

Налаз лабораторијских биомаркера код хематолошких и пулмолошких болесника с високим ризиком за аспергилозу

Елеонора Ратков¹, Ана Видовић^{2,3}, Предраг Минић^{3,4}, Драгана Јанић^{3,5},
Сандра Шипетић-Грујичић⁶, Александар Џамић¹, Валентина Арсић-Арсенијевић¹

¹Референтна лабораторија за узрочнике микоза, Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Клиника за хематологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија;

³Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

⁴Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“, Београд, Србија;

⁵Одељење за хематоонкологију, Универзитетска дечја клиника, Београд, Србија;

⁶Институт за епидемиологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Током протеклих деценија дошло је до великог повећања инциденције инвазивних гљивичних обољења, посебно аспергилозе. Недијагностиковану и касно дијагностиковану инвазивну аспергилозу прати стопа смртности до чак 90%. Доказивање раних лабораторијских биомаркера (галактоманан и анти-*Aspergillus* антитела) доприноси постављању правовремене дијагнозе, а могу се користити и за клиничко праћење лечења оболелих особа.

Циљ рада Циљ рада био је да се процени значај примене тзв. *non-culture* метода (галактоманан, анти-*Aspergillus* антитела *IgA*, *IgM* и *IgG*) у постављању ране дијагнозе аспергилозе код болесника с високим ризиком за развој овог гљивичног обољења.

Методе рада Проспективна двогодишња студија обухватила је 262 особе (одрасли и деца) лечене од пулмолошких и хематолошких обољења код којих је постојао висок ризик за настанак аспергилозе. Код свих болесника су из узорака крви испитивани галактоманан и анти-*Aspergillus* антитела.

Резултати Рани лабораторијски биомаркери су статистички значајно чешће били позитивни код пулмолошких болесника ($p=0,00033$). Код хематолошких болесника чешћи је био позитиван налаз галактоманана, а код испитаника с плућним обољењима налаз анти-*Aspergillus* антитела. Ипак, и поред могуће имunosупресије, код око трећине хематолошких болесника био је позитиван и налаз анти-*Aspergillus* антитела.

Закључак Рано постављање дијагнозе аспергилозе и лечење болесника од овог гљивичног обољења јесу клинички и лабораторијски проблем. Данас је примена нових тзв. *non-culture* метода кључна за исход аспергилозе. Клиничка слика, налаз лабораторијских биомаркера и њихово правилно тумачење значајно повећавају могућност правовремене примене одговарајуће терапије. Због тога је нова организација референтне лабораторије за медицинску микологију значајно побољшала исход лечења од аспергилозе код болесника с високим ризиком за ово обољење код нас. Ипак, неопходни су даља истраживања, примена европских стандарда и увођење нових дијагностичких метода у овој области.

Кључне речи: аспергилоза; рана лабораторијска дијагноза; галактоманан; анти-*Aspergillus* антитела; болесници с високим ризиком

УВОД

Током протеклих деценија дошло је до великог повећања инциденције инвазивних гљивичних обољења (ИГО) изазваних квасницама рода *Candida* и филаментозним гљивама рода *Aspergillus* [1]. Гљиве рода *Aspergillus* изазивају обољење аспергилозу, која се може испољити у три основна клиничка облика: хронична (сапрофитска) аспергилоза, инвазивна аспергилоза (ИА) и алергијска аспергилоза. Сапрофитски облик аспергилозе обухвата отомикозу и плућни аспергилом, док се алергијски облик аспергилозе испољава као алергијски синуситис и алергијска бронхопулмонална аспергилоза (АБПА). ИА захвата дубоке органе и ткива код болесника с имunosупресијом: пролонгирана неутропенија или лечење високим дозама корти-

костероида и других имunosупресива. Које ће се обољење развити превасходно зависи од основне болести и стања имунског система домаћина [2].

Због неспецифичних клиничких знакова и симптома ИА, клиничка дијагноза се тешко поставља, те је рана лабораторијска дијагноза кључна [3]. Лабораторијска дијагноза аспергилозе је тешка, а болест прати висока стопа смртности уколико се не постави правовремено. Данас се за постављање дијагнозе ИА примењују критеријуми *EORTC/MSG* (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer – Mycoses Study Group*): „доказана”, „вероватна” и „могућа”; ови термини означавају с којим степеном сигурности лабораторијски резултати корелирају с клиничком дијагнозом, односно ИА [4].

Correspondence to:

Valentina ARSIĆ-ARSENIJEVIĆ
Institut za mikrobiologiju i
imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Srbija
arsicval@eunet.rs

Рана дијагноза аспергилозе је од пресудног значаја за преживљавање болесника, због чега је доказивање раних лабораторијских биомаркера (тзв. *non-culture* метода) веома важно [5], али омогућава дијагнозу само на нивоу „вероватна” и „могућа”. Најважнији рани лабораторијски биомаркери су: галактоманан (ГМ) и анти-*Aspergillus* антитела. ГМ је главна компонента ћелијског зида гљива рода *Aspergillus*, ванћелијски је егзопродукт који се ослобађа током раста гљива у ткивима, док специфична антитела организам ствара током гљивичне инфекције [5].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада био је да се процени значај примене тзв. *non-culture* метода заснованих на откривању антигена ГМ и анти-*Aspergillus* антитела (класе *IgA*, *IgM* и *IgG*) код болесника с високим ризиком за настанак ИА или АБПА.

