

Invazívne mykotické infekcie u hematoonkologických pacientov – epidemiológia, rizikové faktory, klinické príznaky a diagnostika

Martina Tošková¹, Jana Winterová¹, Iva Kocmanová², Zdeněk Ráčil^{1,3}

¹Interní hematologická a onkologická klinika, Masarykova univerzita a Fakultní nemocnice Brno

²Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

³CEITEC – Central European Institute of Technology, Masarykova univerzita, Brno

Invazívne mykotické infekcie predstavujú závažnú infekčnú komplikáciu imunokompromitovaných pacientov. V porovnaní s bakteriálnymi infekciami je ich výskyt menej častý, na druhú stranu mortalita s nimi spojená je výrazne vyššia než je tomu u infekcií bakteriálnych. Posledné dve desaťročia priniesli významné zmeny v epidemiológii invazívnych mykóz a behom posledných niekoľkých rokov došlo k značným pokrokom v diagnostike a liečbe.

Kľúčové slová: invazívne mykotické infekcie, rizikové faktory, klinické príznaky, diagnostika.

Invasive fungal diseases in hematological patients – epidemiology, risk factors, clinical sings and diagnostics

Invasive fungal infections are serious life-threatening complication in immunocompromised patients. They are rare in comparison with bacterial infection but attributable mortality is higher. Last two decades brought significant changes in epidemiology of invasive fungal diseases and the last few years brought much progress in diagnostics and treatment.

Key words: invasive fungal infections, risk factors, clinical sings, diagnostics.

Onkologie 2012; 6(6): 298–303

1. Pôvodcovia invazívnych mykotických infekcií

Najčastejší patogén spôsobujúci invazívne mykotické ochorenie u pacientov s nádorovým ochorením je *Candida* spp. Vyskytuje sa ako prirodzený komenzál kože a slizníc a väčšina invazívnych kandidóz je teda endogénneho pôvodu, spôsobená prestupom cez poškodené sliznice (napr. pri mukositide po podanej chemoterapii). Môže sa však jednať aj o exogénne infekcie, predovšetkým u kanylových infekcií, kedy dochádza k prenosu rukami personálu (1).

Najčastejšia invazívna mykóza spôsobená vláknitou hubou je invazívna aspergilóza. Aspergilové konídiá sa bežne vyskytujú v prostredí, v nemocniciach ich môžeme nájsť vo vzduchu, sprchách a v kvetináčoch. Ich množstvo vo vzduchu sa výrazne zvyšuje pri stavebných úpravách v nemocnici a jej okolí. Iba málo druhov z celkom vyše 200 druhov aspergilov je patogénnych pre ľudí. Skoro 60 % prípadov invazívnych aspergilóz v talianskej štúdii u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (2) spôsobil *Aspergillus fumigatus*, menej často sa ako pôvodca vyskytoval *A. flavus*, *A. niger* a *A. terreus*. S rozvojom molekulárne biologických metód a ich použitia pri identifikácii kultúr sa

objavujú i v minulosti zriedka rozpoznané druhy ako *A. lentulus*, alebo niektoré teleomorfy rodu *Aspergillus* (napr. *Neosartorya* spp.)

Stále častejšie sa môžeme stretnúť s infekciami spôsobenými takzvanými vzácnymi mykotickými patogénmi, ako sú zygomycéty (*Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp.), *Fusarium* spp. alebo *Scedosporium* spp. Infekcia je exogénna, najčastejšie spôsobená inhaláciou, menej často ingesciou alebo kontamináciou rán a kožných poranení (predovšetkým u fusariózy).

