

Т.В. Триліська<sup>1</sup>  
Г.В. Бондаренко<sup>1</sup>  
В.А. Пляцек<sup>2</sup>  
Л.М. Сківка<sup>3</sup>  
В.Г. Яновська<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Український референс-центр з клінічної лабораторної діагностики та метрології Національної дитячої спеціалізованої лікарні «ОХМАТДИТ» МОЗ України

<sup>2</sup>Центр радіології Національної дитячої спеціалізованої лікарні «ОХМАТДИТ» МОЗ України

<sup>3</sup>Національний науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

#### Ключові слова:

онкогематологічні захворювання, інвазивний аспергілез, галактоманановий антиген.

## ДІАГНОСТИЧНА ТА ПРОГНОСТИЧНА ІНФОРМАТИВНІСТЬ ВІЯВЛЕННЯ ГАЛАКТОМАНАНОВОГО АНТИГЕНУ ASPERGILLUS У СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНОГО ПРОФІЛЮ З ІНВАЗИВНИМ АСПЕРГІЛЬЗОМ

**Мета:** дослідити діагностичну значущість та прогностичну інформативність методу визначення галактомананового антигену (ГА) в сироватці крові пацієнтів дитячого віку з онкогематологічною патологією для раннього виявлення та моніторингу ефективності лікування інвазивного аспергілезу (ІА). **Об'єкт і методи:** досліджено зразки сироватки крові 144 імуноскомпрометованих пацієнтів дитячого віку, з яких 90% становили хворі із онкогематологічною патологією. Усі пацієнти пройшли процедуру стандартного лабораторного обстеження, яке включало мікробіологічні методи та комп'ютерне томографічне дослідження, спрямовані на виявлення ІА. Визначення ГА *Aspergillus* в сироватці периферичної крові проводили імуноферментним методом з використанням тест-системи «*Platelia Aspergillus Ag*» виробництва «*Bio-Rad*» 1 раз на тиждень протягом усього терміну перебування в стаціонарі, а також упродовж курсу антимікотичної терапії. **Результати:** ГА в сироватці крові виявлено у 7 із 144 обстежених пацієнтів. Діагноз ІА у хворих із наявним у сироватці крові ГА підтверджено результатами комп'ютерної томографії у 85,7% випадків. Хибнонегативні результати дослідження в обстеженій групі пацієнтів були відсутні. Кількість хибнопозитивних результатів становила 3%. Однією з причин хибнопозитивних результатів може бути медикаментозна перехресна реактивність, зумовлена прийомом піперациліну і тазобактаму або їх аналогів. **Висновки:** метод виявлення ГА в сироватці крові має високу чутливість і є достатньо інформативним методичним підходом до ранньої діагностики ІА в імуноскомпрометованих пацієнтів онкогематологічного профілю, а також для моніторингу перебігу хвороби та ефективності антимікотичної терапії.

#### ВСТУП

Розвиток онкогематологічного захворювання та його лікування викликають розлади вродженої та адаптивної імунної реактивності організму хворого і роблять його надзвичайно сприйнятливим до інфекцій дихальних шляхів. Одним з основних факторів ризику розвитку інфекцій дихальних шляхів у онкогематологічних пацієнтів є тяжка форма нейтропенії (кількість нейтрофілів  $\leq 500$ /мкл) [1]. Широкий спектр збудників цих інфекційних ускладнень включає бактерії та мікроскопічні гриби, серед яких провідні позиції займають гриби родів *Candida* та *Aspergillus* [1–3].

Інвазивний аспергілез (ІА) як опортуністичний мікоз є поширеним інфекційним ускладненням, котре характеризується тяжкістю клінічних проявів і високою летальністю у дітей і дорослих із гемато-

логічними онкологічними захворюваннями або після аlogenної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин. Частота розвитку ІА у хворих на гострі лейкози коливається від 15 до 40% [4, 5]. Рання діагностика цієї патології та адекватна антимікотична терапія поліпшують результат лікування як при ІА, так і основному захворюванні [6, 7].

