

## Роль бронхоскопии в диагностике инвазивного аспергиллеза легких у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

А.Г. Волкова<sup>1</sup>, М.О. Попова<sup>1</sup>, К.А. Екушев<sup>1</sup>, И.Р. Зиннатуллин<sup>1</sup>, И.Ю. Николаев<sup>1</sup>, Т.С. Богомолова<sup>2</sup>, С.М. Игнатьева<sup>2</sup>, Б.И. Смирнов<sup>3</sup>, Л.С. Зубаровская<sup>1</sup>, Н.Н. Клишко<sup>2</sup>, Б.В. Афанасьев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Клиника НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой  
ГБОУ ВПО Первый СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

Минздрава России; Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, 12;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России; Россия, 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28;

<sup>3</sup>ФГАУ ВО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)»; Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5

**Контакты:** Алиса Георгиевна Волкова [alisa-md@inbox.ru](mailto:alisa-md@inbox.ru)

Мы оценили безопасность и эффективность комплексного исследования образцов жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) ( $n = 222$ ) для диагностики инвазивного аспергиллеза легких (ИАЛ) у 150 пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) детского возраста. Значимых побочных явлений при проведении бронхоскопии не было. ИАЛ был выявлен у 30 % реципиентов ТГСК с изменениями в легких на компьютерной томографии. При многофакторном анализе тест на галактоманнан (ГМ) в БАЛ показал более высокие показатели чувствительности по сравнению с прямой микроскопией и посевом (83,3 и 46,3 % соответственно). При индексе оптической плотности, равном 0,925, диагностическая точность, показанная площадью под кривой при ROC-анализе, составила 0,794 (95 % доверительный интервал 0,665–0,923). Наибольшая диагностическая эффективность достигается многофакторным анализом при использовании всех 3 указанных методов – микроскопии, посева и теста на ГМ в БАЛ.

**Ключевые слова:** *Aspergillus*, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, инвазивный аспергиллез, бронхоальвеолярный лаваж, галактоманнан, микроскопия, посев

DOI: 10.17650/2311-1267-2015-2-2-72-76

### The role of bronchoscopy in diagnosis invasive pulmonary aspergillosis in children after hematopoietic stem cell transplantation

A.G. Volkova<sup>1</sup>, M.O. Popova<sup>1</sup>, K.A. Ekushev<sup>1</sup>, I.R. Zinnatullin<sup>1</sup>, I.Yu. Nikolaev<sup>1</sup>, T.S. Bogomolova<sup>2</sup>, S.M. Ignatieva<sup>2</sup>, B.I. Smirnov<sup>3</sup>, L.S. Zubarovskaya<sup>1</sup>, N.N. Klimko<sup>2</sup>, B.V. Afanasiev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia; 12 Rentgena St., Saint Petersburg, 197022, Russia;

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1/28 Santiyago-de-Kuba St., Saint Petersburg, 194291, Russia;

<sup>3</sup>Saint-Petersburg Electrotechnical University "LETI" named after V.I. Ulianov (Lenin); 5 Professora Popova St., Saint Petersburg, 197376, Russia

We have evaluated the safety and efficiency of the comprehensive examination of the bronchoalveolar lavage (BAL) ( $n = 222$ ) for the diagnosis of the invasive aspergillosis of lungs (IAL) at 150 patients after the hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in childhood. There were no major adverse effects during the bronchoscopy. IAL was revealed at 30 % of HSCT recipients with changes in lungs at the computer tomogram. The multivariate analysis the galactomannan (GM) test in IAL showed higher sensitivity indices in comparison with the direct microscopy and inoculation (83.3 and 46.3 % accordingly). With the optic density index equal to 0.925, the diagnostic precision, showed by the area under curve at ROC-analysis, was 0.794 (95 % confidence interval 0.665–0.923). The most diagnostic efficiency is achieved by the multivariate analysis, when using all 3 mentioned methods – microscopy, inoculation and GM test in IAL.

