



### **3. SIMPOZIJUM**

***Dijagnoza i terapija gljivičnih oboljenja***



# Dokazivanje ranih laboratorijskih biomarkera gljiva i njihov značaj za ishod invazivnih gljivičnih infekcija

*Valentina Arsić Arsenijević*

*Nacionalna referentna laboratorija za uzročnike mikoza*

*Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

**3. DTFD**

**Institut za javno zdravlje Srbije**

**Beograd, 01-02. mart 2012.**

# Invazivne gljivične infekcije (IGI): stanje i perspektive

Značajan porast incidencije!!!  
Visokorizični pacijenti (VRP)!!!  
Teška sigurna dijagnoza!!!  
Skupa terapija!!!  
Visoka smrtnost!!!

Smanjuje smrtnosti zavisi od:

- Pravovremene i sigurne Dg
- Sigurne Th
- Niže cene Th

IGI – prisutne kod pacijenata:

- sa neutropenijom
- bez neutropenije

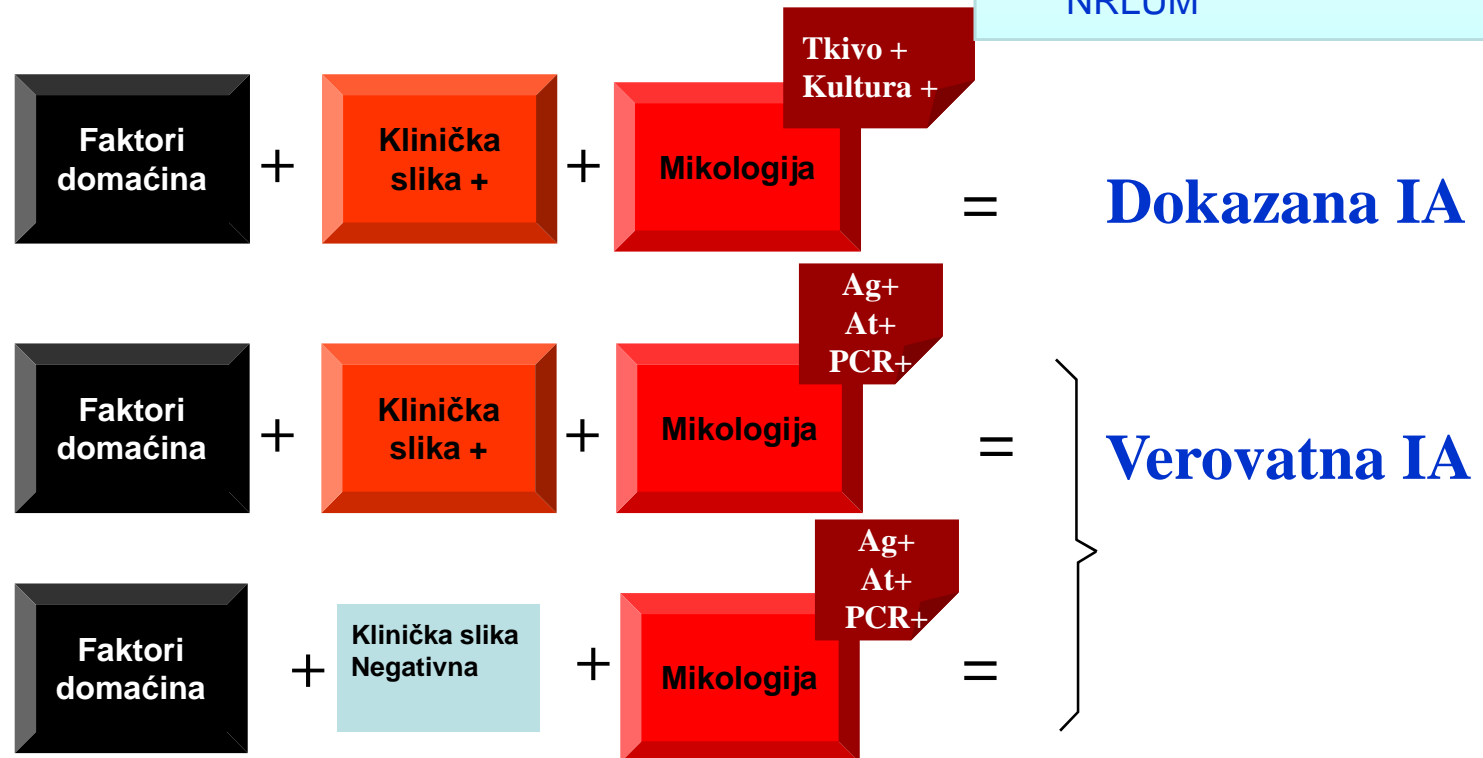
Standardne metode – ograničene

Nove metode – efikasnije:

- Jedan test - bez značaja
- GM, BDG i PCR - obećavaju
- Kombinacija više testova

# Nova strategija dijagnoze IGI\*

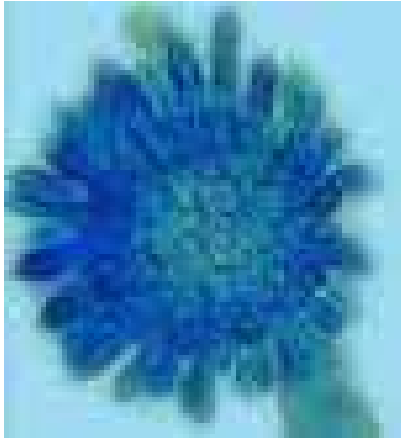
\*EORTC/MSG kriterijumi  
modifikovani prema iskustvu  
NRLUM



- Terapija vođena ranim laboratorijskim dijagnostičkim biomarkerima

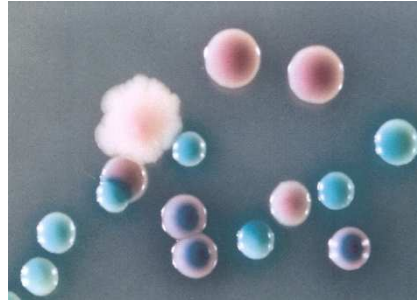
- Screening pacijenata pod rizikom
- Dijagnoza
- Praćenje efekta terapije

# Metode laboratorijske dijagnoze IGI



## MIKOLOŠKE/CITOLOŠKE

DIREKTAN mikroskopski preparat/DMP  
CITOLOGIJA/HP  
IZOLACIJA gljiva  
HEMOKULTURA



## IMUNOLOŠKE

DOKAZIVANJE At

DOKAZIVANJE Ag gljiva

DOKAZIVANJE BIOMARKERA  
gljiva



## MOLEKULARNE

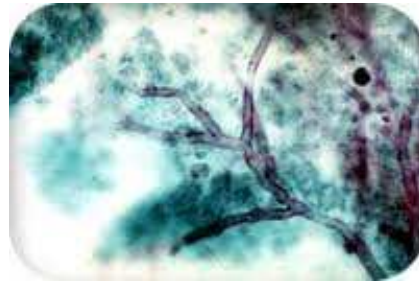
DOKAZIVANJE DNK gljiva  
(PCR)

IDENTIFIKACIJA gljiva

**DOKAZANA  
DIJAGNOZA IGI**

**VEROVATNA  
DIJAGNOZA IGI**

Mikroskopija



Izolacija



Ag/At reakcije

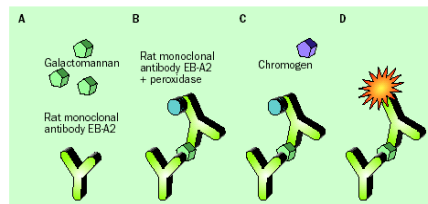
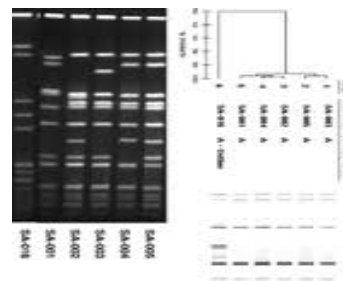


Figure 1. The Platelia Aspergillus ELISA technique. A serum ratio is calculated by dividing the optical density of the patient's serum sample by the mean optical density of two threshold control samples that contain 1 µg/L of galactomannan.

PCR



**BRZ, JEFTIN, DOKAZANA IGI**

Niska senzitivnost

Invazivne metode uzorkovanja

Zahteva eksperta za mikroskopiju i interpretaciju

**JEFTIN, DOKAZANA IGI**

**IDENTIFIKACIJA I AM**

Niska senzitivnost, spor

Invazivne metode uzorkovanja

**BRZ, VEROVATNA IGI**

**VISOKA SENZITIVNOST**

**VISOKA PPV (At)**

**VISOKA NPV (Ag)**

Interpretacija

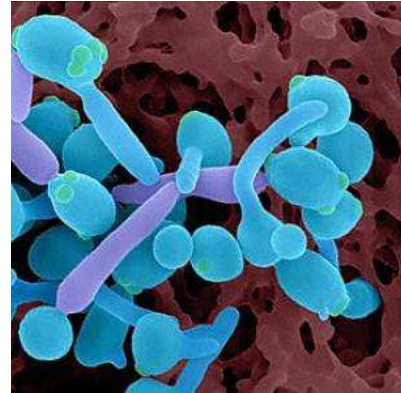
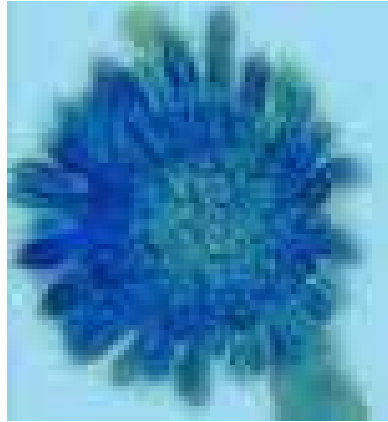
**BRZ, VEROVATNA IGI**

