

# Standardne i „non-culture“ laboratorijske metode u medicinskoj mikologiji

*Valentina Arsić Arsenijević*

*Nacionalna referentna laboratorija za uzročnike mikoza; Institut za mikrobiologiju i imunologiju;  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija*

**“DIJAGNOZA GLJIVIČNIH INFEKCIJA – OD UZORKA DO REZULTATA”**

**Edukacija za medicinske sestre i zdravstvene tehničare**

**Crowne Plaza BEOGRAD, 13.03.2015.**

*Laboratorije nisu samo tehnologije, oprema i zgrade,  
to su ljudi i sistem koji rukovodi procesima i  
standardima zbog tačne i pravovremene dijagnoze  
- koja može da sačuva **život** pacijenata -*

*Laboratories are not just technologies, equipment and buildings, they are  
people and system that manage the processes and standards required to  
produce accurate and timely results  
- to save patients life -*

Ridderhat JC Bull WHO 2007; 85:354-9

# Metode i njihova primena u mikologiji

## METODE

Citologija/DMP

Kultura

Imunoeseji

Molekularna

## ZNAČAJ

Terapijski

Potvrdni

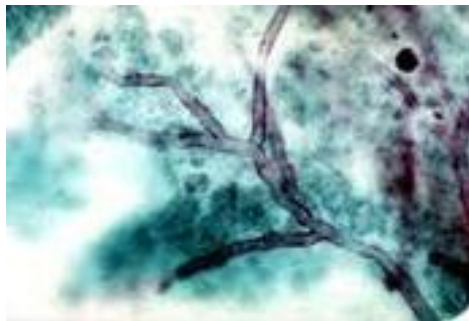
Prognostički

„Screening“



# Standardne metode

## Citologija



### **BRZA, JEFTINA**

Niska senzitivnost

Invazivne procedure uzorkovanja

Neophodan ekspert za detekciju gljiva

Neophodna stručna interpretacija nalaza

## Kultura



### **JEFTINA, ANTIMIKOGRAM IDENTIFIKACIJA**

Spora metoda, niska senzitivnost,

Invazivne procedure uzorkovanja

## Niska senzitivnost i dokazana infekcija

# Standardne metode - citologija

## Gram

Uzorci: svi

Detektuje: kvasnice (Gram+)

## H&E:

Prednost: dobro detektuje zapaljenski odgovor

Nedostatak: loša vizuelizacija gljiva

## KOH (10%, 20% i 30%)

Uzorci: koža, dlaka, nokati

Detektuje: kvasnice i hife plesni

## Gomori methenamin silver (GMS):

Prednost: dobra vizuelizacija gljiva

Gljive: tamno braon – osnova zelena

## Hloral-lakto fenol (HLF)

Uzorci: dlaka

Detektuje: kvasnice i hife plesni

## Periodic acid-Shiff (PAS):

Prednost: dobra vizuelizacija gljiva

Gljive: crvene ili ružičaste – osnova zelena

## Calcofluor white (CFW) i Blankofor

Uzorci : svi

Detektuje: kvasnice i hife plesni /fluorescencija/

## Mucin (mucicarmin):

Prednost: dobra vizuelizacija kapsule gljiva

Kapsula: ružičasta – osnova sivo-roze

## India ink/tus

Uzorci: cerebro-spinalna tečnost (CST)

Detektuje: *Cryptococcus*

## Fontana-Masson:

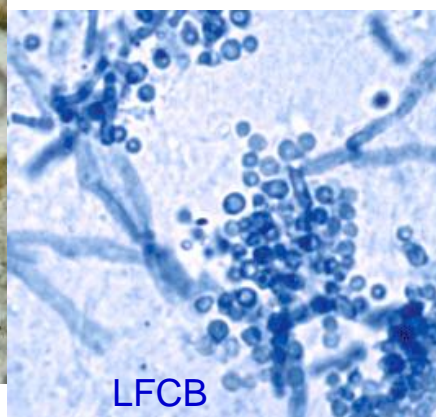
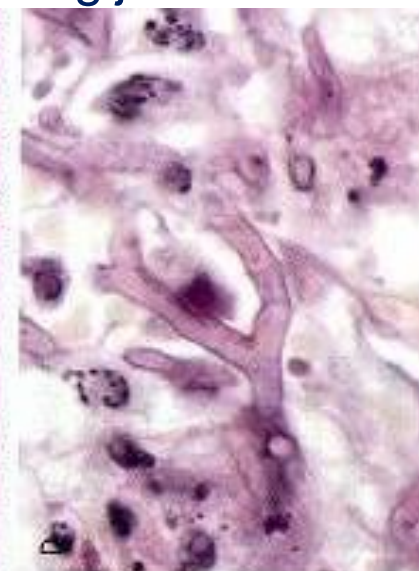
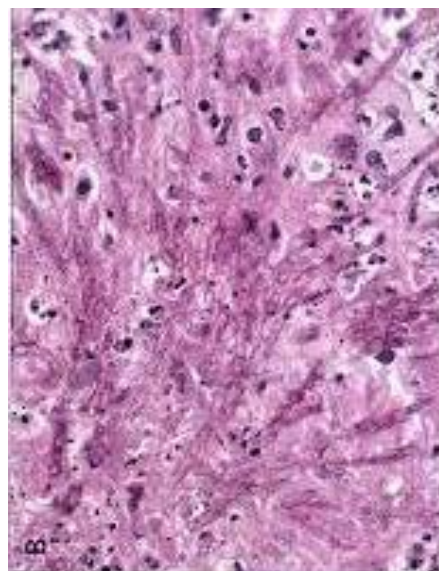
Prednost: dobra vizuelizacija ČZ gljiva i melanina