МЕТОДЕ РАДА

Испитаници

Проспективна студија је трајала од 1. новембра 2007. до 31. октобра 2009. године и обухватила је 262 особе код којих је установљен клинички висок ризик за настанак ИА или АБПА. Узимајући у обзир основно обољење и имунолошко стање, испитаници су сврстани у две групе. Прву групу су чинили хематолошки болесници чије је имунско стање организма било угрожено услед основног обољења или примене имуносупресивне терапије, док су другу групу чинили пулмолошки болесници који су били имунокомпетентни. На основу животног доба ове две групе су даље подељене на одрасле испитанике и децу. Прву групу чинила су 193 одрасла болесника с хематолошким обољењима (леукемије, лимфоми, анемије, мијелодиспластични синдром и др.) лечена на Клиници за хематологију Клиничког центра Србије и 22 детета лечена на Одељењу за хематоонкологију Универзитетске дечје клинике у Београду. Друга група обухватила је 32 одрасла болесника с плућним болестима (bronхопнеумонија, инфилтрација плућа, туберкулоза, астма, рак, цистична фиброза и др.) лечена на Клиници за плућне болести и туберкулозу Клиничког центра Србије и 15 деце која су лечена на Одељењу за пулмологију Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић” у Београду.

Критеријуми за одабир испитаника

У првој групи су се под високим ризиком за настанак ИА сматрали болесници који су примали високодозну хемиотерапију, имали уграђен централни венски катетер, код којих је установљена неутропенија (мање

од 500 неутрофила по mm^3 крви) током најмање десет дана с упорном фебрилношћу дужом од 96 часова која је била рефрактерна на лечење антибиотицима широког спектра, или који су примали кортикостероиде дуже од три недеље.

У другој групи су с високим ризиком за настанак АБПА били испитаници који су се лечили од плућног обољења које значајно ремети функцију плућа или су имали анатомску промену структуре плућа, као што су каверне, бронхиектазије, туберкулоза, тумори, астма или цистична фиброза.

Узорци коришћени за испитивање

Болесници су испитани током болничког лечења. Узорци крви су узимани једном недељно и достављани Националној референтној лабораторији за узрочнике микоза, у Институту за микробиологију и имунологију Медицинског факултета Универзитета у Београду. Из крви је издвајан серум који се користио за даља испитивања биомаркера за ИА или АБПА. Тестирање прикупљених серума је вршено једном недељно. Узорци су чувани у фрижидеру на $2-8^{\circ}C$ најдуже пет дана до тренутка испитивања, а затим депоновани у банку серума замрзавањем на $-70^{\circ}C$.

Утврђивање галактоманана

ГМ је утврђиван комерцијалним тестом *Platelia Aspergillus Ag* (*BioRad, Marnes la Coquette, France*), који се заснива на принципу сендвич теста *ELISA* (енгл. *enzyme linked immunosorbent assay*). Узорци су обрађени према упутству произвођача. Добијене вредности оптичке густине коришћене су за израчунавање индекса ГМ. Узорци серума с индексом од 0,5 и већим сматрали су се позитивним, а граничне и ниже вредности су означене као негативне.

Утврђивање анти-*Aspergillus* антитела класа *IgA*, *IgM* и *IgG*

Анти-*Aspergillus* антитела су одређивана комерцијалним сетом тестова (*Serion Elisa classic, Virion/Serion, Germany*) који се заснива на принципу теста *ELISA*, према упутствима произвођача. Свако тестирање вршено је уз истовремено одређивање позитивног и негативног контролног узорка. Вредност оптичке густине сваког узорка је наносена на стандардну криву с које се читава вредност титра анти-*Aspergillus* антитела. Уколико је титар био мањи од $50 IU/ml$, узорак је означаван као негативан, уколико је био $50-70 IU/ml$, сматрао се граничним, а ако је био већи од $70 IU/ml$, означаван је као позитиван. При тумачењу налаза сви гранични резултати означени су као негативни, а налаз с вредностима већим од $400 IU/ml$ као високо позитиван.

Статистичка анализа

За статистичку обраду добијених података коришћен је χ^2 -тест.

РЕЗУЛТАТИ

У студију је било укључено 150 болесника мушког пола (57,25%) и 112 женског пола (42,75%), за које је урађено укупно 668 анализа за доказивање ГМ и анти-*Aspergillus* антитела класа IgA, IgM и IgG (Табела 1). Приказ клиничких дијагноза испитаника дат је у табели 2.

На графиконима 1 и 2 приказана је расподела болесника с позитивним налазом испитиваних биомаркера за аспергилозу. Код испитаника с плућним обољењима (друга група) чешћи је био позитиван резултат неког од испитиваних биомаркера него у групи испитаника с хематолошким обољењима (прва група) који су под ризиком за настанак аспергилозе ($p=0,00033$) (Графикон 1).

Код испитаника прве групе чешћи је био позитиван налаз ГМ у односу на другу групу испитаника. Код око трећине болесника с хематолошким обољењима утврђена су и анти-*Aspergillus* антитела без обзира на то што су у питању били болесници с могућом имуносупресијом (Графикон 2). У првој групи испитаника код већине су утврђена анти-*Aspergillus* антитела, док је ГМ доказан код малог процента болесника (Графикон 2).

Код хематолошких болесника статистички је значајно чешће утврђен позитиван ГМ или позитиван ГМ и анти-*Aspergillus* антитела у односу на испитанике с плућним болестима ($p=0,000037$).

