

Využití detekce galaktomananu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematologických nemocných

Z. Ráčil¹, I. Kocmanová², B. Wagnerová¹, J. Winterová¹, M. Lengerová¹, M. Moulis³, J. Mayer¹

¹ Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

² Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, pracoviště Bohunice, prim. MUDr. Alena Ševčíková

³ Ústav patologie Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jirka Mačák, CSc.

Souhrn: *Východiska a cíle:* Pro prognózu nemocných s invazivní aspergilózou (IA) má zásadní význam včasné stanovená diagnóza. V posledních několika letech získala na významu v časně diagnostice IA detekce galaktomananu ELISA metodikou. Cílem této práce je analýza využitelnosti této metody v běžné klinické praxi hematologického oddělení. *Pacienti a metody:* V období od května roku 2003 do října roku 2006 byl u nemocných v riziku IA prováděn odběr krve pro detekci galaktomananu (GM) v séru ELISA metodikou. Vyšetření nemocní byli následně na základě výsledků konvenčních diagnostických metod a sekčních nálezů klasifikováni dle pravděpodobnosti přítomnosti IA. *Výsledky:* Celkem bylo vyšetřeno na přítomnost GM 11 360 vzorků séra od 911 dospělých pacientů. IA (pravděpodobná/prokázaná) byla diagnostikována u 42 (4,6 %) z nich. Souhrnně byla senzitivita, specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota detekce galaktomananu pro diagnostiku IA na našem pracovišti 95,2 %, 90,0 %, 31,5 % a 99,7 %. Jako hlavní příčiny omezené pozitivní prediktivní hodnoty testu byly identifikovány jednak velké procento falešných pozitivit testu (především způsobené současným podáváním některých penicilinových antibiotik nebo infuzního roztoku Plasma-Lyte) a jednak fakt, že velké procento námi vyšetřovaných nemocných spadá do skupiny pacientů s hematologickou malignitou, u nichž je prevalence IA velmi nízká. *Závěr:* Detekce GM v séru je spojena s vysokou senzitivitou a excelentní negativní prediktivní hodnotou v diagnostice IA u hematologických nemocných. Pro ještě vyšší výtěžnost testu je nezbytná znalost a eliminace možných příčin falešných pozitivit, stejně tak jako zacílení screeningu na nemocné nejvíce ohrožené touto infekcí.

Klíčová slova: invazivní aspergilóza – sérologické metody – aspergilový antigen – galaktomanan – časná diagnóza – hematologické malignity

The use of galactomannan detection in diagnosing invasive aspergilosis in hemato-oncological patients

Summary: *Premises and objectives:* Timely diagnosis is of critical importance for the prognosis of invasive aspergilosis (IA) patients. Over recent years, IA detection of galactomannan using the ELISA method has assumed growing importance. The objective of the study was to analyse the usability of the method in current clinical practice of a hemato-oncological ward. *Patients and methods:* From May 2003 to October 2006, blood samples were taken from patients at IA risk to detect galactomannan (GM) in serum using the ELISA method. The patients who underwent the tests were classified by the probability of IA presence on the basis of the results of conventional diagnostic methods and section findings. *Results:* A total of 11,360 serum samples from 911 adult patients were tested for GM presence. IA (probable/proven) was diagnosed in 42 (4.6 %) of them. The rates of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of galactomannan detection for IA diagnosis in our ward were, respectively, 95.2 %, 90.0 %, 31.5 % and 99.7 %. The principal causes of the limited positive predictive value of the test were the high percentage of false-positive test results (mainly caused by concomitant administration of some penicillin antibiotics or Plasma-Lyte infusion solution), as well as the fact that a large percentage of patients we examined fell within the group of patients with hematological malignancy with a very low prevalence of IA. *Conclusion:* GM detection in serum is associated with high sensitivity and excellent negative predictive value in IA diagnosis in hemato-oncological patients. Knowledge and elimination of possible causes of false-positive results as well as focusing the screening on patients at greatest risk of infection are necessary for an even better exploitation of the test.

Keywords: invasive aspergilosis – serologic methods – aspergillus antigen – galactomannan – timely diagnosis – hematological malignity

Úvod

Invazivní aspergilóza (IA) je v současné době nejčastější invazivní mykózou u hematologických nemocných,

a to především u pacientů podstupujících intenzivní chemoterapii pro akutní leukemii nebo alogenní transplantaci krvetvorné tkáně (HSCT – hematopoie-

tic stem cell transplantation) [1–4]. I přes to, že jsou v současné době k dispozici nová, velmi účinná systémová antimykotika, zůstává mortalita IA

