

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Davorin Herceg

**Molekularna dijagnostika bakterijemije i fungemije u bolesnika s
febrilnom neutropenijom i malignom bolesti**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u Klinici za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditeljica rada: prof. dr.sc Vanda Plečko

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc Vandi Plečko na pruženoj podršci i savjetima tijekom izrade rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Stjepku Pleštini, predstojniku Klinike za onkologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb i tvrtki Roche- Hrvatska za pomoć pri nabavci SeptiFast testa.

Zahvaljujem dr.sc. Marku Kraliku i dr.sc. Željku Kušteru na pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem tehničarkama i inježerkama Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb u pomoći kod izrade SeptiFast testa.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Dunji Rogić, predstojnici Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb za pomoć kod izrade upalnih parametara.

Zahvaljujem medicinskim sestrama i tehničarima Klinike za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavoda za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Zagreb na pomoći kod vađenja uzoraka krvi za analizu.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Neutropenijska vrućica (febrilna neutropenija-FN).....	1
1.2. Molekulska dijagnostika bakterijemije.....	8
1.3. Upalni parametri kod dijagnostike neutropenijske vrućice.....	9
1.4. Svrha rada.....	10
2. HIPOTEZE RADA.....	12
3. CILJEVI RADA.....	13
4. METODE I ISPITANICI.....	14
4.1. Ispitanici.....	14
4.2. Molekulska metoda.....	15
4.2.1. Priprema uzorka.....	16
4.2.2. PCR amplifikacija na LightCycler® 2.0 uređaju.....	16
4.2.3. Real time detekcija PCR produkta pomoću hibridizacijskih proba.....	17
4.3. Određivanje upalnih parametara.....	18
4.4. Statističke metode.....	18
5. REZULTATI.....	19
5.1. Usporedba rezultata PCR molekularne dijagnostike infektivnih uzočnika (SeptiFast-a) i rezultata hemokultura.....	21
5.2. Usporedba rezultat pozitivnosti hemokultura i vrijednosti prokalcitonina.....	24
5.3. Usporedba pozitivnosti hemokultura i CRP-a.....	26
5.4. Usporedba CRP-a i pozitivnosti molekulske dijagnostike (SeptiFast-a).....	31

5.5. Usporedba prokalcitonina u ovisnosti o pozitivnom ili negativnom SeptiFast-u.....	32
5.6. Usporedba MASCC indeksa rizika, dobi, upalnih parametra s ishodom bolesti.....	33
5.7. Usporedba MASCC, upalnih parametara s pozitivnosti hemokultura.....	41
6. RASPRAVA.....	50
7. ZAKLJUČCI.....	59
8. SAŽETAK.....	60
9. SUMMARY.....	61
10.LITERATURA.....	62
11. ŽIVOTOPIS.....	70

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Neutropenijska vrućica (febrilna neutropenija-FN)

Studije publicirane još prije 40-tak godina pokazale su da je neutropenija (snižen broj neutrofila) kod bolesnika s malignom bolesti predstavlja značajan rizik za infekciju (1,2). Učestalost i težina infekcije je inverzno proporcionalna broju neutrofila; rizik osobito raste ispod broja neutrofila ispod $1 \times 10^9/l$. Povišena tjelesna temperatura kod neutropeničnih bolesnika je uobičajen znak infekcije. Ukoliko se tjelesna temperatura kod neutropeničnih bolesnika izmjeri jednom oralno iznad $38,3^\circ\text{C}$ ili se mjeri 38°C , ali duže od jednog sata, prema Američkom društvu za infektivne bolesti (*Infectious Diseases Society of America- IDSA*) imamo jedan od kriterija za febrilnu neutropeniju (FN) ili neutropenijsku vrućicu. Drugi obavezni kriterij FN je apsolutni broj neutrofila (*absolute neutrophil count-ANC*) manji od $0,5 \times 10^9/l$ ili varijanta drugog kriterija je: procjena da bi ANC kroz 48 sati trebao pasti na $0,5 \times 10^9/l$ ili manje (3). FN je onkološko hitno stanje, koje zahtijeva hospitalizaciju s ciljem brze obrade i terapije. FN se javlja vrlo često nakon kemoterapije (u više od 80%) kod bolesnika s hematološkim neoplazmama, dok nešto rjeđe kod bolesnika sa solidnim tumorima. Inicijalna obrada bolesnika s FN orijentirana je prema potencijalnim mjestima i uzročnicima infekcije i procjeni rizika razvoja komplikacija. Pretrage inicijalne obrade su krvna slika, laboratorijski testovi jetrene i bubrežne funkcije, elektroliti, saturacija kisika, urin i rendgenogram pluća.

Bolesnici s FN-om mogu biti podijeljeni u grupu visokog ili niskog rizika za razvoj teških komplikacija. Prema široko prihvaćenim IDSA kriterijima (3) bolesnici se dijele u grupu visokog i niskog rizika. Grupom visokog rizika smatraju se bolesnici kod kojih se očekuje nakon kemoterapije protrahirana neutropenija (duže od sedam dana) i "duboka" neutropenija (manje od $0,1 \times 10^9/l$), ili su prisutna klinički teža stanja kao što je hipotenzija, pneumonija, novonastala abdominalna bol, neurološki ispad. Takvi bolesnici imaju indikaciju za hitnu hospitalizaciju. Niskorizični su bolesnici s očekivanim kraćim razdobljima neutropenije (manje

od sedam dana) i nemaju značajnijih komorbiditeta. Najpouzdaniji inicijalni test je MASCC (*Multinational Association of Supportive Care in Cancer*) bodovni sustav. Inicijalno (prije propisivanja antimikrobne terapije) procjenjuje se sedam parametara vidjeti Tablicu 1). Ukoliko bolesnik ima rizični indeks ≥ 21 smatra se da pripada grupi niskog rizika za razvoj komplikacija FN-e ili u grupu povoljnog ishoda FN. (4).

Tablica1 MASCC indeks rizika

Karakteristike bolesnika	bodovi
Bez simptoma ili blagi simptomi	5
Srednje teški simptomi	3
Teški simptomi	0
Bez hipotenzije	5
Nema KOBP	4
Solidni tumor ili hematološka neoplazma bez prethodne	
gljivične infekcije	4
Nema dehidracije	3
Ambulantni bolesnik	3
Dob <60 god	2

Najčešća mjesta infekcije bolesnika s febrilnom neutropenijom su: probavni sustav, koža, pluća, sinusi, uši, perivaginalno i perianalno područje, ingvinalne regije i intravaskularni kateteri. Bakterije su najčešće odgovorne za početak razvoja febrilne neutropenije, dok se kasnije u razvoju febrilne neutropenije izoliraju rezistentne bakterije, kvasnice, gljive i virusi. Najčešće izolirane bakterije su: koagulaza-negativni stafilokoki, *Staphylococcus aureus*, *viridans*, streptokoki, enterokoki, a od Gram negativnih bakterija *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter sp.* i *Pseudomonas aeruginosa*. Herpes simplex virus (HSV), respiratorni sincicijalni virus (RSV), virus parainfluence i influence A i B su također česti inicijalni patogeni. Infekcije *Candida sp.* obično su povezane s oštećenjem sluznica, a *Aspergillus sp.* i druge filamentozne gljive važni su uzočnici morbiditeta i mortaliteta kod febrilne neutropenije (5).

Nakon pregleda bolesnika s febrilnom neutropenijom i inicijalne evaluacije, uzimanje kultura krvi neizostavan je korak u dijagnostici febrilne neutropenije. Obično se uzimaju tri uzorka krvi za kulturu (aerobna, anerobna, fungalna). Ukoliko postoji centralni venski kateter (CVK) neki eksperti preporučuju uzimanje uzoraka krvi za kulturu samo iz CVK, premda je prema

drugima pozitivna prediktivna vrijednost manja za uzorake iz CVK, nego za uzorke iz perifernih vena (6). Prema metaanalizi (7) mala je korist vađenja hemokultura kod bolesnika s CVK; iz dva izvora (CVK i periferija). Prema drugima, teško je postaviti dijagnozu kateterski inducirane infekcije i CLABSI (*central line-associated blood stream infection*) ukoliko nema uzorka i iz periferne vene (3). U slučaju postojanja specifičnih simptoma infekcije, uzimaju se dodatne kulture. Ukoliko je prisutan urinarni kateter ili bolesnik ima simptome povezane s mokraćnim sustavom uzimlje se urinokultura. U slučaju proljeva treba uzeti kulture stolica i učiniti test na *Clostridium difficile*. U slučaju kožnih infekcija treba napraviti kulture aspirata ili bioptata kožnih promjena. U slučaju upale vaskularnog katetera uzimlju se odgovarajući brisevi područja inflamiranog katetera. Viralne se kulture rade u slučaju prisutnosti vezikuloznih ili ulcerirajućih promjena kože i/ili sluznica. Briseve ždrijela ili nazofarinksa treba učiniti u slučaju respiratornih simptoma, a u sezoni gripe i na respiratorne viruse.

Postojeća mikrobiološka dijagnostika u otkrivanju mikrobiološkog uzročnika febriliteta bolesnika s neutropenijom nije dovoljno brza, senzitivna niti specifična. Samo je 30% inicijalnih kultura krvi pozitivno (8,9). Razlozi malog broja pozitivnih inicijalnih hemokultura kod bolesnika s febrilnom neutropenijom i malignom bolesti mogu biti: liza tumora (paraneoplastičke povišene tjelesne temperature), reakcije na lijekove, uključujući i transfuzijske reakcije. Takvi rezultati inicijalnih hemokultura doveli su u liječenju febrilne neutropenije do nužnosti rane empirijske primjene antibiotika širokog spektra. Navedeni terapijski pristup potvrđen je u više kliničkih studija (10,11); pokazalo se da empirijsko liječenje antibioticima širokog spektra neposredno po nastupu febriliteta smanjuje smrtnost. Može se reći da je inicijalna empirijska antibiotska terapija opće prihvaćeni standard liječenja (3).

Odabir inicijalnog antibiotskog liječenja ovisi o kliničkom statusu bolesnika (procjeni rizika nastanka teških komplikacija), kliničkom stanju bolesnika (osobito hemodinamskoj stabilnosti), da li je infekcija nastala u kući ili u bolnici (prethodno hospitalizirani ili ambulantni bolesnik), zatim ovisi o presumpivnim infektivnim uzročnicima, uključujući i rezistentne

bakterije kao što su: beta-laktamaza sintetizirajući Gram-negativni štapići, vankomicin rezistentni enterokoki. Važno je uzeti u obzir i prethodnu kolonizaciju, anamnezu prethodnih infekcija, poglavito onih s meticilin-rezistentnim *Staphylococcus aureus*. U odabiru antibiotika bitna je i potencijalna lokalizacija infekcije. Važno je i odabrati antibiotik koji ima i baktericidno antipseudomonasno djelovanje, imati na pameti eventualne alergije i svakako anticipirati prethodnu antibiotsku profilaksu. Možemo zaključiti da na odabir empirijskog antibiotika za FN utječe mnoštvo čimbenika (3).

Nije stoga neobično da je odabir incijalne ili empirijske antibiotske terapije febrilne neutropenije provjeravan u više randomiziranih kliničkih studija s velikim brojem bolesnika (3). Općenite preporuke temeljene na velikim kliničkim studijama dijele se na dva pristupa. Prvi pristup se temelji na primjeni samo jednog antibiotika od sljedećih antibiotika: karbapenemima (imipenemu/cilastatinu ili meropenemu), piperacilinu/tazobaktamu ili primjeni antipseudomonasnog β -laktamskog cefalosporina (cefepim ili ceftazidim). Drugi pristup se temelji na primjeni kombinacije antibiotika. Provjerene antibiotke kombinacije za febrilnu neutropeniju su: 1. aminoglikozid + antipseudomonasni penicilin sa ili bez beta-laktamznog inhibitora 2. aminoglikozid + antipseudomonasni cefalosporin 3. ciprofloksacin + antipseudomonasni penicilin (12,13). Prema meta-analizi (14), kombinacijska antibiotska terapija β -laktam+aminoglikozid nema prednosti u smanjivanju smrtnosti pred monoterapijom β -laktamskim antibiotikom. I za drugu monoterapiju (karbapenemi, piperacilin/tazobaktam) u studijama se ne ustanovi prednost kombinacijske antibiotske terapije pred navedenom monoterapijom (3). Empirijska primjena vankomicina se ne preporuča osim u posebnim kliničkim situacijama (15). Najveći broj bolesnika alergičnih na penicilin ne reagiraju s alergijskom reakcijom na cefalosporine, no kod bolesnika, koji su anamnestički imali bronhospazam ili alergijsku reakciju s hipotenzijom treba izbjegavati β -laktamske antibiotike i karbapeneme, te dati ciprofloksacin + klindamicin ili aztreonam + vankomicin kao empirijsku terapiju FN.

Niskorizični bolesnici su za peroralnu terapiju kombinacijom ciprofloksacina i klindamicina ili samo ciprofloksacina. U mnogim centrima za nisko rizične bolesnike uobičajena je i terapija

ciprofloksacin+amoksicilin/klavulanska kiselina. Dakako, bolesnici, koji su imali ciprofloksacin u profilaksi, isti treba izbjeći u empirijskoj terapiji. Antibiotička profilaksa s fluorokinolonima indicirana je za visokorizične bolesnike i s očekivanom prolongiranom neutropenijom duže od sedam dana i s $ANC \leq 0.1 \times 10^9/l$ (3).

Prema rezultatima u više centara, ceftazidim više nije pouzdan antibiotik za empirijsku monoterapiju, zbog sve veće rezistencije Gram-negativnih bakterija na njega, ali i rezistencije nekih Gram pozitivnih, kao što su streptokoki, za razliku od cefepima, koji je nakon više studija i provjera zadržan u smjernicama za empirijsku monoterapiju (3).

Odstupanja od prvobitne empirijske terapije ili modifikacije u daljnjem slijedu bolesti temelje se uvijek na kliničkim i mikrobiološkim podacima. Moguće je da se radi o identifikaciji mikrobiološkog patogena ili o otkrivanju mjesta infekcije ili bolesnik postane klinički nestabilan, što zahtijeva promptnu promjenu antibiotske terapije.

U Evropskim smjernicama za primjenu empirijske antibakterijske terapije kod FN (16) istaknuto je da je prisutna sve veća rezistencija bakterija, pa je sve češće standardna empirijska monoterapija sa cefalosporinima ili piperacilinom/tazobaktamom neadekvatna. Problematične su enterobakterije ESBL (*extended-spectrum β -lactamase*) ili *AmpC- β -lactamase-producing*, MDR (*multidrug-resistant*) *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, karbapenem rezistentna *Klebsiella pneumoniae*, vankomicin rezistentni enterokoki (VRE). Autori predlažu eskalacijski i de-eskalacijski protokol. Eskalacijska strategija davanja empirijske monoterapije (cefepim, piperacilin/tazobaktam) bi bila za situacije, gdje je nepoznata kolonizacija s rezistentnim bakterijama, u centrima gdje se rijetko takve izoliraju i za nekomplikirane prezentacije FN što bi bilo adekvatno za većinu *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas aeruginosa* osim ESBL i karbapenemaza producirajućih. De-eskalacijski protokol predviđa vrlo široki inicijalni empirijski izbor antibiotika, u situacijama s poznatom kolonizacijom, prethodnom infekcijom s rezistentnim bakterijama, za situacije u centrima gdje se češće izoliraju takvi ili kod komplicirane prezentacije FN. De-eskalacijski protokol bi trebao riješiti problem MDR-*Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacteriaceae*-ESBL, što znači: rano uvođenje karbapenema ili kolistina + β -laktama ili

antipseudomonasnog β -laktama + aminoglikozida. Rano uvođenje glikopeptida (vankomicin, teikoplanin) ili novijih antibiotika za rezistentne Gram-pozitivne bakterije (linezolid, daptomicin) dolazi u obzir kod hemodinamski nestabilog bolesnika, bolesnika s teškom sepsom ili pneumonijom, kod prethodne kolonizacije s MRSA ili VRE, sumnje na tešku CVK infekciju ili upale kože/potkožja.

Prema IDSA smjernicama (3) modifikacije incijalne empirijske terapije mogu biti razmotrene kod bolesnika s rizikom za infekciju s rezistentnim sojem, pogotovo ukoliko je bolesnik nestabilan. Za MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*) predlaže se rano uvođenje vankomicina, linezolida ili daptomicina. Za vankomicin rezistentni enterokok (VRE) dodavanje linezolida ili daptomicina, za ESBL korištenje karbapenema i za karbapenemaza producirajuću *Klebsiella pneumoniae* (KPC) kolistin ili tigeciklin.

Bolesnici s febrilnom neutropenijom imaju značajan rizik od razvoja invazivne gljivične infekcije.

Pokazano je da će 20% bolesnika s prolongiranom neutropenijom razviti neku od invazivnih fungalnih infekcija (17). Pokazalo se i da kliničko praćenje uz uzimanje kultura nema zadovoljavajuću senzitivnost za rano otkrivanje gljivičnih infekcija (18,19). Takva iskustva etablirali su još 70-tih i 80-tih godina praksu da se i antifungik primjeni empirijski, ukoliko febrilitet perzistira 4-7 dana usprkos primjene antibiotika ili se profilaktički u neutropeničnim primijenjivao flukonazol.

Profilaktička primjena flukonazola uspjela je smanjiti broj invazivnih kandidijaza, ali ne i ostalih flukonazol-rezistentnih vrsta kao što su *Candida glabrata* i *Candida krusei* (20). U slučaju prolongiranog febrilnog stanja i neutropenije, ukoliko je netko već profilaktički dobio flukonazol, amfotericin B dezoksikolat bi bio jedan od mogućih empirijskih terapijskih izbora. Ostale varijante amfotericina B su amfotericin B koloidna disperzija i amfotericin B lipidni kompleks i liposomalni amfotericin B. Za niti jednu od alternative nema dokaza o boljoj efikasnosti. Liposomalni amfotericin B zbog povoljnijeg profila nuspojava ima prednost pred konvencionalnih oblika amfotericina B (21). Parenteralna primjena itrakonazola ima također manje nuspojava od konvencionalnog amfotericina B i zadovoljavajući terapijski efekt (22).

Uspoređivan je i vorikonazol s liposomalnim amfotericinom B, ali se pokazao u empirijskoj primjeni manje efikasnim od liposomalnog amfotericina B, makar ga mnogi stručnjaci smatraju primjenjivim u empirijskoj situaciji (23). Ehinokandin kaspofungin efikasan je u liječenju *Candida* i *Aspergillus* sp., nesigurne je efikasnosti za oportunističke gljivice, no u randomiziranoj kliničkoj studiji, koja je uspoređivala kaspofungin i liposomalni amfotericin B u empirijskoj primjeni, bolji rezultati su bili za kaspofungin, uz signifikantno manju toksičnost (24).

Galaktomannan test može pomoći u dijagnostici plijesni. U metaanalizi (25) senzitivnost testa je između 70-82%, ali zato test ima dijagnostičku dobru pozitivnu prediktivnu vrijednost. Test otkriva većinu relevantnih fungalnih patogena, kao što su *Candida species*, *Aspergillus species*, *Pneumocystis species* i *Fusarium species*, ali ne otkriva zigomicete *Cryptococcus* sp.

U situacijama protražiranog febriliteta u neutropeniji (4-7 dana) indicirano je učiniti CT pluća i sinusa. Nalaz makronodula sa ili bez halo-znaka su tipični znakovi invazivne aspergiloze u neutropeniji.

Ukoliko nema dijagnosticiranog mjesta infekcije ili nije izoliran infektivni uzročnik, uobičajena je primjena empirijske antibiotske febrilne neutropenije sve do oporavka ANC iznad $0,5 \times 10^9/l$ i nakon što je bolesnik kroz 24 sata afebrilan i klinički dobrog statusa. U drugačijem slučaju antibiotska terapija se nastavlja ovisno o vrsti patogena ili pak mjestu infekcije (3).