**VISOKA SENZITIVNOST**

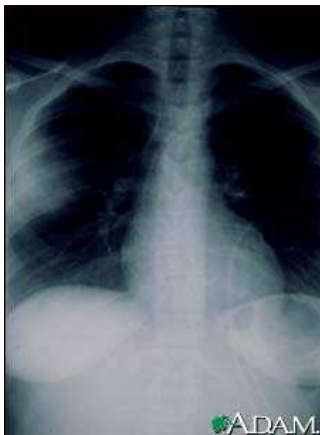
Kontaminacija

Interpretacija

Tkiva +++ (uzorkovanje)



## *Aspergillosis i Candidosis*



80% svih IGI

3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd



# Aspergillus i aspergiloza

*A. fumigatus* > *A. flavus* > *A. terreus* > *A. niger*  
*A. terreus* i *A. nidulans* (rezistentni na AmB)

## VRSTE

*A. fumigatus*  
*A. flavus*  
*A. niger*  
  
*A. terreus* \*

## EPIDEMIOLOGIJA

Vodeći uzročnici  
letaliteta  
(“BMT”/leukemije)  
Inhalacija spora  
Rezistencija na AM\*

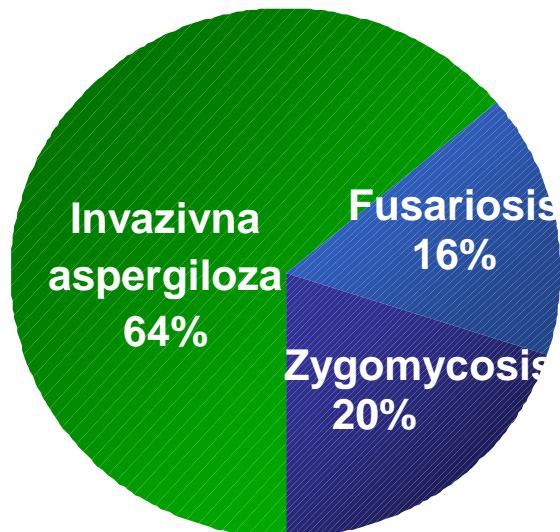
## FAKTORI RIZIKA

“BMT”  
Neutropenija  
Transplantacija pluća  
Th steroidima  
HIV

## KLINIČKA SLIKA

Nespecifična  
Primarno pneumonia  
Primarno sinuzitis  
Diseminacija CNS

Kašalj 92%  
Bol u plućima 76%  
Hemoptisys 54%



Porast incidencije!!!  
357% (1980-2008)

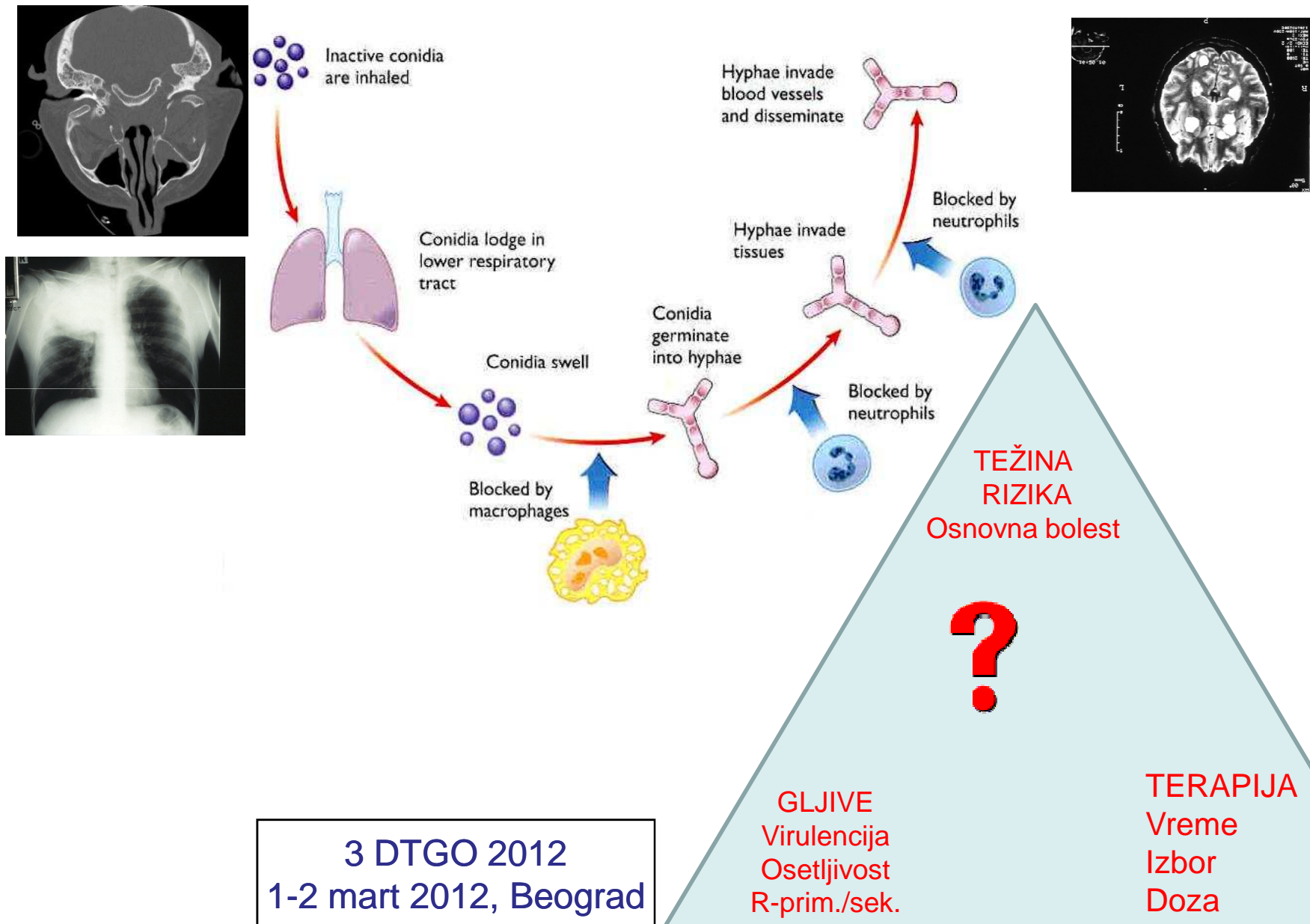
3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd



IPA



# Patogeneza IA

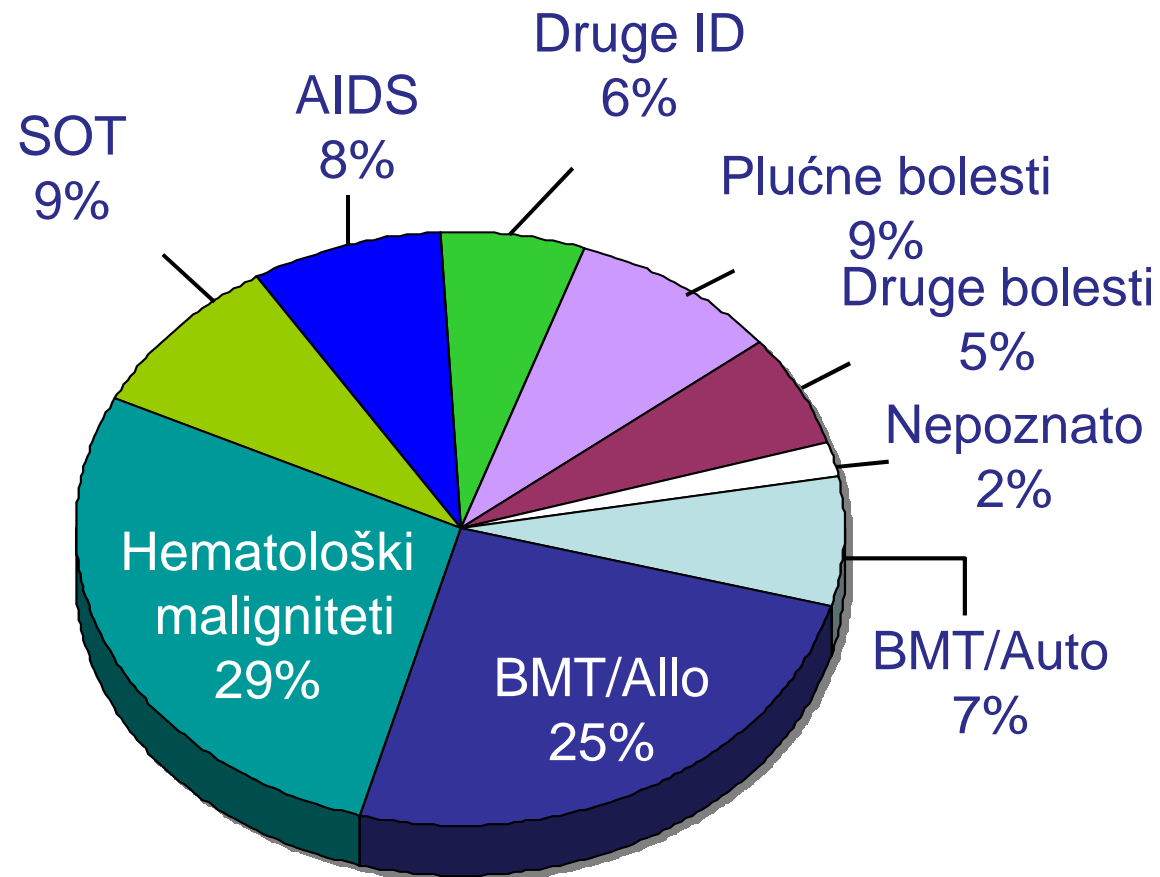


3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd



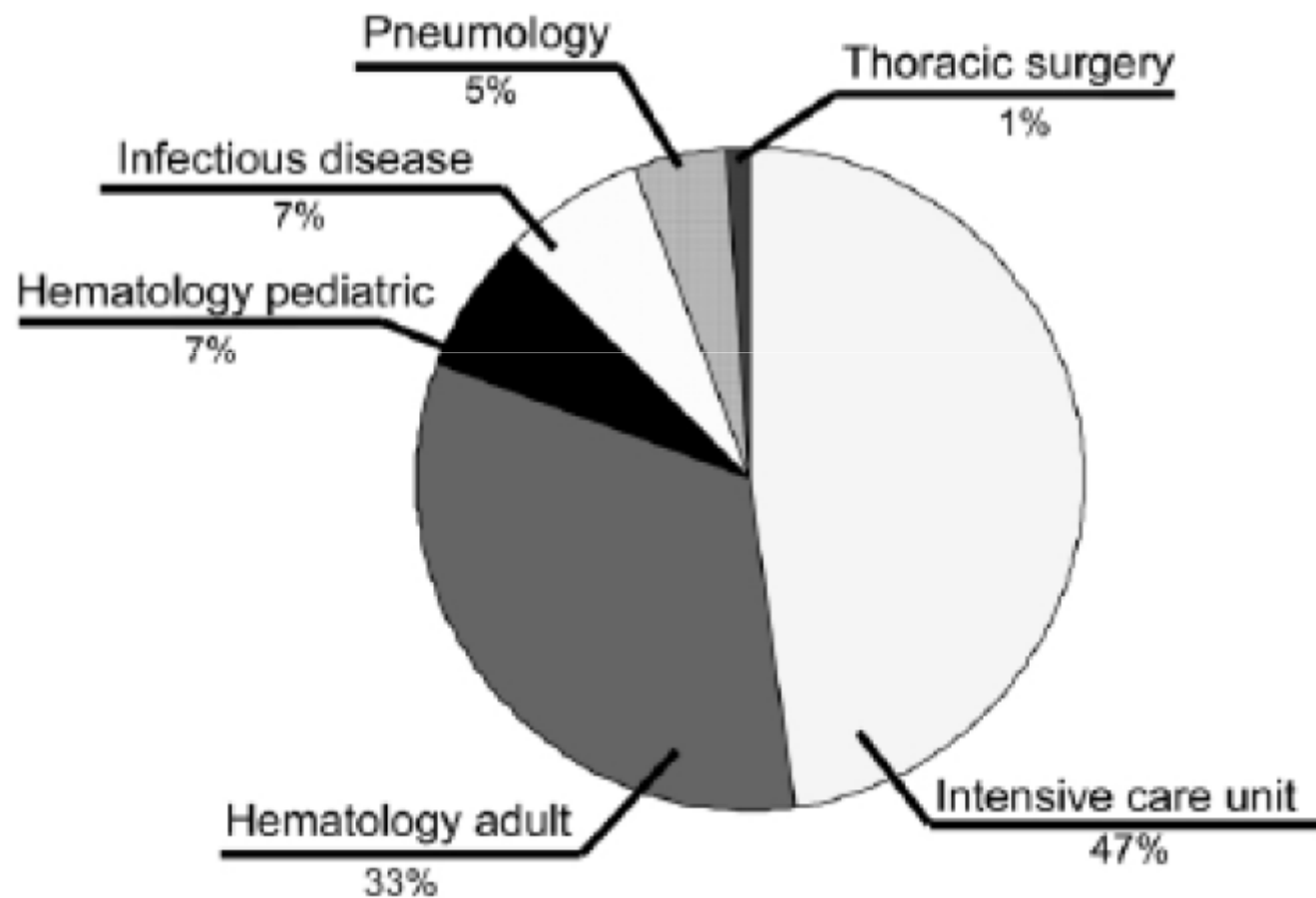
# IA – faktori rizika

595 Pacijenata



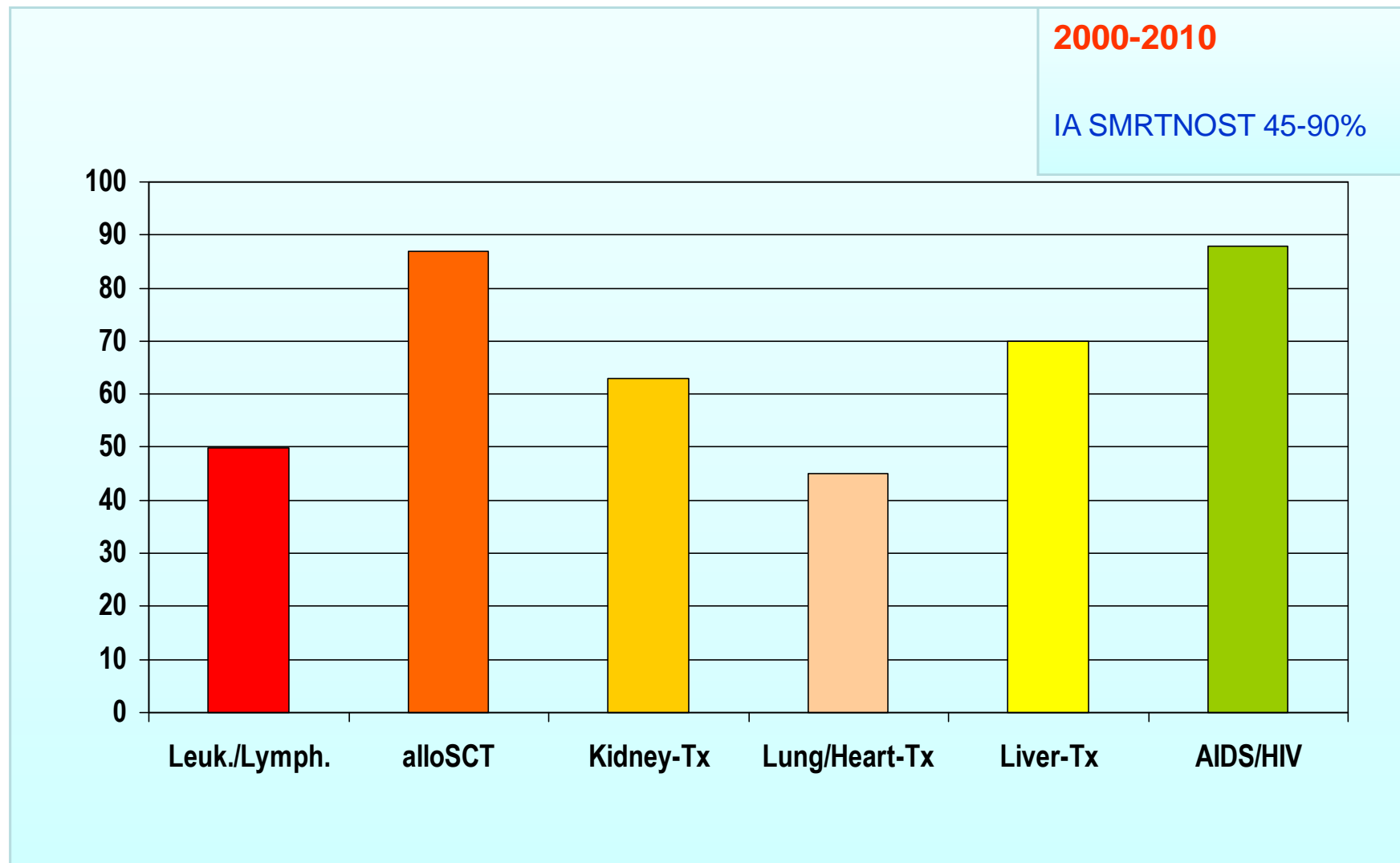
Patterson/ASPERFILE Study Group, MEDICINE, 2000.

## IA u jedinicama intenzivne nege!!!



Cornillet et al, Clin Infect Dis 2006;43:577

# IA - rizične grupe i smrtnost



*Lin et al., CID 2001;32:358*

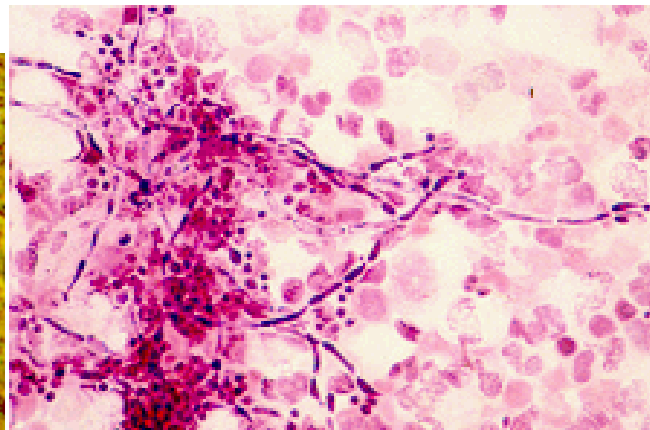
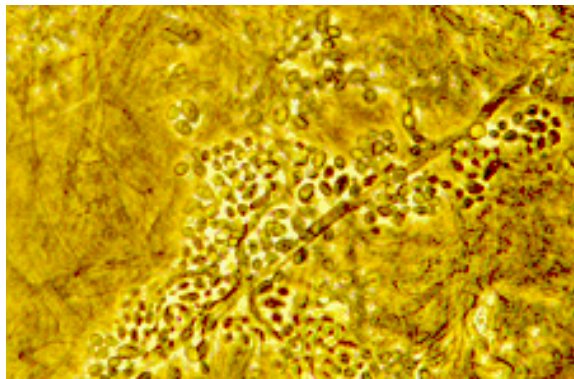
# *Candida* i kandidoza