u hematologických pacientů velmi vysoká a přesahuje 50 % [5]. Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících mortalitu nemocných s IA je včasnost zahájení účinné antimykotické léčby, která však vyžaduje včasné stanovení diagnózy [6]. Bohužel právěčasné stanovení přesné diagnózy je u IA velice komplikované. Klinické příznaky infekce jsou nespecifické, konvenční mikrobiologické metody málo senzitivní a dávají opožděný výsledek. Konečně histologický průkaz hyf ve sterilní tkáni vyžaduje biopsii, která je však často u kritických nemocných s trombocytopenií a koagulopatií neproveditelná. Přestože má pro časnou diagnostiku IA velký význam pravidelně prováděné vysoce rozlišovací CT plic (HRCT – High Resolution CT), má toto vyšetření své limity. Obraz „halo sign“, který je velice často popisován u neutropenických nemocných s IA, není specifický pouze pro IA [7], je pozorovatelný jen krátkodobě, ale především pravidelně a rutinní provádění HRCT není na všech pracovištích schůdné. Obtížnost časné diagnostiky IA vedla k rozvoji tzv. nekultivačních diagnostických metod využívajících detekci mykotických antigenů (galaktomanan, 1,3 β -D glukán) a nebo fungálních nukleových kyselin (různé varianty PCR) [8,9].

S detekcí 1,3 β -D glukánu v diagnostice IA je dosud jen relativně málo zkušeností a různé varianty PCR (vzhledem k heterogenitě používaných metod) nemohou být dosud v žádném případě použity jako kritérium IA [10]. Naopak jednoznačně zásadního významu pro časnou diagnostiku IA doznala sérologická metoda využívající detekci antigenu specifického pro buněčnou stěnu *Aspergillus sp.* – galaktomananu (GM) – a to pomocí komerčně dostupného testu Platelia® *Aspergillus* (Bio-Rad, Francie), se kterou jsou rovněž nejrozsáhlejší zkušenosti. Jedná se o sandwichovou ELISu (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), která využívá vazby krysích monoklonálních protilátek EB-A2 s β -1,5-galaktofura-

nosylovými konci galaktomananu. V posledních několika letech celá řada prací prokázala její velmi dobrou senzitivitu, negativní prediktivní hodnotu a schopnost zkrátit dobu do stanovení diagnózy IA i o řadu dní ve srovnání s konvenčními diagnostickými metodami [11–14]. Z druhé strany však existuje řada faktorů, které mohou využitelnost metody ovlivnit: cut-off indexu pozitivity (hodnota indexu pozitivity, od kterého je vzorek označen jako pozitivní), frekvence odběrů, izolovaná nebo konsektivní pozitivita jako požadavek pro označení nemocného za GM pozitivní, možnost falešných pozitivit testu a další [15].

Cílem naší práce je retrospektivní analýza využitelnosti detekce galaktomananu v séru pomocí Platelia® *Aspergillus* testu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy, a to po 3,5letém extenzivním používání metody v běžné klinické praxi na hematologickém oddělení.

Pacienti a metody

Sledovaná populace a design

V období května roku 2003 do září roku 2006 byla u všech dospělých léčených na našem pracovišti především z důvodů hematologické malignity při současném riziku rozvoje IA prováděn rutinní monitoring detekce GM v krvi. Odběry krve pro záchyt GM byly u pacientů podstupujících indukční a reindukční léčbu akutní leukemie anebo alogenní transplantaci krvetvorné tkáně prováděny pravidelně 2–3krát týdně, ev. častěji, a to od začátku chemoterapie do propuštění. U ostatních nemocných byl monitoring zahájen v případě vzniku klinické pravděpodobnosti nebo rizika invazivní mykotické infekce (nejčastěji v případě febrilní neutropenie nereagující na 5denní podávání širokospektrých antibiotik anebo v případě rozvoje abnormalit na HRCT nebo konvenčním RTG snímku plic) a prováděn opět 2–3krát týdně po dobu trvání rizika.

Nemocní byli obvykle hospitalizováni na standardním třílůžkovém po-

koji s centrální úpravou vzduchu, ovšem kromě pacientů podstupujících alogenní transplantaci krvetvorné tkáně, kteří byli ve většině případů umístěni na jednolůžkovém pokoji s úpravou vzduchu pomocí HEPA filtru až do doby přihojení štěpu (absolutní počet neutrofilních granulocytů $> 1,0 \times 10^9/l$). Po dobu neutropenie, respektive u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorné tkáně také po dobu intenzivní imunosuprese pro reaktivaci štěpu proti hostiteli (Graft Versus Host Disease – GvHD) byla podávána antimykotická profylaxe flukonazolem v dávce 400 mg/den.

Během hospitalizace byli pacienti sledováni z hlediska rozvoje příznaků invazivní mykotické infekce. Denně bylo prováděno klinické vyšetření lékařem. Konveční snímek srdce a plic byl indikován vstupně a následně v průběhu febrilní neutropenie minimálně 1krát týdně, ev. častěji. V týdenním intervalu byla prováděna surveillance bakteriologického a mykologického osídlení v moči, stěru z rektu a dutiny ústní. Odběr hemokultur a kulturační a mikroskopické vyšetření ostatních klinických materiálů (především sputum) bylo prováděno v případě rozvoje febrilií, respektive klinických příznaků infekce.