Trajanje empirijske antibiotske terapije kod klinički ili mikrobiološki dokumentirane infekcije ovisno je o pojedinoj vrsti patogena ili o mjestu infekcije, za ostale situacije može se reći da traje tako dugo dok je bolesnik u neutropeniji, sve dok ANC ne bude $\geq 0,5 \times 10^9/l$ (3).

Iz svega dosad navedenog može se zaključiti da je empirijska primjena antibiotika složen zadatak, katakad s neizvjesnim ishodom, pa je stoga nužna ranija mikrobiološka karakterizacija febrilne neutropenije, što se sadašnjim standardnim metodama ne postiže u zadovoljavajućoj frekvenciji.

1.2. Molekulska dijagnostika bakterijemije

Najrazvijenija molekulska dijagnostička tehnika za dijagnostiku infektivnih bolesti je PCR tehnika. PCR (*polymerase chain reaction*) odnosno lančana reakcija polimerazom je reakcija kojom se kratki ostsječak DNA umnožava u veliki broj indentičnih kopija. Unaprijed je poznata sekvenca tzv. oligonukleotidnih *primer-a* odnosno početnica, koji se hibridiziraju na ciljnu sekvencu nakon početne denaturacije DNA. Ciljna DNA se kopira pomoću DNA polimeraze u višestrukim ciklusima grijanja i hlađenja na vrlo preciznim temperaturama i duljinama ciklusa u termocikleru. Tako se odvijaju mnogostruki cikusi denaturiranja, prijanjanja (hibridizacije) i produžavanja DNA. Ciljna se DNA umnožava (amplificira) eksponencijalno. Zadnjih desetljeća razvijaju se modifikacije PCR. Multiplex PCR koristi simultano više *primer-a* za detekciju više različitih ciljeva. U slučaju značajnijeg broja fragmenata može se koristiti fluorescentno markiranje primera te razdvajanje PCR produkata u postupku automatskog sekvenciranja. Značajni napredak u PCR tehnologiji bilo je uvođenje PCR-a u realnom vremenu. Fluorescirajuće probe emitiraju fluorescentni signal za vrijeme svakog ciklusa amplifikacije samo u prisustvu ciljne sekvence, s jačinom signala koji je proporcionalna količini amplificiranog produkta. Više je specifičnih PCR testova za pojedinačne aplikacije uspješno priskrbiti opće prihvaćanje i odobrenje američke zdravstvene administracije (US Food and Drug Administration). Eksperimentalni rad temelji se uglavnom na korištenju sekvence 16S rRNA gena, koji je ekskluzivan samo za bakterije. Tako se u urgentnim situacijama može odmah potvrditi bakterijska infekcija. 16S rRNA gen ima i hipervarijabilnu regiju, koja je species specifična te zato može koristiti za identifikaciju različitih bakterija. *Multiplex real-time* PCR test za brzu identifikaciju razvijaju se i komercijalno (26). SeptiFast je upravo takav komercijalni test. On sadrži 25 različitih početnica (*primer-a*) za ciljne sekvence koje su locirane između 16S i 23S ribosomalne DNA bakterija i između 18S i 5.8S ribosomalnih sekvenci gljiva (27) (vidjeti Tablicu 2). SeptiFast je evaluiran u više radova i kod bolesnika s FN i hematološkom malignom bolesti kod odraslih (28-34), te u dva rada i kod djece (35,36). U usporedbi sa standardnom hemokulturom osjetljivost SeptiFasta u nekim je radovima

usporediva sa standardom, kod nekih je radova osjetljivost slabija od hemokultura; rezultati radova nisu sasvim konzistentni. No u većini se radova zaključuje da SeptiFast može biti kod FN značajna pomoćna metoda u dijagnostici mikrobioloških patogena.

Tablica 2 Mikroorganizmi detektibilni s LyghtCycler SeptiFast Multiplex PCR-om

Gramm negativni	Gramm pozitivni	Gljive
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	koagulaza negativni stafilocoki ¹	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marscescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	<i>Streptococcus spp.</i> ²	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

¹Koagulaza negativni stafilocoki (CoNS) detektibilni sa *SeptiFast-om*: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saprophyticus* i *S. xylosum*

²Streptokoki detektibilni sa *SeptiFastom*: *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. constellatus*, *S. cristatus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis* i *S. viridans*.

1.3. Upalni parametri kod dijagnostike neutropenijske vrućice

Studije na neutropeničnim bolesnicima s neoplazmama, koje su ispitivale upotrebu upalnih parametara (C-reaktivni protein, prokalcitonin, inteleukin 6 i 8) pokazale su se nekonzistentima (37,38). Prokalcitonin (PCT) se sve više koristi kao pokazatelj sistemskog odgovora na infekciju (39). Recentne meta-analize upućuju da je PCT bolji od C-reaktivnog proteina (CRP) u razlikovanju infekcija od drugih uzroka upale kod bolesnika u intenzivnoj skrbi. Kod bolesnika s FN pokazano je da vrijednosti PCT manje od 0,5 ng/ml ne upućuju na febrilitet povezan s infekcijom. Vrijednosti PCT-a između 0,5-1,0 ng/ml upućuju na

lokaliziranu ili nekompliciranu sustavnu infekciju, dok vrijednosti između 1,0-2 ng/ml izrazito sugeriraju bakterijemiju ili tešku fungalnu infekciju. Prema nekim radovima povećanje PCT može se uočiti i 24 sata nakon početka FN pogotvo kod suspektne gljivične ili virusne infekcije za razliku od CRP-a, koji se povisuje 24 sata prije kliničkog događaja, što bi značilo da je prokalcitonin nepodesan za ranu dijagnozu bakterijske infekcije, odnosno da dolazi do povišenja vrijednosti 32 sata nakon početka povišene temperature (40). Metaanaliza (40), koja je analizirala 30 studija i odnosila se na bolesnike s FN, pokazala je da bi prokalcitonin mogao imati dijagnostičku i prognostičku kod FN. Doduše, manjkavosti metaanalize je da su uključene studije s malim brojem bolesnika i s heterogenom populacijom, također nije bilo jasno definiranih standarda u analizi.

1.4. Svrha rada

Febrilna neutropenija je najčešće hitno stanje u onkologiji. Antimikrobno liječenje FN temelji se na empirijskoj primjeni antibiotika, jer je standardna mikrobiološka dijagnostika (hemokulture) uspješna u identifikaciji infektivnog uzročnika tek u 30% bolesnika. Odabir empirijskog antibiotikskog liječenje FN ovisi o mnoštvu čimbenika, tako da bi od ključnog značenja bilo poboljšanje mikrobiološke dijagnostike.

Dosadašnji znanstveni naponi nisu uspjeli dokazati dijagnostički doprinos molekularnih metoda kod indentifikacije infektivnih uzročnika FN, odnosno potvrditi molekularnu metodu kao zamjenu standardne metode. Svrha rada je istražiti upotrebu SeptiFast-a, komercijalno dostupne *multiplex real-time PCR* metode kod bolesnika s FN.

Drugi važni problem je incijalna procjena bolesnika s FN, odnosno podjela bolesnika u skupinu s visokim rizikom za razvoj komplikacija FN i skupinu s niskim rizikom. Prva zahtijeva hospitalizaciju, parenteralnu antibiotsku terapiju i temeljito kliničko motrenje, a druga skupina se liječi u kućnim uvjetima s peroralnim antibioticima. U radu se stoga, istražuje i upotreba upalnog parametra prokalcitonina i njegov utjecaj na MASCC, najšire

prihvaćeni bodovni sustav za raspodjelu bolesnika s FN u skupine prema riziku za razvoj komplikacija FN.

2. HIPOTEZE RADA

1. Molekularna dijagnostika infektivnih uzročnika iz krvi kod inicijalne obrade FN (prije primjene empirijske antibiotske terapije) ima veću osjetljivost nego standardne mikrobiološke metode (hemokultura)
2. Indeks rizika MASCC score ≥ 21 povezan je s povoljnim ishodom FN (FN bez teške komplikacije).

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

1. usporediti rezultate PCR molekularne dijagnostike infektivnih uzočnika i rezultate hemokultura kod febrilne neutropenije
2. određivanje prediktivnih kliničkih čimbenika za nepovoljan ishod FN kod inicijalne obrade bolesnika

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. izračunati osjetljivost, specifičnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost molekularne dijagnostike infektivnih uzročnika febrilne neutropenije u odnosu na "zlatni standard" hemokulture
2. usporediti rezultate PCR molekularne dijagnostike infektivnih uzočnika i rezultata hemokultura s rezultatima prokalcitonina i C-reaktivnog proteina (CRP)
3. izračunati osjetljivost, specifičnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost MASCC indeksa rizika za nisko rizične i visoko rizične bolesnike s FN u odnosu na ishod FN
4. provjeriti povezanost MASCC indeksa rizika i vrijednosti prokalcitonina i vrijednosti CRP
5. ispitati da li modificirani MASCC indeks rizika, koji u obzir uzima prokalcitonin povećava točnost svrstavanja bolesnika u grupu niskog rizika u odnosu na originalni MASCC indeks rizika u odnosu na ishod FN
6. na temelju rezultata izraditi algoritam mikrobiološke dijagnostike bolesnika s FN niskog i visokog rizika za razvoj komplikacija

4. METODE I ISPITANICI

4.1. Ispitanici

U ovo prospektivno istraživanje bili su uključeni bolesnici stariji od 18 godina hospitalizirani zbog febrilne neutropenije u Klinici za onkologiju i Zavodu za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti KBC-a Zagreb.

Bilo je uključeno 50 bolesnika.

Uključni kriteriji istraživanja su:

1. febrilna neutropenija (FN) definirana na sljedeći način:
 - a) vrućica definirana na sljedeći način: povišena tjelesna temperatura izmjerena jednom oralno više od 38,3°C ili više od 38°C duže od jednog sata
 - b) neutropenija definirana apsolutnim brojem neutrofila manjim od $0,5 \times 10^9/l$ ili ANC manji od $1,0 \times 10^9/l$ s predmnijevanim padom broja neutrofila na vrijednosti manje od $0,5 \times 10^9/l$ u vremenu od 48 sati.
2. bolesnici su dobili kemoterapiju prije epizode FN zbog maligne bolesti

Istraživanje je neintervencijsko u dijagnostičkom i terapijskom smislu; bolesnici se dijagnostički obrađuju prema lokalnim smjernicama i odlukama ordinirajućeg liječnika neovisno o ovom istraživanju. Bolesnici dobivaju empirijsku antibiotsku i ostalu potpurnu terapiju uključujući čimbenike rasta granulocita prema lokalnim smjernicama, koja su temeljena na smjernicama: NCCN-a (*National Comprehensive Cancer Network*) i IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) (3) i smjernicama ESMO-a (*European Society for Medical Oncology*) (39).

Zavisna varijabla u istraživanju je ishod svake epizode febrilne neutropenije. Ishod svake epizode FN može biti:

- a) povoljan: FN bez komplikacija
- b) nepovoljan: FN sa sepsom i/ili s teškim komplikacijama ili sa smrtnim ishodom

Teške komplikacije FN definiraju se kao:

1. hipotenzija s arterijskim tlakom manjim od 90 mmHg ili potrebom za inotropnom potporom za održavanje arterijskog tlaka
2. respiratorna insuficijencija: parcijalni tlak kisika (pO_2) manji od 60 mmHg ili potreba za mehaničkom ventilacijom
3. potreba za liječenjem u Jedinici intenzivne skrbi
4. diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK)
5. kvantitativni ili kvalitativni poremećaj svijesti
6. kongestivno srčano zatajivanje potvrđeno radiološki i s potrebom za adekvatnom terapijom
7. krvarenje s potrebom za transfuzijskom nadoknadom eritrocita
8. aritmija koja zahtijeva adekvatnu terapiju
9. renalna insuficijencija koja zahtijeva dijagnostičku ili terapijsku intervenciju
10. ostale komplikacije koje se po procjeni istraživača ocijene kao teške

Na našem uzorku bolesnika ispituje se uporabljivost MASCC indeks rizika u procjeni ishoda FN. MASCC indeks rizika određuje se kod inicijalne kliničke evaluacije FN, prije uvođenja empirijske antibiotske terapije. Maksimalni broj bodova indeksa je 26, a bolesnik koji ima indeks rizika ≥ 21 smatra se nisko rizičnim bolesnikom za razvoj komplikacija FN (4).

4.2. Molekulska metoda

LyghtCycler SeptiFast Multiplex PCR se izvodio u nekoliko koraka prema autorima Lehman i sur. (27)

1. mehanička liza i purifikacija DNA
2. *real-time* amplifikacija ciljne DNA u tri paralelne reakcije za Gramm pozitivne bakterije, Gramm negativne bakterije i gljive i zatim detekcija PCR produkta pomoću specifičnih hibridizacijskih proba
3. automatska identifikacija *species*-a i kontrola

4.2.1. Priprema uzorka

Uzorak 3 ml pune krvi mehanički se lizirao u tzv. MagNALyzeru[®] uređaju tvrtke Roche, Mannheim, Njemačka u vremenu 30s na 6.500 rpm. Nakon lize, bakterijska DNA se pripremala u *SeptiFast Prep Kit Mgrade*, također proizvođača Roche na sljedeći način: prethodno spomenuti lizat se inkubirao na 56°C kroz 15 min, te se nježno dodala proteaza i litički pufer (50% guanidine tiocijanat, 20% Triton X-100, 2%-tna proteinaza K). Time se dobije nukleinska kiselina i štiti DNA od DNA-aza, koje su prisutne u punoj krvi. Kontrola (IC; 10µl) se stavlja u svaki uzorak s litički puferom. IC je zapravo mješavina sintetičke DNA s dvostrukom uzvojnicom i začetnice, koja ima identično vezno mjesto, kao i ciljna sekvenca, ali ima razliku za hibridizacijsko vezno mjesto, što omogućuje diferencijaciju amplificirane IC i ciljnog (target-specifičnog) amplikona. Nakon što se dodao vezajući pufer, mikstura se stavila na spin (rotirajuću) kolumnu sa staklenom kapilaram (1,900g) kroz 3 min. Humana genomska DNA i bakterijska/fungalna ciljna DNA se tada adsorbiraju na površinu staklene kapilare. Nevezane tvari (soli, protein, dijelovi stanica) su se uklanjali postupkom ispiranja (4,200g) kroz 2 min i s 1,800 ml inhibitornog pufera za uklanjanje. Inhibitorni pufer sadrži 50% guanidine tiocijanat, 40% etanol, Tris-HCL puffer. Slijedilo je ispiranje (4,200g) kroz 10 min s puferom za ispiranje, koji sadrži 0.2% NaCl, 80% etanol, Tris-HCL puffer. Adsorbirane nukleinske kiseline su zatim eluirane s kolumne nakon inkubacije kroz 5 min u elucijskim pregrijanim (70°C) puferom. Na kraju se eluat centrifugirao na 4,200h kroz 2 min.

4.2.2. PCR amplifikacija na *LightCycler*[®] 2.0 uređaju

Eluat je išao u tri paralelne PCR reakcije pomoću *LightCycler*[®] *SeptiFast Kit Mgrade*. Tri uzroka, svaki 50 µl se dodao u tzv. *master mix*, te se sve zajedno stavlja u kapilare *LightCycler*-a. Ciljna DNA se amplificirala u tri paralelne reakcije pomoću tzv. *Hot start Taq-Polymerase*. Sekvence *Gramm* negativnih, *Gramm* pozitivnih bakterija i gljiva su amplificirane u odgovarajućim kapilarama prema listi, koja je navedena u Tablici 2. Za

detekciju bakterija i gljiva kao specifična meta koristila se, kako je i najčešće, tzv ITS (*internal transcribed spacer region*), sekvenca, koja se nalazi na ribosomalnoj RNA. Ciljne sekvence se nalaze između 16S i 23S ribosomalne DNA sekvence bakterija i između 18S i 5.8S ribosomalne sekvence gljiva. Ciljne sekvence različitih vrsta amplificirane su pomoću univerzalnih ili specifičnih začetnica.

4.2.3. Real time detekcija PCR produkta pomoću hibridizacijskih proba

Za vrijeme PCR reakcije, specifični produkt se određuje pomoću hibridizacijskih proba, koje koriste za obilježavanje fluorescirajuću boju, te pomoću automatiziranog fluorescencijskog mjerenja. Po završetku amplifikacije učinila se analiza krivulje taljenja DNA (*melting curve analysis*), kako bi se potvrdila specifičnost produkta. Za vrijeme faze “annealinga” probe se hibridiziraju na sekvencu amplificiranih fragmenata, tada se emitira fluorescentni signal, koji se mjeri na jednom od četiri detekcijska kanala na *LightCycler* uređaju. Temperatura taljenja ovisi o duljini fragmenta, kompoziciji sekvence i stanju homolognosti između hibridizacijske probe i ciljne DNA. Sve su probe tako dizajnirane da mogu razlikovati pojedine vrste bakterijskih patogena, na način da se u pojedinom detekcijskom kanalu koristi specifična temperatura taljenja, što onda odgovara specifičnom amplikonu.

4.2.4. Automatizirana identifikacija vrsta bakterija i gljiva i kontrola

Amplikon, kao rezultat PCG reakcije u uzorcima i kontrolama analizirao se pomoću software-a SIS (SeptiFast identifikacijski softver, koji je specijalno dizajniran da očitava temperature taljenja PCR produkata. U programu je zadano da se očitava T_m vrijednost (temperaturu vezanja primera)

4.3. Određivanje upalnih parametara

Prokalcitonin (PCT) se određivao elektrokemiluminiscencijskim imunološkim testom (ECLIA) koristeći automatizirani cobas® uređaj tvrtke Roche, funkcijske senzitivnosti 0,06 ng/ml, u Zavodu za kliničku i laboratorijsku dijagnostiku, KBC-a Zagreb

CRP se određivao standardnom metodom, uobičajenom u Zavodu za kliničku i laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.

4.4. Statističke metode

Za usporedbu molekulske dijagnostike sa standardnom metodom (hemokultura) formirane su tablice kontigencija, koristit će se ROC analiza (*receiver operating characteristic*), odnosno računa se senzitivnost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost (PPV), negativna prediktivna vrijednost (NPV). Za određivanje točnosti SeptiFast-a koristit će se AUC (area under curve).

Razlika između SeptiFasta i hemokultura računat će se prema Fisher exact testu. Kruskal Waalisov test je korišten za usporedbu hemokulture i upalnih parametara (CRP, prokalcitonin).

Logistička regresijska analiza je korištena za analizu povezanosti MASCC s dobi, upalnim parametrima i s ishodom bolesti odnosno *stepwise* logistička analiza za usporedbu pozitivnosti hemokultura s MASCC, dobi i upalnim parametrima.

5. REZULTATI

U analizi smo koristili 150 parnih uzoraka krvi od 50 bolesnika s dijagnosticiranom neutropeničnom vrućicom za hemokulture 50 uzoraka, 50 za molekulsku dijagnostiku i 50 uzoraka za upalne parametre. Bolesnici su dobili kemoterapiju zbog hematološke zloćudne bolesti ili zbog zloćudnog solidnog tumora. Kliničke karakteristike bolesnika, neoplazme u podlozi i vrsta terapije navedeni su u Tablici 3.