- 10% KOH

PAS

kultura



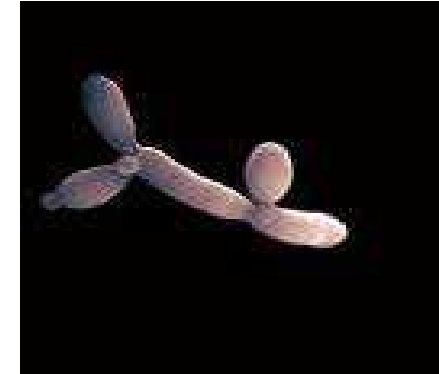
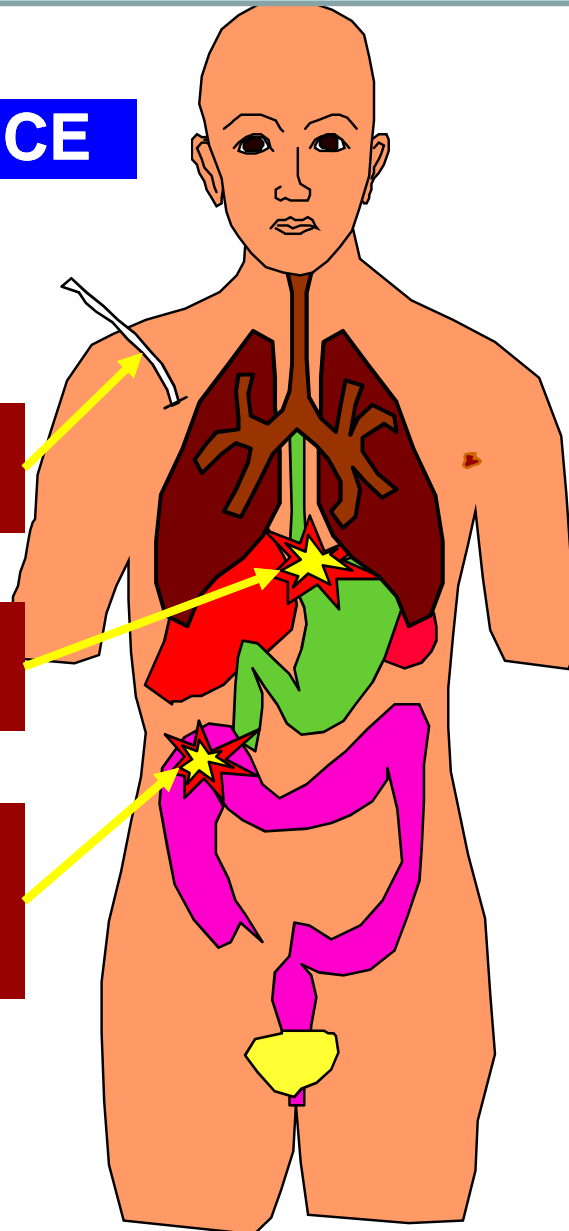
# IK u porastu; nozokomijalne infekcije...

## KVASNICE

*C. parapsilosis*  
*C. albicans*

*C. albicans*  
*C. tropicalis*

*C. albicans*  
*C. glabrata*  
*C. krusei*



*C.albicans* > 50% (EU)

*C.glabrata*

(R) na AmB i triazole

*C.tropicalis*

težak klinički tok

*C.krusei*

(R) na flukonazol

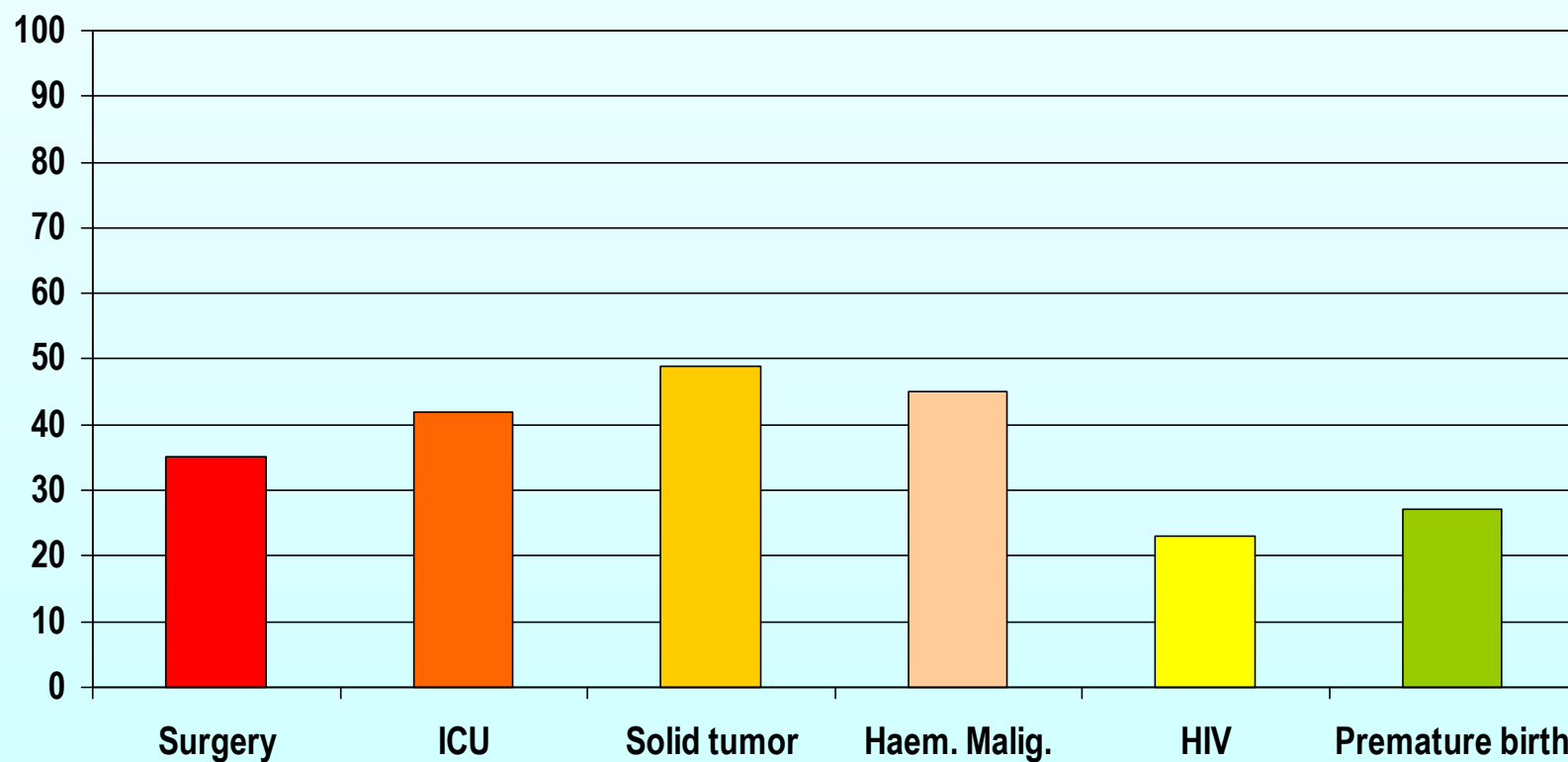
*C.lusitaniae*

*C.guillermundii*

(R) na AmB

# Smrtnost od invazivne kandidoze (IK) visoka

Invazivna kandidoza  
SMRTNOST 22-49%



# Rani laboratorijski biomarkeri



# Rani laboratorijski biomarkeri

“non culture” metode



Galaktomanan/GM  
Manan/MN

GM – kriterijum za Dg IA kod  
onko-hematoloških pacijenata

Antitela/At

izbor za aspergilom (IgG visoko pozitivan)

Individualna specifičnost: manan 41%, At 47%  
Kumulativna specifičnost: manan + At 75%

*BMC Infectious diseases 2007,7:103*

$\beta$ -D glukan/BDG

senzitivnost 67-84%

specifičnost 100%

## ➤ Mikološke metode

### 1. DMP/kultura

Plesni (sputum, BAL, aspirat sinusa...):  
gljivični elementi ili izolacija rodova  
*Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes*, ili  
*Scedosporium*

## ➤ “Non culture” metode

1. GM antigen u plazmi, serumu, BAL-u ili CST
2.  $\beta$ -d-glucan u serumu

PCR

# Galaktomanan (GM)

## Na test utiče:

- Koncentracija *Aspergillus* u tkivu
- Klinička forma IA
- Mikrosredina
- IO obolele osobe
- Nivo GM ima prognostički značaj
- Senzitivnost zavisi od:  
grupe pacijenata  
osnovne bolesti

## Nedostaci testa

- Veoma osetljiv metod
- Važan pretretmana kompleksa Ag-At
- Važna interpretacija

## Preporuka:

**2 puta nedeljno**

**2 uzastopna pozitivna testa**

**1 test visoko pozitivan**

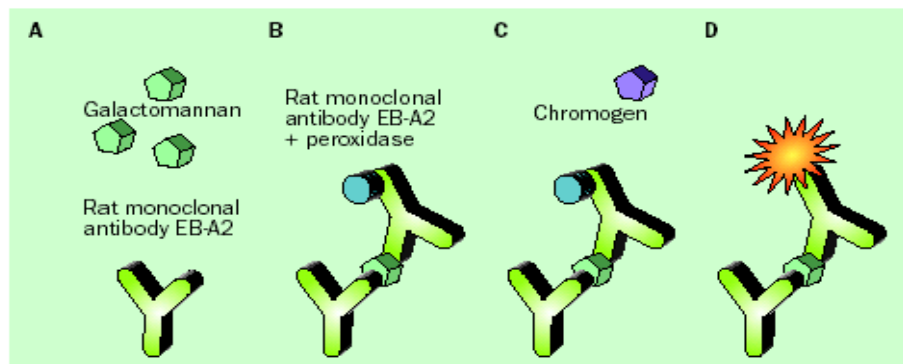


Figure 1. The Platelia *Aspergillus* ELISA technique. A serum ratio is calculated by dividing the optical density of the patient's serum sample by the mean optical density of two threshold control samples that contain 1 µg/L of galactomannan.

## Senzitivnost GM: 29-100%

Deca 29%

Odrasli 90%

**Odrasli hematološki 100% bolesnici**

# GM lažno pozitivan nalaz

## ODRASLI

- Nepravilno uzorkovanje
- ID pacijenti
- AB (piperacillin-tazobactam)
- Parenteralna primena:  
amoksisilin sa klavulonskom  
kiselinom
- Profilaksa AM
- Terapija itrakonazolom
- Ciklofosamid
- Ukrštena reaktivnost:  
*Penicillium*, *Paecilomyces variotti*  
*Alternaria*, *Fusarium*.
- *Graft-versus-host* oboljenje

## DECA

- u pedijatriji >83%
- translokacija GM iz mleka,  
pirinča i sl. preko intestinalne  
mukoze
- nezreo digestivni trakt  
(hrana/voda)
- *Bifidobacterium bifidum*
- GM je termorezistentan  
(sterilna hrana???)