V případě zvýšené pravděpodobnosti vzniku invazivní mykotické infekce (febrilní neutropenie nereagující na 5 dnů antibiotické léčby, rozvoj plicních infiltrátů na konvenčním RTG snímku plic, pozitivní kultivace s průkazem vláknité houby z materiálu z dýchacích cest) nastoupila série vyšetření s cílem maximálního možného průkazu vyvolávajícího agens. Bylo provedeno HRCT plic a v případě pozitivity pak bronchoalveolární laváž (lavážní tekutina byla vyšetřována kulturačně, cytologicky, imunofluorescenčně pro průkaz *Pneumocystis jiroveci* a molekulárně biologicky pro průkaz virových patogenů, mykoplazmat, chlamydií a *Pneumocystis jiroveci*).

Empirická antibiotická léčba febrilní neutropenie zahrnovala monoterapii

cefepimem, piperacilin/tazobaktamem, výjimečně meropenemem. V případě klinické indikace byl do kombinace přidán vankomycin nebo aminoglykosid. Pro empirickou antimykotickou léčbu byl v absolutní většině případů zvolen konvenční amfotericin B, výjimečně kaspofungin nebo vorikonazol.

V případě úmrtí nemocného byla v maximálně možné míře a při souhlasu rodiny provedena patologicko-anatomická pitva. Ve sledovaných letech byla sekce provedena průměrně u 56 % nemocných zemřelých na našem pracovišti.

Retrospektivně byla analyzována zdravotnická dokumentace vyšetřovaných pacientů s cílem určit pravděpodobnost invazivní aspergilózy a zjistit možnou jinou příčinu positivity GM v séru.

Detekce galaktomananu

Srážlivá krev odebraná nemocným byla ihned (při provedení odběru v pracovní dobu) nebo nejpozději následující den ráno (byl-li odběr proveden v nočních hodinách) transportována na mikrobiologické oddělení ke zpracování. Do odeslání byla srážlivá krev na hematologickém pracovišti uchovávána na vyčleněném místě při pokojové teplotě. Na mikrobiologickém oddělení bylo po centrifugaci vzorku (3 min/3 000 otáček) odděleno sérum a přeneseno po 300 µl do 2 sterilních Ependorfových zkumavek. V případě, že se materiál nevyšetřoval tentýž den, byly zkumavky zmrazeny na -20 °C, a takto uchovávány do okamžiku zpracování (maximálně 72 hod).

Galaktomanan byl detekován pomocí komerční soupravy Platelia® Aspergillus (BioRad, France). Vzorky byly v laboratoři zpracovány podle doporučení výrobce tohoto setu.

Výsledek testu byl vydáván jako bezrozměrný index positivity (IP), který odpovídá poměru naměřené optické denzity (OD) vzorku a OD kontrolního séra o koncentraci 1 ng GM/ml. Jako pozitivní byly označeny séra s IP > 0,5. Pro označení nemocného za „galak-

tomanan pozitivního“ bylo zvoleno kritérium IP > 0,5 ve 2 po sobě jdoucích (konsekutivních) vzorcích. Pro vyloučení laboratorní kontaminace byl vždy první pozitivní vzorek u každého pacienta retestován. Při pozitivě retestu byl vyžádán a následně otestován další vzorek séra od nemocného.

Definice pravděpodobnosti invazivní aspergilózy

Jako pacienti s prokázanou IA byli označeni nemocní s pozitivním histologickým/kultivačním průkazem *Aspergillus* sp. ze sterilního místa nebo ze sekce. Nemocným byla závěrem stanovena klinická diagnóza – vysoce pravděpodobná IA a na základě této diagnózy byli také tak léčeni; byli zahrnuti do skupiny pravděpodobné IA (nejčastěji kombinace rizikových faktorů, febrilií nereagujících na antibiotika a vysoce pravděpodobného nálezu na zobrazovacích metodách – nejčastěji HRCT). Ostatní nemocní byli označeni jako pacienti s možnou IA (většinou pacienti s rizikovými faktory a febriliemi nereagujícími na antibiotika, ale se zcela nespecifickým nálezem na zobrazovacích metodách) a nebo bez IA (jedinci zcela asymptomatictí bez nálezu na zobrazovacích metodách, kteří nebyli léčeni antimykotiky ani empiricky).

Vzhledem k charakteru analýzy, která zcela vychází z každodenní reálné praxe na hematologickém oddělení, nebyla použita pro klasifikaci nemocných EORTC/MSG kritéria. Tato kritéria mají v rutinní praxi jen omezené použití a většina nemocných by při jejich aplikaci byla v analýze označena za pacienty s maximálně možnou invazivní mykotickou infekcí [16,17].

Statistická analýza

Statistické zpracování bylo provedeno na úrovni pacienta (per pacient analysis). Pacienti s prokázanou a pravděpodobnou IA byli označeni jako skutečně pozitivní. Ostatní nemocní pak jako skutečně negativní. Senzitivita, specifická, pozitivní a negativní

Tab. 1. Základní onemocnění a typ protinádorové léčby GM pozitivních pacientů.