2. Epidemiológia

V posledných dvoch desaťročiach došlo k nárastu výskytu invazívnych mykotických infekcií. Príčinou je nárast počtu ťažko imunokompromitovaných pacientov, prevažne počet pacientov s hematologickou malignitou, ktorí sú liečení agresívnou chemoterapiou vedúcou k dlhodobej neutropénii, nárast počtu pacientov po transplantácii solidných orgánov alebo krvotvorby, liečba pacientov vyšších vekových skupín. V 90tych rokoch minulého storočia sa začala masívne používať profylaxia flukonazolom u hematologických pacientov, čo výrazne znížilo počet invazívnych kandidóz flukonazol citlivými kmeňmi (*Candida albicans*) a viedlo

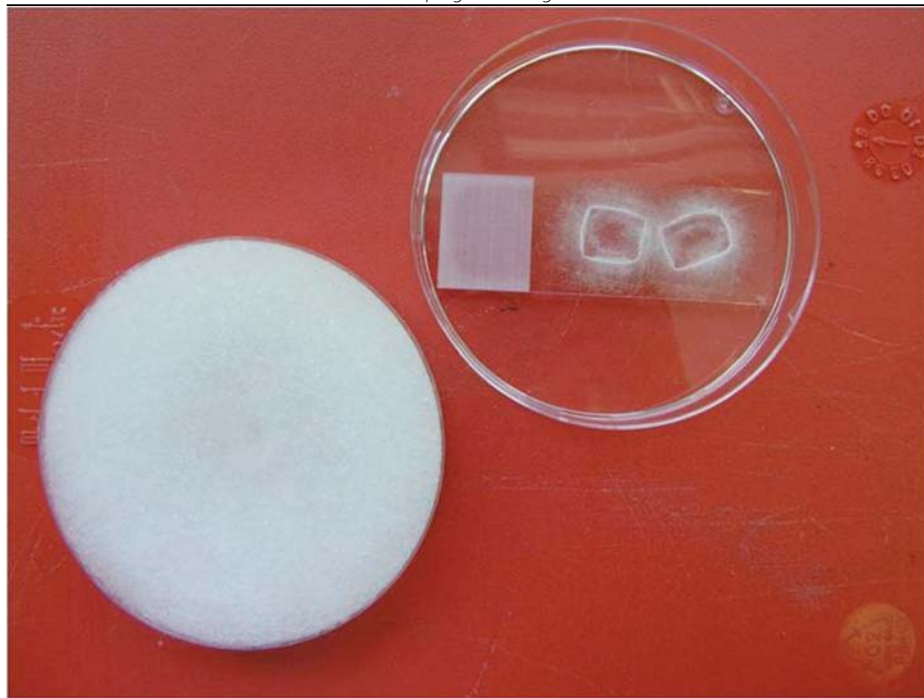
k nárastu infekcií flukonazol rezistentnými druhmi, ako sú *Candida glabrata* a *Candida krusei* (3). Profylaxia flukonazolom však neposkytuje ochranu pred aspergilom a inými vláknitými hubami. Ich zvyšujúca sa incidencia však môže súvisieť aj s lepšími diagnostickými metódami, pri ktorých klesá riziko nesprávnej identifikácie patogéna (4).

Infekcie vláknitými hubami sú najbežnejšie medzi pacientmi s hematologickou malignitou, po transplantácii krvotvorných buniek alebo solidných orgánov, zatiaľ čo u pacientov s HIV pozitivitou, na jednotkách intenzívnej starostlivosti a u novorodencov prevažujú kandidózy. Neofytos a kol. zaznamenal v skupine 250 nemocných po transplantácii krvotvorných buniek s invazívnou mykotickou infekciou 25 % kandidóz a 59 % aspergilóz (4), k podobným výsledkom dospel i Kontoyiannis s početnejšou skupinou 983 rovnako liečených pacientov – 28 % kandidóz a 43 % aspergilóz (5).

3. Rizikové faktory

3.1 Rizikové faktory invazívnej kandidózy

Medzi jedincov s vysokým rizikom vzniku kandidózy patria pacienti s aktívnym nádorovým ochorením (neutropénia, poškodenie sliz-

Obrázok 1. Kultivácia – *Candida albicans* a *Aspergillus fumigatus*

níc) a pacienti hospitalizovaní na jednotkách intenzívnej starostlivosti. Riziko vzniku zvyšuje celá rada liečebných postupov (kortikoterapia, chemo- a rádioterapia, antibiotická terapia, parenterálna výživa), invazívnych výkonov (operácie gastro-intestinálneho traktu, zavedenie centrálného žilného katétru) a komorbidít (napr. renálna insuficiencia).