**Key words:** *Aspergillus*, hematopoietic stem cell transplantation, invasive aspergillosis, bronchoalveolar lavage, galactomannan, microscopy, seeding

#### Введение

Своевременная диагностика инвазивного аспергиллеза легких (ИАЛ) у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является

одним из факторов, положительно влияющих на выживаемость пациентов [1]. Несмотря на появление высокоэффективных противогрибковых препаратов, уровень атрибутивной летальности у реципиентов ТГСК оста-

ется недопустимо высоким [2] и, по данным Kobayashi et al. (Japan, 2008) [3], при ИАЛ у детей достигает 70 %. Широкий анализ аутопсий за период с 1989 по 2003 г. показал, что 75 % инвазивных микозов (ИМ) не были диагностированы прижизненно [4]. Диагностика ИАЛ у детей осложняется широким диапазоном рентгенологических изменений [5], ограниченными возможностями инвазивных методик и требует дополнительных усилий на проведение общего обезболивания. Тем не менее для управления инфекцией важна идентификация патогена, назначение таргетной терапии в раннем периоде заболевания. Получение культуры грибов имеет большое значение, но требует затраты времени – от 3 до 14 дней. Серологические методы исследования жидкостей организма позволяют подтвердить диагноз ИАЛ в ранние сроки заболевания до появления выраженных изменений на компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки [6]. Тест на галактоманнан (ГМ) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) широко применяется в диагностике ИАЛ у взрослых гематологических пациентов [7]. Однако нет единого соглашения относительно использования БАЛ у иммунокомпрометированных пациентов из-за различия имеющихся данных о технике проведения, диагностической ценности и возможных осложнениях [8]. Необходимость выполнения бронхоскопии (БС) у детей после ТГСК изучена недостаточно, и только работы отдельных авторов поддерживают значение теста на ГМ в БАЛ для диагностики ИАЛ в педиатрической популяции [9, 10]. Мы оценили эффективность комплексного исследования жидкости БАЛ для диагностики ИАЛ у реципиентов ТГСК детского возраста.

### Материалы и методы

Мы провели проспективное исследование всех пациентов в возрасте до 18 лет после ТГСК, выполненной в Клинике трансплантации костного мозга Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова с 2009 по 2014 г. Критериями включения пациентов в исследование были: изменения органов грудной клетки по данным мультиспиральной КТ (МСКТ) и проведение БС с комплексным исследованием жидкости БАЛ. В исследование вошли 150 больных: 93 мальчика и 57 девочек. Медиана возраста составила 12 лет (от 8 месяцев до 18 лет). Наиболее частым заболеванием были острые лейкозы ( $n = 105$ ; 70 %) (табл. 1).

Большинству больных провели неродственную (52,7 %) или гаплоидентичную (26,7 %) аллогенную ТГСК (алло-ТГСК) (табл. 2). Немиелоаблативный режим кондиционирования использовали у 64,7 % пациентов.

ИМ до ТГСК был выявлен у 42 (28 %) больных. Антифунгальную профилактику с использованием лекарственных средств с противогрибковой активностью

Таблица 1. Заболевания у обследованных больных

Заболевание	<i>n</i>
Острый миелобластный лейкоз	45
Острый лимфобластный лейкоз	56
Острый бифенотипический лейкоз	4
Хронический миелолейкоз	4
Миелодиспластический синдром	8
Лимфома Ходжкина	3
Неходжкинская лимфома	4
Апластическая анемия	6
Врожденные/наследственные заболевания	8
Солидные опухоли	12

Таблица 2. Виды ТГСК у обследованных больных

Вариант ТГСК	<i>n</i>
Неродственная алло-ТГСК	79
Гаплоидентичная алло-ТГСК	40
Родственная алло-ТГСК	17
Аутологичная ТГСК	14
Миело/немиелоаблативный режим кондиционирования	53/97

(вориконазол, позаконазол, итраконазол) проводили у 65 (43 %) пациентов. Во время проведения БС 21 (14 %) больной находился в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), у 74 (49 %) пациентов был агранулоцитоз  $< 0,5 \times 10^9/\text{л}$  или выраженная тромбоцитопения  $< 20 \times 10^9/\text{л}$ .