Počet GM pozitivních pacientů	n
Základní diagnóza	
Akutní leukemie	43
Non Hodgkinský lymfom	30
Mnohočetný myelom	22
Chronická lymfatická leukemie	12
Myelodysplastický syndrom	5
Hodgkinský lymfom	5
Vlasatobuněčná leukemie	2
Ostatní	8
Protinádorová léčba	
Alogenní HSCT	11
Autologní HSCT	29
Léčba akutní leukemie	31
Ostatní	43
Bez léčby	13

prediktivní hodnota byly vypočítány pomocí 2 × 2 tabulky.

Výsledky

Souhrnná analýza

Od května roku 2003 do října roku 2006 bylo celkem odebráno a na přítomnost GM vyšetřeno 11 360 vzorků séra od 911 dospělých nemocných léčených na našem pracovišti (průměr 12,5 vzorků/pacienta).

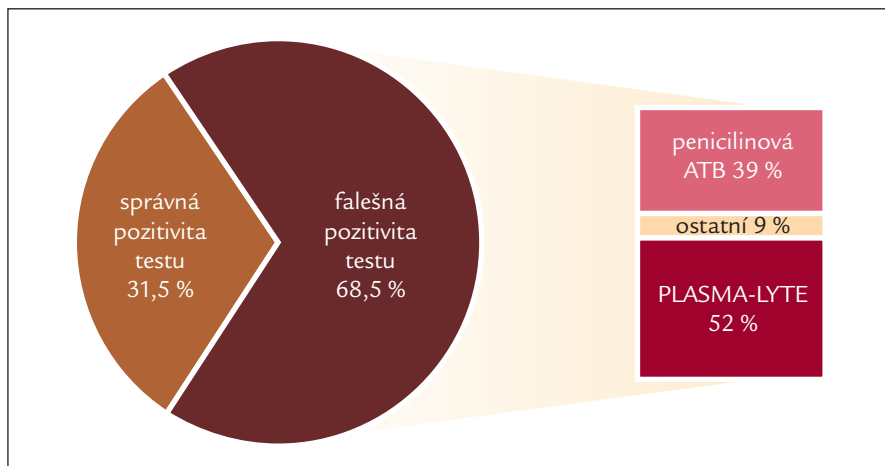
IA byla diagnostikována u 42 (4,6 %) pacientů z našeho souboru – z toho prokázaná IA u 7 (17 %) pacientů a pravděpodobná IA u 35 (83 %) nemocných.

Z celkového počtu vyšetřených vzorků sér byl index positivity vyšší než 0,5 naměřen u 890 (7,8 %) z nich.

Kritéria pro označení za GM pozitivní (IP > 0,5 v minimálně 2 konsekutivních vzorcích) splnilo 127 (13,9 %) nemocných.

Základní onemocnění a typ protinádorové léčby GM pozitivních pacientů ukazuje tab. 1.

Souhrnně byla senzitivita, specifická, pozitivní a negativní prediktivní hodnota detekce GM pro diagnostiku IA na našem pracovišti 95,2 %, 90,0 %, 31,5 % a 99,7 % (tab. 2).



Graf 1. Rozdělení GM pozitivních pacientů dle správnosti positivity Platelia® Aspergillus testu a procentuální zastoupení jednotlivých příčin falešných pozitivit.

Detekce GM pomocí Platelia® Aspergillus testu díky vynikající senzitivitě umožnila zachytit 40 ze 42 případů pravděpodobné/prokázané invazivní aspergilové infekce, ke kterým došlo ve sledovaném období. U obou GM negativních nemocných s IA byl výsledek GM testu sice také pozitivní, ale pouze v 1 vzorku séra, a tak nebyla splněna kritéria pro označení pacientů za GM pozitivní.

782 pacientů ze 784 označených testem za GM negativní nemělo invazivní aspergilovou infekci a tedy díky excellentní NPV dokázal Platelia® Aspergillus test s vysokou pravděpodobností IA vyloučit.

Určitým limitem metody však byla její nízká pozitivní prediktivní hodnota. Tato skutečnost má několik hlavních

příčin – jednak velké procento falešných pozitivit testu a rovněž fakt, že velké procento námi vyšetřovaných nemocných spadá do skupiny pacientů s velmi nízkou prevalencí IA.

Falešné positivity Platelia® Aspergillus testu

Z celkového počtu 127 GM pozitivních pacientů byla pravděpodobná nebo prokázaná IA dle výše popsaných kritérií stanovena u 40 z nich (31,5 %). V 68,5 % případů (87 pacientů) byla pozitivita testu falešná i přesto, že pro označení nemocného za GM pozitivního byla vyžadována konsekutivní pozitivita.

39 % (n = 34) případů falešné positivity bylo způsobeno podáváním penicilinových antibiotik. Testováním

Tab. 2. Souhrnná analýza přínosnosti detekce GM pomocí Platelia® Aspergillus testu.