Gljive/melanin: tamnobraon – osnova svetla

# Standardne metode - citologija

## Histologija

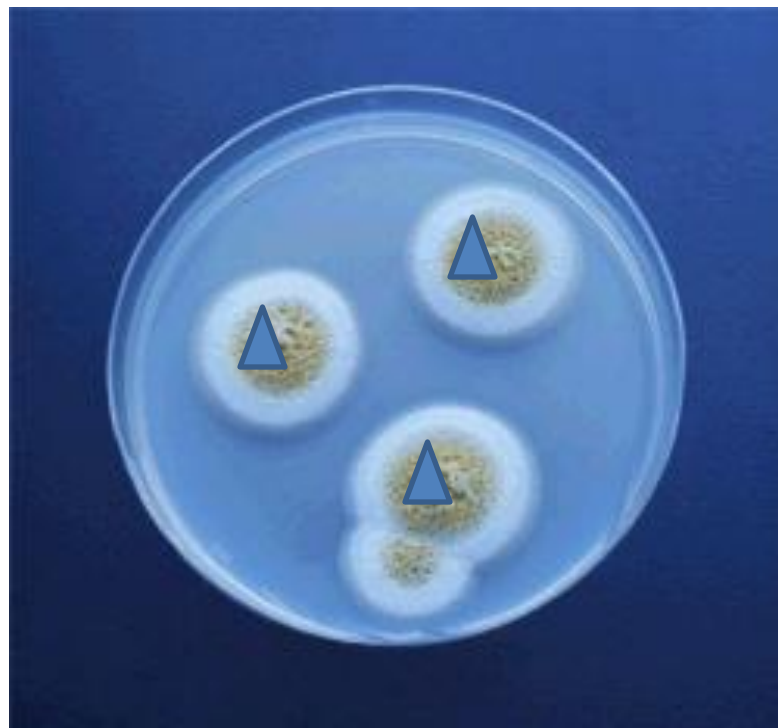
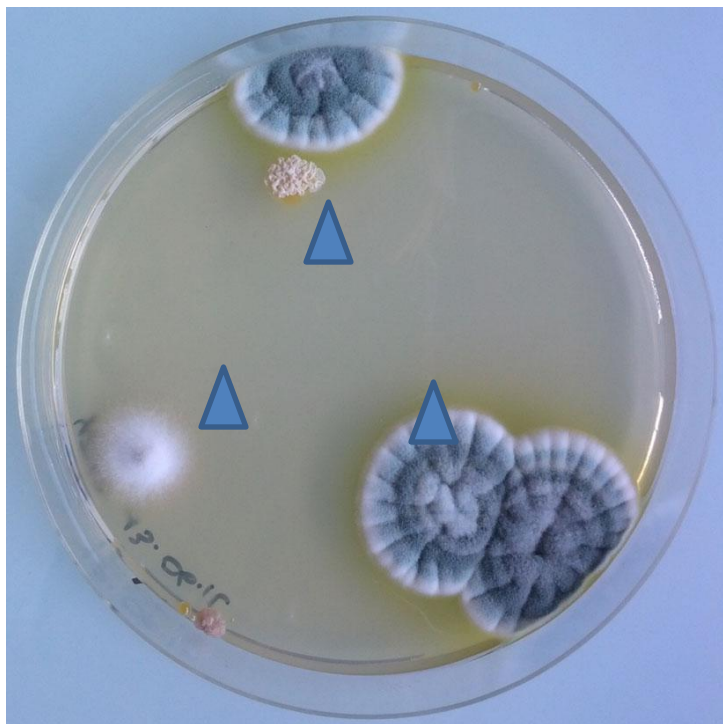
DMP – direktan mikroskopski preparat



# Standardne metode - kultura

- Niska senzitivnosti
- Pozitivan rast - kontaminacija ili uzročnik infekcije?
- **Dokazana infekcija**