Prosječna dob bolesnika, raspon	48,16±18,332; (7-77)
spol, (%)	
M	26 (52%)
F	24 (48%)
Neoplazma u podlozi (%)	
Hodgkinova bolest	2 (4%)
non-Hodgkin limfom	4 (8%)
CLL/SLL (kronična limfatička leukemija)	2 (4%)
AML (akutna mijeloička leukemija)	5 (10%)
ALL (akutna limfatička leukemija)	4 (8%)
kronične mijeloproliferativne bolesti/mijelofibroza	2 (4%)
MDS (mijelodisplastički sindrom)	4 (8%)
multipli mijelom	6 (12%)
sarkom mekih tkiva	4 (8%)
osteosarkom	1 (2%)
Ewing sarkom	2 (4%)
karcinom dojke	3 (6%)
kolorektalni karcinom	4 (8%)
karcinom želuca	1 (2%)
karcinom testisa	1 (2%)
karcinom hipofarinksa	1 (2%)
karcinom nepoznatog primarnog sijela	2 (4%)
glioblastom	1 (2%)
neuroblastom	1 (2%)
Liječenje (%)	
kemoterapija solidnih tumora	21 (42%)
visokodozna kemoterapija s transplantacijom autognih matičnih stanica	8 (16%)
alogeni transplantacija	14 (28%)
druge vrste kemoterapija za hematološke neoplazme	8 (16%)
medijan apsolutnog broja granulocita	0.12 (0-0.49)

Tablica 3 Kliničke karakteristike analiziranih bolesnika

Identificirani mikroorganizmi pomoću hemokultura i pomoću SeptiFast-a navedeni su u Tablici 4.

mikroorganizam	pozitivne obje metode	pozitivna hemokultura	pozitivan SeptiFast
koagulaza-negativni stafilokoki	1	6	8
<i>Klebsiella spp</i>	1		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1	
<i>Klebsiella pneumoniae ESBL</i>		1	
<i>Escherichia coli</i>	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1	
<i>Proteus mirabilis</i>			1
<i>Streptococcus spp</i>			1
<i>Enterococcus faecium</i>			3
<i>Moraxella monoliquefaciens</i>		1	
<i>Propionibacterium acnes</i>		1	
<i>Candida glabrata*</i>			1
<i>Candida tropicalis*</i>			1

Tablica 4 Infektivni uzročnici indentificirani hemokulturom i/ili SeptiFastom

*oba uzročnika su određena u jednom uzorku

Bakterijemija se definirala kao rast bakterije u jednoj od hemokultura, osim za koagulaza-negativne stafilokoke, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp*, *Corynebacterium spp* i *Bacillus spp*. Za te bakterije uvjet za prihvaćanje pozitivnog izolacijskog rezultata su istovjetna bakterijska izolacija u dvije uzastopne hemokulture i istovjetna osjetljivost na antibiotike. Rezultat SeptiFast-a je smatran kontaminacijom ukoliko bi se kod bolesnika našli negativni inflamatorni parametri (CRP, prokalcitonin) i ukoliko klinička slika ne bi ukazivala na sustavni inflamatorni odgovor (*SIRS-systemic inflammatory response syndrome*), odnosno ukoliko ne bi niti postojalo dijagnosticirano mjesto infekcije drugim metodama (npr.

morfološkim metodama). Nadalje rezultat SeptiFast-a je uspoređivan s rezultatima nadzornih kultura. Kontaminacije nisu ulazile u rezultate analize.

Pomoću hemokulture bila je izolirana samo jedna bakterija po svakom uzorku. Od 50 febrilnih epizoda u 50 bolesnika kod 14 bolesnika odnosno (28%) febrilnih epizoda potvrđena je bakterijemija (odnosno detektiran je mikroorganizam). SeptiFast je bio pozitivan kod 18 (36%) febrilnih epizoda. 35 od 50 (70%) je bilo negativnih nalaza upotrebom hemokulture i SeptiFast-om. 10 (20%) uzoraka bilo je negativno upotrebom hemokulture, a 35 (70%) pomoću SeptiFast-a. Pomoću SeptiFast-a u nekim su se uzorcima detektirala dva patogena mikrobiološka uzročnika. Tako smo u dva uzorka imali kombinaciju koagulaza-negativnog stafilokoka i *Enterococcus faecium*. U jednom uzorku imali smo izoliranu kombinaciju koagulaza-negativnog stafilokoka i *Enterococcus faecalis*, a u sljedećem koagulaza-negativnog stafilokoka i *Klebsiella pneumoniae*. Općenito se može zaključiti da su koagulaza-negativni stafilokoki bili najčešće izolirani uzročnici. Drugi po učestalosti izolacije bio je *Enterococcus faecium*.

5.1. Usporedba rezultata PCR molekularne dijagnostike infektivnih uzročnika (SeptiFast-a) i rezultata hemokultura

Slijedi usporedba podudarnosti rezultata izolacije mikroorganizama pomoću hemokultura i pomoću molekulske dijagnostike (SeptiFast-a). Isprva se uspoređivalo rezultate pozitivnog prema pozitivnog rezultata odnosno negativno prema negativnog rezultata (vidjeti Tablicu 5).

		SeptiFast poz.		Ukupno
		Yes	No	
HK poz	Da	7	8	15
	Ne	7	28	35
Ukupno		14	36	50

Tablica 5. Usporedba rezultata hemokultura (HK) i SeptiFasta-a: epizoda FN prema epizodi FN

Ukoliko se kao referentni standard koristi hemokultura izračunata je senzitivnost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) i negativna prediktivna vrijednost (NPV):

senzitivnost = 0,5 (95% CI: 0,2304 do 0,7696)

specifičnost = 0,77 (95% CI: 0,6085 do 0,8988)

PPV = 0,46 (95% CI: 0,2127 do 0,7341)

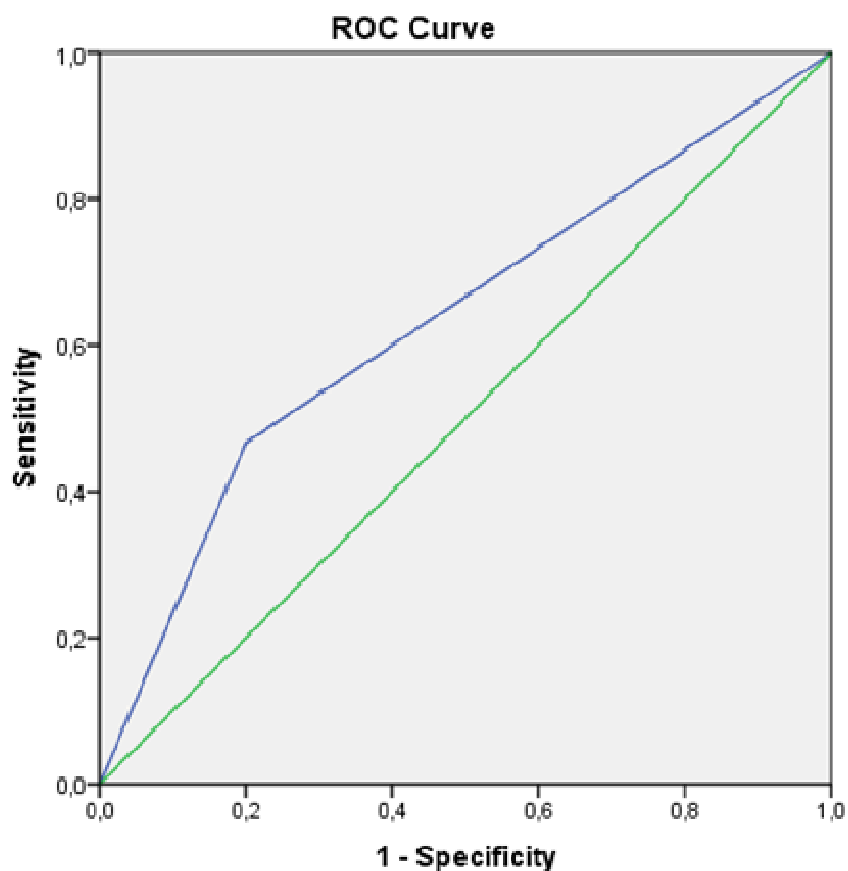
NPV = 0,8 (95% CI: 0,6306 do 0,9156)

Točnost (efikasnost): 0,7 (95% CI: 0,5539 do 0,8214)

Učinjena je i ROC analiza za iste parameter, odnosno gdje je hemokultura standard (vidjeti sliku 1). Izračuna se također area ispod ROC krivulje, koja iznosi 0,63, 95%CI: 0,457-0,81.

Fischerovim testom nema statistične razlike između rezultata SeptiFast testa i rezultata hemokultura (P=0,085).

Slika 1. ROC analiza (HK standard) za SeptiFast (epizoda FN prema epizodi FN)



Diagonal segments are produced by ties.

Potom se analizirala podudarnost izolata prema izolatu mikroorganizma također s hemokulturom kao standardom (vidjeti Tablicu 6).

		SeptiFast poz		Ukupno
		Yes	No	
HK poz	Da	3	12	15
	Ne	7	28	35
ukupno		10	40	50

Tablica 6. Usporedba rezultata hemokultura (HK) i SeptiFast-a: izolat prema izolatu mikroorganizma

Ukoliko se kao referentni standard koristi hemokultura izračunata je senzitivnost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) i negativna prediktivna vrijednost (NPV):

senzitivnost = 0,2 (95% CI: 0,0433 do 0,4809)

specifičnost = 0,8 (95% CI: 0,6306 do 0,9156)

PPV = 0,3 (95% CI: 0,0667 do 0,6525)

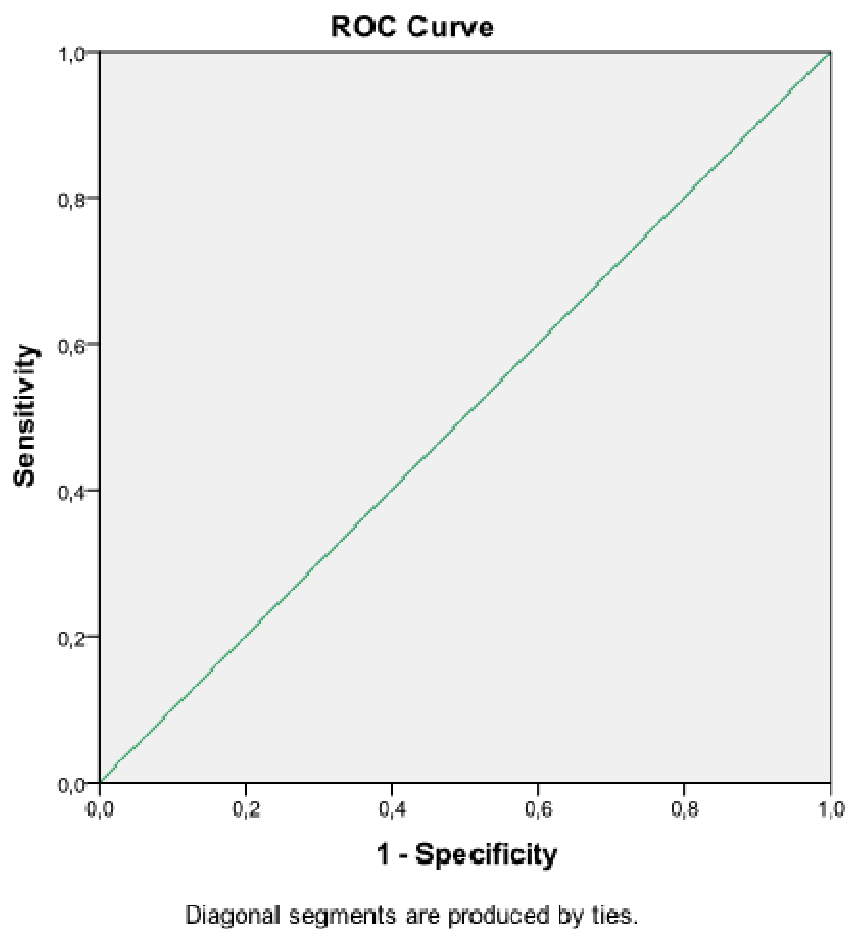
NPV = 0,7 (95% CI: 0,5347 do 0,8344)

Točnost (efikasnost): 0,62 (95% CI: 0,4717 do 0,7535)

ROC analiza za iste parametre prikazana je na slici 2. Area ispod ROC krivulje iznosi 0,500, 95% CI: 0,324-0,676.

Razlika rezultata između SeptiFast test-a i hemokultura nije bila statistički signifikantna

(Fisher exact test: $P=1,000$).

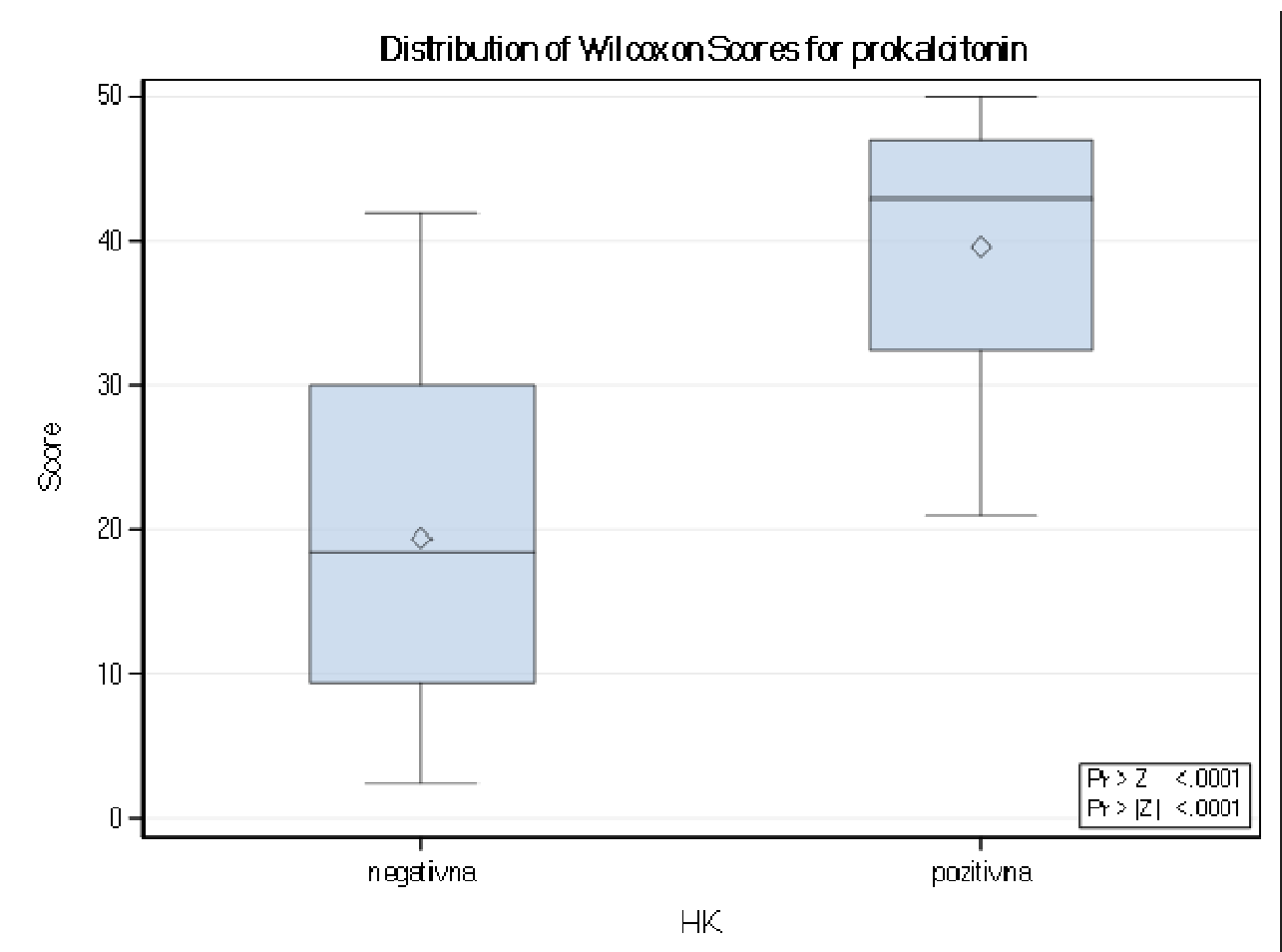


Slika 2. ROC analiza (HK standard) za SeptiFast: izolat mikroorganizma prema izolatu

5.2. Usporedba rezultata pozitivnosti hemokultura i vrijednosti prokalcitonina

Prokalcitonin se statistički značajno razlikuje u ovisnosti da li postoji pozitivna ili negativna hemokultura (ANOVA $P < 0.0001$): Distribucije prokalcitonina u ovisnosti o pozitivnoj ili negativnoj hemokulturi vidjeti na slici 3.

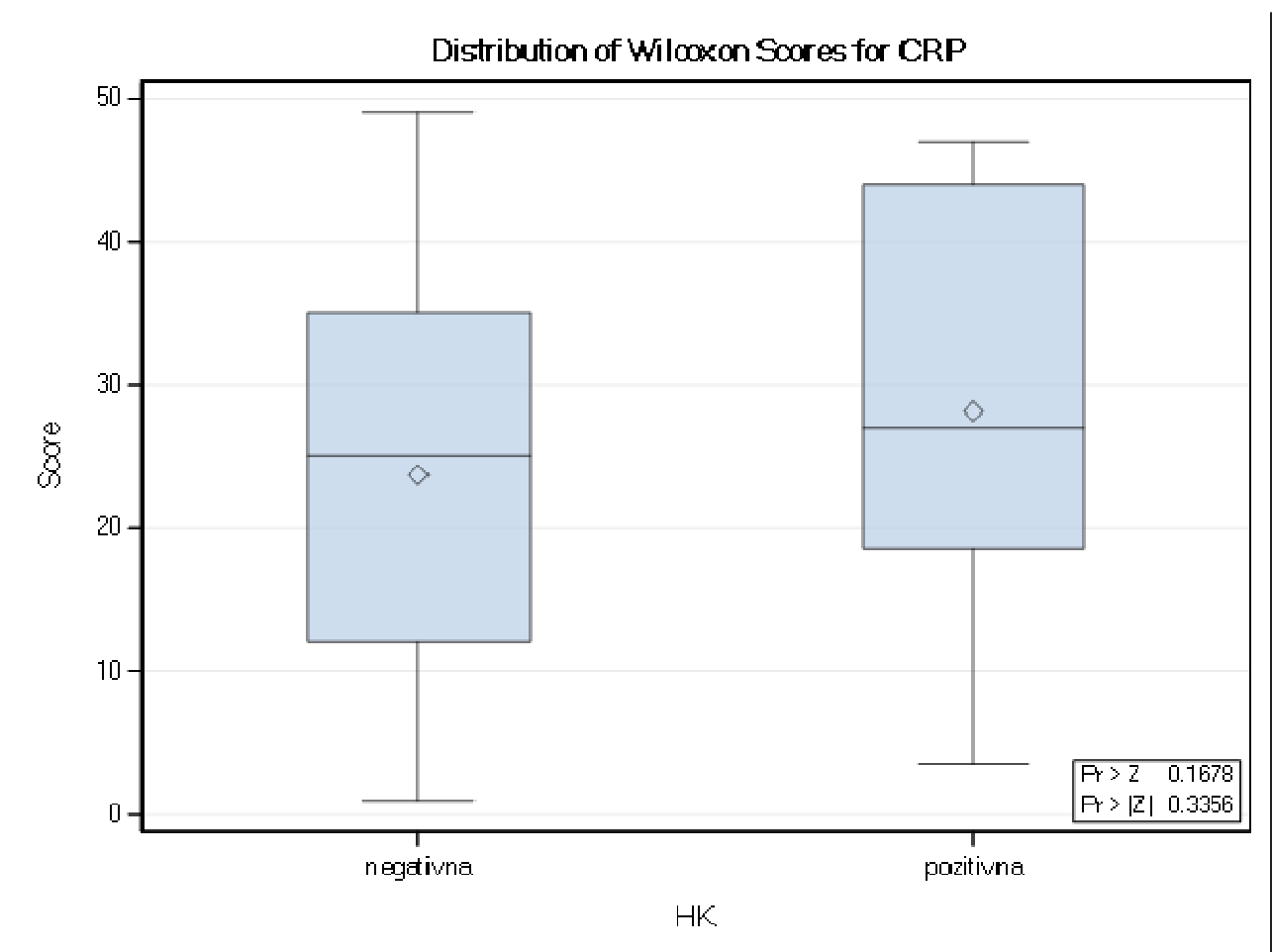
Slika 3. Distribucije prokalcitonina u ovisnosti o pozitivnoj ili negativnoj hemokulturi



5.3. Usporedba pozitivnosti hemokultura i CRP-a

CRP se statistički signifikantno ne razlikuje u ovisnosti o pozitivnosti hemokultura (Kruskal-Wallis test $P=0,33$). Distribucije CRP-a u ovisnosti o pozitivnoj ili negativnom rezultatu hemokultura prikazuje se na slici 4.