	2 * IP > 0,5
senzitivita	95,2 %
specifita	90,0 %
PPV	31,5 %
NPV	99,7 %

jednotlivých penicilinových antibiotik byly jako příčina identifikovány některé šarže piperacilinu/tazobaktamu, ampicilinu a konečně amoxicilin/klavulanátu (a to pouze od některých výrobců), tab. 3. Falešné positivity při detekci GM u hematoonkologických nemocných kumulovaly v obdobích, kdy zmíněná antibiotika, respektive jejich nekontrolované šarže, byly na našem pracovišti podávány (do poloviny roku 2004), graf 2. Od druhé poloviny roku 2004 byl z používání vyloučen ampicilin. GM pozitivní amoxicilin/klavulanát byl nahrazen GM negativním preparátem od jiného výrobce. Konečně všechny šarže piperacilin/tazobaktamu jsou od té doby před distribucí testovány pomocí Platelia® Aspergillus testu a použity jsou výlučně šarže GM negativní, tzn. takové, které nejlépe v koncentrované podobě a nebo alespoň v naředění na koncentraci odpovídající dosažené koncentraci antibiotika v séru mají IP < 0,5. Tato opatření (s výjimkou krátkého období v roce 2005, kdy nebyly k dispozici GM negativní šarže piperacilin/tazobaktamu) vedla k eliminaci falešných pozitivit Pla-

Tab. 3. Testování přítomnosti GM (pozitivity Platelia® Aspergillus testu) v jednotlivých šarzích penicilinových antibiotik v koncentrované podobě a po naředění na plazmatickou koncentraci.

	Počet testovaných šarží ATB	koncentrované ATB		ATB naředěné na plazmatickou koncentraci	
		Průměrný IP	Počet šarží GM pozitivní (IP > 0,5)	Průměrný IP	Počet šarží GM pozitivní (IP > 0,5)
piperacilin/tazobaktam (Tazocin®)	20	2,38 (0,02–8,35)	12 (60 %)	0,29 (0,03–1,3)	3 (15 %)
amoxicilin/klavulanát (Augmentin®)	11	5,41 (4,24–6,97)	11 (100 %)	0,4 (0,08–2,03)	4 (36 %)
amoxicilin/klavulanát (Amoksiklav®)	10	0,15 (0,03–0,85)	1 (10 %)	0,08 (0,03–0,18)	0
ampicilin (Ampicillin Pliva®)	3	4,85 (0,2–7,45)	2 (66 %)	0,87 (0,08–1,82)	2 (66 %)
ampicilin/sulbaktam (Unasyn®)	8	0,09 (0,07–0,12)	0	0,08 (0,07–0,09)	0

Tab. 4. Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) Platelia® Aspergillus testu u jednotlivých skupin hematoonkologických nemocných s odlišnou prevalencí IA.

Protinádorová léčba	PPV
Celý soubor	31,5 %
Alogenní HSCT	73 %
Indukce akutní leukemie	46 %
Konzolidace akutní leukemie	33 %
Ostatní protinádorová léčba (BEACOPP, CHOP, VAD, FC, CODOX/IVAC, ostatní)	29 %
Autologní HSCT	14 %

Tab. 5. Charakter postižení u nemocných s pravděpodobnou/prokázanou IA u kterých bylo provedeno HRCT a byli označeni za GM pozitivní (n = 30).

Nález na HRCT	n	%
Air crescent	2	6,7 %
Halo	1	3,3 %
Intersticiální proces	2	6,7 %
Konsolidace	14	46,7 %
Makronoduly > 1 cm	6	20,0 %
Mikronoduly < 1 cm	5	16,7 %

telia® Aspergillus testu způsobených penicilinovými antibiotiky (graf 2).

52 % (n = 45) případů falešných pozitivit bylo způsobeno podáváním infuzního roztoku Plasma-Lyte a jejich výskyt a počet koreloval se zvyšující se spotřebou tohoto infuzního roztoku na našem pracovišti (graf 2).

U 9 % (n = 8) případů falešné positivity Platelia® Aspergillus testu nelze příčinu přesně identifikovat. U 2 pacientů z této skupiny lze zvažovat jako příčinu těžkou mukozitidu s následným průchodem antigenu ze zažívacího traktu, u ostatních nemocných je však falešná pozitivita testu zcela nevysvětlena.

Testování nemocných s nízkou prevalencí IA

Pouze 33 % GM pozitivních nemocných z našeho souboru spadalo do skupiny s vysokým výskytem IA (alogenní HSCT a léčba akutní leukemie). Ostatní GM pozitivní pacienti tedy patří do skupiny s nízkou prevalencí IA. Tento fakt je také jednou z příčin nízké PPV Platelia® Aspergillus testu. Jestliže PPV testu v celém souboru nemocných byla 31,5 %, u nejvíce rizikových pacientů byla výrazně vyšší (alogenní HSCT – 73 %, indukce akutní leukemie 46 %), a naopak u nejméně rizikových nemocných ještě nižší (autologní HSCT – 14 %, ostatní léčba 29 %), tab. 4.