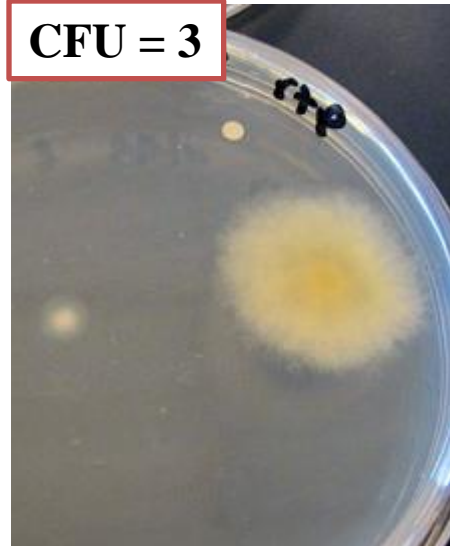
mesto zasejavanja uzorka 



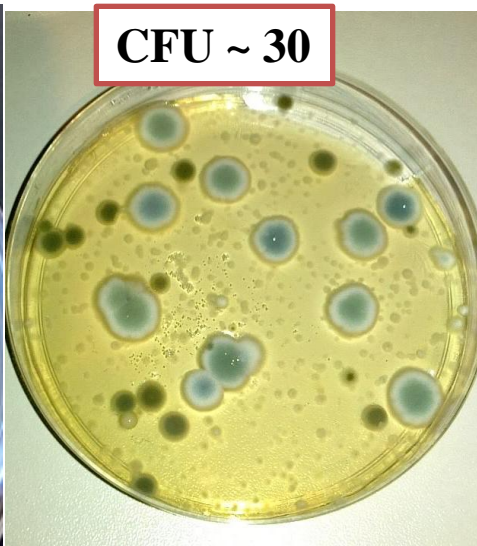


# Standardne metode - kvantitiranje

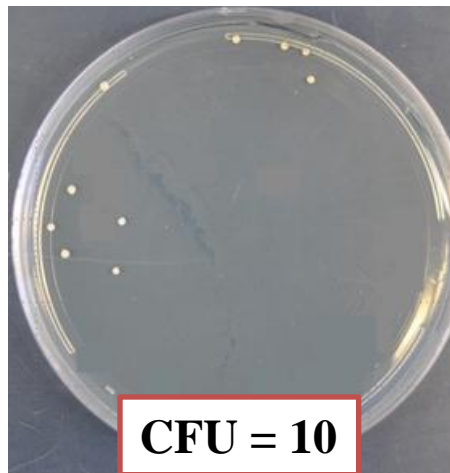
**CFU = 3**



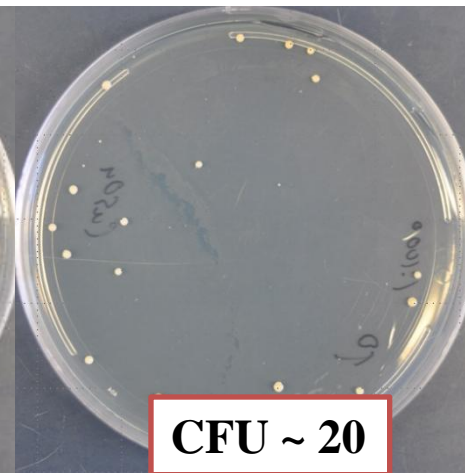
**CFU ~ 30**



**CFU = 10**



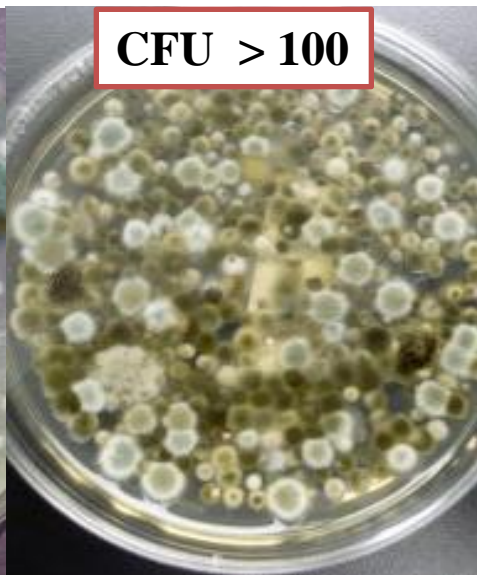
**CFU ~ 20**



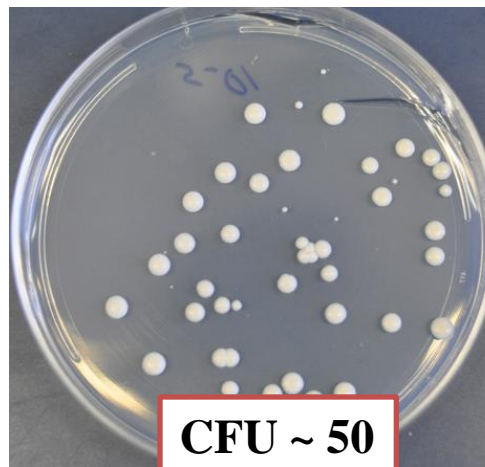
**CFU ~ 50**



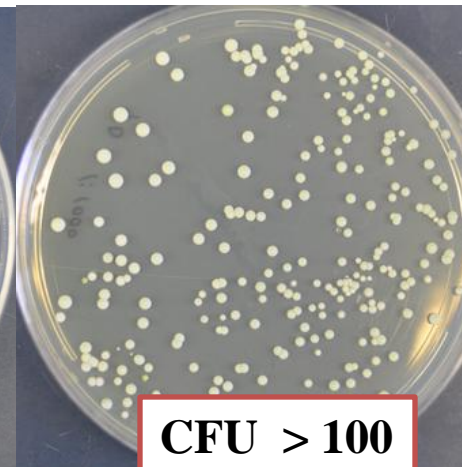
**CFU > 100**



**CFU ~ 50**



**CFU > 100**



# Standardne metode - antimikogram

Ograničen broj antimikotika

Mala selektivnost

Visoka toksičnost

Visoka cena

Rezistencija gljiva

*Candida albicans*



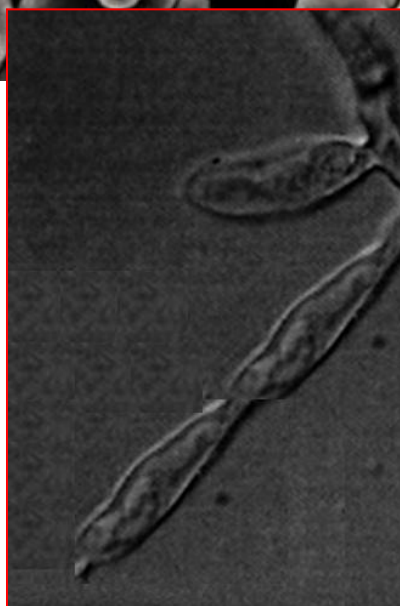
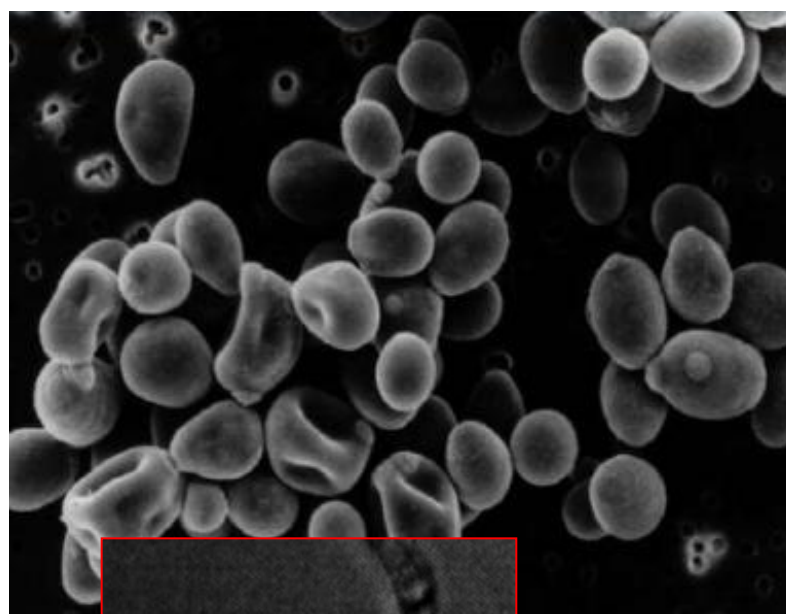
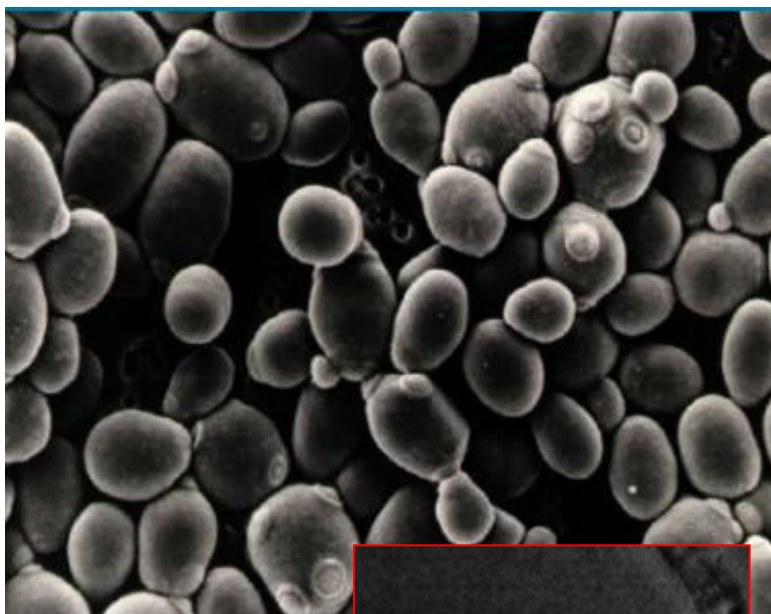
*Aspergillus fumigatus*