Для диагностики ИАЛ использовали критерии European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) 2008 г. [11]. МСКТ органов грудной полости проводили на 3–5-й дни лихорадки в период нейтропении без предварительной рентгенографии грудной клетки и независимо от аускультативной картины легких и всем пациентам с симптомами поражения органов дыхания в посттрансплантационном периоде. При выявлении изменений на МСКТ всем больным в максимально короткие сроки, по возможности до начала эмпирической противогрибковой терапии, проводили БС с комплексным микробиологическим исследованием жидкости БАЛ.

БС проводил врач-эндоскопист высшей категории с базовым педиатрическим образованием в специально оборудованном помещении, соответствующем требованиям малой операционной, с централизованной подачей кислорода и приточно-вытяжной вентиляцией. Находящимся в ОРИТ пациентам БС выполняли непосредственно в палатах отделения. Использовали фиброоптические аппараты фирмы Fujinon и видеобронхоскопы фирмы Olympus с наружным диаметром дистального конца 3,5 и 4,9 мм. При выполнении щипцовой или браш-биопсии использовали стандартные инструменты, полностью совместимые с типом бронхоскопа. Решение о проведении БС принимали совмес-

тно лечащий врач-гематолог, врач-эндоскопист и анестезиолог для подбора метода анестезиологического пособия. Показания для общей анестезии включали: возраст пациента младше 15 лет, непереносимость местных анестезирующих средств, дыхательную недостаточность (II–III степени) или гипоксемию ( $\text{Sat O}_2 \leq 90\%$ ), некупируемый болевой синдром в грудной клетке, а также желание пациента. При наличии нарушений функции сердечно-сосудистой системы исследование временно откладывали для проведения корректирующей терапии. Агранулоцитоз не являлся препятствием для проведения БС. Пациенты с тромбоцитопенией  $< 20 \times 10^9/\text{л}$  и выраженными нарушениями свертывающей системы получали заместительную терапию плазменными факторами крови и гемокомпонентами непосредственно перед исследованием. Независимо от наличия и степени выраженности дыхательной недостаточности, все пациенты во время исследования получали пассивную ингаляцию увлажненного кислорода. Во время БС проводили мониторинг жизненно важных функций организма: частота сердечных сокращений, электрокардиограмма, артериальное давление, степень насыщения периферической крови кислородом. Методика получения БАЛ зависела от возраста и веса больного. Для пациентов старше 15 лет или с массой тела  $\geq 20$  кг применяли стандартную методику, рекомендованную Американским торакальным обществом [12, 13]. После окклюзии искомого бронха IV порядка осуществляли дробную инстилляцию подогретого до температуры тела физиологического раствора по 20 мл в каждой порции до получения адекватного объема материала (40 мл), что составляет 40–70 % введенного объема жидкости. Максимальный объем введенной жидкости не превышал 100 мл. Для пациентов младше 15 лет и весом менее 20 кг объем введенного физиологического раствора соответствовал 1 мл/кг массы тела на 1 введение (не более 15 мл), который трехкратно вводили в бронх. Материал считали адекватным при получении как минимум 30 % введенного объема физиологического раствора [14, 15]. Включенным в исследование пациентам все БС были выполнены одним специалистом. Полученные образцы БАЛ немедленно отправляли в лаборатории для дальнейшего микологического обследования.

Лабораторная диагностика ИА включала микроскопию и посев. Из образцов БАЛ готовили препараты в просветляющей жидкости (10 % раствор гидроксида калия в 10 % водном растворе глицерина) с добавлением флуоресцирующего маркера (калькофлуор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе, отмечали наличие септированных нитей мицелия, ветвящихся под углом  $45^\circ$ . Для определения возбудителя выполняли посев материала на специализированную среду и инкубировали в течение 10 дней при  $+28$  и  $+37^\circ\text{C}$ . Из биопсийного материала готовили гистологические препараты, для выявления

элементов гриба окрашивали срезы по Гомори–Грокотту, гематоксилином–эозином, а также проводили PAS-реакцию.