3.2 Rizikové faktory invazívnej aspergilózy a infekcií vyvolaných vzácnymi vláknitými hubami

Infekcie vláknitými hubami postihujú užšie spektrum pacientov ako invazívne kandidózy. U invazívnej aspergilózy sa najčastejšie jedná o ťažko imunosuprimovaných pacientov s hematologickými malignitami, s hlbokou a protrahovanou neutropéniou (neutrofily $< 0,1 \times 10^9/l$ dlhšie ako 10 dní). Medzi ďalšie rizikové faktory patrí alogénna transplantácia krvotvorby od nezhodného príbuzného darcu alebo od nepríbuzného darcu, reakcia štetu proti hostiteľovi (GvHD – graft versus host disease) stupňa III a IV, reaktivácia CMV (cytomegalovírus) po transplantácii krvotvorby, protinádorová liečba alebo liečba GvHD.

Rizikové faktory invazívnej zygomykózy komplexne zhŕňa review Rodena a kol. (6), ktoré popisuje 929 publikovaných prípadov zygomykóz (od roku 1885). Najohrozenejšou skupinou sú pacienti s diabetes mellitus a hematologickými malignitami, ďalšími rizikovými faktormi môže byť terapia chelátormi železa, liečba kortikosteroidmi a popáleniny.

4. Klinický obraz

4.1 Klinický obraz invazívnej kandidózy

Invazívna kandidóza prebieha vo väčšine prípadov pod obrazom izolovanej kandidémie. Klinická manifestácia kandidémie je však veľmi nešpecifická. Väčšinou je jediným príznakom pretrvávajúca horúčka, eventuálne septický stav nereagujúci na podávanie širokospektrých antibiotík. Hematogénnou cestou môže infekcia diseminovať do najrôznejších tkanív a orgánov. U neutropenických nemocných, s dlhodobou hlbokou neutropéniou (napr. u pacientov liečených pre akútnu leukémiu), je najčastejšou formou diseminácie invazívnej kandidózy postihnutie pečene, sleziny a v niektorých prípadoch i obličiek – tzv. hepatosplenická kandidóza.

4.2 Klinický obraz invazívnej aspergilózy

Stretnutie vnímavého jedinca s touto vláknitou hubou môže spôsobiť širokú škálu ochorení – od relatívne menej závažných alergických foriem, cez aspergilóm až po aspergilové infekcie (aspergilózy), ktoré môžu mať invazívny alebo chronický charakter, môžu byť lokalizované alebo diseminované. Prechod medzi jednotlivými formami je neostrý a závisí hlavne na stupni imunokompetencie postihnutého jedinca.

Vzhľadom k inhalačnej forme infekcie začína invazívna aspergilóza vo väčšine prípadov pod obrazom pneumónie. Iba približne v 5% prípadoch pod obrazom sínusitídy. Infekcia môže následne diseminovať hematogénnou cestou do najrôznejších orgánov (pečeň, obličky, centrálny nervový systém). U hematoonkologických

pacientov a predovšetkým u pacientov po transplantácii krvotvorných buniek k tejto diseminácii dochádza v 30–50% prípadov.

4.3 Klinický obraz invazívnej zygomykózy

Invazívna zygomykóza typicky postihuje rhino-cerebrálnu a oro-faciálnu oblasť. U neutropenických pacientov je najčastejšie postihnutie pľúcne. Kožná a gastrointestinálna forma je menej častá. K diseminácii dochádza v 20–30% prípadov. Infekcia má agresívny priebeh a neliečená rýchlo vedie k smrti pacienta.

Invazívna fusarióza u imunokompromitovaných pacientov veľmi rýchlo hematogénne diseminuje a postihnutý môže byť prakticky ktorýkoľvek orgán, hoci najčastejšie sa stretávame s postihnutím kože (70–90%), pľúc a paranazálnych dutín. Postihnutie kože sa prejavuje mnohopočetnými bolestivými kožnými léziami (erytém, noduly, ulcerácie) a predilekčne sú postihnuté končatiny.