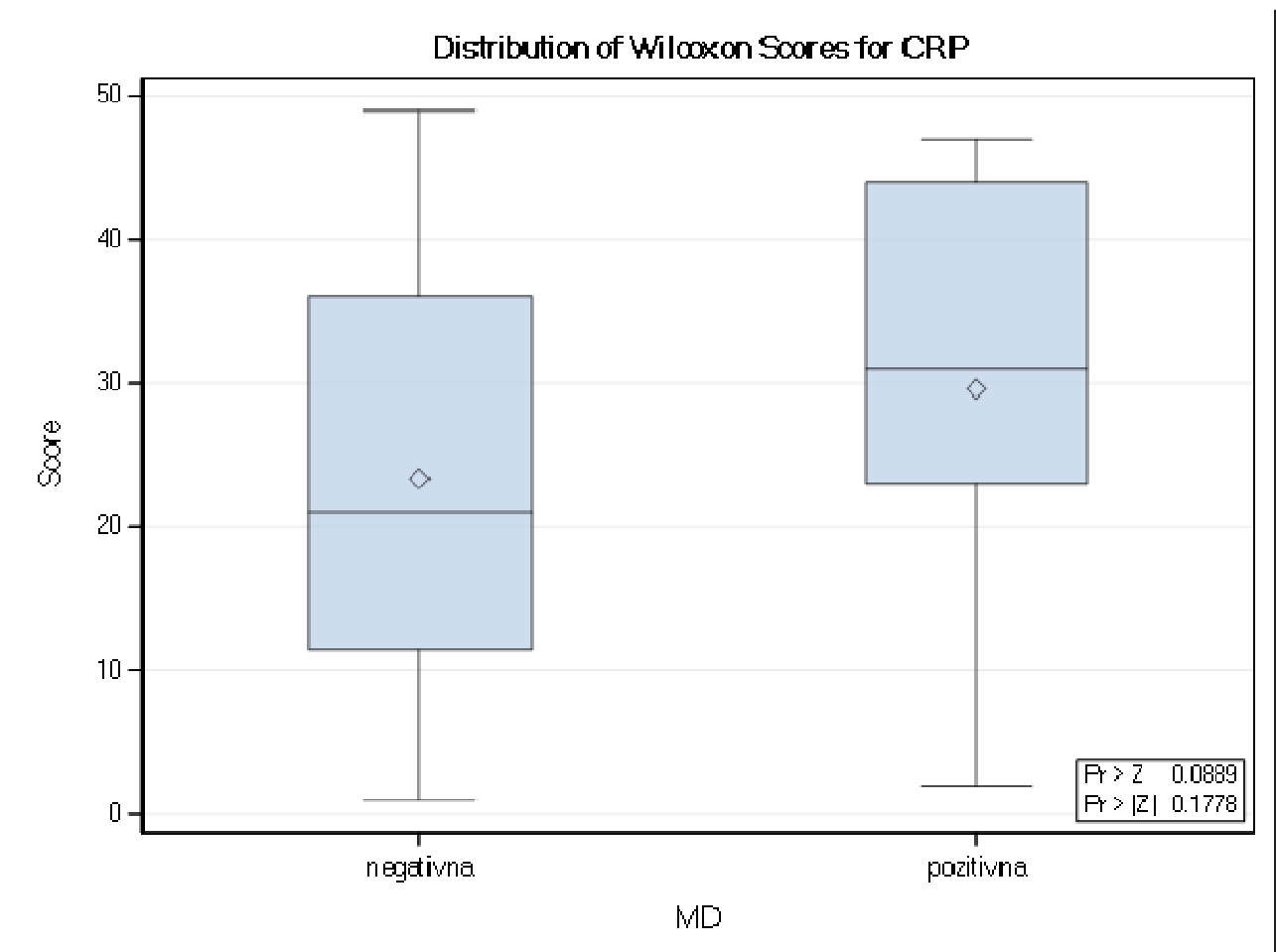
Slika 4. Distribucije CRP-a u ovisnosti o pozitivnoj ili negativnoj hemokulturi



5.4. Usporedba CRP-a i pozitivnosti molekulske dijagnostike (SeptiFast-a)

CRP se statistički značajno ne razlikuje u ovisnosti o pozitivnom ili negativnom rezultatu SeptiFast-a (Kruskal-Wallis $P=0,0889$). Distribucije CRP-a u ovisnosti o pozitivnom ili negativnom rezultatu vidjeti na slici 5.

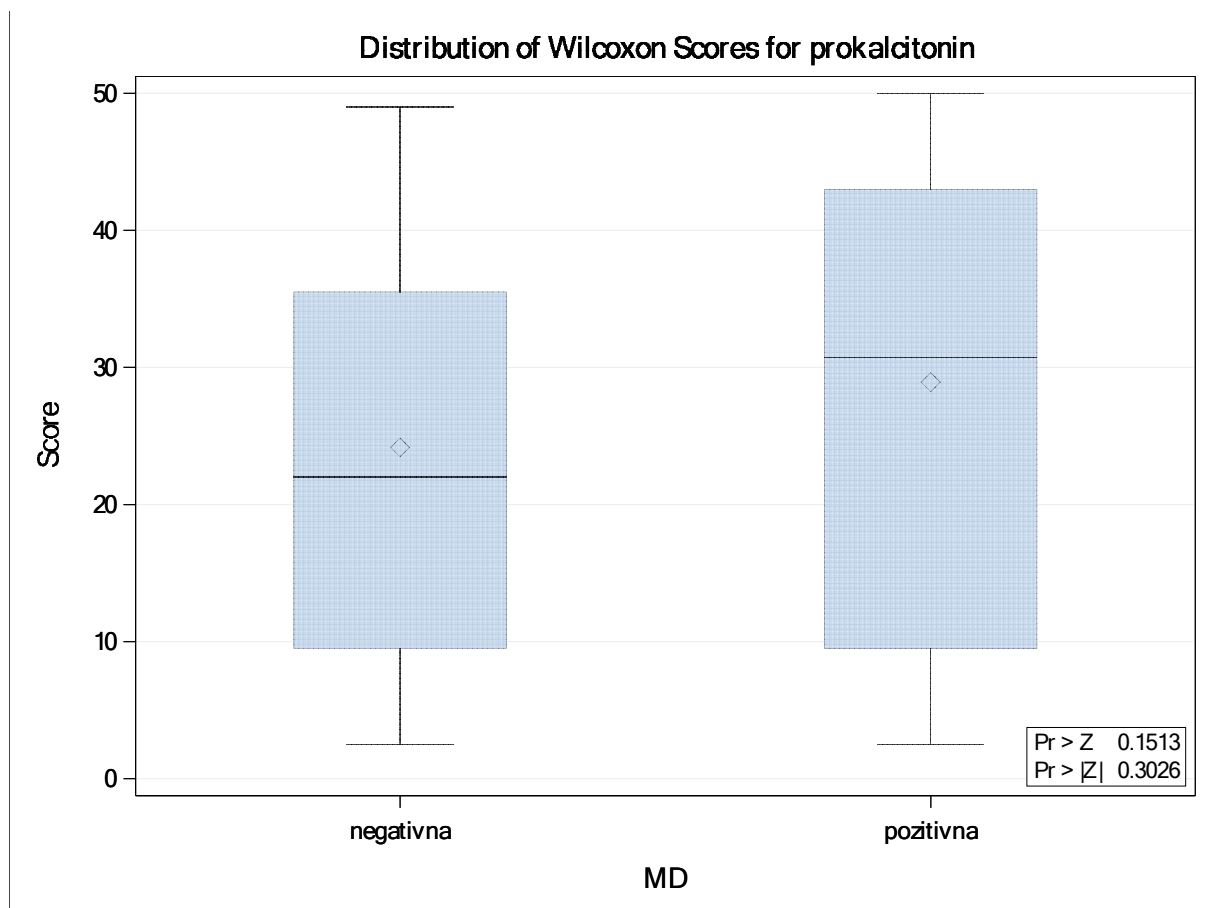
Slika 5. Distribucije CRP-a u ovisnosti o pozitivnom ili negativnom SeptiFast-u



5.5. Usporedba prokalcitonina u ovisnosti o pozitivnom ili negativnom SeptiFast-u

Prokalcitonin se statistički značajno ne razlikuje ovisno o rezultatima SeptiFast-a (Kruskal-Wallis $P=0,1513$). Distribucije prokalcitonina u ovisnosti o pozitivnom ili negativnom rezultatu SeptiFasta-a dani su u slici 6.

Slika 6. Distribucije prokalcitonina u ovisnosti o pozitivnom ili negativnom rezultatu SeptiFast-a



5.6. Usporedba MASCC indeksa rizika, dobi, upalnih parametra s ishodom bolesti

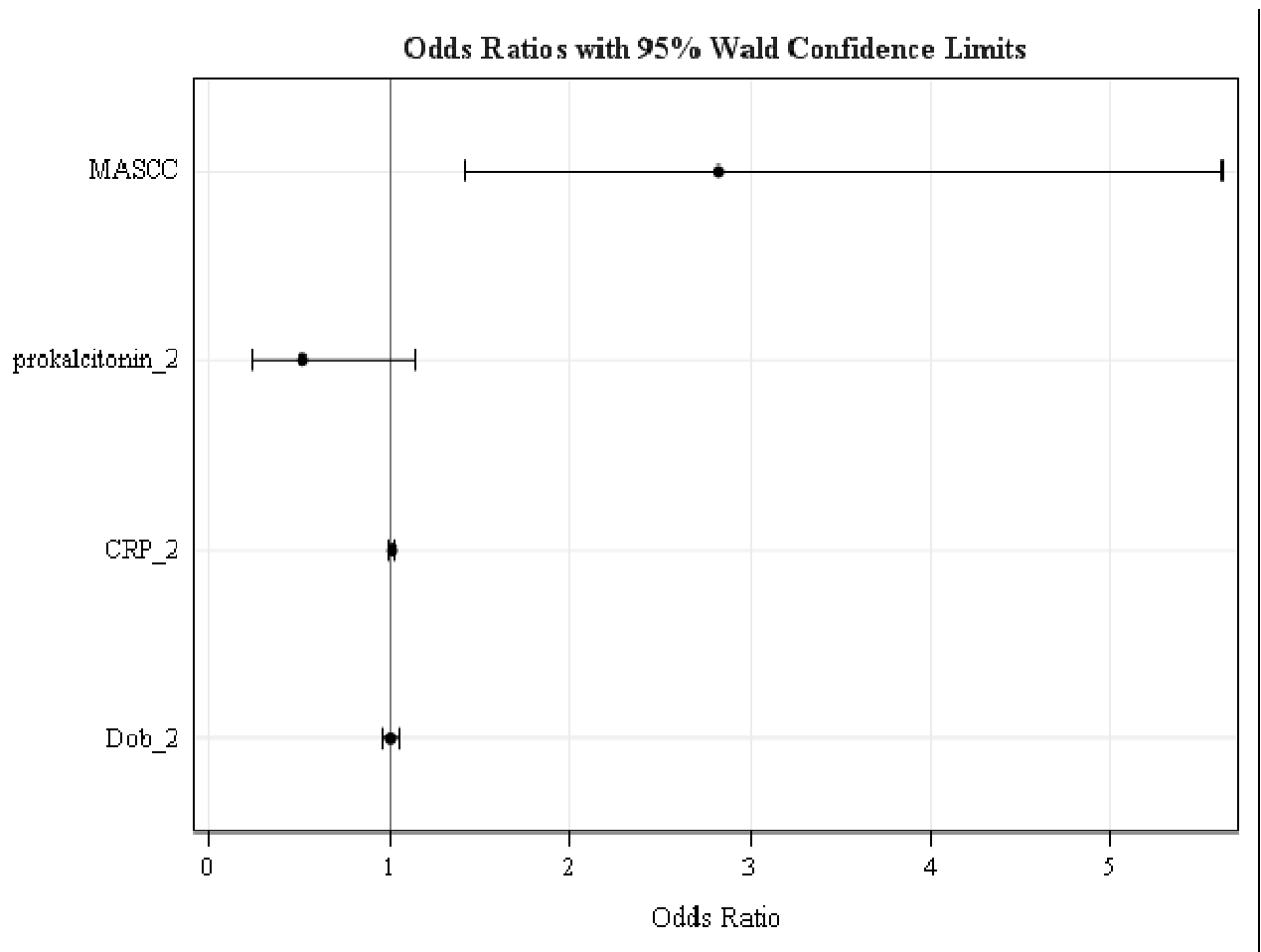
U ispitivanju povezanosti MASCC, prokalcitonina, CRP i dobi s nepovoljnim (FN s komplikacijama) odnosno povoljnim ishodom bolesti (FN bez komplikacija) korišten je logistički model pozitivnog ishoda, gdje je P vjerojatnost povoljnog ishoda. 22 bolesnika je bilo kategorizirano s nepovoljnim ishodom (MASCC < 21), a 26 bolesnika s povoljnim ishodom (MASCC ≥ 21). Dobiju se rezultati da je MASCC statistički značajno povezan s povoljnim ishodom P=0.0032, a da prokalcitonin (P=0.1), CRP (P=0.13), dob (P=0.71) ne utječu na ishod FN. U Tablici 7 navedeni su OR (*odds ratio*) i pripadajući 95% Waldovi interval pouzdanosti (*confidence limits*), a na Slici 8 isti podaci no izraženi grafički. Na drugačiji način izraženo s jediničnim porastom MASCC indeksa šansi za pozitivan ishod se poveća za 182% s intervalom pouzdanosti od 42 do 461%. Povezanost između predviđene i promatrane vjerojatnosti bio je prema Somersu 0.88.

Tablica 7 Logistički model za povoljni ishod bolesti

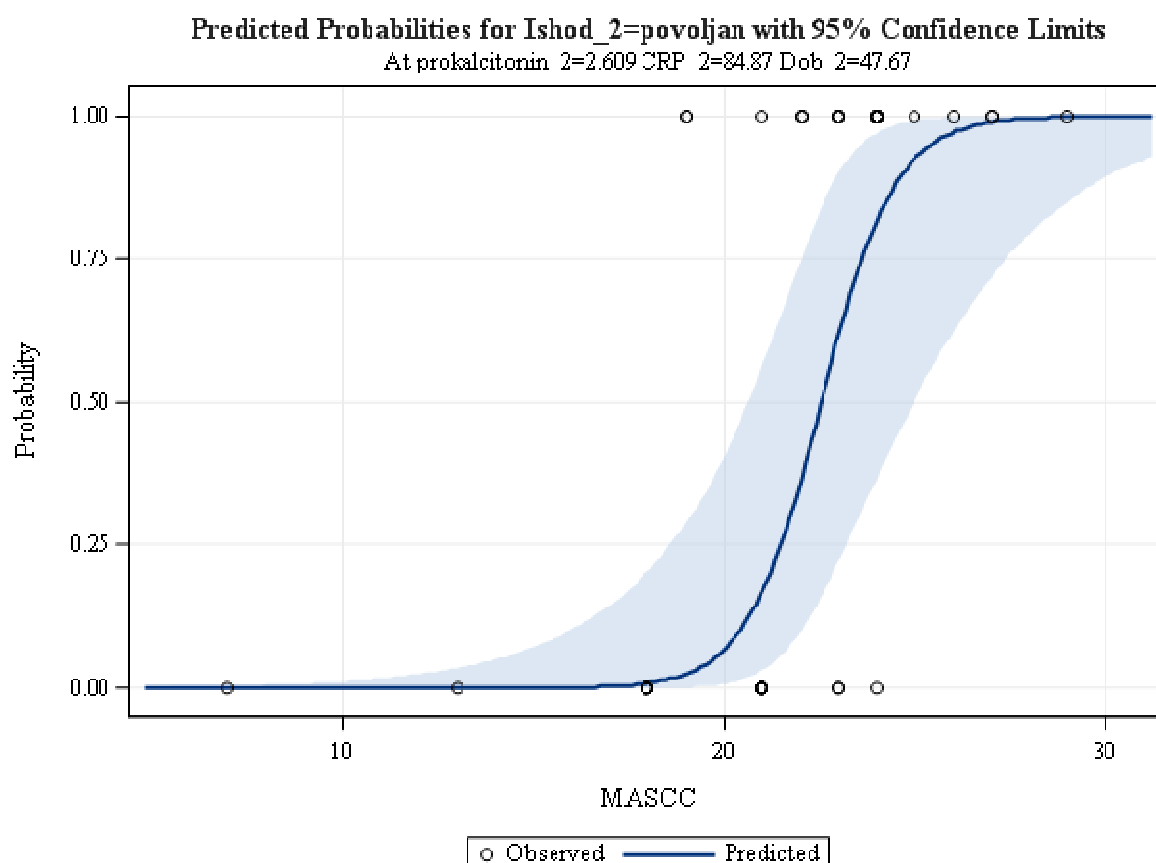
Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
MASCC	2.819	1.415	5.613
prokalcitonin_2	0.522	0.239	1.140
CRP_2	1.013	0.996	1.030
Dob_2	1.010	0.958	1.065

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses			
Percent Concordant	94.4	Somers' D	0.888
Percent Discordant	5.6	Gamma	0.888
Percent Tied	0.0	Tau-a	0.450
Pairs	572	c	0.944

Slika 7 Logistička regresija za pozitivni ishod FN s MASCC, prokalcitoninom, CRP-om i dobi kao numeričkim prediktorima



Na Slici 8 prikazan je grafikon, koji pokazuje kolika je vjerojatnost pozitivnog ishoda u ovisnosti MASCC-a



Slika 8 Vjerojatnost pozitivnog ishoda FN i MASCC

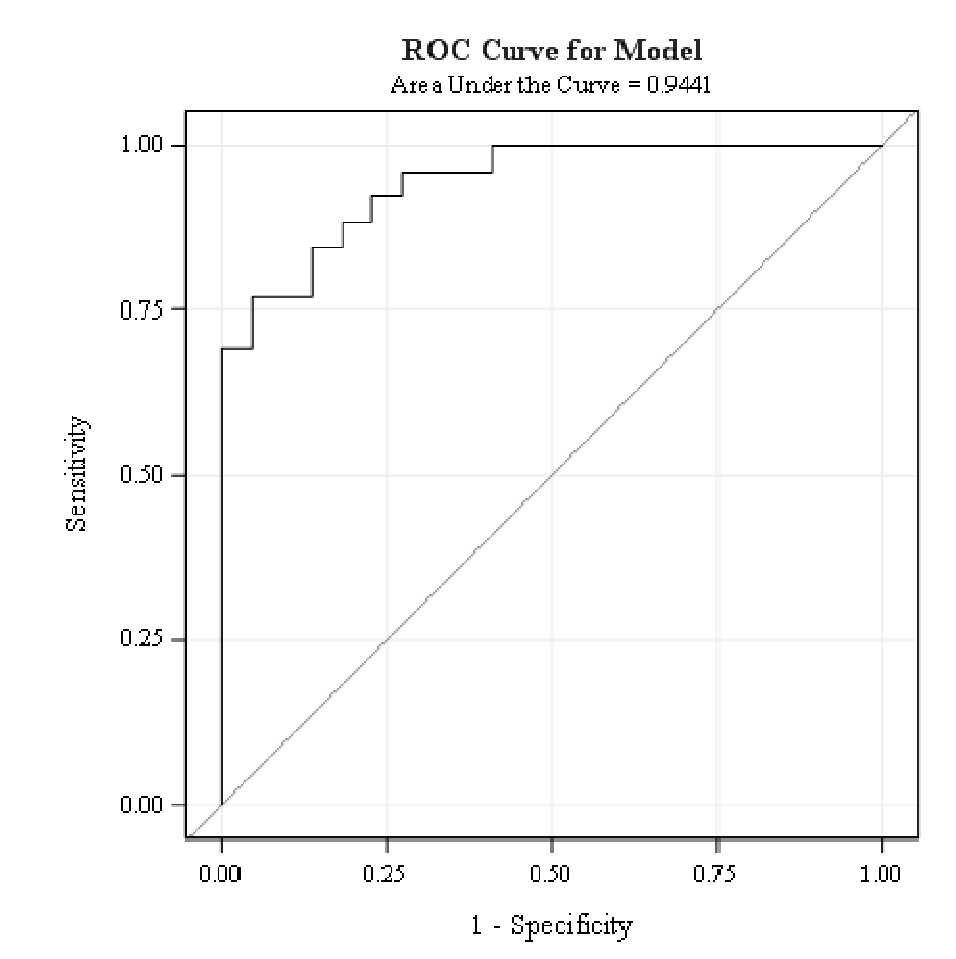
Učinjena je potom ROC krivulja za MASCC, koji pokazuje postotak točno pozitivnih (senzitivnost) u odnosu na postotak pogrešno pozitivnih za različite moguće *cutoff* (granične) vrijednosti dijagnostičkog testa (vidjeti Tablicu 8). AUC (*area under curve*) odnosno točnost iznosi 0.9441 (vidjeti sliku 9).

