

INCIDENȚA ASPERGILOZEI INVAZIVE LA PACIENȚII CU MALIGNITĂȚI HEMATOLOGICE ÎN INSTITUTUL CLINIC FUNDENI – EXPERIENȚA UNUI SINGUR CENTRU

The incidence of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in Fundeni Clinical Institute – experience of a single centre

Dr. Alina Tănase¹, Dr. Anca Coliță¹, Dr. Camelia Ghiță¹, Dr. Elvira Borcan¹,
Dr. Daniel Coriu¹, Dr. Carmen Orban¹, Dr. Adrian Streinu Cerceț²

¹Centrul pentru Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, București

²Institutul de Boli Infecțioase „Matei Balș“, București

REZUMAT

Aspergiuloza Invasivă (AI) este cea mai frecventă Infecție Fungică Invasivă (IFI) amenințătoare de viață a pacienților imunocompromiși, iar un diagnostic precoce este esențial în prognosticul de viață al acestor pacienți. Introducerea tehnicii de testare a antigenului galactomanan (Platelia Aspergillus EIA: Bio Rad) în Institutul Clinic Fundeni a permis evaluarea incidenței Aspergiulozei Invasive la pacienții cu hemopatii maligne și transplant de celule stem hematopoietice. Începând cu ianuarie 2011, am testat 230 de probe de GM la 162 de pacienți, cu 16 probe pozitive; 6 pacienți au fost diagnosticați cu AI probabilă (risc crescut, criterii imagistice, galactomanan pozitiv). Incidența AI (dovedită) în perioada 2006-2010, a fost mult mai mică comparativ cu anul 2011, când s-a introdus testarea antigenului galactomanan, ca test micologic direct (3 cazuri/68.343 hemopatii maligne vs 7 cazuri/13.796 hemopatii maligne). Până acum, diagnosticul de AI a fost bazat numai pe tehnicile convenționale, care sunt de obicei tardive pentru a asigura un tratament cu succes. Testarea antigenului GM poate ajuta clinicianul în elaborarea unui diagnostic precoce al AI și adoptarea unei strategii de terapie preemptivă. Aceste rezultate reprezintă primele date despre valoarea testării GM în diagnosticul AI la pacienții hematologici, în România.

Cuvinte cheie: aspergiuloză invazivă, galactomanan, malignități hematologice, transplant de celule stem hematopoietice

ABSTRACT

Invasive aspergillosis (IA) is the most common life threatening, invasive fungal infection (IFI) in immunocompromised patients and an early diagnosis is essential in the life prognosis of these patients. Introducing galactomannan antigen test (Platelia Aspergillus EIA: Bio Rad) in Institute Fundeni allowed us an evaluation of the incidence of IA in patients with hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplant. Starting Jan 2011, we tested 230 samples from 162 patients GM, with 16 positive samples; 6 patients were diagnosed with probable IA (high risk, imaging criteria, positive galactomannan test). The incidence of proven AI between 2006-2010, was much lower than in 2011, when he introduced galactomannan antigen testing as direct mycological tests (3 cases / 68 343 hematologic malignancy vs 7 cases / 13,796 hematologic malignancies). So far, the diagnosis of AI was based only on conventional techniques, which are usually too late to ensure a successful treatment. GM antigen testing may help clinicians in developing an early diagnosis of IA and starting a pre-emptive therapy. These results represent the first data on GM testing in the diagnosis of IA in hematological patients in Romania.

Key words: invasive aspergillosis, galactomanan, hematological malignancies, hematopoietic stem cell transplant

Adresă de corespondență:

Dr. Alina Tanase, Centrul pentru Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, Șos. Fundeni nr. 258, București
e-mail: alina.tanase@icfundeni.ro

INTRODUCERE

Aspergiloza invazivă (AI) este o infecție amenințătoare de viață, cauzată de fungi care aparțin genului *Aspergillus*. *Aspergillus* spp. se numără printre cei mai cunoscuți fungi filamentoși, adesea fiind prezenți în legumele stricate, în materialele izolatoare, în instalațiile de aer condiționat și de încălzire, în blocurile operatorii și în saloanele de spital, precum și în praful din aer. Infecțiile invazive sunt contractate, de obicei, prin inhalarea sporilor. *Aspergillus* spp. invadează vasele sangvine și determină necroza hemoragică și infarctizarea țesuturilor, simptomele putând fi cele de astm, pneumonie, sinuzită sau de boală sistemică rapid progresivă.