Detekce galaktomananu a vztah k HRCT

U 30 ze 40 (75 %) GM pozitivních nemocných s IA bylo provedeno HRCT.

První pozitivita GM předcházela pozitivitu na HRCT průměrně o 2 dny (minimum –20 dní; maximum +14 dní) a velice často právě pozitivita GM byla u rizikových nemocných indikací k provedení HRCT.

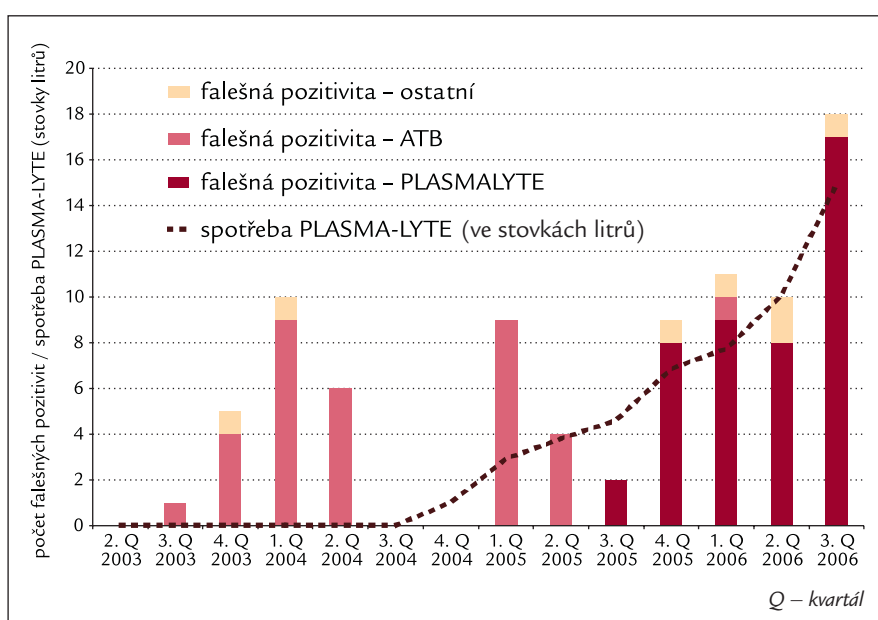
Vedle schopnosti GM předcházet pozitivitu na HRCT měla v našem souboru pozitivita GM v séru zásadní význam pro diferenciální diagnostiku abnormalit identifikovaných na HRCT. Pouze u 3 nemocných (10 %) byl obraz na HRCT považován za „charakteristický“ pro angioinvazivní formu mykózy (air crescent nebo halo). U zbývajících 27 pacientů (90 %) byl nález na HRCT nespecifický, a právě současná pozitivita GM v séru umožnila označit tyto nálezy za abnorma-

lity vyvolané invazivní aspergilovou infekcí (tab. 5).

Diskuse

Správná a časná diagnostika invazivní aspergilózy, nejčastější invazivní mykózy hematoonkologických nemocných současné doby, je velice obtížná. Konvenční diagnostika je málo senzitivní a dává opožděný výsledek. Nezřídka je diagnóza stanovena až post mortem [18].

V posledních letech došlo ke 2 zásadním pokrokům v diagnostice této život ohrožující infekce – rutinnímu používání HRCT a zavedení detekce antigenu buněčné stěny aspergilů (galaktomananu) pomocí Platelia® Aspergillus testu.



Graf 2. Počet a časování výskytu falešných pozitivit Platelia® Aspergillus testu dle jednotlivých příčin.

V literatuře existuje několik prací poukazujících na velmi dobrou senzitivitu a časnost positivity galaktomananu (GM) v séru ve skupině hematologických nemocných, je-li používán jako cut-off indexu positivity (IP) 0,5 a odběry krve jsou prováděny 2–3krát týdně [14,19].

Cílem námi předkládané práce bylo zhodnocení využitelnosti detekce GM v séru pro diagnózu invazivní aspergilózy v běžné rutinní praxi na hematologickém oddělení. Velikostí souboru s více jak 11 000 odběry od 900 nemocnými je tato práce podle našich znalostí největší dosud publikovaná na toto téma.

Při hodnocení výsledků jsme vycházeli z klinických kritérií pravděpodobnosti invazivní aspergilózy, a nikoliv z velice často používaných EORTC/MSG kritérií [16], která jsou doporučována jako referenční pro klinické studie. Bohužel však většinou neodpovídají běžné rutinní praxi. Ve stanovení diagnózy prokázané IA se EORTC/MSG a námi použitá klinická kritéria neliší, rozdílné však bylo hodnocení pravděpodobné IA. Pacienti označení v našem souboru za nemocné s pravděpodobnou IA nemuseli vždy splňovat kritéria EORTC/MSG. Tento přístup k hodnocení, přestože může být určitým limitem naší analýzy, však daleko více odpovídá běžné klinické praxi.