# Efekat antimikotika

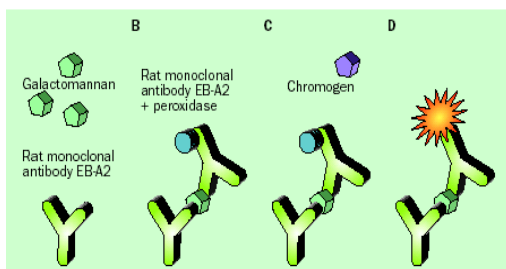
fungistatski

fungicidan



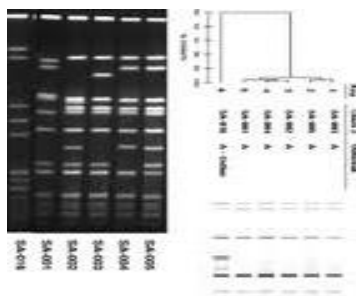
# „Non culture“ metode

Ag/At



**BRZA**  
**VISOKA SENZITIVNOST**  
**VISOKA PPV (At)**  
**VISOKA NPV (Ag)**  
Interpretacija???

PCR



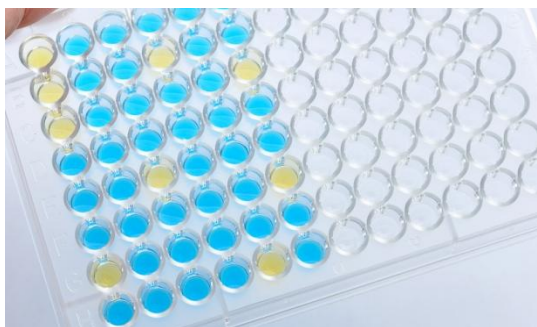
**VISOKA SENZITIVNOST**  
Kontaminacija???  
Interpretacija???  
Invazivno uzorkovanje???

Visoka senzitivnost i verovatna infekcija

# „Non culture“ metode

## Mannan Ag

*Candida At*

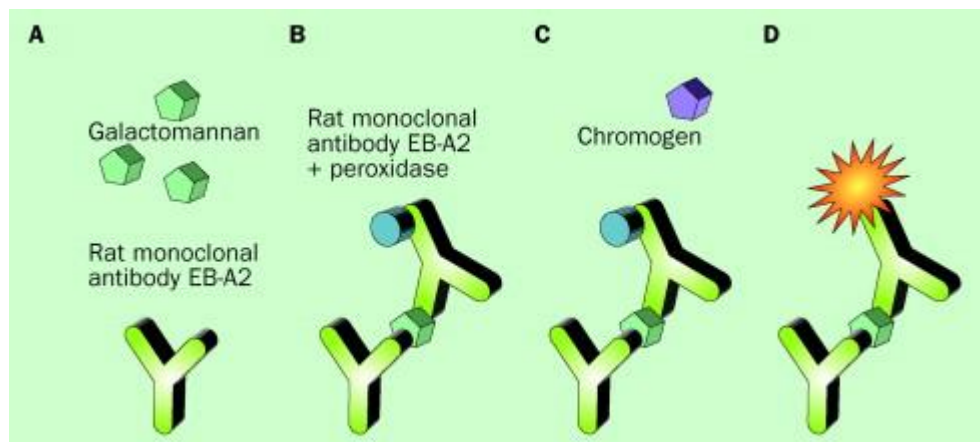


## Glucuroxilomannan Ag

*Cryptococcus*



## Galactomannan Ag za *Aspergillus, Fusarium...*



# Gljive kao patogeni

# Gljive kao patogeni

## POVRŠNE INFEKCIJE

*Koža/sluzokoža, dlaka, nokat*

## INVAZIVNE INFEKCIJE

*Pluća, mozak, jetra, bubreg, krv...*

**visok morbiditet**  
nizak mortalitet

1.7 milijardi ljudi širom sveta

nizak morbiditet  
**visok mortalitet**

1.5 milion smrtnih slučajeva godišnje

# Tackling Human Fungal Infections

FUNGI INFECT BILLIONS OF PEOPLE | – Gordon D. Brown, David W. Denning, Stuart M. Levitz  
of disease is largely unrecognized. Most are “relatively” minor infections, but millions contract diseases that kill at least as many people as tuberculosis or malaria. Although true mortality rates are unknown because of a lack of good epidemiological data, the incidence of

## MEDICAL MYCOLOGY

### Hidden Killers: Human Fungal Infections

Gordon D. Brown,<sup>1\*</sup> David W. Denning,<sup>2\*</sup> Neil A. R. Gow,<sup>1\*</sup> Stuart M. Levitz,<sup>3\*</sup>  
Mihai G. Netea,<sup>4\*</sup> Theodore C. White<sup>5\*</sup>