# GM lažno negativan nalaz

- Visok titar antitela
- Ograničena angioinvazija
- AM (profilaksa, preemptive) sprečavaju rast gljiva i ekspresiju GM
- Lokalizacija gljiva (npr. sinuzitis)
- IA izazvana non *A. fumigatus* vrstama (npr. *A. terreus*)
- Hronično granulomatozno oboljenje

GM - izuzetno visoka NPV (98.5-100%)



**Negativan nalaz GM – isključuje IA skoro 100%**

3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd

GM	Senzitivnost	89.7%	GM	Specifičnost	98.1%
GM	PPV	87.5%	GM	NPV	98.4%

- ✓ svi pacijenti (n=24) sa perzistentnim vrednostima GM su umrli
- ✓ kod 6 pacijenata GM je postao negativan (4 su preživela; 2 su umrla)
- ✓ titrar GM korelira sa kliničkim ishodom IA
- ✓ primena GM redukuje nepotrebnu primenu AM za 43% - 12%

**GM + (n=23)**  
**Odrasli hematološki pacijenti**

**GM+/At+ (n=11)**  
**Letalitet 1/11**

**GM+/At- (n=12)**  
**Letalitet 5/12**

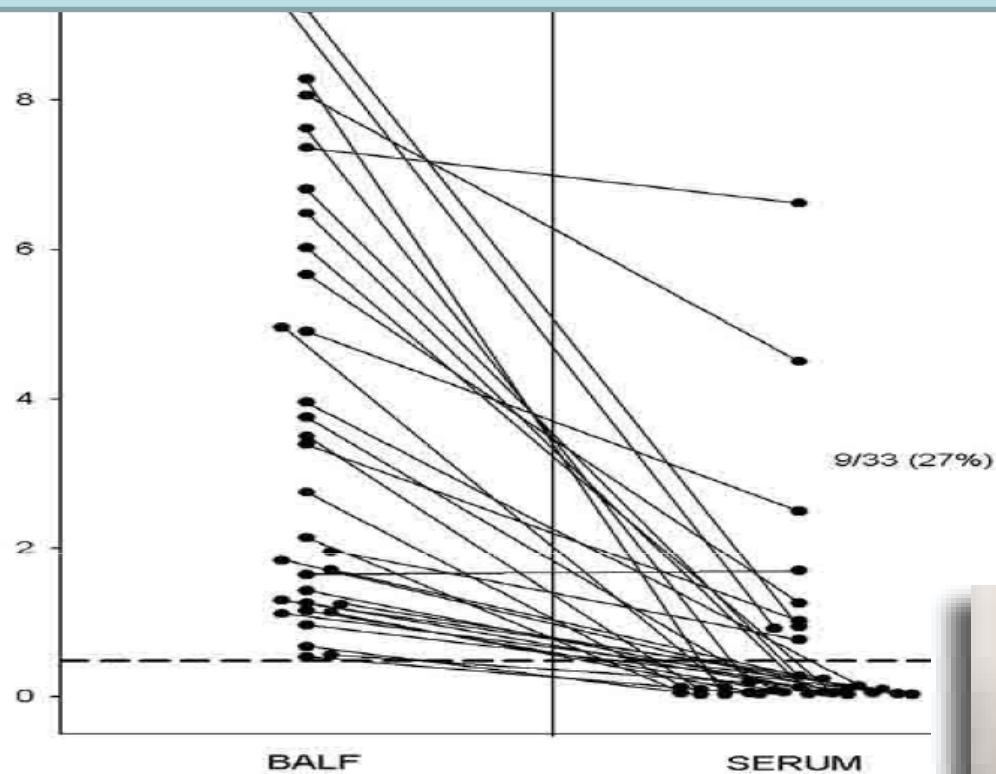
Arsić Arsenijević V, TIMM-4 2009.

GM je visoko pozitivan i kod invazivne infekcije gljivama roda *Fusarium* Tortorano, TIMM 5, 2011  
GM ne može da odredi vrstu *Aspergillus*!!!

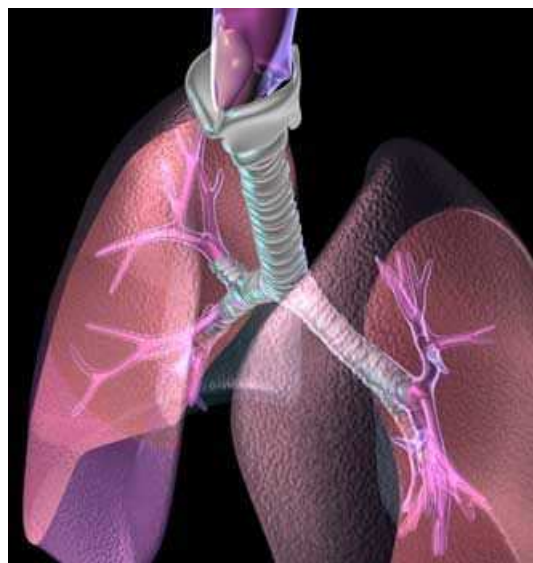
# GM pouzdanost testa BAL/serum

30/33 (92%)

Index



9/33 (38%)



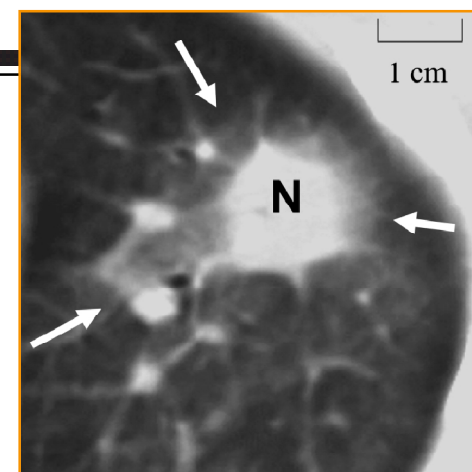
3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd

# Pouzdanost testova za dijagnozu IA vs CT

Alexander B D , Pfaller M A Clin Infect Dis. 2006;43:S15-S27

## Diagnostic Accuracy of Tests for Invasive Aspergillosis

Diagnostic Test	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value	Relationship to CT Findings
Real-time PCR	79%	92%	79%	$-0.3 \pm 6.6$ d
ELISA (galactomannan)	58%	97%	86%	$2.8 \pm 4.1$ d
$\beta$ -D glucan test	67%	84%	61%	$6.5 \pm 4.9$ d



3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd



# Senzitivnost testova vs osnovnu bolest

TEST	HEMATOLOŠKI MALIGNITETI	SOT	COPD
KULTURA	30-67% (72% specifičnost)	40-50% (5-16% specifičnost)	83% (22% specifičnost)
GM/krv meta-analiza	58% -100%	22-60%	42-48%
BDG/krv meta-analiza	55%-68%	/	/
PCR IA meta-analiza	54%-88%	/	/

Reichenberger BMT 1999; Maertens JCM 1999; Pfeiffer CID 2006; Cordonnier CMI 2009; Koo CID 2009; Mengoli Lancet ID 2009 ; White JCM 2010; Bulpa ERJ 2007; Singh CMR 2005; Cornelius JCM 2007; Guinea CMI 2009; Meersseman CCM 2004; Cornillet CID 2006; Husain Transplantation 2007

**Terapija antimikoticima smanjuje senzitivnost testova!!!**  
**Pravilna interpretacija – zavisi od profilakse/empirijske terapije!!!**

# Primena testova i imunski odgovor

NORMALNA  
FUNKCIJA IMUNSKOG SISTEMA

OŠTEĆENA  
FUNKCIJA IMUNSKOG SISTEMA

PLUĆNA BOLEST

+ URODJENI IMUSKI DEFICIT

KORTIKOSTEROIDI →

OŠTEĆENJE NEUTROFILA

NEUTROPENIJA

VIŠE OŠTEĆENJA

KULTURA	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
GM	-	-	-	+	++	++
BDG	+/-	+/?	+/?	++	+/-	+/-
ANTITELA	+++	+++	++	+/?	+/?	-/?
PCR (tkivo)	+++	++?	+++?	+++?	+++?	++
PCR (krv)	-?	-?	-?	+/-	+	+

Modifikovano - David Deninng

Šta su najnoviji trendovi u ranoj dijagnozi  
IA i IK

# Izdisajni test za *A. fumigatus*

Novi dijagnostički marker: 2- pentyl-furan (2PF)

Detektuje biomarkere u dahu osobe koja je kolonizovana/inficirana

Chambers ST, Syhre M, Murdoch DR, McCartin F, Epton MJ. **Detection of 2-pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigatus*.**

Med Mycol. 2009;47(5):468-76.