ДИСКУСИЈА

Повећање инциденције ИА за чак 357% утврђено је од 1980. године [6]. Постоји неколико разлога који су довели до ове појаве: примена антинеопластичних и имуносупресивних лекова, употреба антибиотика широког спектра, имплантација ендогених протеза, трансплантација матичних ћелија хематопоезе (ТМЋХ) и солидних органа, примена инвазивних дијагностичких и терапијских поступака. Код особа с хематолошким малигнитетима, великим опекотинама, ХИВ инфекцијом, хроничним респираторним обољењима и панкреатитисом такође је већи ризик за настанак ИА [7]. ИА прати висока стопа смртности уколико се дијагноза не постави правовремено и не започне с одговарајућим антимикотичним лечењем. Стопа смртности од ИА је око 50%, а код болесника с алогеном ТМЋХ може бити и око 90% [8].

Услед непостојања специфичних клиничких и радиолошких знакова и симптома болести, поуздан начин постављања ране дијагнозе ИА је тежак [9]. Због тога се најчешће започиње с емпиријском терапијом антимикотицима пре него што дође до дијагностичко-вања инфекције. Међутим, поуздана дијагноза је нео-

Табела 1. Расподела испитаника према врсти основног обољења и према полу

Table 1. Distribution of studied patients according to the underlying condition and gender

Групе испитаника Groups of patients		Број болесника Number of patients		
		Мушки пол Male gender	Женски пол Female gender	Укупно Total
Хематолошко обољење Haematologic disease	Одрасли Adults	107 (55.44%)	86 (44.56%)	193
	Деца Children	12 (54.54%)	10 (45.45%)	22
Пулмолошко обољење Pulmonary disease	Одрасли Adults	22 (68.75%)	10 (31.25%)	32
	Деца Children	9 (60%)	6 (40%)	15
Укупан број Total number		150 (57.25%)	112 (42.75%)	262

пходна, како би се избегла нерационална примена антимикотика и смањили нежељени и токсични ефекти системске употребе ових лекова.

EORTC/MSG је предложио стандарде за дефинисање ИГО код имунокомпромитованих болесника с малигнитетима, према којима се дијагноза ИГО, односно ИА може поставити са три степена сигурности: „доказана”, „вероватна” и „могућа”. Користи се комбинација три групе критеријума: фактори ризика домаћина (неутропенија, ТМЋХ, примена кортикостероида или супресора Т-ћелијске имуности, наследне имунодефицијенције), клиничке манифестације (знаци гљивичног обољења доњег дисајног тракта, трахеобронхитиса, инфекција синуса, централног нервног система или дисеминоване гљивичне инфекције) и резултати миколошких анализа (директни тестови – визуелизација гљивичних елемената у директним препаратима или позитивна култура на гљиве, индиректни тестови – утврђивање различитих антигена, метаболичких или саставних елемената ћелијског зида гљива) [4].

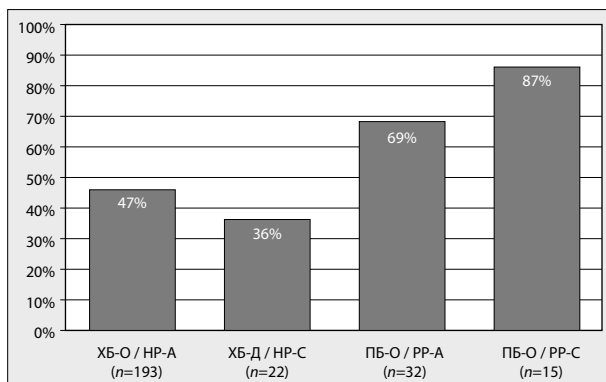
Дијагноза ИА према критеријумима „доказане” инфекције је тешка, јер захтева хистопатолошку, цитопатолошку или микроскопску потврду постојања гљивичних елемената у ткиву или позитивну културу гљива из узорка добијеног стерилним поступком из примарно стерилне регије. Да би се добио одговарајући узорак, неопходно је болесника подвргнути инвазивним дијагностичким поступцима (биопсија ткива), који су често контраиндиковани због тешког општег стања болесника, тромбцитопеније и следственог ризика од крварења. Такође, директна визуелизација је често тешка, док изолација гљива дуго траје, због чега је примена класичних миколошких метода као тзв. златног стандарда ограничена. У рутинској пракси дијагноза ИА се најчешће поставља на нивоу „вероватне” инфекције, што значи постојање барем једног од фактора ризика домаћина, постојање барем једне од клиничких манифестација и позитиван барем један миколошки налаз (нпр. позитиван налаз ГМ из серума, бронхоалвеоларног лавата – БАЛ или ликвора). „Могућа” дијагноза ИА подразумева позитиван барем један од фактора ризика домаћина и позитиван један клинички, односно миколошки налаз, те због тога

Табела 2. Расподела испитаника према основном обољењу и позитивним биомаркерима (галактоманан, анти-*Aspergillus* антитела)
Table 2. Distribution of patients according to the underlying condition and positive biomarkers (galactomannan, anti-*Aspergillus* antibodies)