Nutné však povedať, že klinické príznaky, ani použitie zobrazovacích metód, nemôže rozlíšiť medzi invazívnou aspergilózou a zygomykózou – jedinou možnosťou je dôkaz mikrobiologický alebo patomorfologický.

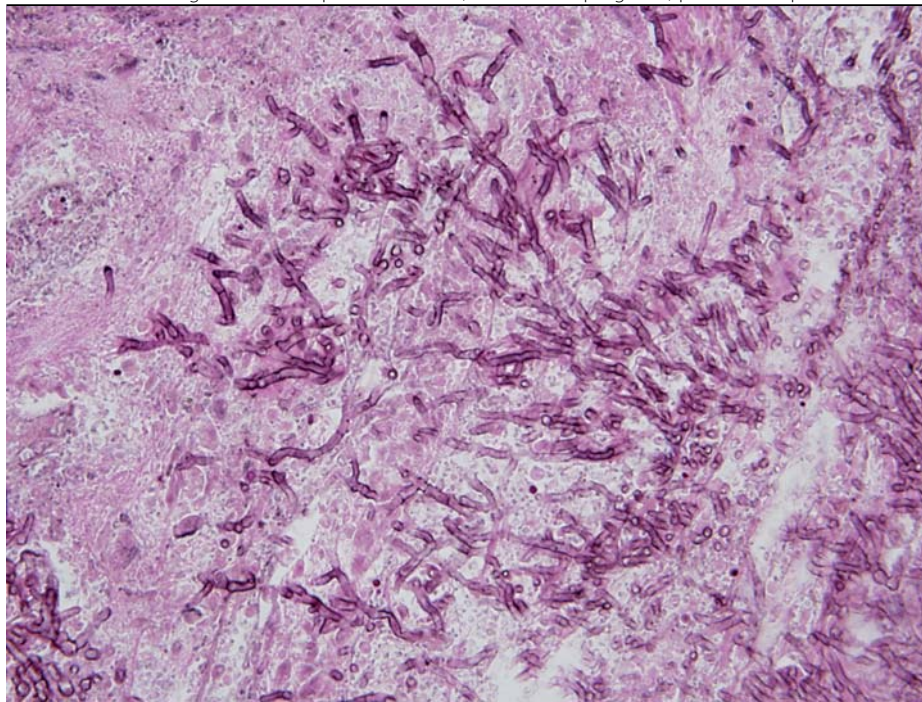
5. Diagnostika

Správna a rýchla diagnostika invazívnych mykotických infekcií je zásadná hlavne u tých najohrozenejších pacientov. Bol dokázaný vzťah medzi mortalitou a včasnou (a správnou) diagnostikou – čím skôr je zahájená liečba, tým väčšiu má pacient šancu na prežitie týchto závažných infekčných komplikácií (7).

5.1 Mikroskopické a kultivačné metódy

Priama mikroskopia je základnou vyšetровacou metódou v diagnostike invazívnych infekcií. Priama vizualizácia patogénu v klinickom materiáli umožňuje jeho predbežnú identifikáciu na základe morfológie a farbenia. Na farbenie sa používajú bežné mikrobiologické farbenia (Gram, Giemsa), alebo špeciálne mykologické farbenia (Mycolnk, fluorescencia). Veľkou výhodou mikroskopie je jej rýchlosť (výsledky môžu byť k dispozícii už do 1 hodiny od odberu) a najväčšou nevýhodou nízka senzitivita, pretože mykotické štruktúry sú viditeľné až keď ich je vo vzorke dostatočné množstvo. Negativita mikroskopie teda nevylučuje mykotickú infekciu.