AI are o mortalitate foarte înaltă, 80-90% la pacienții cu risc crescut, în special la cei cu malignități hematologice și transplant de celule stem hematopoietice (TCSH) (1,2). Diagnosticul AI este de obicei tardiv, din cauza lipsei până nu demult a unor tehnici specifice, de mare acuratețe.

Incidența AI variază între 0,3 și 12%, în funcție de boala hematologică de bază, ajungând până la 15% din allotransplanturile de celule stem hematopoietice (alloTCSH), cu o incidență mai crescută la recipientii cu transplant mismatch sau de la donator neînrudit (2,3,4). Remarcabil este faptul că AI rămâne cea mai frecventă cauză de mortalitate dată de infecții la pacienții cu TCSH, așa cum o dovedesc studiile efectuate pe autopsii (5).

Factorii de risc cei mai frecvent incriminați în apariția AI, sunt reprezentați de neutropenia severă prelungită și apariția bolii de greșă contra gazdă în cazul TCSH. Alți factori de risc recunoscuți pentru AI, în cazul pacienților cu hemopatii maligne și TCSH sunt: tratamentul cu corticoterapie, condiționarea nonmieloablativă, reactivarea infecției cu citomegalovirus, tratamentul cu inhibitori de TNF alfa/ anticorpi monoclonali, anumite caracteristici legate de receptor, ca polimorfismul nucleotidelor receptorului TNF de tip 2 și a IL10, dar și creșterea depozitelor de fier de la nivelul măduvei hematogene (6,7).

Criteriile de diagnostic ale unei infecții fungice invazive (IFI) au fost elaborate în 2002 și revizuite în 2008 de către 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 (8,9). Diagnosticul IFI, în funcție de nivelul de certitudine, poate fi încadrat în: IFI dovedită, probabilă sau posibilă. Această clasificare depinde de 3 categorii de criterii,

legate de: caracteristicile pacientului, trăsăturile clinice/imagistice și rezultatele micologice. AI dovedită necesită un examen histopatologic sau citopatologic din puncție-biopsie ce evidențiază prezența de *Aspergillus* spp și de leziuni tisulare asociate (evidențiate microscopic) sau culturi pozitive obținute dintr-un situs în mod normal steril. Diagnosticul unei IFI probabile necesită prezența unui factor de risc al gazdei, un criteriu clinic și un criteriu micologic. Cazurile care întrunesc un criteriu de risc al gazdei și un criteriu clinic fără prezența criteriului micologic reprezintă IFI posibile. Important de subliniat faptul că decelarea unui test micologic indirect pozitiv (pentru AI – testul galactomanan) schimbă încadrarea infecției din posibilă în probabilă.

Deși standardul de aur al diagnosticului rămâne punerea în evidență a fungului, printr-un examen histopatologic sau printr-o cultură pozitivă, dintr-o probă recoltată printr-o manevră sterilă dintr-un situs steril, totuși aceasta este rareori posibilă în condițiile unui pacient cu risc înalt (de obicei trombocitopenic). Diagnosticul precoce al IFI rămâne o provocare pentru clinicieni, găsirea unui marker precoce de IFI fiind foarte utilă. Metodele (non-cultură) de laborator de detectare a infecțiilor fungice au devenit foarte importante în managementul unui pacient cu risc înalt de IFI. Noile metode de detectare a AI includ: Polymerase Chain Reaction (PCR), care nu reprezintă o metodă standardizată la ora actuală, și detectarea Antigenului Galactomanan, un constituent al peretelui celular aspergilar, criteriu recunoscut în clasificarea EORTC.

OBIECTIVE

Până la ora actuală nu există date despre incidența IFI la pacienții cu malignități hematologice în România. Am efectuat un studiu retrospectiv, care și-a propus să evalueze incidența AI în Centrul pentru Transplant Medular din Institutul Clinic Fundeni. În perioada 2006-2010 a fost evaluată incidența AI dovedite, iar în anul 2011, odată cu introducerea testării antigenului galactomanan, s-a evaluat incidența AI dovedite și probabile.

