = borderline cut-off at 62.5 pg/mL



four patients after multiple doses in the steady state and for two patients after the last dose. Results of serum c_{mannan} were plotted against time to create a kinetic curve which is displayed in Figure 5. Administration of TZP resulted in an increase in c_{mannan} immediately after infusion in two patients with a rapid decrease after 1 hour from start of infusion. Directly after the first infusion of TZP, we noted the highest amount of the antigen in serum of patient 2 with c_{mannan} of 170.8. To study the kinetic considering at cumulative doses, blood sampling was repeated on day 7, 8 or 9. In the steady state, the highest amount of mannan ($c_{\text{mannan}} = 79.82$) was observed in patient

5 directly after the termination of infusion. Mannan was not detectable anymore 6 hours after the last dose of TZP. Except for the one positive and borderline value, the remaining results were considered as negative.

4 | DISCUSSION

Previous research broadly covered the rate of false-positive GM assay results while studies concerning false positivity of mannan EIA

are lacking. The antigen GM could be detected in fungus-derived antibiotics like TZP, in sodium gluconate used for bronchoalveolar lavage and in soya bean-containing nutrients.^{11,23-25} In patients with damaged intestinal mucosa, antigens from enteral nutrition translocate into the blood and can be detected with the antigen assay.²⁵ False-positive GM antigenemia is reported in haematological patients after allogeneic PBSCT due to gastrointestinal chronic GVHD.²⁶ However, recent publications regarding GM in beta-lactam antibiotics and sodium gluconate could not detect GM anymore.^{13-18,27,28} Furthermore, false-positive GM EIA results due to TZP or PN infusion did not occur in our investigation which is consistent with the results of our previous *in vitro* study.⁷ In contrast, the *in vitro* study has demonstrated drug-laboratory interaction with the mannan assay in all examined batches and brands of the beta-lactam antibiotic TZP, in a lipid emulsion (SMOFlipid®), in a fat-soluble vitamin supplement (FrekaVit® fat soluble) and in trace element preparations (Addel® and Addaven®) with positive test results in the range of 144-265. Particularly high c_{mannan} was detected in vials of TZP. In the current study, intravenous administration of TZP in patients after allogeneic PBSCT showed a minimal but not statistically significant trend to an increase in c_{mannan} in serum with start of therapy and a decrease with the termination. The difference can also be owed to the imprecision of the assay.²¹ This phenomenon was investigated closely in a kinetic analysis. Measurement with mannan EIA immediately after infusion of the antibiotic resulted only into a rise of c_{mannan} in serum of two patients. In comparison with the first infusion on day 1, the c_{mannan} in serum was not higher in the steady state which indicates that an accumulation of mannan after multiple dosing does not occur. Negativity of mannan in serum with $c_{\text{mannan}} < 62.5$ was reached 1 hour postinfusion. Because of the small rate of positive serum c_{mannan} and the small number of patients in the kinetic analysis, we conclude that no clinically relevant effect on mannan levels exists. Despite of constant rate infusion and measurable amounts of mannan *in vitro*, elevated c_{mannan} in serum due to PN administration was not detected. Positive mannan results after application of the lipid emulsion, vitamin or trace element supplements could not be confirmed *in vivo*, which might be explained by an effect of dilution. Small volumes of supplements in the range of 10 mL are usually added to all-in-one-bags. After administration of PN, an additional dilution in the bloodstream occurs. A study in 2005 noted that kinetic of GM in serum can vary depending on the treatment duration and the amount of antigen detected in the antibiotic batch.²⁴