Kultivácia (obrázok 1) má zásadný význam pre identifikáciu patogéna a pre určenie jeho citlivosti k antimykotikám. Má však viacero limitácií. Prvou je, že rast kvasiniek a vláknitých húb je pomalší než rast baktérií (niekoľko dní, niekedy až týždňov) a preto výsledok pozitívnej kultivácie

Obrázok 2. Histológia – farbenie podľa Groccota, Invazívna aspergilóza, postihnutie pľúc

cie dochádza v čase, keď je mykóza už vo veľmi pokročilom stave. Ďalším limitujúcim faktorom je prediktívna hodnota dôkazu mykologického patogéna v klinickom materiáli. Najrelevantnejším je vyšetrenie primárne sterilného materiálu (hemokultúra, biopsia, resekát, likvor). Získať však vzorku pomocou invazívneho výkonu u kritických a pancytopenických pacientov je veľmi ťažké. Pri vyšetrovaní spúta alebo vzoriek tekutiny získanej bronchoalveolárnou lavážou musíme mať na pamäti riziko kontaminácie z kolonizovaných horných ciest dýchacích alebo kontaminácie pri laboratórnom spracovaní. Pri vylučovaní možnosti kontaminácie vzorky však vždy musíme posúdiť klinický stav pacienta, jeho rizikové faktory a opakovaný záchyt mykotického agens z rôznych miest odberu u toho istého pacienta.

5.2 Histologické metódy

Histologický dôkaz mykotického patogéna v tkanive patrí medzi základné vyšetrenie v diagnostike invazívnych mykóz. Má vysokú špecifitu a výsledok je dostupný za krátky časový interval. Okrem základného farbenia hematoxi-línom-eozínom sa používa metóda striebrenia podľa Groccota (obrázok 2) a PAS (periodic acid Schiff). Orientačná identifikácia patogénov prebieha na základe ich morfolologickej odlišnosti. Kvasinky sú oválne, pučiace, niekedy môžu byť prítomné pseudohyfy. *Aspergillus* má jemné septované vlákna, vetviace sa v ostrom uhle, zatiaľ čo zygomykotické vlákna sú široké, neseptované a vetvia sa v otvorenom uhle (45–90°). Vzhľadom k rôznym citlivostiam jednotlivých druhov húb

k antimykotikám, je nemožnosť určenia presného druhu najväčšou limitáciou vyšetrenia.

5.3 Sérologické metódy

Vzhľadom k limitáciám, ktoré majú konvenčné diagnostické metódy a nutnosti diagnostikovať invazívne mykózy v čo najskoršom štádiu, boli vyvinuté sérologické metódy, ktoré detekujú mykotické antigény.

5.3.1 Detekcia galaktomananu

Galaktomanan je termostabilný heteropolysacharid nachádzajúci sa v bunečnej stene *Aspergillov*. V menšom množstve sa nachádza aj v stenách iných húb, napr. *Fusária*, *Penicillia* a iných. Detekcia prebieha pomocou sendvičového ELISA testu (enzyme-linked immunosorbent assay, Platelia *Aspergillus*®, Bio Rad). Výsledok je semikvantitatívny, udávaný vo forme indexu positivity. Pri interpretácii je treba mať na pamäti príčiny možnej falošnej positivity (súčasná aplikácia roztoku Plasmalyte (8), niektorých penicilínových antibiotík (9)), stupeň angioinvázie, závažnosť imunosupresie pacienta, profylaxia antimykotikami s účinnosťou proti *Aspergillov* alebo frekvencia odberov (10). Podľa metaanalýzy z roku 2006 má jeho detekcia v sére senzitivitu 71 % a špecifitu 89 % (10). Detekcia galaktomananu v tekutine z bronchoalveolárnej laváže (BAL) je spojená s veľmi dobrou senzitivitou (60–100%). U časti pacientov môže pozitivita v BAL predchádzať pozitivitu v krvi. Metóde však zatiaľ chýba štandardizácia a výsledky výrazne ovplyvňujú preanalytické faktory (neutropénia, antimykotická profylaxia, množstvo aspirovanej tekutiny) (11).