Існують важливі відмінності між дітьми і дорослими щодо епідеміології, перебігу основних і супутніх захворювань, тому діагностичні показники для виявлення ІА також можуть різнитися між групами пацієнтів різного віку. Наприклад, застосування комп'ютерної томографії (КТ) для раннього виявлення ІА є високоінформативним у дорослих і значно менш діагностично ефективним у більшості дітей [8]. Оскільки ІА найчастіше загрожує життю імуноскомпрометованих

пацієнтів, тест для діагностики ІА не має бути агресивним і становити навантаження для фізіологічних систем, у тому числі й імунної, ослабленого пацієнта. Виявлення галактомананового антигену (ГА) у сироватці крові методом імуноферментного аналізу (ІФА) задовольняє зазначені вимоги [9].

Галактоманан (ГМ) — високоімуногенний компонент клітинної стінки мікроміцетів, полісахарид з молекулярною масою від 35 до 100 кДа. Його наявність характерна для *A. fumigatus* та інших видів *Aspergillus spp.* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*). ГМ потрапляє в кров під час росту гриба в тканинах [10, 11].

У 2008 р. Європейська організація з досліджень та лікування раку (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) разом із дослідницькою групою з вивчення мікозів Національного інституту алергії та інфекційних захворювань (National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group) опублікувала стандартні критерії дефініції інвазивних мікозних інфекцій для клінічних та епідеміологічних досліджень. Рекомендації включають визначення ГА як одного з мікологічних критеріїв встановлення діагнозу ймовірного/підтвердженого ІА [12]. Перевагами тесту є швидкість проведення, висока чутливість та специфічність. Згідно з результатами більшості клінічних досліджень чутливість та специфічність методу сягає 90% саме для хворих із онкогематологічною патологією [13]. Хоча не існує регламентованого алгоритму моніторингування рівня ГА у крові або бронхоальвеолярному лаважі, відповідно до світової практики тест рекомендують проводити двічі на тиждень з моменту розвитку нейтропенії з метою скринінгу або відразу після появи симптомів, які клінічно або радіологічно узгоджуються з ІА [10]. Така стратегія дозволяє знизити відсоток хибнонегативних результатів тесту [2]. Визначення антигену *Aspergillus spp.* дає можливість припустити інвазивний процес за 6–13 днів до його клінічних проявів (тобто до виникнення лихоманки) і почати терапію значно раніше, ніж у звичайних випадках [14]. Налагоджене скринінгове тестування рівня ГМ створює можливість оптимізувати тактику ведення пацієнтів, які отримують високодозову хіміотерапію. У разі відсутності або несвоечасного використання скринінгових методів діагностики ІА, таких як виявлення ГМ, що дає можливість верифікувати ІА на рівні вірогідного, терапія з перших днів розвитку ІА, на жаль, майже неможлива [2].

В Україні метод виявлення циркулюючого ГА в сироватці крові досі не набув широкого використання.

З 2014 р. в Українському референс-центрі з клінічної лабораторної діагностики та метрології Національної дитячої спеціалізованої лікарні (НДСЛ) «ОХМАТДИТ» Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України у відділі імунологічних та мікробіологічних досліджень референс-лабораторії проведено роботу з верифікації та впровадження як рутинного дослідження цього методу.

Метою роботи було дослідити діагностичну значущість та прогностичну інформативність методу виявлення ГА у сироватці крові пацієнтів дитячого віку з онкогематологічною патологією для раннього виявлення та моніторингу ефективності лікування ІА.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі представлено результати обстеження дітей, що перебували на лікуванні в НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України. Починаючи з 2014 р. обстежено більше 500 зразків крові 144 пацієнтів стаціонару віком від 3 міс до 18 років. Пацієнти були госпіталізовані у НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України з приводу таких основних діагнозів:

- група онкогематологічних захворювань (гострий мієлолейкоз, гострий лімфолейкоз, лімфогранулематоз, неходжкінська лімфома, апластична анемія, лімфома Беркітта; таблиця) — 90% усієї групи обстежених; на момент обстеження пацієнти проходили курс лікування з приводу основних захворювань згідно зі стандартними протоколами; група гнійно-септичних захворювань; імунодефіцит, що виник внаслідок ВІЛ (СНІД) або тривалої імуносупресивної терапії.