Серологическое исследование включало определение ГМ в сыворотке крови и БАЛ двойным иммуноферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы Platelia® *Aspergillus* (Bio-Rad Laboratories, США). Наличие ГМ оценивали путем сравнения оптической плотности исследуемого материала и контрольного образца, содержащего 1 нг/мл ГМ. Диагностически значимым считали индекс оптической плотности (ИОП) выше 0,5 в сыворотке крови и 1,0 – в БАЛ.

Статистическую обработку данных проводили с помощью прикладного пакета статистики SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), версия 19. Было выполнено построение логистической регрессии для зависимых переменных, отражающих наличие и отсутствие ИАЛ, и набора независимых переменных, в числе которых были основные предикторы заболевания ИАЛ. Разведочный анализ был проведен на основе критериев Манна–Уитни,  $\chi^2$  и теста Фишера. Из базы данных были отобраны переменные с уровнем значимости  $p < 0,05$ . В результате полученной модели нам удалось оценить диагностическую эффективность теста ГМ в БАЛ у детей и провести его сравнительный анализ с микроскопическим и культуральным исследованием.

### Результаты

Всего проанализировали 222 образца БАЛ, полученных от 150 пациентов. Повторные исследования БАЛ были проведены у 44 (29 %) больных. В соответствии с критериями диагностики EORTC/MSG 2008 г., ИАЛ был выявлен у 45 (30 %) реципиентов ТГСК (доказанный – 7, вероятный – 38).

При прямой микроскопии жидкости БАЛ наличие нитей септированного мицелия, делящегося под острым углом, отмечали у 33 % больных.

При посеве БАЛ *Aspergillus* spp. были выделены у 27 % пациентов. Основным возбудителем ИАЛ был *A. fumigatus* (62 %), реже – *A. flavus*, *A. nidulans* и *A. niger* (рис. 1).

Тест на ГМ проводили в 222 образцах БАЛ, полученных от 150 пациентов. У 50 % больных с диагнозом ИАЛ показатели ИОП-теста на ГМ были распределены между значениями 0,65–2,07, в то время как при отсутствии ИАЛ – 0,24–0,5. Максимальные значения ИОП в группах равны 7,45 и 0,89 соответственно. Медиана значения теста ГМ в БАЛ соответствует ИОП, равному 1. Медианный тест показывает различие в группах на уровне  $< 0,001$ . Показатели ИОП-теста на ГМ в БАЛ у больных ИАЛ и без него представлены на рис. 2.

Проведенное исследование выявило, что определение ГМ в БАЛ отличается высокими диагностическими характеристиками, достоверно превосходящими