# Taksonomija

Kingdom - Fungi

Phylum – Ascomycota

Order – Eurotiales

Family – Trichocomaceae

\*Genus – *Aspergillus*

\*Species - *A. fumigatus*

\*Genus i species - italic

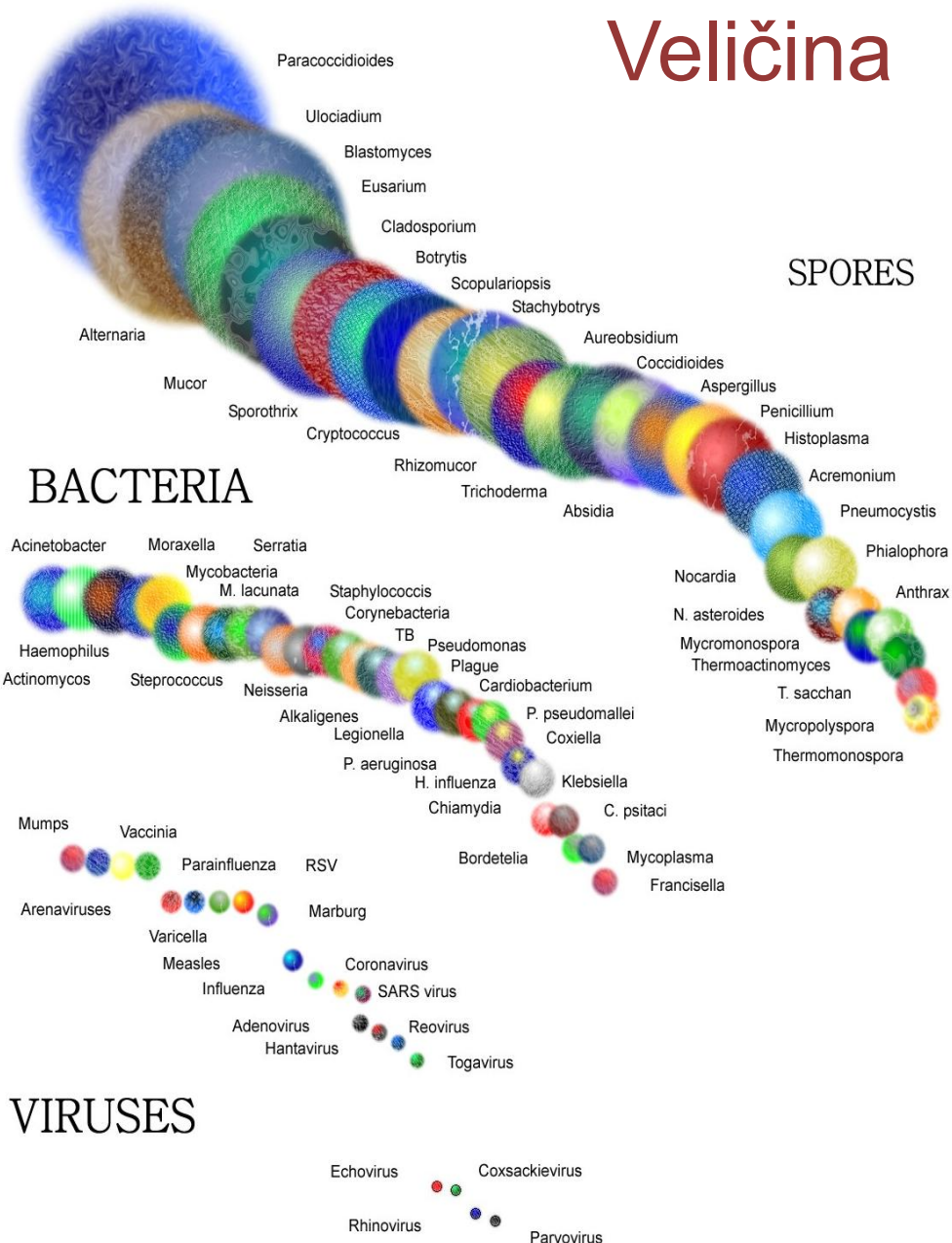
100

## FUNGI

10

1

0.1



# Plesni i okolina



„outdoor“



„indoor“

# Plesni i bolesti



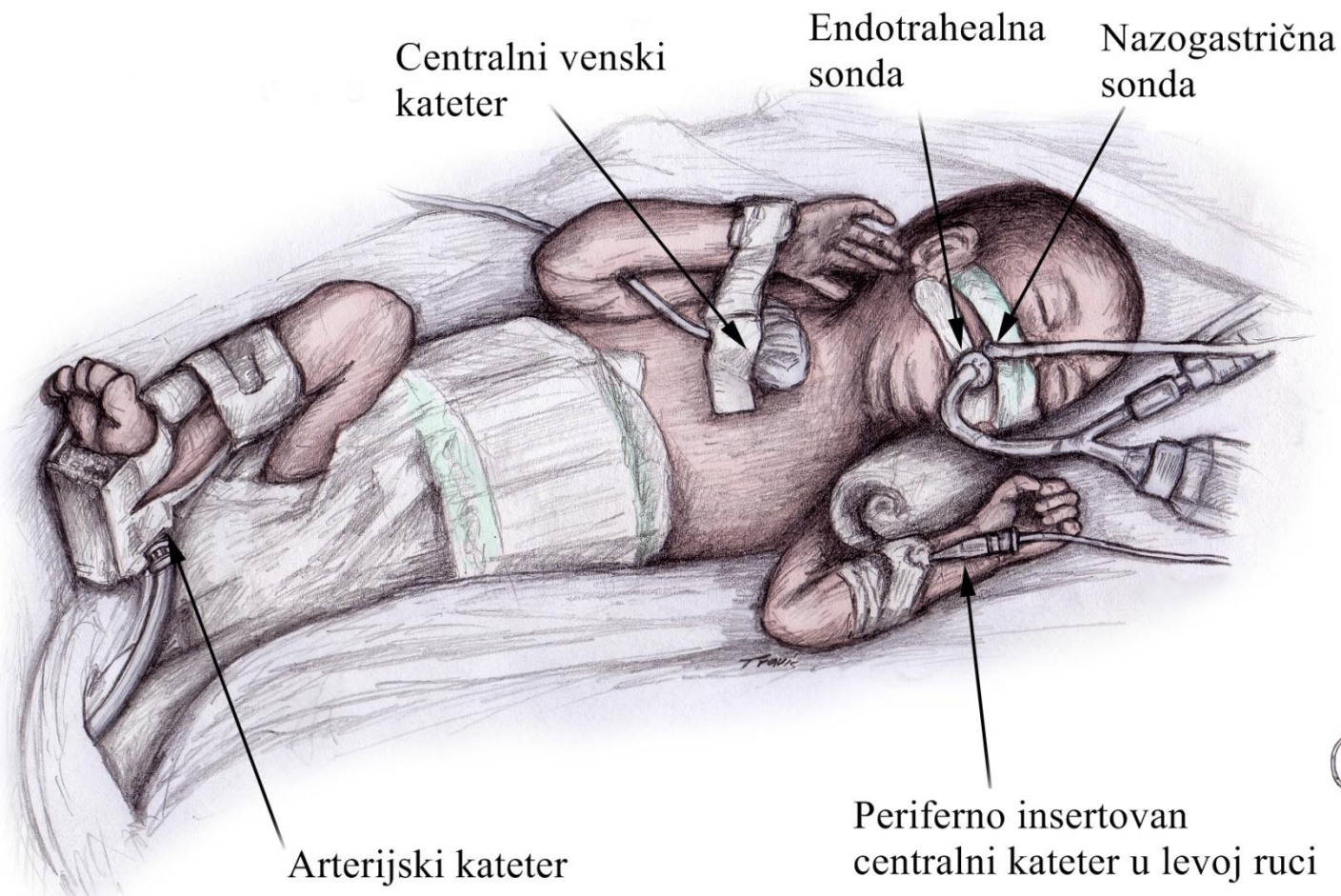
- Nekroza tkiva
- Fulminantni tok
- Visok procenat smrtnosti (80-100%)!!!