Таблиця  
Розподіл пацієнтів (n=130, 100%) з онкогематологічними захворюваннями згідно з діагнозами

Діагноз	Кількість пацієнтів, %
Гострий мієлолейкоз	37
Гострий лімфолейкоз	34
Лімфогранулематоз	8
Апластична анемія	7
Неходжкінська лімфома	7
Лімфома Беркітта	6
Інші	1

Учасники дослідження пройшли процедуру стандартного лабораторного обстеження, яке включало мікробіологічні методи та КТ, спрямовані на виявлення ІА. Пацієнтам з онкогематологічними захворюваннями проводили скринінгове дослідження сироваткового рівня ГА 1 раз на тиждень протягом усього терміну перебування в стаціонарі, іншим пацієнтам — за показаннями (при підозрі на ІА) та впродовж курсу антимікотичної терапії.

Визначення ГА *Aspergillus* в сироватці периферичної крові проводили методом ІФА з використанням тест-системи «Platelia *Aspergillus Ag*» виробництва «Bio-Rad», Франція, згідно з вимогами виробника. Дослідження виконували на напівавтоматичному імуноферментному аналізаторі Sunrise виробництва «ТЕСАН», Австрія. Принцип методу — якісний одноетапний імуноферментний мікропланшетний аналіз, «сендвіч»-варіант. Оцінювання отриманих результатів дослідження проводили з використанням індексу позитивності (ІП), розрахованого за формулою:

$$ІП = \frac{ОГзр.}{ОГсер. ГЗ}$$

де ОГзр. — оптична густина сироватки зразка; ОГсер. ГЗ — середнє значення оптичної густини cut-off проби.

Результати значень ІП  $\geq 0,5$  вважаються позитивними.

КТ проводили на 128-зрізовому томографі Definition AS («Siemens», Німеччина) із застосуванням протоколів:

- стандартний протокол High resolution CT для легень з автоматичною модуляцією параметрів напруги і сили струму залежно від маси тіла і віку пацієнта з метою зниження дозового навантаження;
- стандартний протокол для навколоносових пазух.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У всіх обстежених нами пацієнтів результат мікробіологічного дослідження був негативним.

При дослідженні ГА у сироватці крові позитивний результат був зареєстрований у 7 зі 144 обстежених пацієнтів (рис. 1). Діагноз ІА у пацієнтів із наявним у сироватці крові ГА був підтверджений за результатами КТ у 85,7% випадків.

Хибнонегативні результати дослідження серед обстеженої нами групи пацієнтів були відсутні. Кількість хибнопозитивних результатів становила 3%. За даними наших спостережень, однією з причин хибнопозитивних результатів може бути медикаментозна перехресна реактивність. На рис. 2 представлено результати виявлення ГА у 3 пацієнтів з онкогематологічною патологією, клінічний стан яких був задовільним; зміни, типові для ІА, на КТ-зображеннях були відсутні (дані не представлено), однак результат ІФА був позитивним.

Виявилось, що всі ці пацієнти перебували на лікуванні піперациліном і тазобактамом або їх аналогами. Згідно з інструкцією виробника тест-системи для виявлення ГА, ці антибіотики можуть спричинити хибнопозитивні результати дослідження. Після відміни препаратів на 5–6-ту добу показники сироваткового рівня ГА знижувалися до негативних значень. Слід зазначити, що не всі пацієнти, що приймають зазначені антибіотики, мали хибнопозитивні результати дослідження ГА у сироватці крові. Імовірно, хибнопозитивні результати на виявлення ГА залежать від дози антибіотичного препарату та індивідуальних особливостей організму пацієнта.

Діагностична і прогностична інформативність методу дослідження ГА в сироватці крові з використанням ІФА добре ілюструється на прикладі окремих типових клінічних випадків.