Tablica 8 Klasifikacijska tablica za različite granične vrijednosti MASCC

Classification Table									
Prob Level	Correct		Incorrect		Percentages				
	Event	Non-Event	Event	Non-Event	Correct	Sensitivity	Specificity	False POS	False NEG
0.000	26	0	22	0	54.2	100.0	0.0	45.8	.
0.020	26	5	17	0	64.6	100.0	22.7	39.5	0.0
0.040	25	8	14	1	68.8	96.2	36.4	35.9	11.1
0.060	25	8	14	1	68.8	96.2	36.4	35.9	11.1
0.080	24	10	12	2	70.8	92.3	45.5	33.3	16.7
0.100	24	12	10	2	75.0	92.3	54.5	29.4	14.3
0.120	24	13	9	2	77.1	92.3	59.1	27.3	13.3
0.140	24	13	9	2	77.1	92.3	59.1	27.3	13.3
0.160	24	14	8	2	79.2	92.3	63.6	25.0	12.5
0.180	23	14	8	3	77.1	88.5	63.6	25.8	17.6
0.200	23	14	8	3	77.1	88.5	63.6	25.8	17.6
0.220	23	14	8	3	77.1	88.5	63.6	25.8	17.6
0.240	23	14	8	3	77.1	88.5	63.6	25.8	17.6
0.260	23	14	8	3	77.1	88.5	63.6	25.8	17.6
0.280	23	16	6	3	81.3	88.5	72.7	20.7	15.8
0.300	23	16	6	3	81.3	88.5	72.7	20.7	15.8
0.320	23	16	6	3	81.3	88.5	72.7	20.7	15.8
0.340	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0
0.360	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0
0.380	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0

Classification Table									
Prob Level	Correct		Incorrect		Percentages				
	Event	Non-Event	Event	Non-Event	Correct	Sensitivity	Specificity	False POS	False NEG
0.400	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0
0.420	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0
0.440	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0
0.460	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0
0.480	22	16	6	4	79.2	84.6	72.7	21.4	20.0
0.500	22	17	5	4	81.3	84.6	77.3	18.5	19.0
0.520	22	17	5	4	81.3	84.6	77.3	18.5	19.0
0.540	22	17	5	4	81.3	84.6	77.3	18.5	19.0
0.560	22	17	5	4	81.3	84.6	77.3	18.5	19.0
0.580	21	18	4	5	81.3	80.8	81.8	16.0	21.7
0.600	21	18	4	5	81.3	80.8	81.8	16.0	21.7
0.620	21	18	4	5	81.3	80.8	81.8	16.0	21.7
0.640	21	18	4	5	81.3	80.8	81.8	16.0	21.7
0.660	21	18	4	5	81.3	80.8	81.8	16.0	21.7
0.680	21	18	4	5	81.3	80.8	81.8	16.0	21.7
0.700	20	18	4	6	79.2	76.9	81.8	16.7	25.0
0.720	19	18	4	7	77.1	73.1	81.8	17.4	28.0
0.740	19	19	3	7	79.2	73.1	86.4	13.6	26.9
0.760	18	19	3	8	77.1	69.2	86.4	14.3	29.6
0.780	18	19	3	8	77.1	69.2	86.4	14.3	29.6
0.800	18	19	3	8	77.1	69.2	86.4	14.3	29.6
0.820	17	19	3	9	75.0	65.4	86.4	15.0	32.1
0.840	17	20	2	9	77.1	65.4	90.9	10.5	31.0
0.860	16	21	1	10	77.1	61.5	95.5	5.9	32.3
0.880	16	21	1	10	77.1	61.5	95.5	5.9	32.3
0.900	14	21	1	12	72.9	53.8	95.5	6.7	36.4
0.920	13	22	0	13	72.9	50.0	100.0	0.0	37.1
0.940	10	22	0	16	66.7	38.5	100.0	0.0	42.1
0.960	9	22	0	17	64.6	34.6	100.0	0.0	43.6
0.980	5	22	0	21	56.3	19.2	100.0	0.0	48.8
1.000	0	22	0	26	45.8	0.0	100.0	.	54.2

Slika 9 ROC krivulja za MASCC indeks



Zatim je učinjena *stepwise* logistička regresija za parameter dob, CRP, prokalcitonin, MASCC u ovisnosti o pozitivnom ishodu. Prema rezultatima navedenima u Tablici 9 određivanje prokalcitonina MASCC-u statistički značajno mijenja vjerojatnost učinkovitosti MASCC u procjeni pozitivnog ishoda FN.

Prvi korak postupne logističke regresije prepoznaje MASCC:

Tablica 9 omjer šansi MASCC za povoljni ishod FN

Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
MASCC	2.293	1.413	3.721

U drugom koraku se dodaje prokalcitonin, te se vidi promjena *odds ratio*

Tablica 10 omjer šansi MASCC i prokalcitonin za povoljni ishod FN

Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
MASCC	2.463	1.427	4.252
prokalcitonin_2	0.500	0.209	1.198

Uklanjanjem prokalcitonina (u *backward* analizi) šansa predviđanja MASCC se vraća na ishodišnu

Tablica 11 omjer šansi u *backward* analizi (uklanjanjem prokalcitonina) za povoljni ishod FN

Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
MASCC	2.293	1.413	3.721

Konačno sumarno su prikazani efekti postupne logističke regresije u Tablici 12.

Tablica 12 Sumarna tablica postupne logističke regresije za povoljan ishod FN i varijabli sa statistički značajnim učinkom

Summary of Stepwise Selection								
Step	Effect		DF	Number In	Score Chi-Square	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq	Variable Label
	Entered	Removed						
1	MASCC		1	1	16.0529		<.0001	MASCC
2	prokalcitonin_2		1	2	4.3453		0.0371	
3		prokalcitonin_2	1	1		2.4160	0.1201	

5.7. Usporedba MASCC, upalnih parametara s pozitivnosti hemokultura

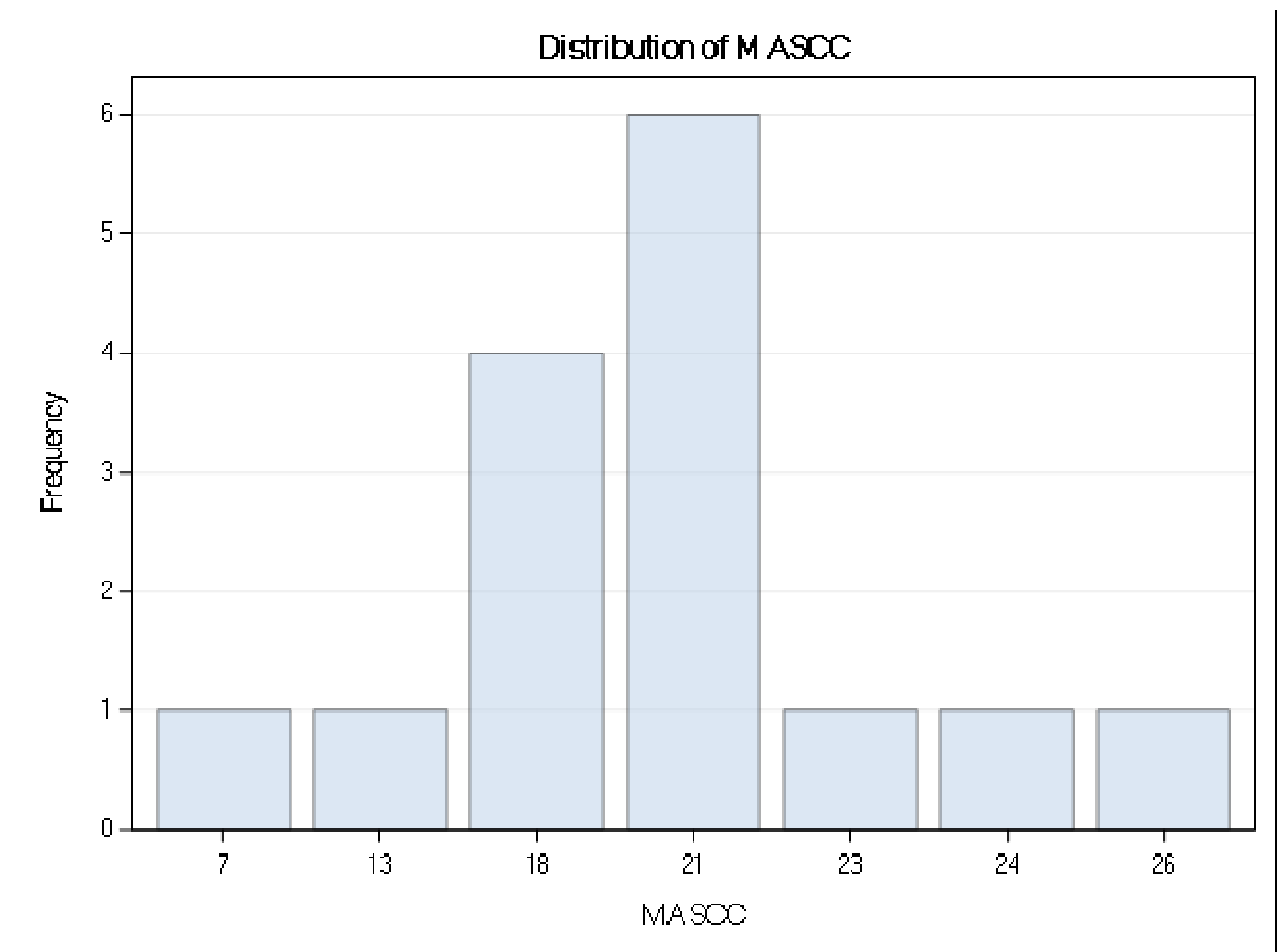
U sljedećoj analizi navode se frekvencije distribucija MASCC za pozitivne HK i frekvencije distribucija MASCC za negativne HK odnosno nalaze se raspodjela frekvencija MASCC za skupine s pozitivnim i negativnom HK, u obliku tablice i histograma (Tablica 13 i 14 i Slika 10 i 11) . Vidi se da je raspodjela bitno različita za obje skupine, te da je razmjerno malo preklapanje.

Jednako tako prikazuju se frekvencije distribucija za prokalcitonin za pozitivne (Slika 12) i za negativne hemokulture (Slika 13).

Tablica 13 Raspodjela frekvencija MASCC za pozitivne HK

MASCC	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
7	1	6.67	1	6.67
13	1	6.67	2	13.33
18	4	26.67	6	40.00
21	6	40.00	12	80.00
23	1	6.67	13	86.67
24	1	6.67	14	93.33
26	1	6.67	15	100.00

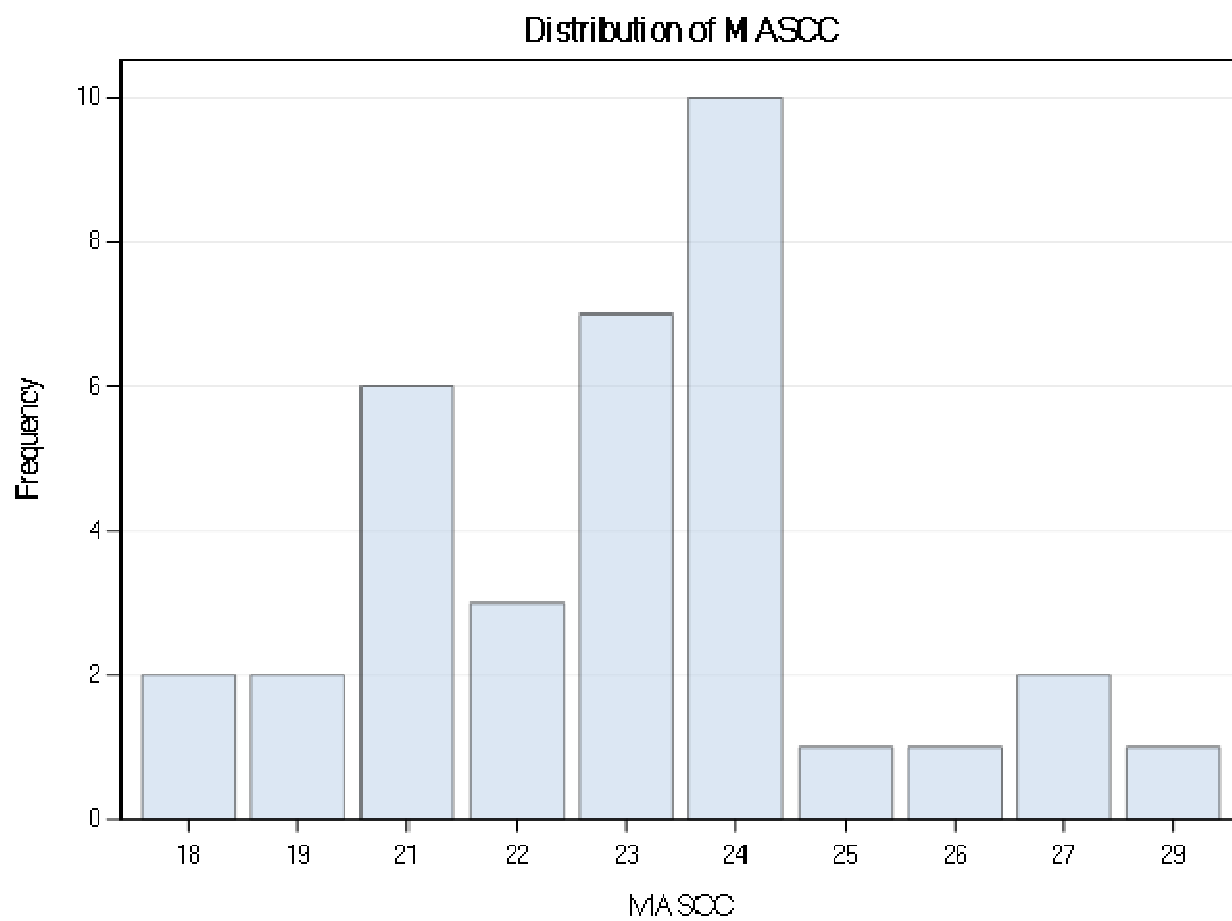
Slika 10 Raspodjela frekvencija MASCC za pozitivne HK



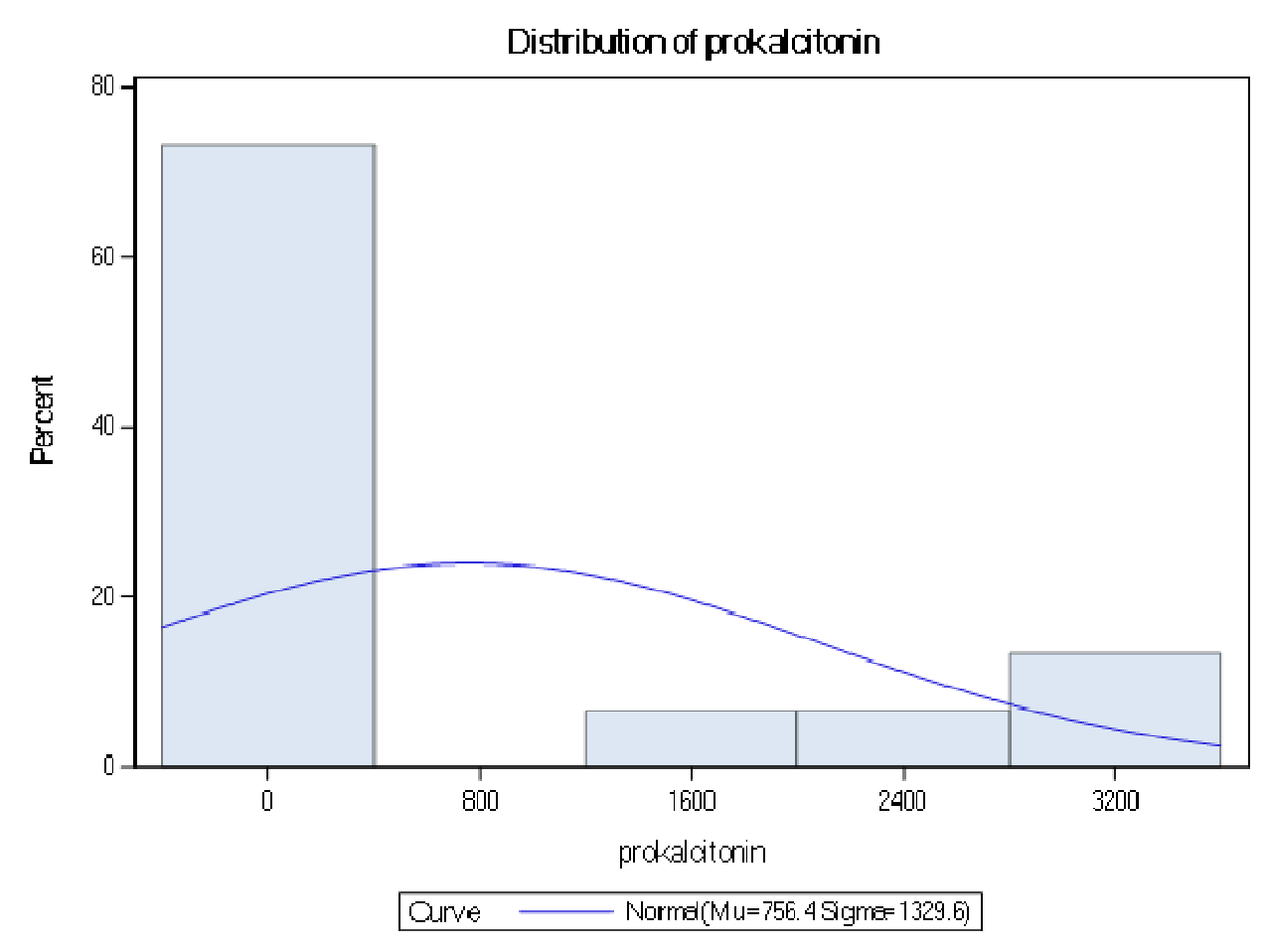
Tablica 14 Raspodjela frekvencija MASCC za negativne HK