# Community acquired fungal infections

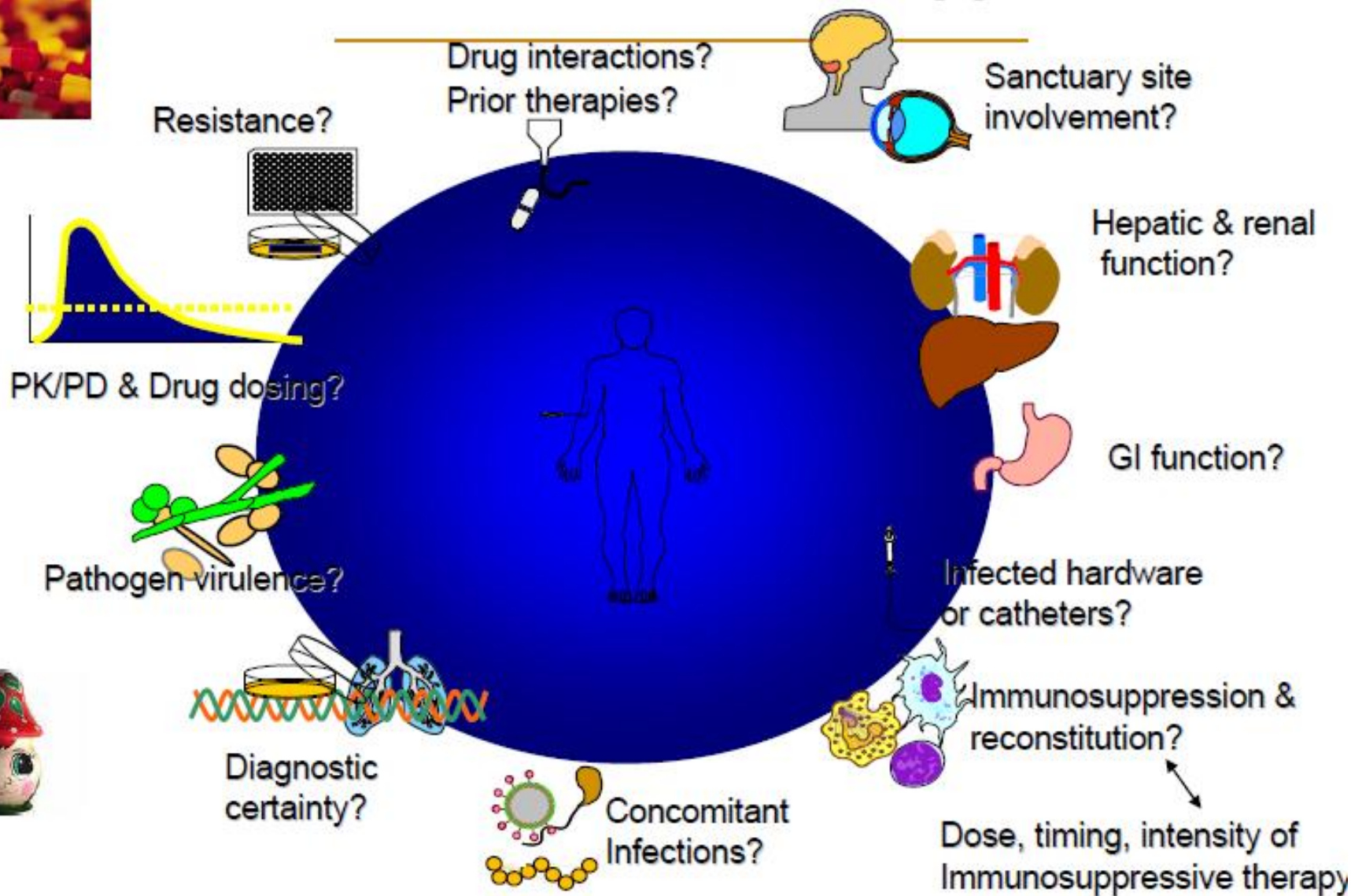


# Hospital acquired fungal infections





Candida biofilm



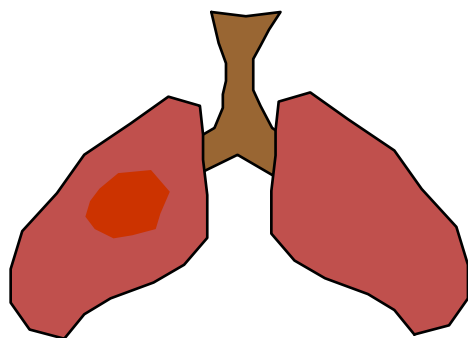
# Interpretacija rezultata

DMP	+	Kultura	+	→	Dokazana gljivična infekcija
DMP	+	Kultura	-	→	Dokazana gljivična infekcija
DMP	-	Kultura	+	→	Dokazana gljivična infekcija Provera kontaminacije
DMP	-	Kultura	-	→	Nije utvrđena gljivična infekcija

- Rešenje:
- 1) Više uzastopnih uzoraka istom metodom
  - 2) Više metoda na istom uzorku