Recommendations to the handling of false positivity exist only for the GM EIA. In our opinion, they can be partly transferred to the mannan EIA. Authors suggest a repeat of the assay and a confirmation of results by clinical and radiological methods.^{9,29} To decrease the possibility of false-positive antigen test results, samples should be obtained prior to the TZP administration.^{9,30} Our findings are in accordance with this statement. Mannan has reached a peak directly at the end of TZP infusion in two patients while the lowest levels were obtained before the next infusion. Some authors recommend to use separate tubes of the central venous catheter for blood sampling and for application of antibiotics.³¹ In addition to the clinical condition,

the medication of the patient should always be involved in the appraisal of positive EIA test results.³² A costly method is the testing of every batch of suspected drugs given to a patient at risk for IFI.^{10,11,24}

However, the study is limited to the small selection of tested infusion solutions. HCT recipients are given diverse intravenous drugs partly from semi-synthetic origin. False-positive reactions with fungal EIA could also occur in other preparations.

We conclude that mannan antigenemia should be considered cautiously in conjunction with other diagnostic methods. Mannan testing should always be combined with antimannan antibody testing to increase sensitivity and specificity.^{21,33} We suggest that blood samples for fungal EIA should be drawn before intravenous infusion to minimise the risk of cross-reactions. Furthermore, current guidelines do not especially recommend the use of mannan EIA in contrast to the GM EIA.^{1,4,33}

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the nursing staff for assistance on the HCT ward, the patients for participation in the trial and the Department of Microbiology of the UKD for performance of the antigen tests. We also thank Dino Bellmann for checking the English and Sven Knoth for rechecking the statistics.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

The study was approved from the local Ethics Committee (EK 482112015).

INFORMED CONSENT

Written informed consent was given by the participants of the study.

ORCID

Wencke Walter  <https://orcid.org/0000-0003-1800-2330>

REFERENCES

1. Ruhnke M, Bohme A, Buchheidt D, et al. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology-guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO). *Ann Oncol*. 2012;23(4):823-833.
2. Zhang S, Wang S, Wan Z, Li R, Yu J. The diagnosis of invasive and noninvasive pulmonary aspergillosis by serum and bronchoalveolar lavage fluid galactomannan assay. *Biomed Res Int*. 2015;2015:943691.
3. Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ, Bow EJ, et al. Early treatment of candidemia in adults: a review. *Med Mycol*. 2011;49(2):113-120.

4. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016.
5. Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, et al. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses*. 2011;54(4):279-310.
6. Müller FM, Weig M. Systemic fungal infections—new approaches for diagnosis and treatment. *Klinikerzt*. 2003;32(2):53-60.
7. Walter W, Bornhäuser M, Stölzel F, Zeidler A, Knoth H. In-vitro detection of *Candida* and *Aspergillus* antigen in parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. *Mycoses*. 2018;61(12):931-944.
8. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False-positive galactomannan platelia aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):913-916.
9. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4744-4748.
10. Machetti M, Majabo MJ, Furfaro E, et al. Kinetics of galactomannan in surgical patients receiving perioperative piperacillin/tazobactam prophylaxis. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(4):806-810.
11. Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, et al. False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Med Mal Infect*. 2012;42(1):10-14.
12. Stynen D, Sarfati J, Goris A, et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immun*. 1992;60(6):2237-2245.
13. Xavier MO, Pasqualotto AC, Aquino VR, Sukienni TCT, Severo LC. Galactomannan detection from piperacillin-tazobactam brands available in the Brazilian market. *Braz J Infect Dis*. 2009;13(5):352-355.
14. Ko JH, Peck KR, Lee WJ, et al. Generic piperacillin/tazobactam is not associated with galactomannan false-positivity in adult patients with cancer: a case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(7):1437-1441.
15. Metan G, Agkus C, Nedret Koc A, Elmali F, Finkelman MA. Does ampicillin-sulbactam cause false positivity of (1,3)-beta-D-glucan assay? A prospective evaluation of 15 patients without invasive fungal infections. *Mycoses*. 2012;55(4):366-371.
16. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, et al. Piperacillin/tazobactam (Tazocin) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1746-1748.
17. Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, et al. Reduction in false-positive *Aspergillus* serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2199-2201.
18. Metan G, Agkus C, Buldu H, Koc AN. The interaction between piperacillin/tazobactam and assays for *Aspergillus* galactomannan and 1,3-beta-D-glucan in patients without risk factors for invasive fungal infections. *Infection*. 2010;38(3):217-221.
19. Huppman S. Inzidenz und Letalität invasiver Mykosen bei Hochrisikopatienten mit akuter myeloischer Leukämie. Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München; 2010.
20. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-1821.
21. Bio-Rad. Instruction Manual Platelia *Candida* Ag Plus; 2011.
22. Bio-Rad. Instruction Manual Platelia *Aspergillus* EIA; 2009.
23. Aubry A, Porcher R, Bottero J, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):389-394.
24. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, et al. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5214-5220.
25. Murashige N, Kami M, Kishi Y, Fujisaki G, Tanosaki R. False-positive results of Asp. ELISA for a patient with gastrointestinal GVHD. *Clin Infect Dis*. 2004;40(2):333-334.
26. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan antigenaemia after haematopoietic stem cell transplantation. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(2):411-416.
27. Otting KA, Stover KR, Cleary JD. Drug-laboratory interaction between beta-lactam antibiotics and the galactomannan antigen test used to detect mould infections. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(5):544-547.
28. Spriet I, Lagrou K, Maertens J, Willems L, Wilmer A, Wauters J. Plasmalyte: no longer a culprit in causing false-positive galactomannan test results. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):795-797.
29. Adam O, Aupérin A, Wilquin F, Bourhis J-H, Gachot B, Chachaty E. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis*. 2004;38:917-920.
30. Singh N, Obman A, Husain S, Aspinall S, Mietzner S, Stout JE. Reactivity of platelia *Aspergillus* galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):1989-1992.
31. Penack O, Rempf P, Graf B, Thiel E, Blau IW. False-positive *Aspergillus* antigen testing due to application of piperacillin/tazobactam—is it still an issue? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60(1):117-120.
32. Zandijk E, Mewis A, Magerman K, Cartuyvels R. False-positive results by the platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(7):1132-1133.
33. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of Candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-e50.

How to cite this article: Walter W, Bornhäuser M, Stölzel F, Knoth H. False-positive *Candida* and *Aspergillus* antigen testing in recipients of allogeneic haematopoietic cell transplantation due to administration of parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. *Mycoses*. 2019;62:576-583. <https://doi.org/10.1111/myc.12921>

11. Anlage 1

Anlage 1

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Dr. Holger Knoth, Prof. Martin Bornhäuser, PD Dr. Friedrich Stölzel, Dr. Xina Grählert, Ursula Range

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

- Walter W, Bornhäuser M, Stölzel F, Zeidler A, Knoth H. 2018. In vitro detection of Candida and Aspergillus antigen in parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. Mycoses 61 (12): 931-937.
- Walter W, Bornhäuser M, Stölzel F, Knoth H. 2019. False-positive Candida and Aspergillus antigen testing in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplantation due to administration of parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. Mycoses 62 (7): 576-583.

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

9. Ich bin mit den "Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis, zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens und für den Umgang mit Verstößen" der Technischen Universität Dresden einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift des Doktoranden

12. Anlage 2

Anlage 2

Erklärung über die Einhaltung gesetzlicher Bestimmungen

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen

→
Hier ist die Unterschrift des Klinik- bzw. Institutsdirektors einzuholen

Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: *EK 482112015*

die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes

Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung: *nicht zutreffend*

.....
Hier ist die Unterschrift des Klinik- bzw. Institutsdirektors einzuholen

die Einhaltung des Gentechnikgesetzes/Projektnummer: *nicht zutreffend*

.....
Hier ist die Unterschrift des Klinik- bzw. Institutsdirektors einzuholen

die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden 12.02.20

Ort, Datum

Wendee Waehr

Unterschrift des Doktoranden