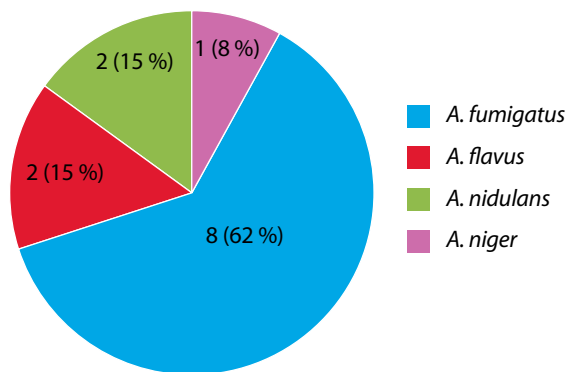


Рис. 1. Спектр возбудителей ИАЛ у детей

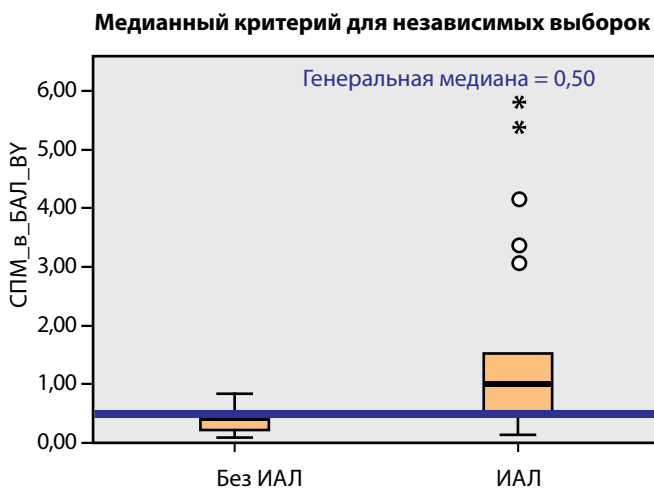


Рис. 2. Показатели ИОП-теста на ГМ в БАЛ в группах больных ИАЛ и без него

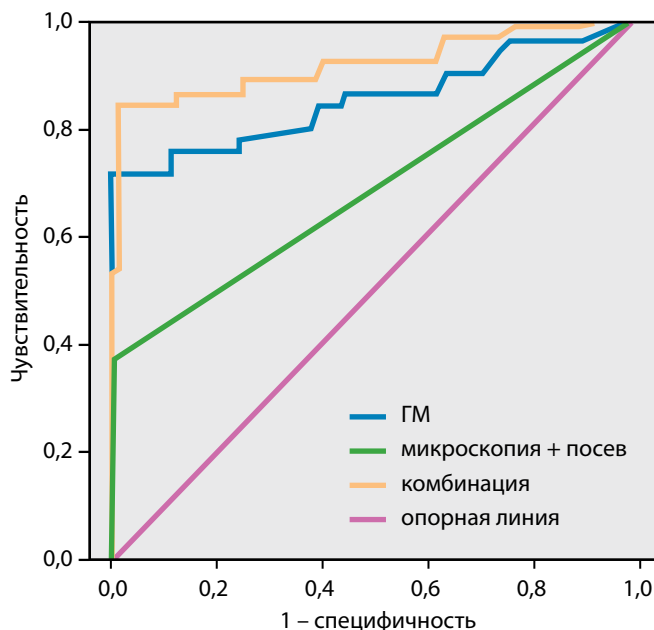


Рис. 3. ROC-анализ диагностических методов исследования при ИАЛ

показатели традиционных исследований – микроскопии и посева БАЛ. При многофакторном анализе тест на ГМ в БАЛ показал более высокие показатели чувствительности при фиксированном значении специфичности по сравнению с прямой микроскопией и посевом (83,3 и 46,3 % соответственно). Характеристики качества ROC-анализа установили, что площадь под ROC-кривой «микроскопия + посев» (0,680) явно проигрывает тесту на ГМ (0,850). При этом, как и следовало ожидать, наибольшая диагностическая эффективность достигается при использовании всех 3 указанных методов диагностики ИАЛ – микроскопии, посева и теста на ГМ в БАЛ (0,914) (рис. 3).

При ИОП, равном 1, у пациентов с вероятным и доказанным ИАЛ чувствительность теста на ГМ в БАЛ равна 73 %, специфичность – 98 %, предсказательная ценность положительного результата – 95 %, предсказательная ценность отрицательного результата – 92 %. Диагностическая эффективность теста в целом – 92,7 %. Фактический максимум индекса Юдена, определяющий соотношение между истинным и ложным прогнозом заболевания, равен 0,60 при значении ИОП 0,925. При построении кривых Кульбака–Лейблера пороговое значение ИОП – 0,6, после которого потенциал теста для опровержения диагноза устойчиво принимает меньшие значения, чем потенциал теста для подтверждения диагноза ИАЛ.

Анализ аутопсийного материала, проведенный у 18 пациентов, показал присутствие признаков заболевания ИАЛ у 6 больных с диагнозом вероятный ИАЛ, установленным с помощью теста на ГМ в БАЛ при жизни, и отсутствие данных за ИАЛ у 12 пациентов, у которых исследование БАЛ не выявило ИАЛ при жизни.