# EORTC/MSG kriterijumi

„Pre-emptive“



GM / MN / BDG /  
At

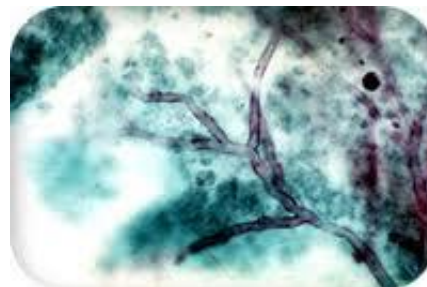
+

PCR

+

Verovatna IGI

Specifična



Citologija

+



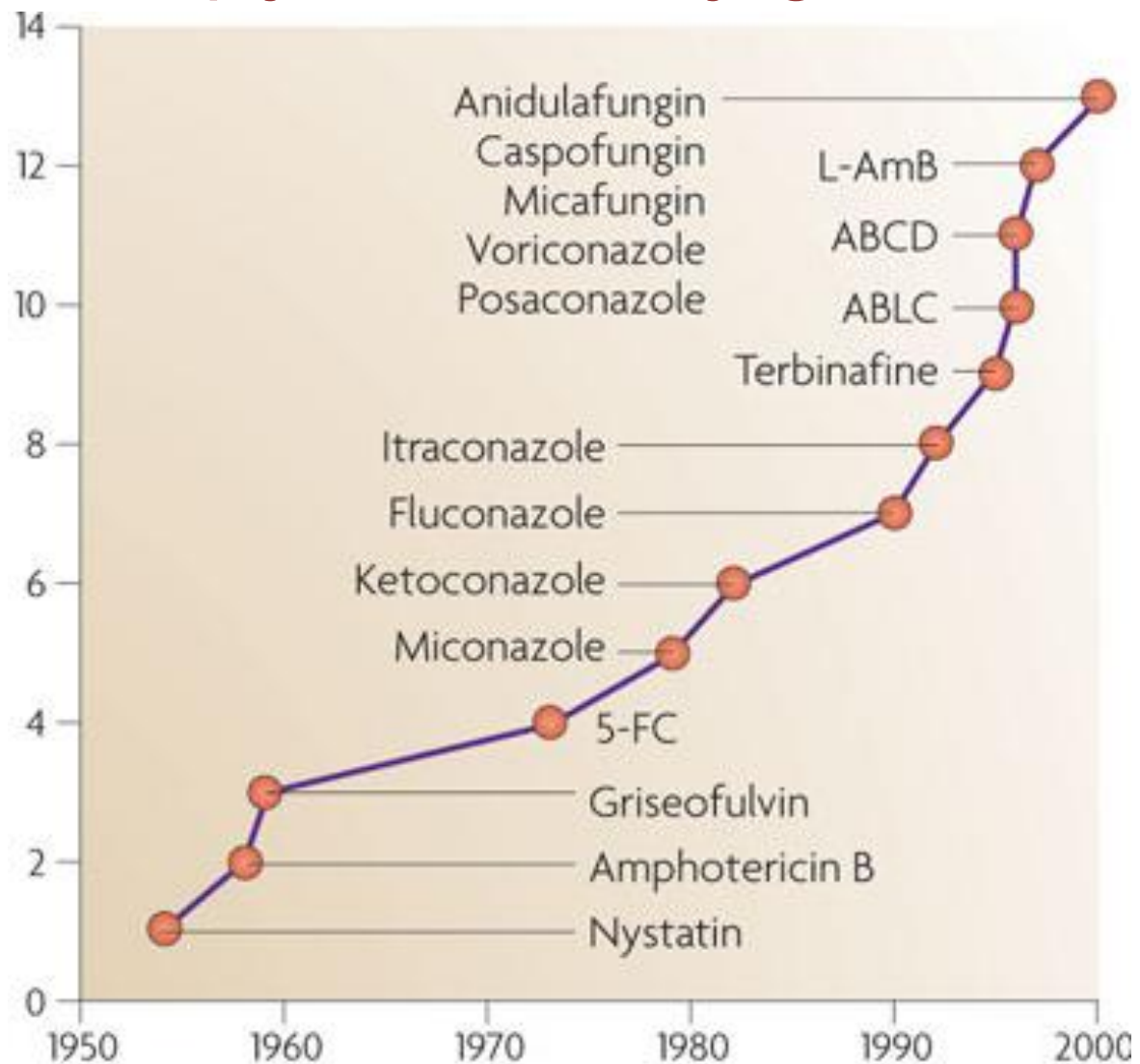
Kulture

+

Dokazana IGI



# Terapija vođena dijagnostikom



# Od uzorka do rezultata

## Kako???

✓ Standardizacija

✓ Validacija

✓ Komercijalizacija

✓ Dostupnost

✓ Jednostavnost

# Pravilno uzorkovanje

Pravo **vreme i pre** primene antigljivične terapije!

Sa pravog **mesta**

Na pravi **način** (izbor tehnike uzimanja)

U **dovoljnoj količini**

Uz aktivno ili pasivno učešće pacijenta

Pod sterilnim uslovima! (kontaminacija)

Koristiti sterilne **posude, medijumi**

Pravilno i jasno **obeležiti**



# Uzorkovanje i vrste uzoraka

**BRISEVI/SCRAPING,  
ASPIRAT VEZIKULE,  
MALI UZORCI TKIVA**



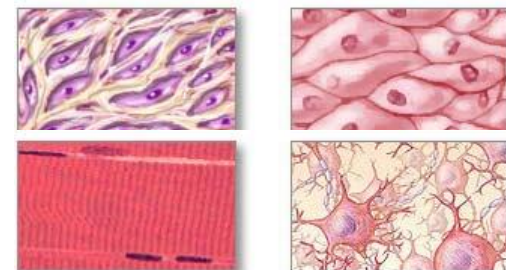
*STAVLJAJU SE  
U EPRUVETE SA  
1-2 mL FR*

**TEČNI UZORCI:  
NEKOAGULISANA KRV,  
URIN, LIKVOR, BAL,  
NAZOFARINGEALNI  
ASPIRAT**



*STAVLJAJU SE U  
STERILNE POSUDE SA  
ZATVARAČEM  
FR NIJE POTREBAN*

**ČVRSTI UZORCI:  
STOLICA I TKIVA**



*STAVLJAJU SE U  
STERILNE POSUDE  
DODAJE SE  
5-10 mL FR*

**TRANSPORT DO LABORATORIJE NA 2-8°C**



0 h

6 h

24h

72 h

7 dana

citologija

biomarkeri

kultura

**PACIJENT**

MIKROBIOLOG nalaz i interpretacija analize

Laboratorijski izveštaj analize

Izdavanje rezultata analize

Kontrola i validacija analize

Rezultat analize

LEKAR  
klinička dijagnoza

Zahtev za analizu

Uzorkovanje

Transport uzorka

Zavođenje uzorka

Izbor analiza i potrebno vreme

**Mikroskopiranje uzorka: citološki nalaz gljiva**

**ELISA ili PCR uzorka: dokazivanje Ag /DNK gljiva**

**Kultivisanje uzorka : izolacija gljiva, identifikacija i osetljivost na antimikotike**

POSTANALITIČKA

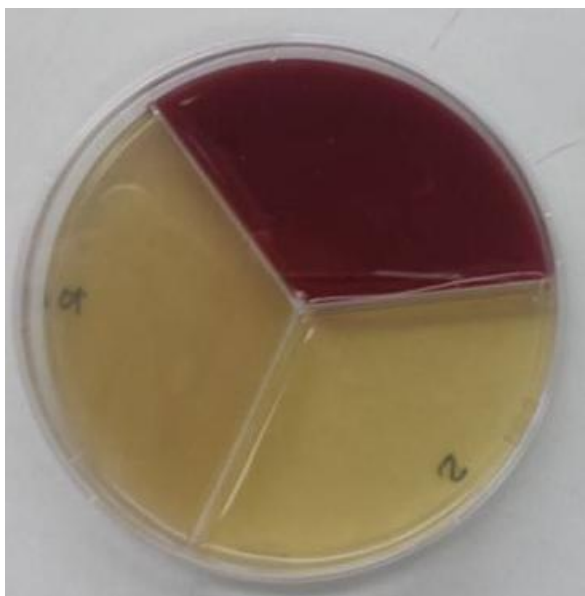
ANALITIČKA

PREANALITIČKA

**FAZE LABORATORIJSKE DIJAGNOZE IGI**

# Mukokutana kandidijaza

- R&D komercijalni *Candida* set:



Uzorkovanje  
Identifikacija  
Osetliivosti



- *Home / Hospital / Laboratory testing kit*
- *Candida* sepsa – HEMOKULTURE (niska senzitivnost)
- *Candida* sepsa – URIN (veća efikasnost od hemokultura)