Групе испитаника Groups of patients	Просечна старост (опсег година) Mean age (range of years)	Основно обољење Underlying condition	Број испитаника Number of patients				
			Укупно Total	Позитивни биомаркери Positive biomarkers			
				ГМ GM	Ат Ab	ГМ+Ат GM+Ab	Укупно Total
Хематолошко обољење Haematologic disease	Одрасли Adults (n=193)	Акутна мијелоидна леукемија Acute myeloid leukaemia	102	16	32	14	62 (60.8%)
		Акутна лимфоидна леукемија Acute lymphoid leukaemia	21	2	5	5	12 (57.1%)
		Неходжкински лимфом Non-Hodgkin's lymphoma	21	1	0	0	1 (8.3%)
		Хочкинова болест Hodgkin's disease	11	1	2	1	4 (36.4%)
		Остало* Other*	47	4	2	5	11 (23.4%)
	Деца Children (n=22)	Акутна лимфоидна леукемија Acute lymphoid leukaemia	12	1	0	1	2 (16.7%)
		Акутна мијелоидна леукемија Acute myeloid leukaemia	3	1	1	1	3 (100.0%)
Остало** Other**		7	0	1	2	3 (42.8%)	
Пулмолошко обољење Pulmonary disease	Одрасли Adults (n=32)	Запаљење плућа Pneumonia	9	0	3	1	4 (44.4)
		Сумња на аспергилом плућа Suspected pulmonary aspergilloma	7	0	4	1	5 (71.4)
		Туберкулоза Tuberculosis	5	0	4	0	4 (80.0)
		Сумња на инвазивну аспергилозу Suspected Aspergillois invasiva	5	0	4	1	5 (100.0)
		Остало*** Other***	6	0	4	0	4 (66.7)
	Деца Children (n=15)	Цистична фиброза Cystic fibrosis	10	0	7	1	8 (80.0)
		Астма Asthma	4	0	4	0	4 (100.0)
		Запаљење плућа Pneumonia	1	0	1	0	1 (100.0)

ГМ – галактоманан; Ат – антитело; n – број испитаника
 * мијелодиспластични синдром, хронична лимфоцитна леукемија, анемија, лимфом, мултипли мијелом, хронична мијелоидна леукемија
 ** хистиоцитоза Лангерхансових ћелија, неуробластом
 *** астма, рак плућа

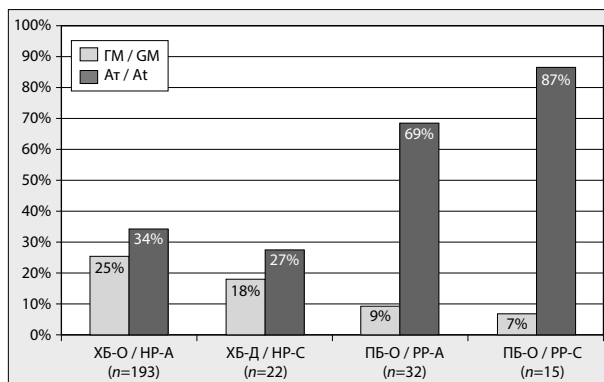
GM – galactomannan; Ab – antibody; n – number of patients
 * myelodysplastic syndrome, chronic lymphoid leukemia, anemia, lymphoma, myeloma multiplex, chronic myeloid leukemia
 ** Langerhans' cell histiocytosis, neuroblastoma
 *** asthma, lung cancer



Графикон 1. Расподела испитаника на основу бар једног позитивног биомаркера (галактоманан и/или анти-*Aspergillus* антитела)

Graph 1. Distribution of patients based on at least one positive biomarker (galactomannan and/or anti-*Aspergillus* antibodies)

ХБ-О – хематолошки болесници (одрасли); ХБ-Д – хематолошки болесници (деца); ПБ-О – пулмолошки болесници (одрасли); ПБ-Д – пулмолошки болесници (деца); n – број испитаника
 HP-A – haematology patients (adults); HP-C – haematology patients (children); PP-A – pulmonology patients (adults); PP-C – pulmonology patients (children); n – number of patients



Графикон 2. Расподела испитаника према позитивном налазу за галактоманан (ГМ) и анти-*Aspergillus* антитела (Ат)

Graph 2. Distribution of patients based on positive findings for galactomannan (GM) and anti-*Aspergillus* antibodies (Ab)

ХБ-О – хематолошки болесници (одрасли); ХБ-Д – хематолошки болесници (деца); ПБ-О – пулмолошки болесници (одрасли); ПБ-Д – пулмолошки болесници (деца); n – број испитаника
 HP-A – haematology patients (adults); HP-C – haematology patients (children); PP-A – pulmonology patients (adults); PP-C – pulmonology patients (children); n – number of patients

има најнижи степен сигурности. Ови критеријуми се превасходно односе на класификацију ИА код особа оболелих од рака, док за остале групе болесника који су под високим ризиком за ИА адекватни критеријуми још нису утврђени, па се примењују постојећи [4].

С обзиром на то да и клиничка и радиолошка дијагноза ИА и даље имају малу сензитивност и специфичност [10], највећи допринос дијагнози пружа истовремена употреба компјутеризоване томографије високе резолуције и утврђивање ГМ [11]. Тест за доказивање ГМ (*Platelia Aspergillus*, *BioRad*, *Marnes la Coquette, France*) одобрила је 2003. године Америчка агенција за примену хране и лекова (*Food and Drug Administration – FDA*) као помоћно средство за постављање дијагнозе ИА код оболелих од рака [11] и усвојен је као један од миколошких налаза који омогућава постављање дијагнозе ИА на нивоу „вероватне” инфекције [4].