5.3.2 Detekcia 1,3-β-D-glukanu

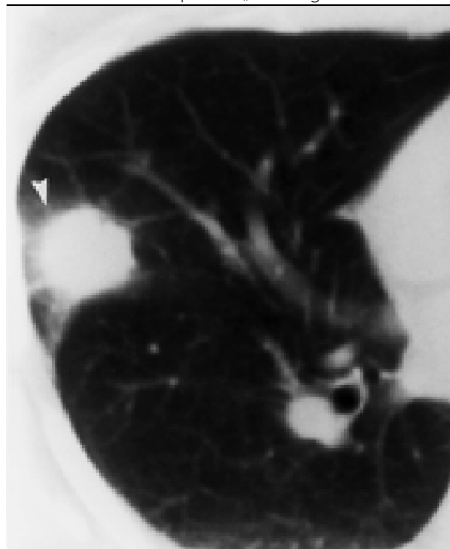
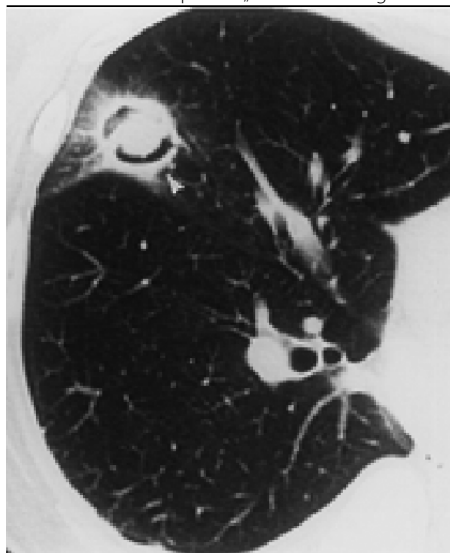
Glukan je tak isto polysacharid bunečnej steny, ale jeho prítomnosť je nie obmedzená na *Aspergila*, ale je súčasťou bunkovej steny všetkých húb a je preto nazývaný panfungálny antigén. Okrem aspergilózy jeho detekciu možno použiť pri fusarioze alebo trichosporonóze, ale nie pri kryptokokóze alebo zygomykóze. Glukan je schopný reagovať s lyzátom amébo-cytov ostrochvosta (*Limulus polyphemus* alebo *Tachypleus tridentatus*) a táto reakcia je vizualizovaná spektrofotometricky alebo turbidimetricky. Podľa metaanalýzy z roku 2011 (12) je jeho senzitivita 76,8 % a špecifita 85,3 %. Použitie ako skriningová metóda invazívnej aspergilózy je veľmi obmedzené jeho častými falošnými pozitivitami a jeho najčastejšie využitie je ako doplnujúce vyšetrenie u pacientov s pozitívnym galaktomananom, kedy eliminuje jeho falošnú pozitivitu. Medzi najčastejšie príčiny positivity sa radí súčasná bakteriémia. Na jeho detekciu z tekutiny z BAL nie sú dostatočné dáta a vyšetrovanie z tohto materiálu nie je zaradené do diagnostických kritérií invazívnych mykotických infekcií (13).

5.3.3 Detekcia mananu a antimananu

Manan je glykoprotein steny kvasiniek, ktorý sa uvoľňuje do telesných tekutín, kde môže byť detekovateľný. V cirkulácii indukuje tvorbu protilátok, tzv. antimananov rôznych tried. Mananémia vzniká u 30–90 % pacientov a kandidémiou a percento pozitivít je významne ovplyvnené stupňom imunodeficitu, kmeňom vyvolávajúcom infekciu (falošná negativita u infekcií spôsobených *C. parapsilosis*, *C. krusei* a *C. kefyr*), frekvenciou odberov. Používanie detekcie antimananu má tiež svoje úskalia a to v nedostatočnej tvorbe protilátok u imunokompromitovaných pacientov (falošná negativita) a tvorbe protilátok u pacientov s kolonizáciou sliznic kandidami (falošná pozitivita).

6. Molekulárne-biologické metódy

Detekcia fungálnej DNA pomocou molekulárne-biologických metód je ďalšou z nekultivačných metód diagnostiky invazívnych mykotických infekcií. Používa sa kombinácia tzv. „panfungálnej PCR“, kedy je amplifikovaný produkt spoločný pre takmer všetky huby (napr. 18S rRNA) a následnou špecifikáciou amplifikovaného produktu pomocou reštrikčnej endonukleázovej analýzy, sekvenácie alebo hybridizácie. Použitie tejto metódy pre rutinnú diagnostiku je široko diskutované pre jej úskalia (malé množstvo fungálnej DNA v klinických vzorkách, nemožnosť použiť bežné metódy izolácie DNA, kontaminácia vzoriek, neexistencia

Obrázok 3. HRCT pľúc – „halo sign“**Obrázok 4.** HRCT pľúc – „air crescent sign“

štandardnej metodiky) a t. č. nepatrí medzi rutinné postupy v diagnostike invazívnych mykóz.