MASCC	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
18	2	5.71	2	5.71
19	2	5.71	4	11.43
21	6	17.14	10	28.57
22	3	8.57	13	37.14
23	7	20.00	20	57.14
24	10	28.57	30	85.71
25	1	2.86	31	88.57
26	1	2.86	32	91.43
27	2	5.71	34	97.14
29	1	2.86	35	100.00

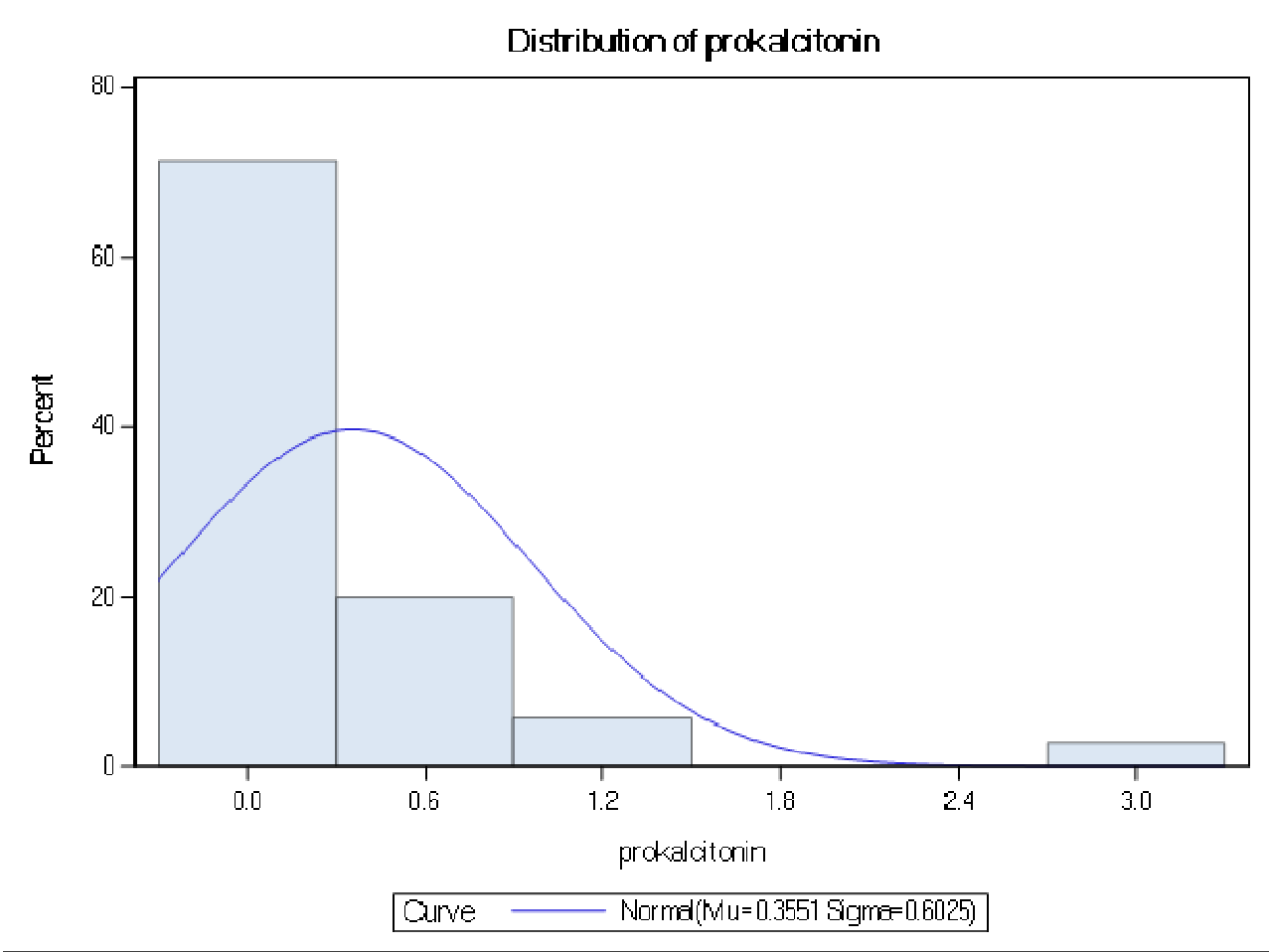
Slika 11 Raspodjela frekvencija MASCC za negativne HK



Slika 12 Raspodjela frekvencija prokalcitonina za pozitivne hemokulture

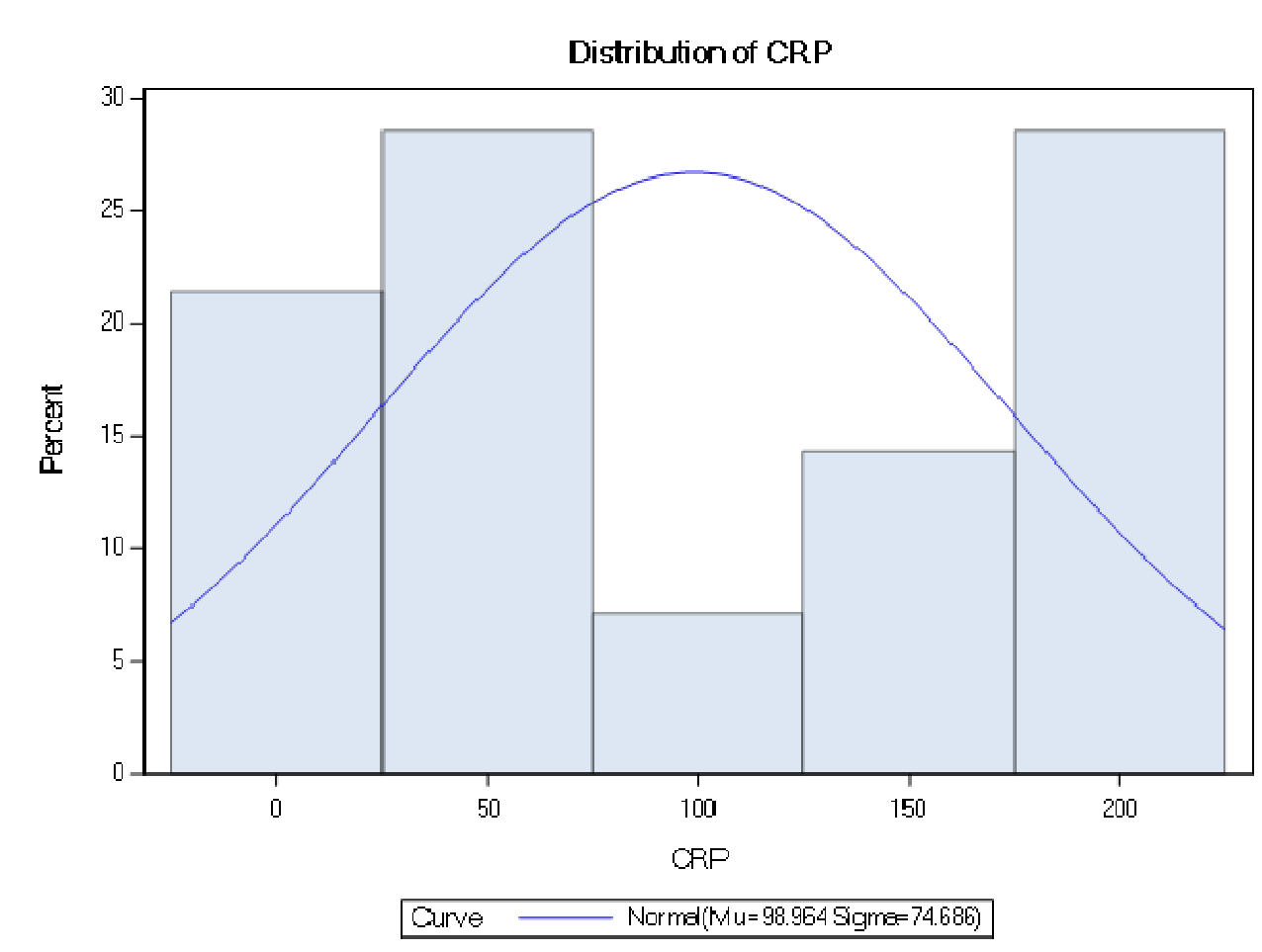


Slika 13 Raspodjela frekvencija prokalcitonina za negativne hemokulture

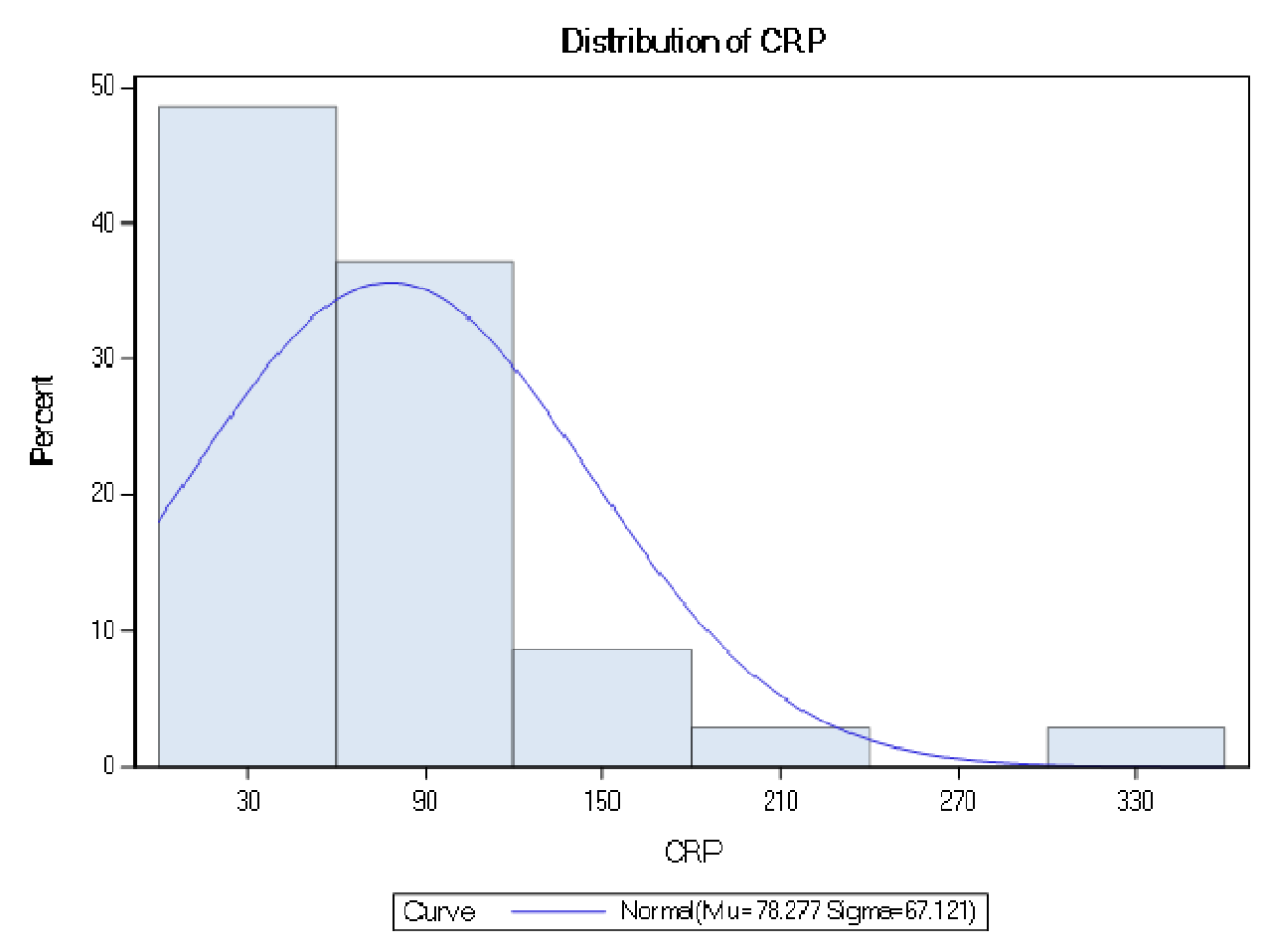


Slijedi prikaz raspodjele frekvencija CRP-a za pozitivne hemokulture (Slika 14) i raspodjela frekvencija CRP-a za negativne hemokulture u obliku histograma (Slika 15)

Slika 14 Raspodjela frekvencija CRP-a za pozitivne hemokulture



Slika 15 Raspodjela frekvecija CRP-a za negativne hemokulture



Slijedi *stepwise* logistička analiza povezanosti pozitivne HK s molekulskom dijagnostikom, MASCC i prokalcitoninom dobi i CRP-om. Jedino je prokalcitonin statistički značajno u kombinaciji s MASCC povezan s pozitivnom hemokulturom.

Tablica 15 Logistički model povezanosti s pozitivnom HK

Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Confidence Limits	Wald
MASCC	0.551	0.347	0.875
prokalcitonin	1.507	0.985	2.306

Summary of Stepwise Selection							
Step	Effect		DF	Number In	Score Chi-Square	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
	Entered	Removed					
1	MASCC		1	1	12.6812		0.0004
2	prokalcitonin		1	2	9.2501		0.0024

6. RASPRAVA

Prva hipoteza rada povezana je s molekulskom dijagnostikom mikroorganizama iz krvi kod FN, odnosno trebalo je dokazati ili odbaciti tvrdnju da je molekulska metoda dijagnostike (SeptiFast) senzitivnija nego standardna dijagnostika: hemokulture. Terapijske odluke kod liječenja FN trebale bi biti što više temeljene na mikrobiološkoj izolaciji i testovima osjetljivosti antibiotika, pogotovo u vrijeme raširene rezistencije na antibiotike. Pravovremena mikrobiološka dijagnoza i eventualna korekcija empirijske antibiotske terapije može biti ključna za liječenje posljedične sepse. Zakašnjela ili pogrešna mikrobiološka dijagnostika rezultira s neadekvatnim liječenjem u 25% slučajeva, što značajno povećava rizik od smrtnog ishoda (48).

U cilju dokazivanja prve hipoteze te ciljeva rada vezanih uz molekulsku dijagnostiku uspoređivani su rezultati SeptiFast testa s rezultatima hemokultura, kao "zlatnim standardom" za detekciju bakterijskih i gljivičnih patogena kod bolesnika s FN.

58% bolesnika imalo je hematološku malignu bolest, a 42% je bilo liječeno zbog solidnog tumora (vidjeti Tablicu 3). 44% bolesnika bilo je liječeno visokim dozama citostatika, bilo uz alogenu ili autolognu transplantaciju koštane srži, što je uzrokovalo medijan apsolutnog broja granulocita $0.12 (0-0.49) \times 10^9$.

Hemokulture su bile pozitivne (izolirao se mikrobiološki patogen) u 14 uzoraka krvi (28%), a SeptiFast je bio pozitivan u 17 uzoraka (34%). Slični rezultati pozitivnih uzoraka za hemokulture (13,9-34%) i za SeptiFast (20-29%) nađeni su u različitim radovima (29, 31, 34, 35, 49). Očekivalo bi se da se s boljom dijagnostičkom metodom izolira više patogena od standarda. U ovom radu je bilo 13 uzoraka, s pozitivnim SeptiFast-om, a istovremeno s negativnom hemokulturom. No prema preporukama eksperata, rezultate SeptiFast-a kod istovremeno negativnih hemokultura treba procijenjivati u kliničkom kontekstu (50,51). Zato smo u izradi rada dali posebnu pozornost na mogućnost kontaminacije, pogotovo u slučajevima izolacije CoNS; tada smo mikrobiološki nalaz uspoređivali s kliničkom slikom i ostalim mikrobiološkim nalazima. Rezultat SeptiFasta-a smatrali smo točno pozitivnim jedino

u slučaju prisustva pozitivnih laboratorijskih parametara upalnog zbivanja i u prisustvu znakova SIRS-a (*systemic inflammatory response syndrome*). U jednom uzorku pomoću SeptiFast-a izolirane su dvije vrste gljiva: *Candida glabrata* i *Candida tropicalis*, što je bilo u skladu s kliničkom slikom bolesnika. Naime, bolesnik je u kliničkom tijeku bio febrilan nakon inicijalne primjene empirijskih antibiotika, te tek nakon terapije vorikonazolom postaje afebrilan. Kod istog bolesnik hemokulture nisu detektirale gljive. I u radovima drugih autora opisuju se slične epizode FN, gdje se također samo SeptiFastom dokazuje kandidemija, a hemokulture ostaju nijeme (29). Autori istog rada (29) objašnjavaju da je mogući uzrok odsustva izolacije gljiva izostanak nasađivanja krvi u bočice sa specijalnim fungalnim medijem.

66% uzoraka ostaje sa SeptiFastom negativno; slični rezultati nalaze se i u drugim radovima (29,31). SeptiFast-om se nije uspjelo detektirati česte uzročnike bakterijemije: *Staphylococcus epidermidis* dva puta, Gram-negativne bakterije: *Klebsiella pneumoniae* ESBL, *Escherischia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (jednom svaku bakteriju). U dva uzorka pomoću hemokultura su se izolirale bakterije, koje ne može detektirati SeptiFast: *Moraxella monoliquefaciens* i *Propionibacterium acnes*. Neuspjeh izolacije SeptiFast-om objašnjava se u literaturi na više načina: prvo uzorak krvi za analizu za SeptiFast je manji nego za hemokulturu, teoretski količina bakterija je na samom početku febrilnog stanja niska, bilo zbog malog broja granulocita ili zbog profilaktičke primjena antibiotika (u našem uzorku je značajan broj bolesnika, koji su bili povrgnuti bilo alogenoj bilo autolognoj transplantaciji i imali su antibiotsku i antifungalnu profilaktičku terapiju), potom jedan od uzroka može biti i paradoksa inhibicija molekulske metode u situacijama prisustva velike količine bakterija. Nadalje, niska senzitivnost SeptiFast-a za CoNS i streptokoke je moguće povezana sa semikvantitativnom analitičkom *cutoff* vrijednosti, koja je prije svega prilagođena da razlikuje kontaminaciju od infekcije u neneutropeničnih bolesnika sa sepsom (28, 29, 32, 35, 36). Najčešće izolirana vrsta mikroorganizma u našem uzorku pomoću obje metode su CoNS. Vjerojatni uzrok je veliki broj bolesnika, koji su imali centralni venski kateter.