Лабораторијска анализа биомаркера гљива може се користити при прегледу болесника, за постављање дијагнозе ИА или за клиничко праћење дејства терапије. Употреба биомаркера при прегледу болесника код којих је установљен висок ризик за настанак ИА је значајна, јер је неинвазивна метода и може да открије постојање ИА пре испољавања клиничких знакова и симптома. ГМ има позитивне вредности и претходи дијагнози ИА у просеку 12-30 дана [12]. Преживљавање болесника код којих долази до нормализације вредности ГМ у серуму статистички је значајно боља у поређењу са болесницима код којих вредност ГМ остаје стално позитивна. Значајна повезаност вредности ГМ у серуму и исхода ИА доказана је и код неутропеничних болесника, али и код болесника код којих неутропенија није дијагностикована [13]. У нашој студији болесници су испитивани током периода ризика за настанак ИА. Код оних код којих је вредност ГМ била стално висока болест се углавном завршавала смртним исходом (резултати нису приказани).

Доказивање ГМ помоћу теста *ELISA* засад се показало да је од највеће користи код болесника с хематолошким малигнитетима, нарочито код оних који су подвргнути ГМБХ и који су неутропенични. Међутим, у овој групи болесника сензитивност самог теста је од 33% до 100% [11]. Разлози за овако широк опсег сензитивности нису потпуно расветљени, иако су утврђени неки фактори који на то могу утицати. Сензитивност и специфичност теста за утврђивање ГМ значајно се разликују према подацима из литературе, углавном због хетерогености студија [10]. Сензитивност теста према клиничким групама је од 17% [14] до 100% [11]. Метаанализом је доказана сензитивност од 61% и специфичност од 93% за „доказане” и „вероватне” случајеве ИА [10]. Иако се сензитивност самог теста значајно разликује међу различитим групама болесника и може бити чак изузетно ниска, специфичност теста је веома добра. Ове варијације последица су разлика у испитиваним групама болесника, различитим узорцима који се користе за одређивање ГМ, разликама у допремању и припреми узорака за анализу, као

и у различитим критеријумима за дефинисање ИА и граничне вредности [11].

ГМ некада није могуће доказати упркос правилном узорковању и доказима о постојању ИА [14]. Један од могућих разлога за настанак ове лажне негативности могао би бити у нивоу циркулишућег ГМ, који је код неких болесника испод прага који тест може регистровати. Осим фактора који се односе на сам поступак извођења теста, испитивањима *in vitro* је доказано да се различите количине ГМ ослобађају приликом раста различитих врста гљива рода *Aspergillus*. Врсте *A. fumigatus* и *A. flavus* ослобађају мање количине ГМ приликом раста, за разлику од врста *A. terreus*, *A. niger* и *A. nidulans*, које приликом раста ослобађају више ГМ [15].

Могући су и лажно позитивни налази ГМ. С обзиром на то да је ГМ термостабилан антиген који је широко распрострањен у природи и налази се у храни и пићу, постоји могућност премештања ГМ кроз интестиналну мукозу у крвоток. Ово се најчешће дешава код особа с оштећеним интегритетом интестиналне мукозе [16]. Лажно позитивни резултати су утврђени и код болесника који су примали неке од бета-лактамских антибиотика, као што су пиперацилин-тазобактам, амоксицилин с клавулонском киселином, ампицилин и феноксиметилпеницилин. Ова лажна позитивност вероватно је последица тога што се гљиве рода *Penicillium* користе у процесу производње ових антибиотских лекова, а познато је и да ове гљиве приликом раста ослобађају ГМ. Иако примена поменутих антибиотика доводи до лажне позитивности ГМ, ипак није уочена јасна повезаност концентрације лека у крви и индекса ГМ у серуму болесника. Волш (*Walsh*) и сарадници [17] су показали да је понављана примена пиперацилин-тазобактама дуже од седам дана довољна за настанак лажне позитивности ГМ. Осим гљива рода *Aspergillus*, и друге гљиве из групе плесни, као што су гљиве рода *Penicillium* и *Paecilomyces*, такође садрже ГМ; међутим, ове гљиве ретко изазивају инвазивна обољења. Неочекивано, лажна позитивност је примећена и код кваснице *Cryptococcus neoformans* [18] и потврђена у истраживањима *in vitro*. Глукуроксиломанан, који се налази код врсте *C. neoformans*, садржи један епитоп или више њих који показују укрштену реактивност са ГМ који се налази код гљива рода *Aspergillus* [18]. Такође, постојање β -1,5-галактофуранозног ланца доказано је и код неких бактерија, нарочито код *Bifidobacterium bifidum* [11]. Ове бактерије у свом ћелијском зиду садрже липогликане, који може довести до укрштене реактивности са ГМ. Будући да се интестинална микрофлора новорођенчади претежно састоји од *Bifidobacterium bifidum*, постоји могућност да услед премештања ових бактерија или укрштене реактивности дође до честих лажно позитивних резултата ГМ код деце.

Висока учесталост ИА бележи се код неутропеничних особа које болују од хроничне опструктивне болести плућа (ХОБП), астме, реуматоидног полиартритиса и васкулитиса [19]. Код ових умерено имунокомпромитованих болесника колонизација гљивама

рода *Aspergillus* доприноси развоју ИА, нарочито код оних са ХОБП. Већа преваленција аспергилозе међу болесницима мушког пола повезана је са чешћим оболевањем особа мушког пола од болести које захватају дисајни тракт [8]. И према резултатима наше студије, у групи одраслих испитаника с обољењима плућа више је било особа мушког пола.