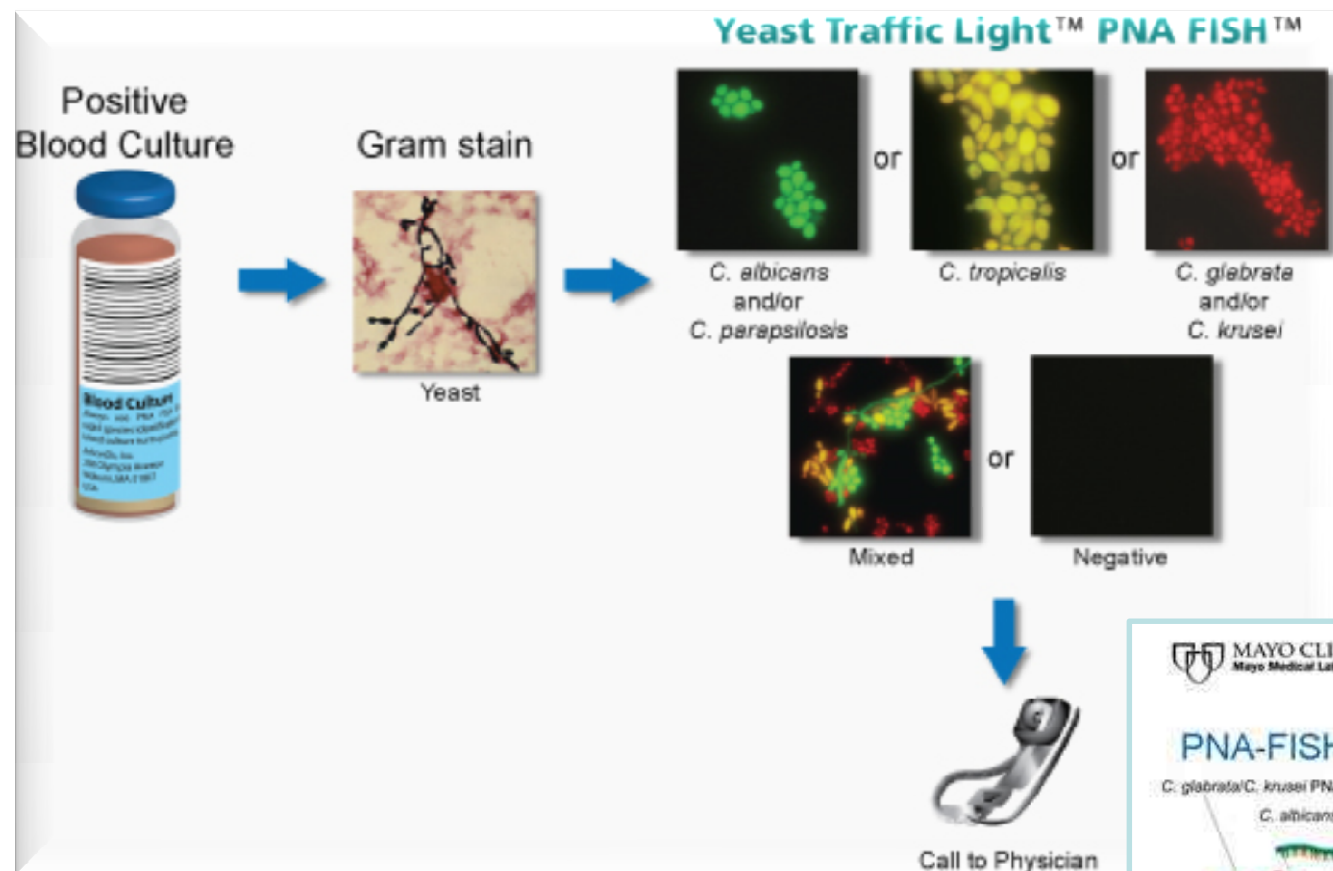
Department of Pathology, University of Otago Christchurch, Christchurch, New Zealand.

Steve.Chambers@cdhb.govt.nz

Chambers et al., Med Myc 2011

3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd

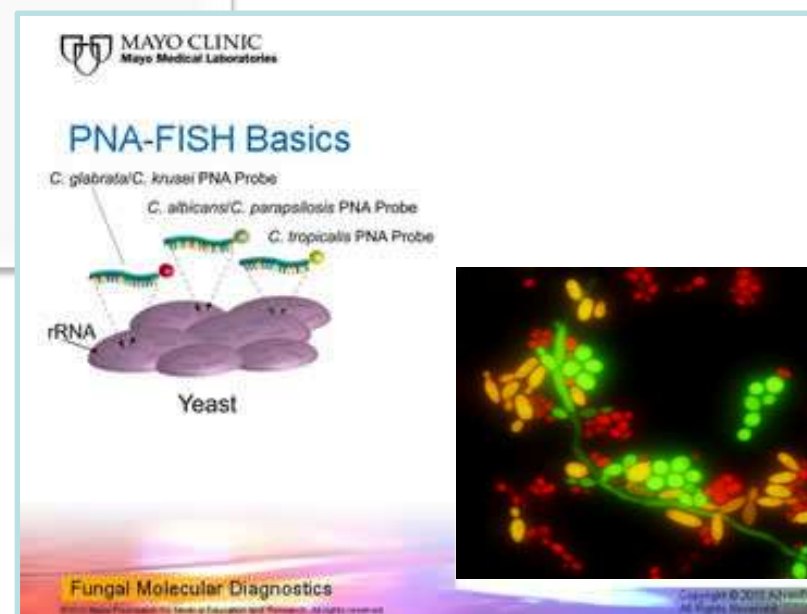
# Yeast Traffic Light PNA FISH



***C. glabrata, C. krusei,*  
*C. tropicalis (R) Flu***

**Peptide Nucleic Acid (PNA) FISH**  
**Multikolorni kvantitativni test**  
**nucleic acid hybridization assay**

**Brza identifikacija 95-99% kvasnica iz hemokulture**  
**Vreme 2-3 sata u odnosu na 2-3 dana**

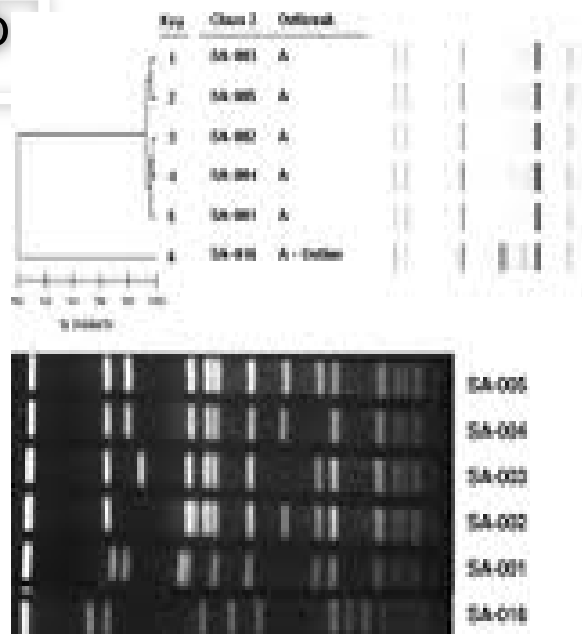


# Molekularne metode

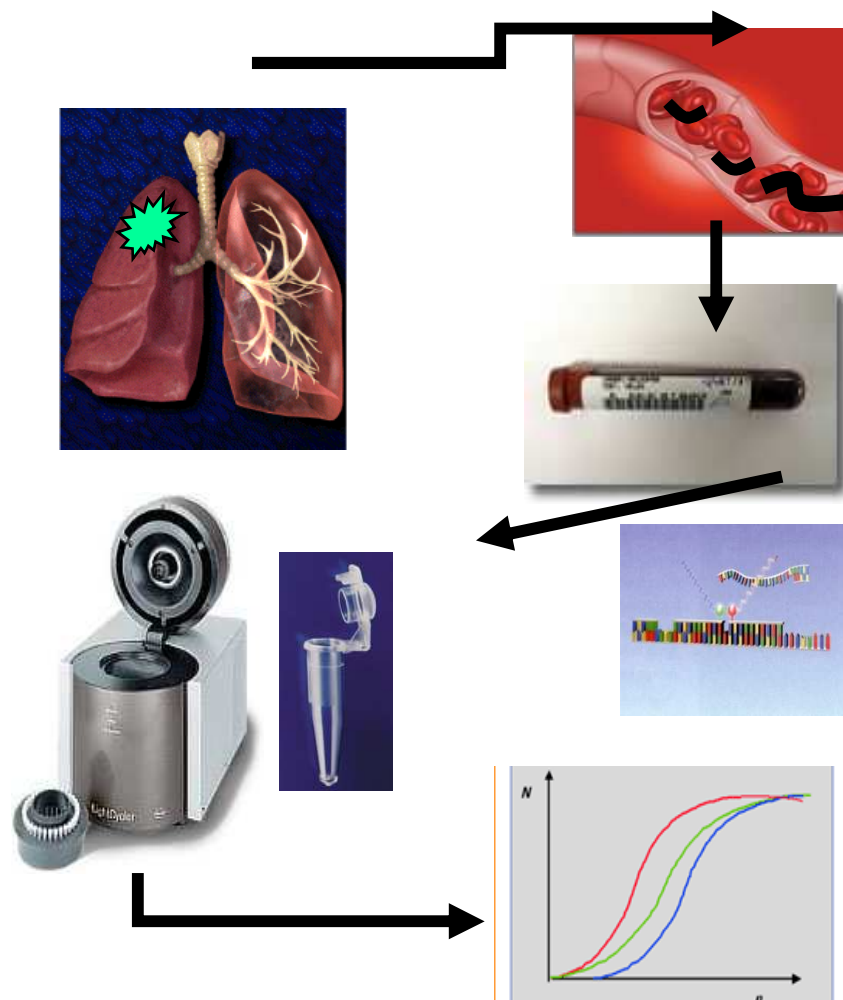
## Molekularna identifikacija izolovanih plesni – rep PCR



Diversilab



## Molekularna dijagnoza IA Rt PCR



# Rana dijagnoza poboljšava terapiju

## ❖ Vreme – rana detekcija

GM

PCR (u razvoju)

Poboljšati mikroskopiju  
(fluorescentne boje)

Poboljšati izolaciju  
(veći broj podloga)