Výsledek naší studie prokázal vysokou senzitivitu testu pro diagnostiku IA u hematologických nemocných a zachytil 40 ze 42 případů IA (senzitivita 95 %). U jednoho z GM negativních nemocných z našeho souboru vznikla IA při profylaktickém podávání vorikonazolu – u pacientů léčených antimykotiky s efektem na kmeny aspergilů mohou být vzhledem k nižší mykotické náloži hodnoty GM v séru hraniční [19]. Předpokládáme, že právě tento jev byl příčinou pouze jednorázové a nikoliv již opakované positivity GM v séru u našeho pacienta, který tak musel být označen za GM negativního (díky zvolenému kritériu 2 pozitivních konsekutivních vzorků séra).

Dalším velkým přínosem testu, který vyplynul z naší analýzy, je jeho velmi vysoká negativní prediktivní hodnota. S pravděpodobností 99,7 % dokázal při negativitě test vyloučit přítomnost IA. V klinické praxi je právě schopnost s vysokou pravděpodobností vyloučit IA u rizikových skupin nemocných velmi přínosná a umožňuje zacílit diagnostické a léčebné postupy dalšími směry.

Naše analýza také prokázala velký význam kombinace detekce GM a včasné provedení HRCT plic u nemocných v riziku IA. Pozitivita GM v séru sice v průměru předcházela pozitivitu HRCT plic o 2 dny a byla ve většině případů signálem k provedení HRCT, na druhou stranu u 9 nemocných (30 %) naopak abnormalita na HRCT předcházela pozitivitu GM v séru. Kombinace obou metod tedy umožní rozšířit počet pacientů, u kterých bude diagnóza IA stanovena časně.

Jednou z nejdůležitějších výhod kombinace obou dvou zmíněných metod je však možnost pomocí GM odlišit etiologii infiltrátů na HRCT plic. V našem souboru pouze 10 % pacientů mělo na HRCT obraz „specifický“ pro IA. Ve všech ostatních případech to byla právě pozitivita GM v séru, která etiologii nespecifických plicních nálezů odlišila, respektive umožnila stanovit diagnózu IA (tab. 5).

Slabým místem detekce GM v séru je podle našich zkušeností velmi nízká pozitivní prediktivní hodnota (PPV) – tedy pravděpodobnost, že pozitivní výsledek testu bude odpovídat přítomnosti invazivní aspergilózy. Při PPV 31,5 % tedy téměř 70 % pozitivit Platelia® Aspergillus testu nebylo způsobeno IA.

PPV každého testu závisí na prevalenci hodnoceného onemocnění ve sledované populaci [20]. A právě vysoké zastoupení pacientů s nízkým rizikem IA v našem souboru (2/3 GM pozitivních pacientů představovali nemocní s nízkou pravděpodobností IA) je jedním z důležitých faktorů,

který vedl k tak nízké PPV. Zacílení pravidelného screeningu GM pouze na nemocné s nejvyšším rizikem IA (alogenní HSCT, indukční a reindukční léčba AML) pak jednoznačně zvýší přínosnost testu, respektive zvýší jeho PPV. PPV testu ve skupině nemocných po alogenní HSCT v našem souboru byla 73 % (tab. 4).

Hlavní příčinou tak nízké PPV Platelia® Aspergillus testu však bylo vysoké procento falešně pozitivních výsledků.

Izolované falešné positivity testu (způsobené především kontaminací vzorku aspergilovými, ev. penicilinovými vlákny při odběru nebo zpracování vzorku) lze eliminovat opakováním odběru a vyžadováním konsekutivní positivity pro to, aby byl nemocný označen jako GM pozitivní. Velký problém představují opakované falešné positivity, které lze u rizikových nemocných často jen velmi obtížně odlišit od pozitivit skutečných.

Podobně jako je popisováno v literatuře, i v našem souboru bylo jednou z hlavních příčin podávání některých penicilinových antibiotik. 39 % všech falešných pozitivit testu v našem souboru bylo způsobeno podáváním těchto antibiotik. Penicilinová antibiotika (piperacilin/tazobaktam, amoxicilin/klavulanát a ampicilin) jsou vyráběna semisynteticky s pomocí *Penicillium sp.* GM ze stěn penicilii následně kontaminuje vlastní výrobek a vede k falešné pozitivitě Platelia® Aspergillus testu při vyšetřování séra nemocných léčených zmíněnými preparáty [8]. Množství kontaminujícího GM je v jednotlivých šaržích antibiotik různé. Proto řešením, které vedlo k eliminaci falešných pozitivit způsobených podáváním penicilinových antibiotik na našem pracovišti, bylo:

- ukončení podávání ampicilinu;
- náhrada amoxicilin/klavulanátu za GM negativní přípravek od jiného výrobce;
- pravidelné měření množství GM ve všech nových šaržích piperacilin/tazobaktamu určených pro naše pra-

coviště a použití pouze šarží „GM negativních“ ($IP < 0,5$), nejlépe již v koncentrované podobě antibiotika, ev. pokud není jiná volba, ale spoň po naředění na obvyklou plazmatickou koncentraci léku (tab. 3 a graf 2).