Постоји неколико хипотеза које покушавају да објасне бољу могућност постављања дијагнозе ИА помоћу доказивања ГМ и одређивања индекса код болесника с неутропенијом у односу на неутропеничне особе. Прво, количина гљива која се налази у ткивима може бити већа код неутропеничних болесника у тренутку постављања дијагнозе ИА. Такође, количина гљива у ткивима је већа код болесника с лошом прогнозом, па је и ниво ГМ код ових особа виши [13]. Друго, примена антимикотичне терапије може да утиче на извођење теста тако што доводи до смањења количине гљива у ткивима болесника и доводи до промене вредности индекса ГМ. То је нарочито значајно код болесника који су на профилактичкој терапији неким од антимикотика. Треће, лезије код ИА су слабије ограничене код неутропеничних болесника услед смањења броја неутрофила и слабијег запаљењског процеса. Ово ствара повољне услове да се ГМ много лакше ослобађа у крвоток, док се код болесника без неутропеније његово нормално стварање током раста хифа ограничава запаљењским процесом у захваћеној области, чији је циљ ограничавање инвазије и смањење ризика од дисеминације гљива. Такође, недостатак макрофага доприноси слабијем одстрањивању ГМ из крвотока. Осим тога, код неутропеничних болесника с очуваним имунским одговором могу се стварати специфична анти-ГМ антитела која могу стварати комплексе са ГМ и тако довести до снижења концентрације ГМ у серуму [20]. Због тога негативан налаз ГМ у серуму код ових болесника није у вези са изостанком ИА. Додатним анализама, пре свега одређивањем ГМ у БАЛ, потребно је потврдити или одбацити дијагнозу ИА.

Комбинација класичних и нових (тзв. *non-culture*) метода повећава могућност постављања дијагнозе аспергилозе. Рутинско микроскопско испитивање узорака БАЛ у комбинацији с култивисањем БАЛ показало је сензитивност од 69%, док је сензитивност теста за доказивање ГМ у серуму код испитаника исте студије била 65% [19]. Осим у серуму, ГМ се може открити и у другим телесним течностима, као што су мокраћа, цереброспинална течност или БАЛ. Показано је да индекс ГМ има веће вредности и постаје позитиван раније у узорцима БАЛ у поређењу са серумом. Вредности ГМ су биле негативне у серуму, док су биле позитивне у узорцима БАЛ код 25% болесника са „доказаном” или „вероватном” дијагнозом ИА [3]. Уочена је значајна повезаност позитивног налаза ГМ у серуму или БАЛ и позитивних клиничких налаза и код испитаника наше студије (резултати нису приказани).

За разлику од углавном неутропеничних болесника с хематолошким обољењима, код особа с трахеобронхитисом изазваним гљивама рода *Aspergillus* налаз ГМ

је често негативан. Ово је вероватно последица очуване способности макрофага да уклањају ГМ из крвотока, те се не може открити [21]. Резултати наше студије такође показују да је ГМ ретко био позитиван код испитаника с плућним обољењима (одрасли 9%, деца 7%), док су анти-*Aspergillus* антитела утврђена код великог броја болесника из ове групе (одрасли 69%, деца 87%). Негативан налаз је највероватније био последица тога што је трахеобронхитис локално обољење и до дисеминације ретко долази у раним фазама болести. Због тога би испитивање БАЛ било корисније за дијагностиковање ИА у овој групи болесника. Студије су утврдиле позитиван налаз ГМ код болесника са цистичном фиброзом и ХОБП. Иако колонизација гљивама рода *Aspergillus* није никада потврђена код ових болесника, показано је да су оба обољења предиспонирајућа стања за колонизацију респираторног тракта гљивама, а пре свега рода *Aspergillus* [21].

Када је у питању доказивање анти-*Aspergillus* антитела код особа оболелих од хематолошких болести, веома је мали број студија које су вршиле таква испитивања, али се добро зна да је утврђивање анти-*Aspergillus* специфичних антитела метода избора за постављање дијагнозе хроничне плућне аспергилозе и АБПА [22]. Традиционално се сматало да доказивање анти-*Aspergillus* антитела није значајно за постављање дијагнозе ИА код имunosупримираних болесника, међутим, нова истраживања су показала да специфична антитела постоје код скоро трећине болесника са ИА у свету и код нас [23, 24]. У нашој студији анти-*Aspergillus* антитела су у групи испитаника с хематолошким обољењима утврђена код 34% одраслих и 27% деце. Међутим, њихова правилна интерпретација за дијагнозу ИА још није стандардизована. Алам (*Alam*) и сарадници [25] су испитивали значај истовременог доказивања манана и анти-*Candida* антитела у дијагнози инвазивне кандидозе, при чему је осетљивост теста за откривање манана била 41%, за утврђивање анти-*Candida* антитела 47%, док се комбинованим доказивањем и манана и анти-*Candida* антитела сензитивност повећала на 75%. Наши резултати показују да збирно истовремено одређивање и ГМ и анти-*Aspergillus* антитела даје већи проценат позитивних налаза и чешће корелира са дијагнозом ИА. Примена више различитих метода и тестова значајно доприноси постављању ране дијагнозе, што је кључно за правовремено започињање лечења, због чега су потребна даља истраживања, како би се побољшао исход ИА и преживљавање болесника.