Za usporedbu učinkovitosti SeptiFast-a u usporedbi sa "zlatnim standardom" hemokulturom isprva su se uspoređivali epizoda FN prema epizodi FN ili pozitivni prema pozitivnim rezultatima SeptiFast-a i hemokultura (odnosno negativni prema negativnim). Rezultat osjetljivosti SeptiFast-a u navedenoj analizi bila je 50% . Rezultati osjetljivosti SeptiFast-a kod drugih autora je između 46-62% (32,35,36), odskaku dobri rezultati osjetljivosti (91,3%) SeptiFast-a u ranom radu Guido i sur. (34). U ROC analizi dobiju se slabi rezultati (AUC=0,63), što bi značilo da je prva hipoteza rada odbačena, odnosno SeptiFast ne može zamijeniti "zlatni standard" hemokulturu u mikrobiološkoj dijagnostici FN. Jednako tako ukoliko se rezultati SeptiFast-a uspoređuju s rezultatima hemokultura izolat prema izolatu odnosno vrsta bakterija prema vrsti bakteriji, što bi trebalo značiti direktniju komparaciju nego prethodna komparacija epizoda FN prema epizodi (52), dobiju se još slabiji rezultati, te se potvrđuje gore navedena tvrdnja o odbacivanju prve hipoteze rada. U literaturi nema kalkulacije točnosti SeptiFast-a prema ROC analizi, pa je ovo time originalni znanstveni doprinos. U dosadašnjoj literaturi za komparaciji dvije metode koristila se podudarnost (*agreement*) kappa (κ), te se dobije slaba podudarnost (69% ili $\kappa=0.37$) (32). Mogući razlozi neuspjeha efikasnosti SeptiFasta u dijagnostici mikroorganizama u FN je sama činjenica neutropenije. Samo u studiji Manzini i sur. (31) i Guido i sur. (32) dobiju povoljnije rezultate za SeptiFast, kao jasno superioniju metodu od hemokultura, no u ostalim radovima, kako je već napomenuto, senzitivnost SeptiFast-a je slična ili lošija od hemokultura (28, 30, 32, 35, 36). Razlike među studijama mogu se objasniti različitim mikroorganizmima, koji su se izolirali, različitim brojem uzoraka krvi, koji su se uzimali po epizodi FN, volumena krvi, prisutnosti ili odsutnosti antibiotke profilakse itd. Važna pretpostavka ove analize bila je da je su hemokulture "zlatni standard" mikrobiološke dijagnostike krvi u FN. Doduše, u našem uzorku imali smo FN epizode s negativnim hemokulturama i istovremeno pozitivnim SeptiFast-om, a klinički tijek se razvijao u smjeru septičkih komplikacija. Drugim riječima diskrepanca između rezultat SeptiFast-a i hemokultura može biti ispravno interpretirana jedino u kliničkom kontekstu. Obzirom da je hemokultura pozitivna samo u 30% uzoraka, u

budućim studijama trebalo bi komparirati nove dijagnostičke metode ne samo s hemokulturom kao "zlatnim standardom", nego i s ishodom FN.

Može se zaključiti da SeptiFast može biti komplementarna metoda, ali ne može zamijeniti hemokulture u etiološkoj dijagnostici bakterijeme kod FN. Daljnja istraživanja bi trebalo planirati na intervencijskoj prospektivnoj osnovi i u komparaciji s ishodom FN.

Prokalcitonin se povisuje specifično kod bakterijskih infekcija, ali ne u drugim vrstama upale (virusnih infekcija, autoimunih bolesti). Ponašanje kalcitonina kod sistemskih gljivičnih infekcija je kontroverzno, prema nekim radovima povisuje se kod vrlo teških gljivičnih infekcija, drugi izvještavaju o lošoj senzitivnosti kod gljivičnih infekcija (53,54). Mjesto značajne sinteze prokalcitonina u sepsi nije zasad jasno istraženo, no vjerojatno ishodište bi bili monociti i neuroendokrine stanice u parenhimatoznim organima. Vjerojatna uloga prokalcitonina kao medijatora upale je slična ulozi kao i interleukin-6 i interleukina-8 kao dio integralnog odgovora domaćina na sepsu., no postoji i potencijalna intracelularna funkcija prokalcitonina u modulaciji apoptotičkog odgovora na upalu. U metaanalizi (55) ispitala se uloga prokalcitonina, CRP-a i interleukina-6 u dijagnozi teške infekcije kod bolesnika s FN. Od ta tri markera, prokalcitonin je imao najbolju diskriminatornu vrijednost za dijagnozu bakterijske infekcije kod bolesnika s FN, no senzitivnost CRP-a je bila bolja, odnosno prokalcitonin je bio specifičniji, ali manje senzitivnan marker bakterijske infekcije kod bolesnika s FN. Autori su zaključili da bi prokalcitonin bio bolji marker potvrđivanja infekcije, a manje bi bio upotrebljiv za isključivanje infekcije.

U ovom radu htjelo se pokazati imaju li prokalcitonin i CRP povezanost s bakterijemijom u inicijalnoj obradi FN. Distribucije prokalcitonina razlikuju se statistički signifikantno u ovisnosti da li se radi o pozitivnoj ili negativnoj hemokulturi, dok se za CRP ne dobije statistički značajna razlika distribucija u ovisnosti o istom, što je u skladu s rezultatima u literaturi (56). U radu Jimeno i sur. (56) koristi se *cut-off* vrijednost 0,5 ng/ml za diskriminaciju bakterijske infekcije kod inicijalne obrade FN (kod autora u bazičnoj obradi). U istom radu postižu se statistički značajno više vrijednosti prokalcitonina kod bolesnika s mikrobiološki potvrđenom infekcijom, dok se za CRP isto ne utvrdi. To bi značilo da se prokalcitonin povisuje ipak brže

nego CRP u populaciji bolesnika s FN što je skladu s radovima (56,57), ali u suprotnosti s prethodno spomenutima (40).

U bazičnim radovima Klustersky i sur. (4,58) pokazano je da je MASCC indeks rizika koristan prediktor ishoda FN. No u kliničkom radu, kod primjene MASCC indeksa, najviše smo zabrinuti za mogućnost postojanja lažno pozitivnih rezultata za povoljan ishod, nego lažno negativnih, jer lažni povoljni ishod može dovesti do drastične greške npr. nezadržavanje u bolnici bolesnika s FN, čiji klinički tijek može voditi u katastrofu. Escalante i sur. (60) su uočili visoki postotak komplikacija teškog mukozitisa > stupnja 2 kod bolesnika s niskim rizikom prema MASCC indeksu rizika, slični prigovori, koji na ozbiljan način problematiziraju MASCC indeks rizika navodi se u još jednom radu (61). U njihovoj statistici, 15% bolesnik s niskim rizikom prema MASCC-u je razvilo ozbiljne komplikacije. Iz tih razloga na našem uzorku se učinilo ispitivanje povezanosti MASS i pozitivnog ishoda FN. Prvo je u ROC analizi pokazana odlična diskriminacijska točnost MASCC za razlikovanje povoljnog ishoda FN (povoljni ishod MASCC \geq 21) od nepovoljnog ishoda FN (MASCC $<$ 21). AUC vrijednost za MASCC je iznosila 0.9441, što je bolji rezultat nego u radu Hui i sur. (59).

U daljnjoj obradi rezultata učinjena je logistička regresijska analiza za pozitivan ishod i MASCC, CRP i dob kao numeričkim prediktorima povoljnog ishoda FN. Moglo se uočiti da je samo koeficijent uz MASCC statistički značajan ($P=0.0032$) na razini od 5%. Za interpretaciju važniji dio "odds ratio estimates" pokazuje da se za jediničnu promjenu MASCC, šansa (odds) promijeni s *odds ratio* kao faktorom, uz uvjet da su ostale varijable konstantne, dakle za jedični porast MASCC indeksa, šansa/izgled za pozitivni ishod FN se promijeni s faktorom 2,82 (interval pouzdanosti 1,42-5,61) ili na drugačiji način izraženo: s jediničnim porastom MASCC, šansa/izgled za pozitivan ishod se poveća za 182%, s 95% intervalom pouzdanosti od 42 do 461%. Slika 9 grafički prikazuje odnos opserviranih vrijednosti MASCC i vjerojatnosti pozitivnog ishoda.

Uzimajući u obzir već spomenute prigovore za MASCC (60,61) u daljnjim ciljevima rada se uspoređivalo upalne parametre s MASCC indeksom, odnosno pokušalo se odgovoriti na pitanje da li neki od upalnih parametara iz krvi bolesnika, u inicijalnoj obradi, može pomoći u

diskriminaciji bolesnika s FN u grupe rizika za komplikacije FN (povoljan odnosno nepovoljan ishod FN). Jednako tako kao varijablu se uključila i dob. U tu svrhu je korištena *stepwise* logistička regresija. Prema rezultatima analize; jedino uključivanje prokalcitonina u drugom koraku postupne logističke regresije poboljšava šansu procjene povoljnog ishoda (odds ratio 2.293; 95% Wald CL 1.413-3.721) na 2.463; Wald CL 1,427-4,252). U radu Uys i sur. (62) u multivarijantnoj analizi niti jedan od upalnih parametara : prokalcitonin, CRP itd. nije bio nezavisna varijabla za predikciju komplikacija FN, doduše u studiji nisu bili uključeni hematološki bolesnici nakon alogene transplantacije koštane srži, što imamo u ovoj studiji. Ahn i sur.(63) imaju drugačije rezultate za prokalcitonin: na osnovi rezultat svog rada preporučuju ga kao dodatak MASCC-u, a u radu Combariza i sur. (64) CRP ispada dobar prediktor bolesnika s visokim rizikom od komplikacija FN i smrti.

Sljedeći zadatak je bio ispitati interakciju između MASCC indeksa rizika i bakterijemijskog statusa (prisustva pozitivne ili negativne hemokulture). Predvidjeti bakterijemijski status u osnovi je vrlo teško, no zna se da je prisustvo bakterijemije značajno ovisi o vrsti maligne bolesti u podlozi, premda smrtnost od bakterijemije je oko 32% bez obzira na vrstu neoplazme (65). U praksi se empirijska antibiotska terapija uvodi bez podataka o bakterijemijskom statusu, pa neki autori postavljaju pitanje da li uopće trebamo dokumentirati bakterijemiju ili se treba samo osloniti na procjenu rizika komplikacija (66). Isti autori (66) nisu potvrdili interakciju između MASCC indeksa rizika i bakterijemijskog statusa.

Učinjena je *stepwise* (postupna) logistička analiza, koja je trebala pokazati povezanost dobi, CRP, prokalcitonina, MASCC, molekulske dijagnostike s pozitivnom hemokulturom (dokumentiranom bakterijemijom). Prema podacima analize MASCC indeks rizika i prokalcitonin poboljšavaju statistički značajno šansu (*odds ratio*) da se dogodi pozitivna hemokultura.

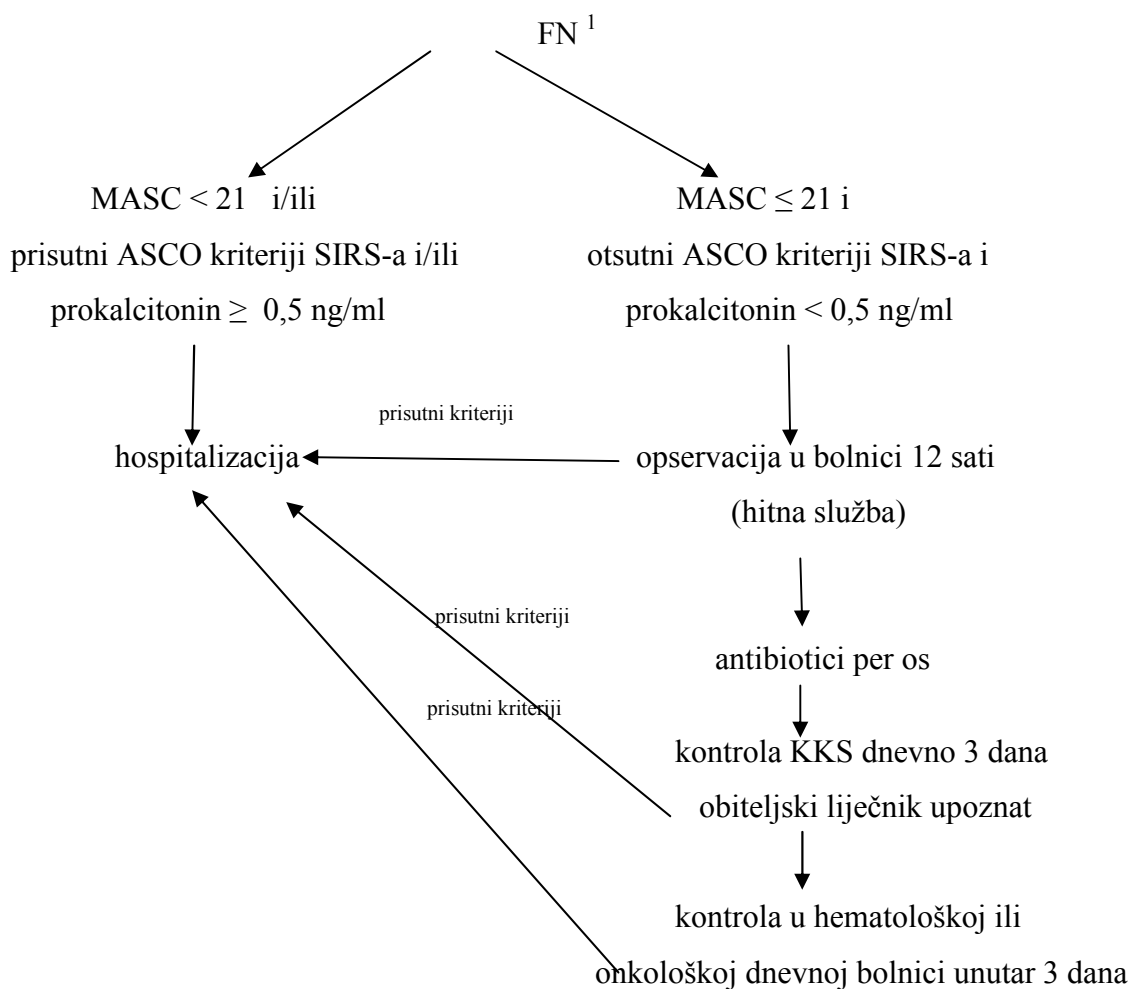
U literaturi je istraživano više čimbenika prediktora ishoda FN. U radu Günalpa i sur. (67) broj trombocita manji od 50×10^6 , CRP > 50 mg/dl, hipoproteinemija, glomerulska filtracija ≤ 90 ml/min, MASCC < 21 su neovisni rizični čimbenici za nepovoljan ishod FN.

S ciljem poboljšanja MASCC indeksa rizika pojedini autori uvode modificirane MASCC indekse rizika kao što je to npr. u radu Carmona-Bayonasa (68), koji utvđuju upotrebljivost tzv. CISNE indeksa (*Clinical Index of Stable Febrile Neutropenia*), koji uključuje ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) izvedbeni status, prisustvo KOBP-a, kronične kardiovaskularne bolesti, mukozitisa, broj monocita i hiperglikemiju.

Može se zaključiti da je MASCC indeks rizika široko ispitivan u literaturi. Osam studija ocjenjuje indeks, a dodatnih sedam modificirani indeks rizika. U osam studija bilo je analizirano 2.582 bolesnika, ali u 11% bolesnika, koji se procjenjuju s niskim rizikom za razvoj komplikacija FN razvijaju se ipak takve komplikacije (69). MASCC je ipak uključen u temeljene smjernice IDSA i ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*). Prema ASCO-vim preporukama, liječenje FN može biti prihvatljivo bez hospitalizacije uz vrlo stroge kriterije i temeljitu kliničku prosudbu što prije svega uključuje MASCC indeks rizika ≤ 21 i odsutvo simptoma SIRS-a. ASCO-e smjernice sadrže 41 simptoma SIRS-a odnosno iznimki kod kojih se usprkos MASCC-u indicira hospitalizacija.

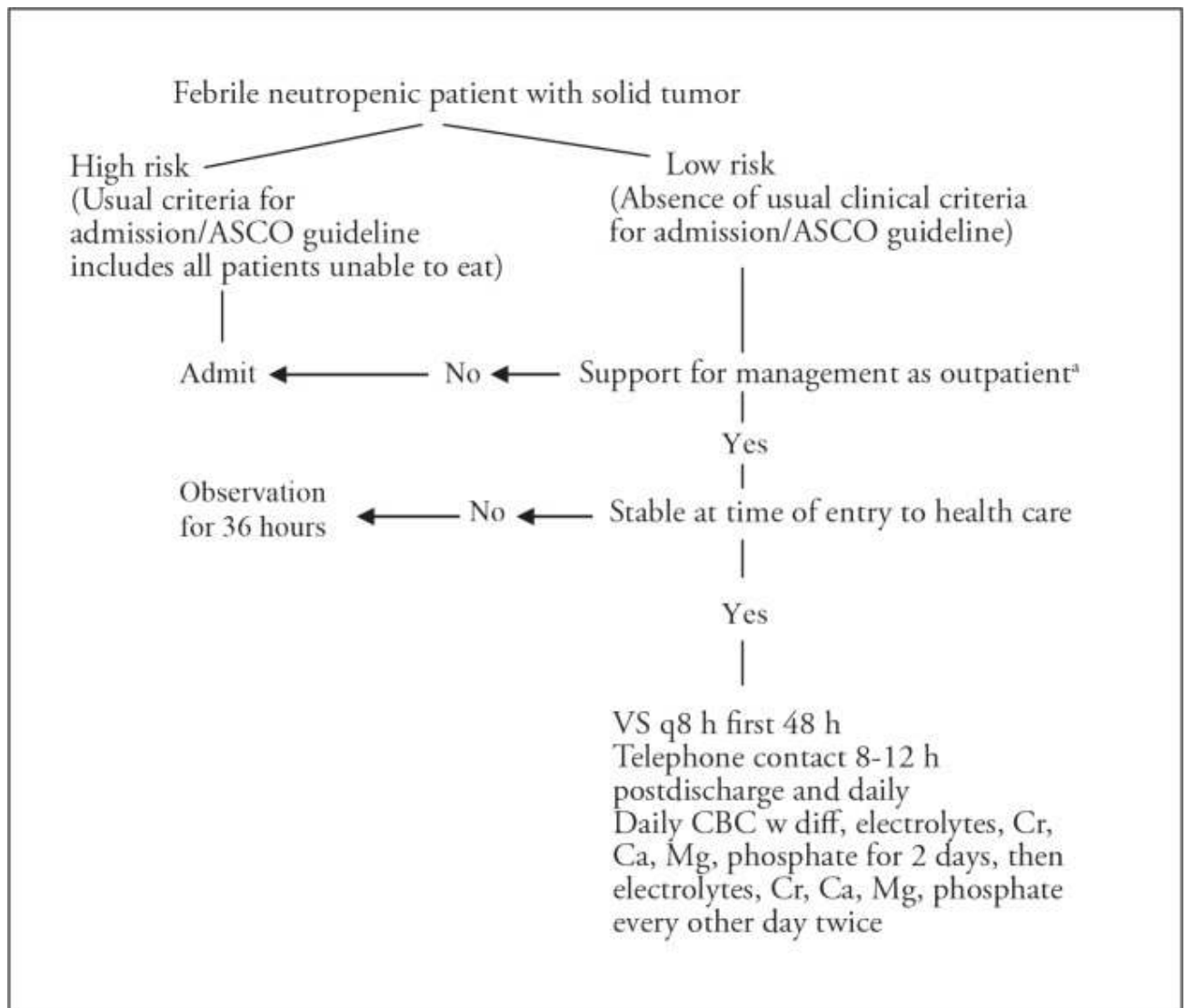
Posljednji zadatak doktorskog rada je izrada algoritma odnosno postupnika kod FN. Kao predložak su uzete ASCO smjernice (69) i predloženi algoritam Bitar i sur., koji se prije svega odnosi na bolesnike sa solidnim tumorima (70). Algoritam je predložen obzirom na domaće prilike. Uzimajući u vid rezultate ovog rada u predloženi algoritam uključuje se prokalcitonin u incijalnoj obradi te 12 sati nakon opservacije u bolničkoj Hitnoj službi. Osim prokalcitonina nakon 12 sati opservacije ponavlja se fizikalni pregled i sve ostale relevantne laboratorijske pretrage. Dodatne pretrage treba učiniti ovisno o kliničkoj slici. Treba napomenuti da algoritam dolazi u obzir uz uvjete: ukoliko je bolesniku dostupna bolnica u udaljenosti od 50 km, ukoliko je bolesnikov liječnik obiteljske medicine dostupan na dnevnoj osnovi, ukoliko se bolesnik složi s predloženim liječenjem i nužnosti kontrole u bolnici u roku tri dana. Predloženi panel pretraga uz predloženi algoritam je u skladu sa smjernicama već spomenutog ASCO-a i sa smjernicama IDSA, NCCN, ESMO (*European Society for Medical Oncology*), Japan Febrile Neutropenia Study Group.