## ❖ Brza identifikacija vrste

MALDI-TOF

Diversilab

## ❖ Doziranje (TDM)

Vorikonazol

Posakonazol

Itrakonazol

## Početak lečenja

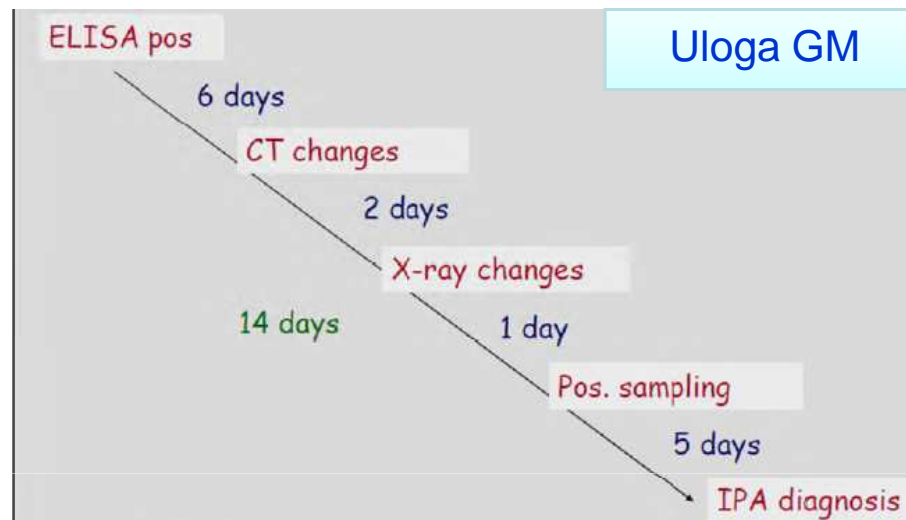
pre 10-og dana

posle 11-og dana

## Smrtnost

manja od 40%

veća od 90%



Ključna uloga referentne laboratorije



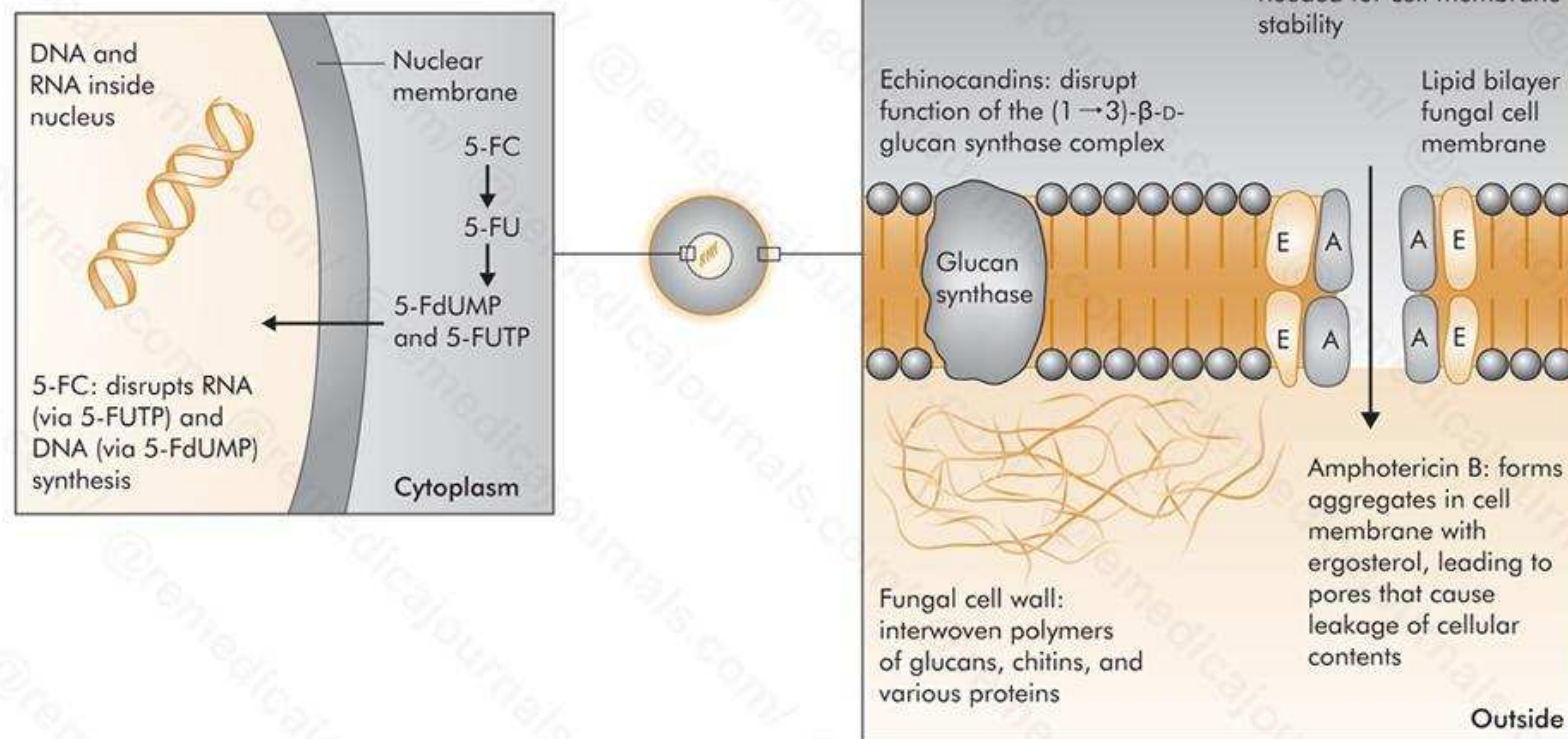
# Rana dijagnoza i terapijski pristupi

Profilaktički

Empirijski

*“Preemptive”*

Specifični



5-FC: 5-fluorocytosine; 5-FdUMP: 5-fluorodeoxyuridine monophosphate; 5-FU: 5-fluorouracil; 5-FUTP: 5-fluorouridine triphosphate; A: amphotericin B; E: ergosterol. Redrawn from [57], with permission from Elsevier.

Gde smo i šta dalje???

## 183 PACIJENTA (KH KCS)

2008			2009			2010		
39 pacijenata			49 pacijenata			95 pacijenata		
NEGATIVAN	POZITIVAN	VISOKO POZITIVAN	NEGATIVAN	POZITIVAN	VISOKO POZITIVAN	NEGATIVAN	POZITIVAN	VISOKO POZITIVAN
5	<b>?</b> 34	→ 15	9	<b>?</b> 40	→ 19	5	<b>?</b> 90	→ 31

3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd

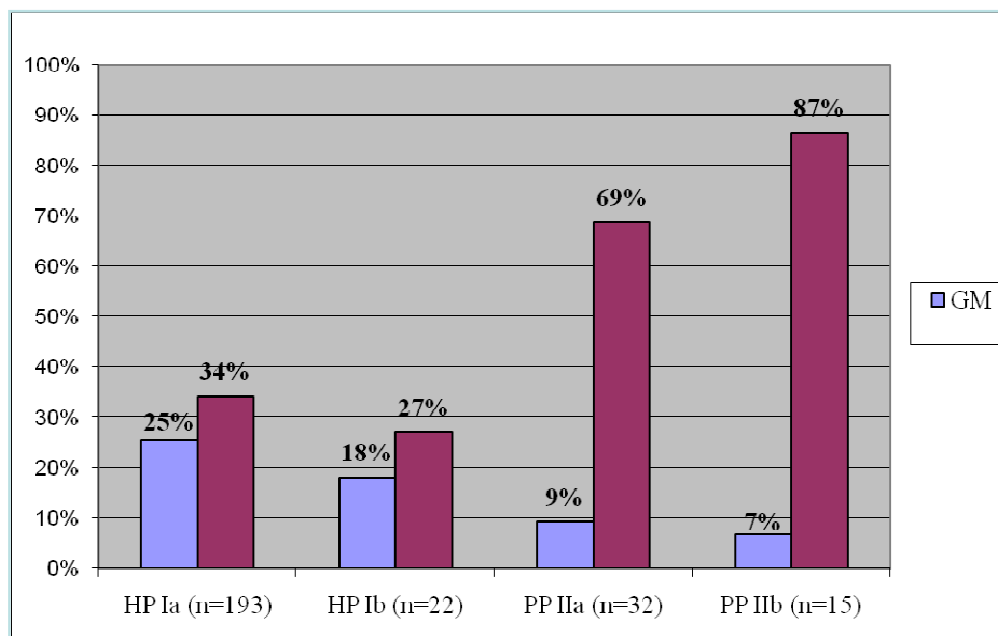
## ZAKLJUČCI I PREPORUKE

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| • OSNOVNA BOLEST          | testovi variraju                                  |
| • UZORAK                  | testovi variraju                                  |
| • GM                      | izbor BAL   |
| • BDG                     | slično GM   |
| • At                      | da (kada su visoko pozitivna)                     |
| • PCR                     | komercijalni testovi (problem kontrole kvaliteta) |
| • PRO ET CON'S            | za <i>non-cultur</i> metode su jednaki            |
| • VIŠE RAZLIČITIH TESTOVA | da  |
| • JEDAN TEST              | ne  |

# IA – rani laboratorijski biomarkeri

**NRLUM**  
**2008-2010**

Grupa	♂		♀		<i>Aspergillus</i> GM	<i>Aspergillus</i> IgA, IgM, IgG	Ukupno
	Broj	%	Broj	%			
HP Ia	107	55.44	86	44.56	193	193	193
HP Ib	12	54.54	10	45.45	22	22	22
PP IIa	22	68.75	10	31.25	32	32	32
PP IIb	9	60	6	40	15	15	15
<b>Ukupno</b>	<b>150</b>	<b>57.25</b>	<b>112</b>	<b>42.75</b>	<b>262</b>	<b>262</b>	<b>262</b>



# Šta NRLUM može da UČINI???

- **K**valitet analiza
- **K**vantitet analiza
- **K**ontinuitet analiza

3 "K"



- **O**rganizacija
- **O**dgovornost

2 "O"



3 "K" + 2 "O"

*Unaprediti laboratorijsku dijagnozu gljivičnih infekcija u Srbiji*

3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd

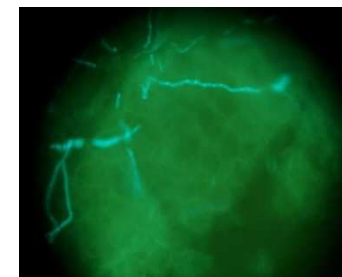
# Nova strategija - nivoi dijagnostike

- **PRVI NIVO**

- Mikroskopske metode detekcije gljiva u bolesničkom materijalu
- Izolacija kvasnica i plesni

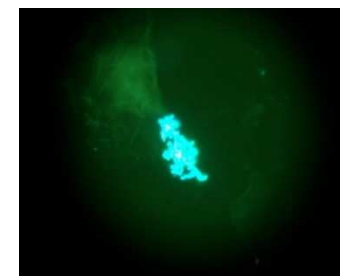
- **DRUGI NIVO**

- Izolacija i identifikacija i dermatofita, *C. neoformans*...
- Osetljivost kvasnica disk difuzionim metodom