MATERIAL ȘI METODĂ

Au fost evaluate toate cazurile internate în Centrul pentru Transplant Medular în perioada 2006-2010 pentru a pune în evidență diagnosticul de AI. Astfel, au fost evaluate toate examenele histopatologice sugestive de IFI pentru probele

obținute printr-o manevră sterilă, cât și toate culturile de *Aspergillus* din probe obținute printr-o manevră sterilă (se exclud urina și mucoasele, sinusurile) la pacienții internați în perioada 1.01.2006-31.12.2011.

Testarea GM seric s-a efectuat conform instrucțiunilor producătorului (Platelia *Aspergillus* EIA: Bio Rad) începând cu ianuarie 2011.

Platelia™ *Aspergillus* EIA este un test cu o singură fază imunoenzimatică („sandwich mono-step“) care detectează galactomananul în serul uman. Testul utilizează anticorpi monoclonali de șoarece EBA2, care sunt îndreptați împotriva Galactomananului *aspergilar*. Anticorpi monoclonali sunt folosiți pentru:

- a acoperi godeurile din microplăci și a lega antigenul;
- a detecta antigenul legat de microplăcile sensibilizate (reactiv conjugat: anticorpii monoclonali – peroxidase-linked).

Probele de ser sunt tratate termic în prezența de EDTA cu scopul de a disocia complexe imune și de a precipita proteinele serice, care ar putea interfera cu testul. Probele de ser tratate și conjugate se adaugă în godeurile acoperite cu anticorpi monoclonali și se incubează 90 de minute la 37°C. Se formează un complex: anticorp monoclonal – galactomanan – anticorp monoclonal/peroxidază, în prezența antigenului galactomanan. Godeurile plăcii sunt spălate pentru a elimina orice material neconsolidat. Apoi, se adaugă soluția substrat, care va reacționa cu complexe Antigen-anticorp, evidențiate printr-o reacție de culoare albastră. Reacția enzimatică se oprește prin adăugarea de acid, care schimbă culoarea albastru în galben. Absorbanta probelor (densitatea optică) se determină cu un spectrofotometru, la două lungimi de undă: 450 și 620 nm.

Un test GM pozitiv a fost definit ca două teste consecutive cu o densitate optică $\geq 0,5$ sau un singur test cu o densitate optică $\geq 0,8$. Data primului test GM pozitiv a fost considerată data diagnosticului de AI, la pacienții cu risc crescut și modificări imagistice caracteristice.

Ținând cont de factorii de risc ai IFI pentru diversele categorii de pacienți, strategia de testare a antigenului galactomanan a fost diferită în funcție de grupa de risc. Astfel, protocolul de testare a antigenului galactomanan conține 3 tipuri de testări:

- *testare screening, de două ori pe săptămână* pentru pacienții cu risc crescut (leucemii acute mieloblastice la inducție, transplant allogenic de celule stem hematopoietice,

tratament cu blocanți ai TNF alfa, boala de grefă contra gazdă severă etc.);

- *testare de confirmare*, pentru pacienții cu hemopatii maligne sau transplant autolog de celule stem, la care există suspiciune clinică sau radiologică de IFI;
- *testare de evaluare a răspunsului la tratament*, pentru a monitoriza eficacitatea terapiei introduse.

Evaluarea criteriilor clinice/imagistice s-a efectuat urmărind prezența oricăreia dintre următoarele infiltrate la examenul computer tomografic toracic (semnul haloului, „air crescent“, cavitate într-o arie de consolidare sau orice infiltrat nou apărut) sau la nivelul sinusurilor anterioare ale feței (eroziune la nivelul pereților sinuzalilor extinderea infecției la structurile adiacente)

REZULTATE

În Centrul pentru Transplant Medular, au fost internați, în anul 2011, 13.796 de pacienți cu hemopatii maligne, din care 654 de cazuri nou diagnosticate. Dintre cazurile diagnosticate în 2011, 66 de cazuri au fost leucemii acute (47 mieloblastice și 19 limfoblastice) și 54 de cazuri sindroame mielodisplazice. Au fost efectuate 85 de proceduri de auto și allotransplant de celule stem hematopoietice.

În cursul anului 2011, am testat 230 de probe de GM la 162 de pacienți: 173 de probe de screening, 27 de probe de confirmare și 30 teste de evaluare a răspunsului. 47% dintre pacienți au avut un singur test și 53% au avut testări multiple.