Одређивање анти-*Aspergillus* специфичних антитела добар је неинвазивни начин за постављање дијагнозе субакутне ИА код неутропеничних болесника са ИА. Такође, утврђивање антитела може бити веома значајно за постављање ретроспективне дијагнозе ИА код веома имунокомпромитованих болесника после опоравка имунског система [5].

Знатно је мањи број студија које су се бавиле доказивањем ГМ код деце с високим ризиком за ИА. Хербрехт (*Herbrecht*) и сарадници [20] наводе да се код деце знатно чешће јављају лажно позитивни резултати

(44%) него код одраслих испитаника (0,9%). Један од разлога може бити употреба комбинације антибиотика пиперацилин-тазобактам, за који је утврђено да и код одраслих болесника може изазвати појаву лажно позитивних резултата испитивања. Зиман (*Siemann*) и сарадници [26] су установили да се код чак 83% превремено рођене деце с малом телесном масом на рођењу јављају појединачне лажно позитивне вредности ГМ, док су друге студије показале да се неколико узастопних лажно позитивних резултата може јавити код новорођенчади. Две теорије покушавају да објасне појаву лажно позитивних вредности ГМ при испитивању код деце. Према једној, липотеихоична киселина, која је саставни део ћелијског зида бактерија врсте *Bifidobacterium bifidum subspecies pennsylvanicum* и која се у великим количинама налази у интестиналној микрофлори новорођенчади, садржи епитопе, које препознају EB-A2 моноклонска антитела на ГМ [27]. Бактерије рода *Bifidobacterium* јесу део нормалне микрофлоре новорођенчади и одојчади до приближно другог месеца. Интестинална микрофлора одојчади која се храни мајчиним млеком преобладајно се састоји од бактерија рода *Bifidobacterium* (91%). Знатно мање се ове бактерије налазе код деце која се хране млечним формулама (75%), док су код одраслих особа заступљене незнатне количине (3%) [28]. Према другој теорији, лажно позитивни резултати настају услед пролаза ГМ који се налази у млечним формулама, храни и води кроз незрели или оштећени епител интестиналног тракта новорођенчади и одојчади [26]. Иако је неколико ранијих кохортних студија обухватило и децу, резултати нису били стратификовани у односу на узраст, те се стога није могао проценити значај примене теста у дечјој популацији [14]. Због тога је препорука да се започне с лечењем тек након два узастопна позитивна налаза ГМ [4].

Студије су показале да су код 79% болесника са АБПА серумска преципитинска антитела била позитивна на *A. fumigatus*, док је налаз гљива рода *Aspergillus* био позитиван код 55% испитаника [29]. У нашој студији анти-*Aspergillus* антитела била су позитивна код 74,5% испитаника с плућним обољењима, док је ГМ био позитиван код само 8,5% болесника, а у појединим случајевима је и налаз културе гљива рода *Aspergillus* био позитиван.

И поред све већег значаја утврђивања биомаркера за дијагнозу ИА, класичне методе и даље остају „злат-

ни стандард”, због чега се препоручује да се врши комбинавање доказивања антитела, антигена и изолације гљива код болесника чије опште стање то дозвољава, у високоспецијализованим референтним центрима.

ЗАКЉУЧАК

1. Код 50,8% испитаних болесника утврђени су позитивни биомаркери, значајно више код оболелих од плућних него хематолошких болести (74,5% према 45,6%; $p=0,00033$).
2. ГМ, односно анти-*Aspergillus* антитела најчешће су била позитивна код деце са цистичном фиброзом (86,7%) и одраслих пулмолошких болесника (68,7%), а ређе код одраслих испитаника с хематолошким обољењима (46,6%) и деце с истим болестима (36,4%).
3. ГМ је био значајно чешће позитиван код испитаника оболелих од хематолошких болести (24,6%) у односу на пулмолошке болеснике (8,5%). У обе групе испитаника чешће је био позитиван код одраслих него код деце (25,4% према 18,2%; 9,4% према 6,7%).
4. Анти-*Aspergillus* антитела су била значајно чешће позитивна у групи испитаника с плућним обољењима (74,5%) у односу на групу хематолошких болесника (33,5%). У првопоменутој групи чешће код деце (86,7%) него код одраслих (68,7%), а у другој групи чешће код одраслих (34,2%) него код деце (27,3%).
5. У групи хематолошких испитаника статистички значајно чешће је био позитиван ГМ, односно истовремено ГМ и анти-*Aspergillus* антитела, у односу на болеснике с плућним обољењима ($p=0,000037$).
6. У оквиру испитиваних група болесника није утврђена значајна разлика у позитивним налазима појединих биомаркера за ГМ (одрасли према деци), односно за анти-*Aspergillus* антитела (одрасли према деци).

НАПОМЕНА

Рад је финансиран средствима пројеката Министарства просвете и науке Републике Србије (ТР23009 и ОИ175034).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kauffman CA. Fungal infections. Proc Am Thorac Soc. 2005; 3:35-40.
2. Walsh T, Anaissie E, Denning D, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis. 2008; 46:327-60.
3. Penack O, Rempf B, Graf B, Blau IW, Thiel E. Aspergillus galactomannan testing in patients with long-term neutropenia: implications for clinical management. Ann Oncol. 2008; 19:984-9.
4. De Pauw B, Walsh T, Donnelly P, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/ Invasive fungal infections cooperative group and the National institute of allergy and Infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group (2008). Clin Infect Dis. 2008; 46:1813-21.
5. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis. 2005; 5:609-22.
6. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. Clin Infect Dis. 2001; 33(5):641-7.

7. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol.* 2006; 55:809-18.
8. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:358-66.
9. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2004; 126:852-60.
10. Pfeiffer C, Fine J, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006; 42:1417-27.
11. Mennink-Karsten MASH, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:349-57.
12. Williamson EC, Oliver DA, Johnson EM, Foot AB, Marks DI, Warnock DW. Aspergillus antigen testing in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol.* 2000; 53:362-6.
13. Woods G, Miceli M, Graziutti M, Zhao W, Barlogie B, Anaisse E. Serum Aspergillus galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis. A study of 56 patients with hematologic cancer. *Cancer.* 2007; 110:830-4.
14. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5):2184-6.
15. Verweij PE, Mennink-Kersten MASH. Issues with galactomannan testing. *Medical Mycology.* 2006; 44(6):179-83.
16. Gangneux JP, Lavarde D, Bretagne S, Guiguen C, Gandemer V. Transient aspergillus antigenaemia: think of milk. *Lancet.* 2002; 359:1251.
17. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaher A, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlation between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen reaction. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:4744-8.
18. Dalle F, Charles PE, Blanc K, Caillot D, Chavanet P, Dromer F, et al. Cryptococcus neoformans galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with Aspergillus galactomannan. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2929-31.
19. Cornillet A, Camus S, Nimubona V, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, et al. Comparison of epidemiological, clinical and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis.* 2006; 43:577-84.
20. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1898-906.
21. Verweij PE, Weemaes CM, Curfs JH, Bretagne S, Meis JF. Failure to detect circulating Aspergillus markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3900-01.
22. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(Suppl 3):S265-80.
23. Chan CM, Woo PC, Leung AS, Lau SK, Che XY, Cao L, et al. Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of Aspergillus fumigatus aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2041-5.
24. Arsić V. Laboratorijska dijagnoza invazivne aspergiloze. In: Goldner B, editor. Invazivne gljivične bolesti u humanojoj populaciji. Beograd: Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva; 2009. p.51-64.
25. Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1,3)- β -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and Candida species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infect Dis.* 2007; 4(7):103-12.
26. Siemann M, Koch-Dorfler M, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia Aspergillus sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses.* 1998; 41:373-7.
27. Mennink-Kersten MA, Ruegerbrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJ, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:3925-31.
28. Mennink-Kersten MASH, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. Bifidobacterium lipotheichoic acid and false ELISA activity in Aspergillus antigen detection. *Lancet.* 2004; 363:325-7.
29. Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest.* 2009; 135:805-26.

Detection of Laboratory Biomarkers in Haematological and Pulmonology Patients at High Risk for Aspergillosis

Eleonora Ratkov¹, Ana Vidović^{2,3}, Predrag Minić^{3,4}, Dragana Janić^{3,5}, Sandra Šipetić-Grujičić⁶, Aleksandar Džamić¹, Valentina Arsić-Arsenijević¹

¹Medical Mycology Reference Laboratory, Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Clinic of Haematology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia;

³School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

⁴Institute for Health Protection of Mother and Child of Serbia "Dr. Vukan Čupić", Belgrade, Serbia;

⁵Department of Haematology, University Children's Hospital, Belgrade, Serbia;

⁶Institute of Epidemiology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction During the past decades a dramatic increase in the incidence of invasive fungal diseases, especially invasive aspergillosis has been observed. Undiagnosed and diagnosed late invasive aspergillosis is followed by lethality of up to 90%. Detection of early laboratory biomarkers (galactomannan and anti-*Aspergillus* antibodies) contributes to early diagnosis and is used for screening, as well as for monitoring therapy of aspergillosis.

Objective The aim was to evaluate usefulness of "non-culture" methods (galactomannan and anti-*Aspergillus* antibodies IgA, IgM and IgG) for early diagnosis of aspergillosis in high-risk patients.

Methods Prospective two-year study involved 262 high-risk patients for aspergillosis. In pulmonology and haematology patients (adults and children) blood samples were tested on galactomannan and anti-*Aspergillus* antibodies.

Results Early laboratory biomarkers were statistically significantly higher in pulmonology patients ($p=0.00033$). However, in haematological patients galactomannan was a more fre-

quently positive finding, while in pulmonology patients it was the finding of anti-*Aspergillus* antibodies. It is interesting that, despite the possible immunosuppression, in about 1/3 of haematological patients anti-*Aspergillus* antibodies were confirmed.

Conclusion Early diagnosis and treatment of aspergillosis represent both clinical and laboratory problem. Nowadays, the application of new "non-culture" methods is of particular importance for the outcome of aspergillosis. Clinical features, laboratory findings of biomarkers and their correct interpretation significantly increase the possibility of timely implementation of appropriate therapy. In this regard, the new organization of reference laboratory for medical mycology has significantly improved the outcome of aspergillosis in high-risk patients in our country. However, further investigations, implementation of European standards and introduction of new diagnostic methods are necessary in this field.

Keywords: aspergillosis; early laboratory diagnosis; galactomannan; anti-*Aspergillus* antibodies; high-risk patients

Примљен • Received: 27/12/2010

Прихваћен • Accepted: 11/05/2011