### Обсуждение

Ранняя диагностика ИАЛ у пациентов детского возраста – трудная задача. Применение исследования БАЛ для ранней диагностики ИАЛ, широко используемое у взрослых гематологических больных, до сих пор не внедрено в педиатрическую практику. Мы показали высокие диагностические качества комплексного исследования жидкости БАЛ, включающего прямую люминесцентную микроскопию с окраской калькофлуором белым, посев и тест на ГМ у детей после ТГСК. Применение КТ направленного БАЛ позволяет получить материал непосредственно из зоны поражения легких, определить возбудителя ИМ, его чувствительность к антимикотикам *in vitro* и назначить таргетную терапию.

Мы не получили значимых осложнений во время проведения исследования и считаем, что при наличии адаптированного для детей технического оснащения и квалифицированной операционной бригады фиброБС с БАЛ является безопасной методикой и может проводиться у пациентов онкогематологического профиля,

включая реципиентов ТГСК в ранние сроки после трансплантации.

### Выводы

1. БС с комплексным исследованием БАЛ – эффективный и безопасный метод диагностики ИАЛ у детей с онкогематологическими заболеваниями.

2. При многофакторном анализе тест на ГМ в БАЛ показал более высокие показатели чувствительности по сравнению с прямой микроскопией и посевом (83,3 и 46,3 % соответственно).

3. Наибольшая диагностическая эффективность достигается при использовании всех 3 указанных методов – микроскопии, посева и теста на ГМ в БАЛ.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Клишко Н.Н., Шадривова О.В., Хостелиди С.Н. и др. Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования. *Онкогематология* 2014;2:13–9. [Klimko N.N., Shadrivova O.V., Khostelidi S.N. Invasive aspergillosis: results of multicenter study. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2014;2:13–9. (In Russ.)].
2. Bow E.J. Invasive fungal infection in haematopoietic stem cell transplant recipients: epidemiology from the transplant physician's viewpoint. *Mycopathologia* 2009;168(6):283–97.
3. Groll A.H. ECIL 4 – Pediatric Group Considerations for Fungal Diseases and Antifungal Treatment in Children. Meeting: September 8–10<sup>th</sup>, 2011. Final version: Jan 19<sup>th</sup>, 2012. <http://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/ECIL/Pages/ECIL.aspx>.
4. Chamilos G., Luna M., Lewis R. et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989–2003). *Haematologica* 2006;91:986–9.
5. Burgos A., Zaoutis T.E., Dvorak C.C. et al. Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics* 2008;121(12):86–94.
6. Maertens J., Van Eldere J., Verhaegen J. et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002;186:1297–306.
7. Maertens J., Maertens V., Theunissen K. et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis* 2009;49(11):1688–93.
8. Maschmeyer G., Beinert T., Buchheidt D. et al. Diagnosis and antimicrobial therapy of pulmonary infiltrates in febrile neutropenic patients – Guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2003;82(Suppl 2):118–26.
9. Desai R., Ross L.A., Hoffman J.A. The role of bronchoalveolar lavage galactomannan in the diagnosis of pediatric invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:283–6.
10. De Mol M., de Jongste J.C., van Westreenen M. et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in children with bronchoalveolar lavage galactomannan. *Pediatr Pulmonol* 2013;48(8):789–96.
11. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P. 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(12):1813–21.
12. Sampsonas F., Kontoyiannis D.P., Dickey B.F., Evans S.E. Performance of a standardized bronchoalveolar lavage protocol in a comprehensive cancer center: a prospective 2-year study. *Cancer* 2011;117(15):3424–33.
13. Meyer K.C., Raghu G., Baughman R.P. et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(9):1004–14.
14. Vega-Briceño L.E., Holmgren N.L., Bertrand P. et al. [Utility of bronchoalveolar lavage in immunocompromised children: diagnostic yield and complications]. [Article in Spanish]. *Arch Bronconeumol* 2004;40(12):570–4.
15. de Blic J., Midulla F., Barbato A. et al. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. *Eur Respir J* 2000;15(1):217–31.