Toate cele 30 de teste de evaluare a răspunsului au fost negative după începerea terapiei specifice cu Voriconazol injectabil. Din care 27 de probe de confirmare (pacienți fără risc major, dar cu semne clinice și modificări imagistice sugestive) numai una a fost pozitivă. Din cele 173 de probe de screening 15 au fost pozitive.

Din totalul de 230 de probe am avut 16 probe pozitive, la 15 pacienți. 6 probe pozitive au fost corelate cu celelalte criterii de diagnostic (criterii legate de gazdă și modificări sugestive la examenul CT toracic) și au pus diagnostic de AI probabil. Un singur caz a fost diagnosticat AI dovedit, cu ajutorul examenului histopatologic posttoracotomie.

Nouă probe pozitive au fost considerate fals pozitive, deoarece nu s-au corelat cu modificări imagistice.

Incidența AI la pacienții cu hemopatii maligne și TCSH din Institutul Clinic Fundeni în 2011 a fost

de 7 cazuri/13.796 pacienți internați. Este de remarcat faptul că toate cazurile cu AI probabilă au fost pacienți postallotransplant medular, ceea ce înseamnă o incidență de 7 cazuri la 55 de cazuri de pacienți allotransplantați, aflați în urmărire în I.C. Fundeni (12,7%). Din cele 7 cazuri postallotransplant, 3 au fost în perioada de neutropenie pregrefare și 4 au prezentat boala de grefă contra gazdă în tratament cu corticosteroizi.

Pentru a evalua beneficiul testării antigenului galactomanan, am studiat retroactiv incidența AI dovedite în I.C. Fundeni între anii 2006-2010. Au fost decelate 3 cazuri de aspergiloză la pacienții cu malignități hematologice, împărțite pe ani în felul următor:

- Anul 2008 – 1 caz de Aspergiloză Auriculară (otită medie) – *Aspergillus Niger* la un pacient cu Metaplazie Mieloidă cu Mielofibroză
- Anul 2009 – 1 caz de Aspergiloză Pulmonară, la un pacient cu Leucemie Acută Limfoblastică, aflat la 1 an și 8 luni postallotransplant de la donator compatibil familial (ex. histopatologic post-lobectomie pulmonară)
- Anul 2010 – 1 caz de Aspergiloză sinusală (cultură pozitivă pentru *Aspergillus Flavus* din puncția sinusală), la un pacient cu Leucemie Mieloidă Cronică – puseu blastic

Astfel, incidența AI între anii 2006-2010 a fost de 3 cazuri/68.343 cazuri de hemopatii maligne internate în Centrul pentru Transplant Medular.

DISCUȚII

În mai 2003, FDA (US Food and Drug Administration) a aprobat un test ELISA de detecție a galactomananului (GM), care reprezintă o glicoproteină a peretelui celular al *Aspergillus*ului, testul GM ELISA pozitiv devenind un element important de diagnostic al infecției fungice oportuniste la pacienții cu cancer și transplant de celule stem hematopoietice.

Antigenul GM este un constituent al peretelui celular fungic, care se eliberează în sânge și se poate doza, fiind corelat cu gradul de angioinvasie. Pacienții cu risc crescut de AI, au un epiteliu lezat de dozele mari de citostatice și radioterapie, astfel încât au un grad mare de angioinvasie a GM și, astfel, o sensibilitate bună a testului (10).

Testul devine pozitiv, în medie, cu 7-14 zile mai devreme decât alte mijloace de diagnostic; are o sensibilitate variabilă (între 64-96%) și o specificitate de 81-95% (11). Numeroase alimente (paste, orez) ce conțin galactomanan, ca și modificările peretelui intestinal induse de chimioterapie, iradiere

sau de reacția grefă-contra gazdei (GVHD), pot fi responsabile parțial de rezultatele fals- pozitive obținute la acest test. Antibioticele semisintetice cum ar fi piperacilina, amoxicilina și ticarcilina care se bazează pe compuși naturali derivați din genul *Penicillium*, pot da reacții încrucișate cu anticorpii monoclonali incluși în test. Probele care conțin antigen *Histoplasma* pot da, de asemenea, reacții încrucișate. Pe de altă parte, un rezultat negativ nu exclude o aspergiloză invazivă (10,12).