Nově byl identifikován jako zdroj falešné positivity Platelia® Aspergillus testu infuzní roztok Plasma-Lyte (Baxter, USA) [21–23]. Tento infuzní roztok obsahuje kalcium glukonát, který je vyráběn fermentací na kmenech aspergilů, a GM pak opět kontaminuje finální výrobek. Index positivity při testování jednotlivých šarží přípravku v Platelia® Aspergillus testu je obvykle vysoký [22]. Spotřeba infuzního roztoku Plasma-Lyte na našem pracovišti od konce roku 2004 velmi prudce stoupala a s navyšující se spotřebou následně koreloval i prudký vzestup počtu falešných pozitivit při detekci GM v séru u nemocných hydratovaných tímto roztokem. 68,5 % případů všech falešných pozitivit v našem souboru bylo způsobeno podáváním výše zmíněného roztoku. Falešné positivity při detekci GM v séru způsobené podáváním roztoku Plasma-Lyte lze velice snadno eliminovat vyloučením používání Plasma-Lyte k hydrataci u hematologických nemocných s předpokladem vyšetřování GM v séru.

Pokud bychom vyloučili z analýzy falešné positivity při detekci GM způsobené podáváním penicilinových antibiotik a roztoku Plasma-Lyte (neboť obě příčiny jsou pomocí výše zmíněných opatření eliminovatelné), počet GM falešně pozitivních pacientů by klesl z 87 na 8 a pozitivní prediktivní hodnota testu (PPV) by stoupla z 31,5 % na 83,3 %.

Závěr

Výsledky naší práce představují největší dosud publikovanou analýzu sledující význam detekce GM u hematologických nemocných pomocí sandwichové ELISy (Platelia® Asper-

gillus, Bio-Rad, Francie) v diagnostice invazivní aspergilové infekce. Prokázali jsme její excelentní senzitivitu a negativní prediktivní hodnotu stejně tak jako velký význam její kombinace s HRCT plic. V běžné klinické praxi je však nutno myslet na možnost falešně pozitivních výsledků a tak omezenou pozitivní prediktivní hodnotu testu. Znalost a eliminace dvou hlavních příčin těchto falešných pozitivit – podávání některých penicilinových antibiotik a aplikace infuzního roztoku Plasma-Lyte – však umožňuje tyto falešné positivity testu významnou měrou minimalizovat.

Poděkování

Práce byla podpořena IGA MZ ČR NR8452-3/2005 a VZ MSM6198959223.

Literatura

1. Pagano L, Caira M, Candoni A et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068–1075.
2. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after non-myeloablative conditioning. *Blood* 2003; 102: 827–833.
3. Subira M, Martino R, Franquet T et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies: survival and prognostic factors. *Haematologica* 2002; 87: 528–534.
4. Mayer J. Nahradí transplantace periferních kmenových buněk krvetvorby definitivně transplantace kostní dřeně? *Vnitř Lék* 2000; 46: 785–793.
5. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358–366.
6. von Eiff M, Roos N, Schulten R et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995; 62: 341–347.
7. Brodoefel H, Vogel M, Hebart H et al. Long-term CT follow-up in 40 non-HIV immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis: kinetics of CT morphology and correlation with clinical findings and outcome. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 404–413.

8. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 2007; 163: 191–202.

9. Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B et al. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných pomocí sérologických metod. *Vnitř Lék* 2007; 53: 645–654.

10. Donnelly JP. Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis: Getting Closer but Still a Ways to Go. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 487–489.

11. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223–3228.

12. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K et al. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001; 97: 1604–1610.

13. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002; 186: 1297–1306.

14. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and hematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004; 126: 852–860.

15. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1417–1427.

16. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7–14.

17. Subira M, Martino R, Rovira M et al. Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol* 2003; 82: 80–82.

18. Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B et al. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. Postgrad Med 2007; 9: 240–252.

19. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. J Infect Dis 2004; 190: 641–649.

20. Loong TW. Understanding sensitivity and specificity with the right side of the brain. BMJ 2003; 327: 716–719.

21. Hage CA, Reynolds JM, Durkin M et al. Plasmalyte as a cause of false-positive results for Aspergillus galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol 2007; 45: 676–677.

22. Ráčil Z, Kocmanová I, Lengerová M et al. Intravenous PLASMA-LYTE as a Major Cause of False-Positive Results of Pla-

telia Aspergillus Test for Galactomannan Detection in Serum. J Clin Microbiol 2007; 45: 3141–3142.

MUDr. Zdeněk Ráčil
www.fnbrno.cz
e-mail: zracil@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 22. 8. 2007
Přijato po recenzi: 3. 10. 2007

www.csnn.eu