- **TREĆI NIVO**

- Izolacija i identifikacija plesni i bifaznih gljiva
- Osetljivost – Etest, dilucija (MIK/MFK) kvasnica i plesni
- Detekcija Ag/At
- PCR

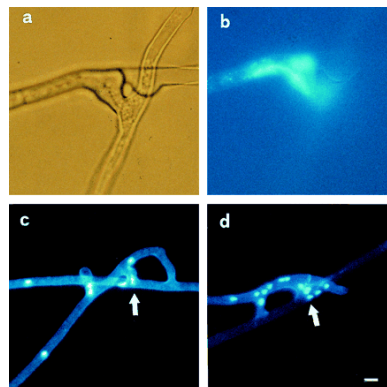


3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd

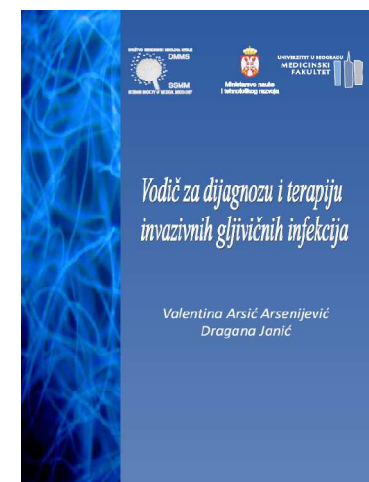


# Nova strategija – edukacija

## EDUKACIJA KONTROLA I UNAPREDJENJE ANALIZA PRAVILNA INTERPRETACIJA REZULTATA



3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd



Ekspertski sistem za:

1. “*screening*” pacijenata pod rizikom
2. dijagnozu IGI
3. “*monitoring*” terapije IGI

- **Cilj** – povećati efikasnost organizacije, kontrole, izdavanja i planiranja analiza i formiranje IGI baze podataka

## Izveštavanje kliničara i interpretacija rezultata

Analiziranje različitih kriterijuma: period, osnovna bolest, institucije ...

**Statističke analize:** NPV, PPV, incidencija, prevalencija...

### Osnovni podaci

JMBG 20085988710289	Ime i prezime: Bojan Jovic	Godina rođenja: 1988	Broj protokola laboratorije 22222
Dijagnoza dijagnoza2	Uzorak Krv	Broj istorije bolesti 1111	
Pregled koji se traži AspergillusAg		Datum uzimanja materijala 7-3-2010	
Ustanova koja traži analizu/uput Institut za majku i dete, Beograd		Analiza se radi na lični zahtev-broj računa 11-22-33	

### Candidosis

Analiza	Metoda	Rezultat	Referentne vrednosti
Anti-Candida IgA antitela	elisa	40 U/ml	negativan
Anti-Candida IgM antitela	elisa	50 U/ml	negativan
Anti-Candida IgG antitela	elisa	400 U/ml	pozitivan
Anti-Candida IgE antitela	elisa	111 U/ml	niskopozitivan
Candida - mannan antigen	elisa	0.5	negativan

Napomena: Neophodno je ponoviti analizu za 7 dana

### Aspergillosis

Anti-Aspergillus IgA antitela	elisa	55 U/ml	negativan
Anti-Aspergillus IgM antitela	elisa	66 U/ml	negativan
Anti-Aspergillus IgG antitela	elisa	560 U/ml	visokopozitivan
Anti-Aspergillus IgE antitela	elisa	1000 U/ml	visokopozitivan
Aspergillus - galactomannan antigen	elisa	0.1	negativan

Napomena: Neophodno je ponoviti analizu za dana

### Mišljenje

Ovde je potrebno uneti mišljenje

\*Analize se rade četvrtkom

Datum analize

7-3-2010

Prof.dr Valentina Anđić - Arsenijević  
Specijalista mikrobiologije sa parazitologijom  
subspecijalista parazitolog-mikolog

Zapamti analizu

**3 DTGO 2012**  
**1-2 mart 2012, Beograd**

# Database: analize i evaluacija

Home	Analize	Pacijenti	Pretraga	Statistika		
Ukupno analiza 24						
Prezime i ime ↑	Dijagnoza↑	Uzorak ↑	Pregled↑	Ustanova ↑	Datum analize ↑	
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	BAL		Hematologija, KCS, B	31.12.2069	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	BAL		Hematologija, KCS, B	31.12.2069	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	BAL		Hematologija, KCS, B	31.12.2069	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>					01.01.1970	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	BAL			00.00.0000	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	Krv	AspergillusAg	Hematologija, KCS, B	00.00.0000	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	Krv	AspergillusAg	Hematologija, KCS, B	00.00.0000	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	BAL			00.00.0000	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	Krv	AspergillusAg	Hematologija, KCS, B	00.00.0000	<a href="#">Detalji</a>
<a href="#">sss ddd</a>	dijagnoza2	Krv	AspergillusAg	Hematologija, KCS, B	00.00.0000	<a href="#">Detalji</a>

« « 1 2 3 » »

Prikaz rezultata 11 - 20

3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd

## *Database: analize i evaluacija*

Evaluacija i interpretacija  
laboratorijskih nalaza  
kod pacijenata pod  
rizikom za IG

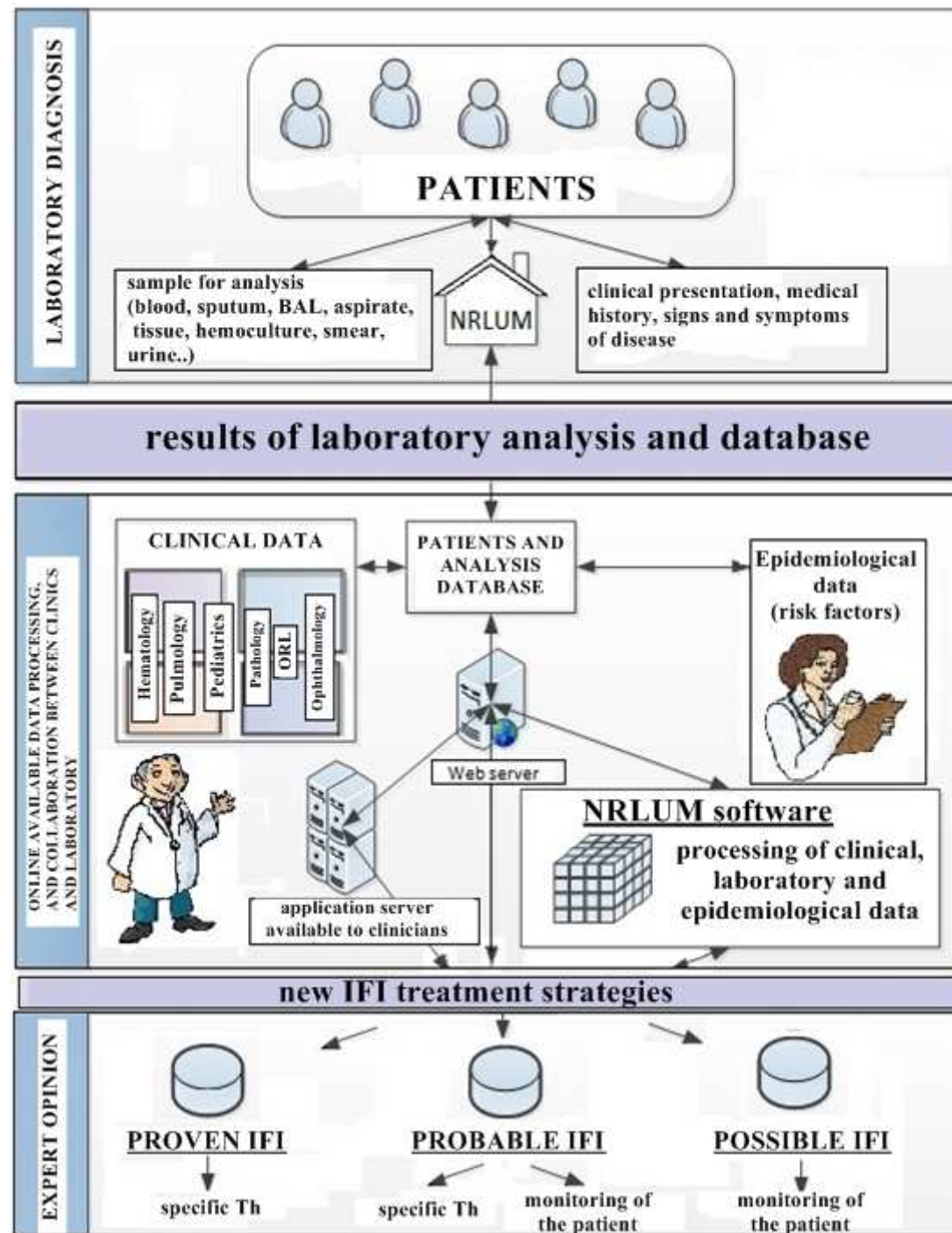
Utvrđiti nacionalnu  
strategiju za kontrolu,  
prevenciju i terapiju IGI

- Prikupljanje podataka:  
laboratorijski testovi, klinički podaci, epidemiološki podaci
- Baza pacijenata sa IGI
- Epidemiološki “monitoring” IGI
- Dijagnostički algoritmi za IGI
- Implementacija nacionalnog Vodiča  
“Vodič za dijagnozu i terapiju IGI”

Strategija...

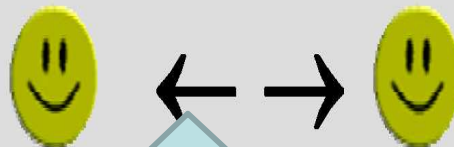
No single test...

Duble test or  
Triple test...



## Strategija – timski rad

*kliničar* ← → *mikrobiolog*



***EPIDEMIOLOG  
PUBLIKACIJE***

3 DTGO 2012  
1-2 mart 2012, Beograd