7. Zobrazovacie metódy

Zobrazovacie metódy umožňujú detekovať postihnutie orgánov invazívnou mykózou. Pretože najčastejšou formou invazívnej kandidózy je izo-

lovaná kandidémia, nie je prekvapením, že hlavné uplatnenie zobrazovacích metód je pri posudzovaní orgánového postihnutia invazívnou infekciou vyvolanou vláknitými hubami. Najlepšie využiteľné u vláknitých mykóz je HRCT pľúc (high resolution computer tomography). Toto vyšetrenie je pozitívne u 40–50 % pacientov s invazívnou aspergilózou a normálnym nálezom na röntgenovom snímku pľúc. U väčšiny pacientov sú zmeny nešpecifické, ale u niektorých pacientov s neutropéniou možno pozorovať typický vývoj zmien v HRCT obraze. Vo včasnej fáze infekcie a môžeme stretnúť s tzv. „halo“ príznakom (obrázok 3) a v neskoršej fáze nachádzame tzv. „air crescent“ príznak (obrázok 4). Zmeny sa však nevyskytujú iba pri invazívnej aspergilóze, ale rovnaký obraz môžeme nájsť i u invazívnej zygomykózy alebo fusariózy a preto informáciu o pôvodcovi infekcie musíme vždy získať biopsiou a následným histologickým a mikrobiologickým vyšetrením. Vzhľadom k trombocytopénii a často i kritickému stavu hematologických pacientov však biopsia väčšinou nie je možná. Prínosom v tomto prípade môžu byť už zmienené nekultivačné metódy.

8. Záver

V posledné 2 desaťročia priniesli výrazné zmeny v diagnostike invazívnych mykóz. Ku kultivačným a histologickým diagnostickým metódam pribudli tzv. nekultivačné metódy, ktoré sa pre svoju vysokú senzitivitu a špecifickosť, minimálnu invazívnosť a včasnú detekciu mykózy veľmi rýchlo rozšírili. Tento fakt ďalej podporilo i pribúdanie ťažko imunosuprimovaných pacientov a nutnosť zahájenia včasnej a cielenej liečby, ktorá zlepšuje prognózu takto postihnutých pacientov.

Práca bola podporená grantom Masarykovej Univerzity Brno MUNI/A/0784/2011.

Literatúra

1. Pfaller MA. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. Clin Infect Dis 2006; 43(Suppl 1): 3–14.

2. Pagano L, et al. Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. Haematologica 2010; 95: 644–650.

3. Hachem R, et al. Clinical and radiologic predictors of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients. Cancer 2006; 106: 1581–1586.

4. Neofytos D, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. Clin Infect Dis 2009; 48(3): 265–273.

5. Kontoyannis DP, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. Clin Infect Dis 2010; 50: 1091–1100.

6. Roden MM, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. Clin Infect Dis 2005; 41: 634–653.

7. von Eiff M, et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. Respiration 1995; 62: 341–347.

8. Racil Z, et al. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia Aspergillus test for galactomannan detection in serum. J Clin Microbiol 2007; 45: 3141–3142.

9. Walsh TJ, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. J Clin Microbiol 2004; 42: 4744–4748.

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

11. Racil Z, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. Int J Infect Dis 2011; 15: 874–881.

12. Karageorgopoulos DE, et al. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2011; 52: 750–770.

13. De Pauw B, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46: 1813–1821.

Článek přijat redakcí: 24. 5. 2012

Článek přijat k publikaci: 23. 10. 2012

MUDr. Martina Tošková

IHK FN Brno

Jihlavská 20, 625 00 Brno

mtoskova@fnbrno.cz