Slika 17 Algoritam kod FN



¹Od pretraga učiniti: anamneza, fizikalni pregled, KKS, elektroliti, ureja, kreatinin, bilirubin AST, ALT, AF, urin, 2X hemokulture: periferna vena i CVK ako postoji, kulture stolica, urina, brisevi ždrijela, nosa, kože itd. ovisno o kliničkoj slici, Rtg pluća u slučaju respiratornih simptoma, bolesnici sa simptomima gripe u sezoni epidemije nazofaringealni uzorak na respiratorne viruse.

Slika 18. Predloženi algoritam obrade Bitar i sur. (70)



7. ZAKLJUČCI

1. Molekulska metoda SeptiFast, obzirom na vrijednost u ROC analizi $AUC=0,63$, ne može zamijeniti "zlatni standard" hemokulture u dijagnostici FN, eventualno može biti komplementarna metoda, osobito kod dijagnosticiranja fungemije

2. Distribucije prokalcitonina razlikuju se statistički signifikantno u ovisnosti da li se radi o pozitivnoj ili negativnoj hemokulturi, dok se za CRP ne dobije statistički značajna razlika distribucija u ovisnosti o istom, što bi impliciralo da bi prokalcitonin mogao poslužiti kao komplementarna metoda u dokazivanju bakterijemije u inicijalnoj obradi FN.

3. MASCC indeks rizika je prema ROC analizi odlično diskriminira povoljni od nepovoljnog ishoda FN, što potvrđuje i logistička regresijska analiza

4. Ukoliko se MASCC indeksu rizika priključi prokalcitonin dobiju se bolje šanse/izgledi (*odds ratio*) za procjenu pozitivnog ishoda FN, ostali čimbenici CRP, dob nemaju utjecaja.

5. MASCC indeks rizika, prokalcitonin su povezani s pozitivnom hemokulturom (statusom bakterijemije), ostali čimbenici: molekulska, dijagnostika, CRP, dob nisu povezani.

8. SAŽETAK

Neutropenijska vrućica (febrilna neutropenija-FN) je jedno o najučestalijih onkoloških hitnih stanja i predstavlja i značajan rizik mortaliteta. Usprkos liječenju s antibioticima širokog spektra u bolničkim uvjetima te drugim terapijskim mjerama smrtnost doseže oko 10%. Premda je hospitalizacija kod FN uobičajen postupak, predmet je istraživanja, koji bolesnici ipak ne bi trebali biti hospitalizirani. Najsnažnije je prihvaćen MASCC indeks rizika, pomoću kojeg bi trebalo moći predvidjeti rizik komplikacija FN. Nadalje, dokazivanje mikrobiološkog uzročnika FN postaje središnje mjesto u obradi i liječenju FN, te je jedna od svrha rada bila evaluirati korist od upotrebe multiplex PCR testa-SeptiFast-a u dijagnostici bakterijemije kod bolesnika s FN.

ROC analiza u ovom radu pokazala je da u mikrobiološkoj obradi FN, SeptiFast ne može zamijeniti standardne hemokulture. S druge strane, MASCC indeks rizika pokazao se u ovom radu uspješnim u razlikovanju bolesnika s FN i s niskim rizikom od komplikacija od onih sa visokim rizikom od komplikacija. Dodavanjem prokalcitonina MASCC-u poboljšava se stratifikacija bolesnika s povoljnim od onih s nepovoljnim ishodom FN.

9. SUMMARY

Molecular diagnostics of bacteremia and fungemia in patients with febrile neutropenia and malignant disease

Davorin Herceg

Zagreb, 2016.

Febrile neutropenia (FN) is one of the most common oncological emergencies with significant risk of mortality. Nonetheless, patients are treated with broad-spectrum antimicrobial agents in hospital conditions and despite of other therapeutical measures, reported mortality was approximately 10%. Although the conduction of the treatment in the hospital environment is efficient, not all FN patients require intensive treatment, and this practise has been debated. Currently, the most used model of prediction of complication of FN is the MASCC risk-index score. This study was designed to validate the MASCC score in an attempt to accurately predict the FN complication risk. Furthermore, the detection of microbiological pathogen becomes a central point in management of FN and the one of the aim of the study was also to evaluate the usefulness of the multiplex blood PCR or SeptiFast test in the diagnosis of bloodstream infections in FN patients.

ROC analysis in this study shows that the SeptiFast can not replace blood cultures in the diagnostic workup of FN. On the other hand the MASCC score can successfully discriminate the FN patients with low risk of complications and adding the procalcitonin adding to the MASCC risk-index score could improve risk stratification.

10. LITERATURA

1. *Schimpft SC*. Empiric antibiotic therapy for granulocytopenic cancer patients. *Am J Med* 1986;80:13-20.
2. *Bodey GP, Buckley M, Sathe YS i sur*. Quantitative relationship between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1996;64:328-340.
3. *Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA i sur*. Clinical practise guideline for he use antimicrobial agents in neutropenic with cancer: 2010 update by the Infectious Disease Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;52:56-93.
4. *Klastersky J, Paesmans M, Rubinstein EB i sur*. The multinational association for supportive care in cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18:3038-3051.
5. *Gersen SL, Talbot GH, Hurwitz S i sur*. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984;10:345-351.
6. *Gaur AH, Flynn PM, Giannini MA i sur*. Difference in time to detection: a simple method to differentiate catheter-related from non catheter related bloodstream infection in immunocompromised pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003;37:469-475.
7. *Siegman-Igra Y, Anglim AM, Shapiro DE i sur*. Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. *J Clin Microbiol* 1997;57:928-936.
8. *Marchetti O, Calandra T*. Infections in neutropenic cancer patients. *Lancet* 2002;359:723-725.
9. *Serody JS, Berrey MM, Albritton K i sur*. Utility of obtaining blood cultures in febrile neutropenic patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:533-538.
10. *Coullioud D, Van der AP, Viot M, Lasset C*. Prospective multicentric study of the etiology of 1051 bacteremic episodes in 782 cancer patients. CEMIC (Fench-Belgian Study Club of Infectious Diseases in cancer). *Support Care cancer* 1993;1:34-36.

11. *Link H, Bohme A, Cornely OA i sur.* Antimicrobial therapy of unexplained fever in neutropenic patients-guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO), Study Group Interventional Therapy of Unexplained Fever, Arbeitsgemeinschaft Supportivmassnahmen in der Onkologie (ASO) of the Deutsche Krebsgesellschaft (DKG-German Cancer Society). *Ann Hematol* 2003;82:S105-117.
12. *Flaherty JP, Waitley D.* Multicenter randomized trial of ciprofloxacin plus azlocillin vs ceftazidime plus amikacin for empiric treatment of febrile neutropenic patients. *Am J Med* 1989;87:278S-282S.
13. *Cometta A, Zinner S, de Bocks R i sur.* Piperacillin/tazobactam plus amikacin vs ceftazidime plus amikacin as empiric therapy for fever in granulocytopenic patients with cancer. The International Antimicrobial Therapy Cooperative Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:445-452.
14. *Paul M, Soares-Weiser K, Grozinsky S i sur.* Beta-lactam versus beta-lactam-aminoglycoside combination therapy in cancer patients with neutropenia. *Cochrane database Syst Rev* 2003: CD003038.
15. *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), International Antimicrobial Therapy Cooperative Group, and the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group.* Vancomycin added to empirical combination antibiotic therapy for fever in granulocytopenic cancer patients. *J Infect Dis* 1991;163:951-958.
16. *Averbuch D, Orsch CH, Cordonnier C i sur.* European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance: summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. *Haematologica* 2013; 98:1826-1835.
17. *Wingard JR.* Empirical antifungal therapy in treating febrile neutropenic patients. *Clin Infect Dis* 2004;39:S38-S43.

18. *Michallet M, Ito JI*. Approches to the management of invasive fungal infections in hematologic malignancy and hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2009;27:3398-3409.
19. *Staber P, Langner S, Dombusch HJ, Neumeister P*. Antifungal management in cancer patients. *Wien Med Wochenschr* 2007;17:503-510.
20. *Marrk A, Seidel K, White TE i sur*. Candidemia in allogenic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole antimicrobial therapy. *J Infect Dis* 2000; 181:309-316.
21. *Walsch TJ, Finberg RW, Arndt C i sur*. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infections Diseases Mycoses Study Group. *N Engl J Med* 1999;340:764-771.
22. *Boogaerts M, Winston DJ, Bow EJ i sur*. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycholate as empirical antiphungal therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2001;135:412-422.
23. *Walsch TJ, Pappas P, Winston DJ i sur*. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med* 2002;346:225-234.
24. *Walsch TJ, Tepler H, Donowitz i sur*. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Engl J Med* 2004;301:1391-1402.
25. *Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N i sur*. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta analysis. *Clin Infect Dis* 2006;42:1417-1727.
26. *Yang S i Rothman RE*. PCR-diagnostica for infectious disease: uses, limitations, and future applications in acute settings. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:337-348.
27. *Lehmann LE, Hunfeld K-P, Emrich T i sur*. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197:313-324.

28. *von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD i sur.* Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2405-2410.
29. *Lamoth F, Jaton K, Prod'hom i sur.* Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3510-3516.
30. *Varani S, Stanzani M, Paolucci M i sur.* Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect* 2009; 58:346-351.
31. *Mancini N, Clerici D, Diotti R i sur.* Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2008; 57:601-604.
32. *Bravo D, Blanquer J, Tormo M i sur.* Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *Int J Infect Dis* 2011; 15:326-331.
33. *Paolucci M, Stanzani M, Mechionda F i sur.* Routine use of real-time polymerase chain reaction method for detection of bloodstream infections in neutropenic patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 130-134.
34. *Guido M, Quattrocchi M, Zizza A i sur.* Molecular approaches in the diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Prev Med Hyg* 2012; 53:104-108.
35. *Santolaya ME, Farfán MJ, de la Maza V i sur.* Diagnosis of bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with cancer. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:957-961.
36. *Shachor-Meyouhas Y, Sprecher H, Moscoviz D i sur.* Molecular-based diagnosis of bacteremia in the setting of fever with or without neutropenia in pediatric hematology-oncology patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:500-503.
37. *von Lilienfeld-Toal M, Dietrich MP, Glasmacher A i sur.* Markers of bacteremia in febrile neutropenic patients with haematological malignancies: procalcitonin and IL-6 are more reliable than C-reactive protein. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2004; 23:539-544.

38. *Persson L, Söderquist B, Engervall i sur.* Assessment of systemic inflammation markers to differentiate a stable from a deteriorating clinical course in patients with febrile neutropenia. *Eur J Haemat* 2005;74:297-303.
39. *Marti FM, Cullen MH, Roila F.* Management of febrile neutropenia: ESMO Clinical Recommendations. *Ann Oncol* 2009;20(Supp 4):166-169.
40. *Sakr Y, Sponholz C, Tuche F i sur.* The role of procalcitonin in febrile neutropenic patients: review of the literature. *Infection* 2008;36:396-407.
41. *Winn WJr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G.* Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5. izd. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2006, str. 67.
42. *Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM i sur.* Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiolog Rev* 2006;19:165-256.
43. *Martinez-Albarran M, Perez-Molina JdeJ, Gallegos-Castorena S i sur.* Procalcitonin and C-reactive protein serum levels as markers of infection in a pediatric population with febrile neutropenia in cancer. *Pediatr Hematol Oncol* 2009;26:414-425.
44. *Klausegger A, Hell A, Berger K i sur.* Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. *J Clin Microbiolog* 1999;37:464-466.
45. *Chan KY, Lam HS, Cheung HM i sur.* Rapid identification and differentiation of Gram-negative and Gram-positive bacterial bloodstream infections by quantitative polymerase chain reaction in preterm infants. *Crit Care Med* 2009;37:2441-2447.
46. *Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A i sur.* Real-time PCR for detection and differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiolog* 2002;40:4304-4307.
47. *Caroll NM, Jaeger EEM, Choudhury S i sur.* Detection of and discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:1753-1757.
48. *Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M.* Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clin Chem* 2004;50(8):1301-14.

49. Gaytán-Martínez, Mateos-García E, Sánchez-Cortés E, González-Llaven J, Casanova-Cardiel LJ, Fuentes-Allen JL. Microbiological findings in febrile neutropenia. Arch Med Res 2000;31:388-392.
50. Nakamura A, Sugimoto Y, Ohishi K, Sugawara Y, Fujieda A, Monma F, Suzuki K, Masuya M. Diagnostic value of PCR analysis of bacteria and fungi from blood in empiric-therapy-resistant febrile neutropenia. J Clin Microbiol 2010;48(6):2030-2036.
51. Peters RP, Van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. Lancet Infect Dis 2004;4(12):751-760.
52. Westh H, Lisby G, Breyse F, Bøddinghaus B, Chomarat M, Gant V, Goglio A, Raglio A, Schuster H, Stuber F, Wissing H, Høeft A. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. Clin Microbiol Infect 2009;15:544-551.
53. Christofilopoulou S, Charvalos E, Petrikoss G. Could procalcitonine be a predictive biological marker in systemic fungal infections? Study of 14 cases. Eur J Intern Med 2002;13:493-495.
54. Delevaux I, Andre M, Colombier M. Can procalcitonin measurement help in differentiating between bacterial infection and other kinds of inflammatory process? Ann Rheum Dis 2003;62:337-340.
55. Wu C-W, Wu J-Y, Chen C-K, Huang S-L, Hsu S-C, Lee M G, Chang S-S, Lee C-C. Does procalcitonin, C-reactive protein, or interleukin-6- test have a role in the diagnosis of severe infection in patients with febrile neutropenia? A systematic review and meta-analysis. Support Care Cancer 2015;23(10):2863-72.
56. Jimeno A, García-Velasco A, del val O, González-Billalabeitia E, Hernández R, Sánchez-Muñoz A, López-Martín A, Durán I, Robles L, Cortés-Funes H, Paz-Ares. Assessment of

procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker in patients with solid tumors and febrile neutropenia. *Cancer* 2004; 100:2462-2469.

57. *Whicher J, Bienvenu J, Monneret G.* Procalcitonin as an acute phase marker. *Ann Clin Biochem* 2001;38:483-493.

58. *Uys A; Rapoport B, Anderson R.* Febrile neutropenia: a prospective study to validate the Multinational Association of Supportive Care of cancer (MASCC) risk-index score. *Support care Cancer* 2004;12:555-560.

59. *Hui EP, Leung LKS, Poon TCW, Mo F, Chan VTC, Ma ATW, Poon A, Hui EK, Mak S, Lai M, Lei KIK, Ma BBY, Mok TSK, Yeo W, Zee BCY, Chan ATC.* Prediction of outcome in cancer patients with febrile neutropenia: a prospective validation of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk-index in a Chinese population and comparison with Talcott model and artificial neural network. *Support Care Cancer* 2011;19:1625-35.

60. *Escalante CP, Weiser MA, Manzullo E i sur.* Outcomes of treatment pathways in outpatient treatment of low risk febrile neutropenic cancer patients. *Support care Cancer* 2004;12(9):657-662.

61. *Cherif H, Johansson, Bjorkholm i sur.* The feasibility of early hospital discharge with oral antimicrobial therapy in low risk patients with febrile neutropenia following chemotherapy for hematologic malignancies. *Haematologica* 2006;91(2):215-222.

62. *Uys A, Rapoport BL, Fickl H, Meyer PWA, Anderson R.* prediction of outcome in cancer patients with febrile neutropenia: comparison of the Multinational Association of Supportive care in cancer risk-index score with procalcitonin, C-reactive protein, serum amyloid A, and interleukins-1 β , -6, -8 and -10. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2007;16(6):475-83.

63. *Ahn S, Lee YS, Lim KS, Lee JL.* Adding procalcitonin to the MASCC risk-index score could improve risk stratification of patients with febrile neutropenia. *Support Care Cancer* 2013;21(8):23303-8.

64. *Combariza JE, Lombana M, Pino LE, Arango M.* C-reactive protein and the MASCC risk index identify high-risk patients with febrile neutropenia and hematologic neoplasms. *Support Care Cancer* 2015;23:1009-13.
65. *Norgaard M, Larsson H, Pedersen G, Schonheyder HC, Sorensen HT.* Risk of bacteraemia and mortality in patients with haematological malignancies. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:217-223.
67. *Günel M, Koyunoğlu M, Gürler S, Koca A, Yeşilkaya I, Öner E, Akkaş M, Aksu NM, Demirkan A, Polat O, Elhan AH.* Independent factors for prediction of poor outcomes in patients with febrile neutropenia. *Med Sci Monit* 2014;20:1826-32.
68. *Carmona-Bayonas A, Jiménez-Fonseca P, Virizuela Echaburu J, Antonio M, Font C, Biosca M i sur.* Prediction of serious complications in patients with seemingly stable febrile neutropenia: validation of the Clinical Index of Stable Febrile Neutropenia in a prospective cohort of patients from the FINITE study. *J Clin Oncol* 2015;33(5):465-71.
69. *Flowers CR, Seidenfeld J, Bow EJ, Karten C, Gleason C, Hawley DK, Kuderer NM, Langston AA, Marr KA, Rolston KVI, Ramsey SD.* Antimicrobial prophylaxis and outpatient management of fever and neutropenia in adults treated for malignancy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Oncol Pract* 2012;31(6):794-810.
70. *Bitar RA.* Utility of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer (MASCC) risk index score as a criterion for nonadmission in febrile neutropenic patients with solid tumors. *Perm J* 2015;19(3):37-47.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen 26. travnja 1965. u Zagrebu, gdje završava osnovnu školu, potom i V zagrebačku gimnaziju.

Diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1991. godine. Tijekom studija bio demonstrator pri Katedri za histologiju i Katedri za patologiju.

Pripravnički liječnički staž odradio u KB Merkur u Zagrebu, državni ispit položio 1992. godine.

Kao liječnik sudjelovao u domovinskom ratu 1991./1992. u Trnjanskoj 48. brigadi.

Nakon položenog državnog ispita 1992. nekoliko mjeseci radio u Domu zdravlja "Velika Gorica".

Od 1993. do 1997. specijalizirao internu medicine u Klinici za unutrašnje bolesti, KBC Zagreb i položio specijalistički ispit.

1996./1997. Pohađao stručni postdiplomski studij "Ultrazvuk u kliničkoj medicine i gastroenterologiji i hepatologiji" i položio propisane ispite

1997. do 2001. zaposlen u Klinici za patofiziologiju, KBC Zagreb kao odjelni liječnik, a od 2001. u Zavodu za internističku onkologiju Klinike za onkologiju, KBC Zagreb

2001. klinička praksa iz internističke onkologije u Hamburgu, Eppendorf

2001. do 2003. uža specijalizacija iz internističke onkologije, položio ispit iz uže specijalizacije iz internističke onkologije.

2003. položio "ESMO exam" iz internističke onkologije

2009.-2012. pohađao "Doktorski studij iz biomedicinskih znanosti" i položio propisane ispite

Od 2008. do danas pročelnik Dnevne bolnice Klinike za onkologiju

Predmet stručnog interesa je liječenje sarkoma, melanoma, karcinoma dojke i imunoterapija tumora.

Do sada objavio kao prvi autor odnosno koautor više znanstvenih publikacija, od kojih se 5 citiraju u Current Contentsu.

Član je Hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ-a, ESMO-a.

Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom, pasivno znanje talijanskog jezika.

Oženjen, otac dvoje djece.