Testarea GM își găsește utilitatea în două situații: diagnostic precoce și evaluarea răspunsului bolii la tratament. Testarea bisăptămânală a GM în vederea detectării AI este un instrument de diagnostic înalt specific, iar când este folosit cu regularitate, testul ELISA poate detecta precoce AI (11).

Evaluarea cazurilor de Aspergiloză Invazivă dovedită și probabilă, în I.C. Fundeni la pacienții cu malignități hematologice arată o incidență extrem de mică, care nu se corelează cu incidența descrisă la aceeași categorie de pacienți, în alte centre din Europa sau SUA. Se pot enunța mai multe explicații:

- pacienții cu semne clinice de infecție fungică invazivă au fost transferați în Clinici de Boli Infecțioase pentru diagnostic și tratament
- nu s-au efectuat puncții pentru a preleva material pentru cultură din cauza condițiilor medicale ale pacienților (în majoritate trombocitopenici) și astfel nu s-a putut pune diagnosticul de IFI dovedită
- la pacienții decedați nu s-au efectuat autopsii și astfel, s-au pierdut multe cazuri de IFI

Evaluând însă incidența cazurilor de AI la pacienții cu allotransplant de celule stem hematopoietice, cu risc înalt pentru infecțiile fungice invazive am evidențiat o incidență de 12,7%, ceea ce concordă cu literatura de specialitate.

CONCLUZII

Incidența aspergilozei invazive în perioada 2006-2010, la pacienții cu malignități hematologice internați în Centrul pentru Transplant Medular – I.C. Fundeni a fost mult mai mică comparativ cu anul 2011, când s-a introdus testarea antigenului galactomanan, ca test micologic indirect (3 cazuri / 68.343 hemopatii maligne vs. 7 cazuri / 13.796 hemopatii maligne). Incidența AI la pacienții cu allotransplant de celule stem hematopoietice este de 12,7%.

Testarea antigenului GM (tehnica Platelia *Aspergillus*) poate ajuta clinicianul în elaborarea unui diagnostic precoce al AI, dacă este corelată cu

semnele clinice și imagistice specifice, ceea ce se poate traduce într-o terapie ținută precocă și o șansă de supraviețuire mai bună pentru acești pacienți.

Mulțumiri

Această lucrare este efectuată în cadrul Programului Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea

Resurselor Umane (POS DRU), finanțat din Fondul Social European și Guvernul României prin contractul nr. POS DRU/89/1.5/S/64109”.

BIBLIOGRAFIE

1. Pagano L., Girmenia C., Mele L., Ricci P., Tosti M.E., Nosari A., et al. – Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program. GIMEMA Infection Program; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto. *Haematologica* 2001; 86:862-70.
2. Martino R., Subira M., Rovira M. – Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. *Br J Haematol* 2002; 116:475-82
3. Baddley J.W., Stroud T.P., Salzman D., Pappas P.G. – Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1319-24
4. Jantunen E., Salonen J., Juvonen E., Koivunen E., Siitonen T., Lehtinen T., et al. – Invasive fungal infections in autologous stem cell transplant recipients: a nation-wide study of 1188 transplanted patients. *Eur J Haematol* 2004; 73:174-8
5. Kume H., Yamazaki T., Abe M., Tanuma H., Okudaira M., Okayasu I. – Increase in aspergillosis and severe mycotic infection in patients with leukemia and MDS: comparison of the data from the Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan in 1989, 1993 and 1997. *Path Intern* 2003; 53:744-50
6. Patterson T.F., Kirkpatrick W.R., White M., Hiemenz J.W., Wingard J.R., Dupont B., et al. – Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine* 2000; 79:250-60
7. Muhlemann K., Wenger C., Zenhausem R., Tauber M.G. – Risk factors for invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematologic malignancies. *Leukemia* 2005; 19:545-50
8. Ascioglu S., Rex J.H., 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
9. Ben De Pauw, Thomas J. Walsh, J. Peter Donnelly, et al. – Revised Definition 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. *CID* 2008, 46:1813-21
10. Herbrecht R., Letscher-Bru V., Oprea C., et al. – Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1898-1906
11. 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 evaluation. *Blood* 2001 March 15; 97(6):1604-1610
12. Pinel C., Fricker-Hidalgo H., Lebeau B., et al. – Detection of circulating Aspergillus fumigatus galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003 May; 41(5):2184-21861