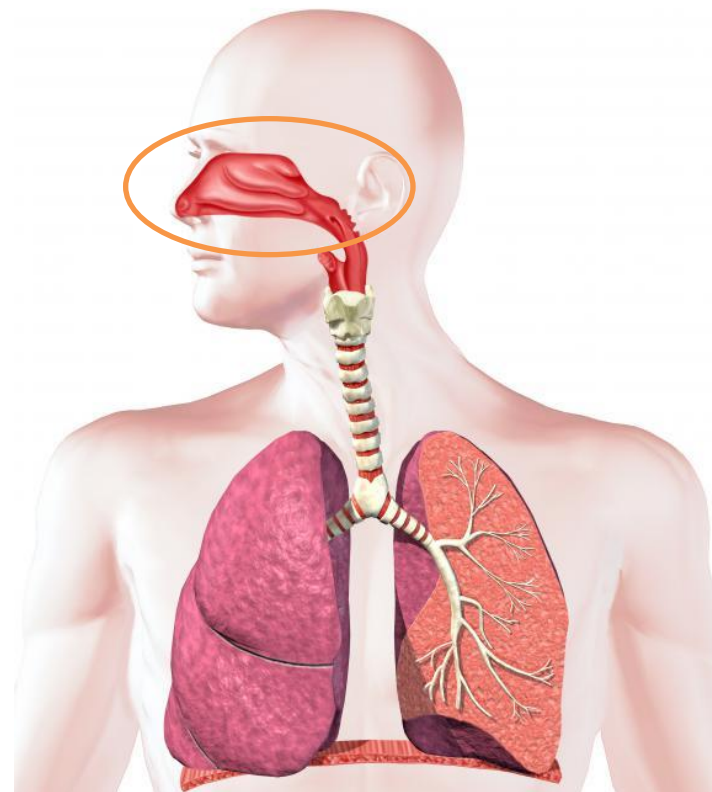
# Gljive u sinusima „skrivena ubice“

Dokazivanje gljiva u sinusima - *indukcija sinonazalnog sekreta*

Unapređenje standardne dijagnostike

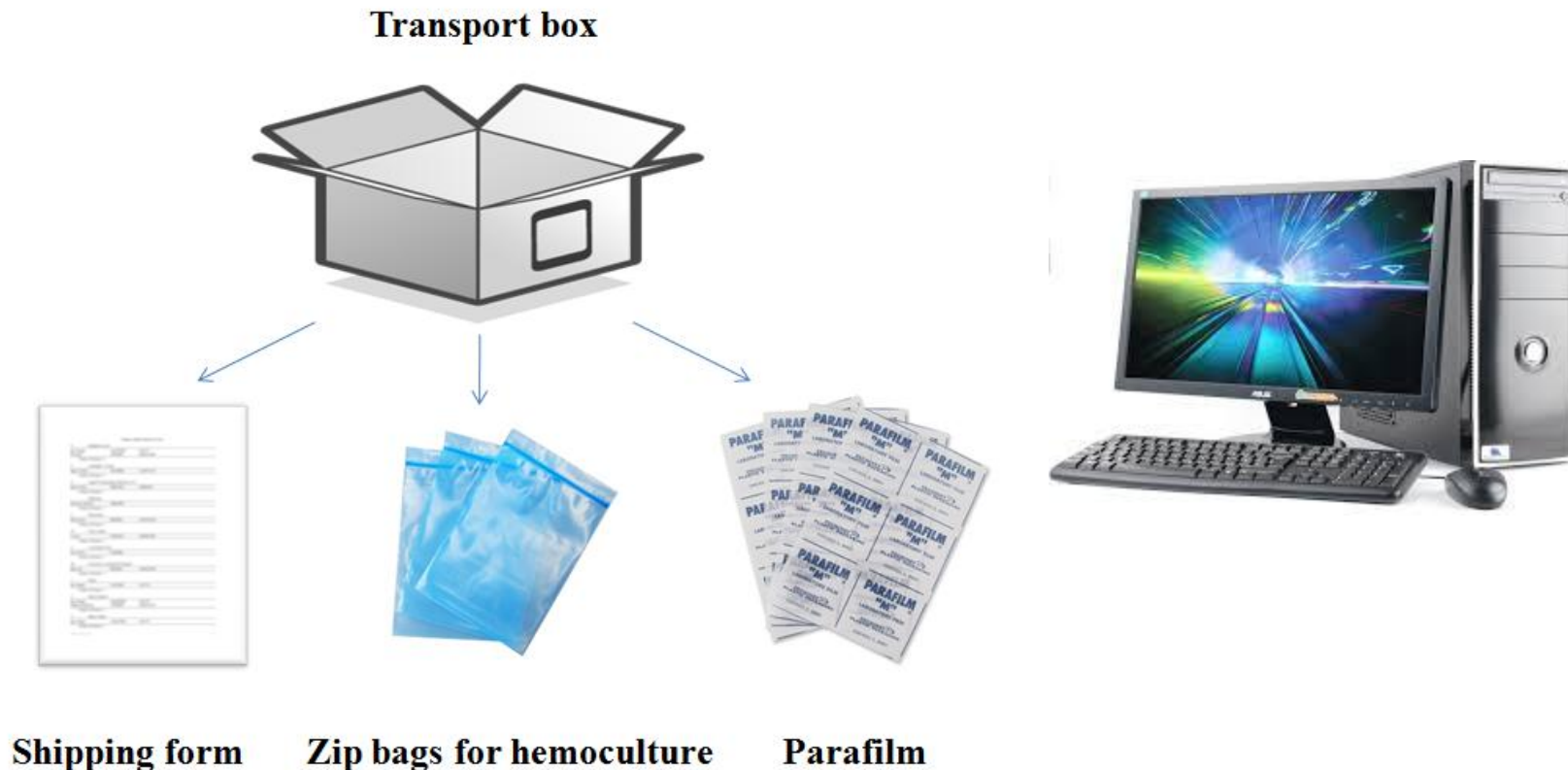
Set za uzorkovanje i detekciju plesni

- Sinusi
- Trahealni aspirat



# Sistem za prikupljanje izolata i kliničko-epidemioloških podataka

- Mycopack sistem & MycoLIS baza





# Od uzorka do rezultata

## Zajedno – zašto???

### **Kombinovanje metoda i/ili praćenje pacijenata**

- ✓ kontrola/„screening“ PGI za prevenciju IGI
- ✓ rana dijagnoza/terapija IGI i redukcija smrtnosti
  - ✓ lokalna epidemiologija “mapa gljiva”
- ✓ Identifikacija pacijenata pod rizikom za IGI