### Клінічний випадок № 1

**Пацієнтка Р.**, 7 років, основний діагноз — гострий лімфобластний лейкоз. На знімках КТ виявлено зміни в легенях, характерні для ІА (рис. 3). Результат мікробіологічного дослідження негативний. Кількість нейтрофілів становила  $0,1 \cdot 10^9$ /л. При надходженні в лікарню проведено обстеження на наявність ГА в сироватці крові та отримано позитивний результат: ІП = 6,3 (рис. 4).

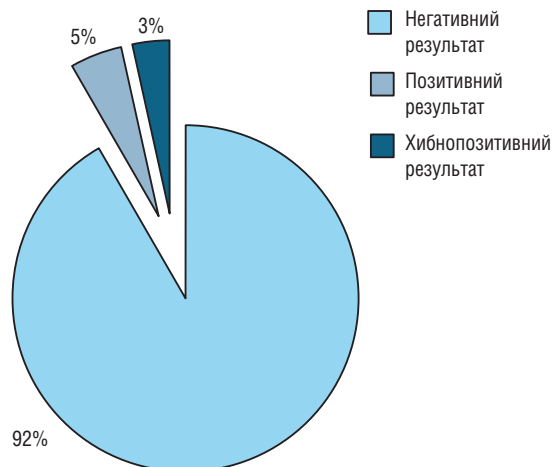


Рис. 1. Розподіл обстежених пацієнтів згідно з виявленням в сироватці крові ГА

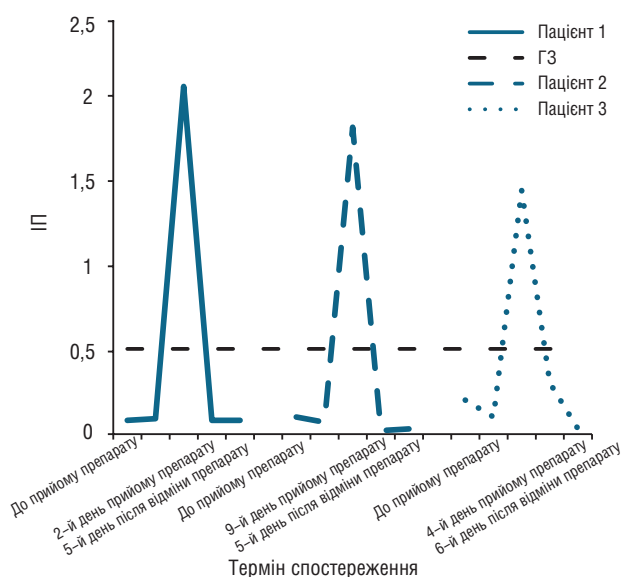


Рис. 2. Сироватковий рівень ГА у пацієнтів з онкогематологічною патологією на тлі застосування піперациліну і тазобактаму в динаміці скринінгового тестування. Тут і далі: ГЗ — граничне значення ІП



Рис. 3. КТ високої роздільної здатності легень пацієнтки Р. на момент госпіталізації: зливні вогнищеві ділянки консолідації базальних відділів лівої легені з наявністю випоту в плевральній порожнині

Позитивний результат на ГА (у сукупності з клінічними ознаками, дихальною недостатністю та даними КТ) дав підставу встановити діагноз інвазивного мультифокального легеневого аспергілозу

з ураженням лівої легені та почати лікування (згідно зі стандартним протоколом, деталі якого не представлено).

Моніторинг антимікотичної терапії за результатами сироваткового рівня ГА проводили 1 раз на тиждень, починаючи з 10-ї доби після її початку. У результаті лікування відзначали зниження рівня ГА (див. рис. 4), покращення клінічних проявів та регресію вогнищ інфекції за даними КТ (рис. 5).

Таким чином, інформативність визначення сироваткового рівня ГА у цієї пацієнтки підтверджена результатами КТ. Позитивні наслідки антимікотичної терапії, які супроводжувалися зниженням показника ГА у сироватці крові до негативних значень, також підтверджені даними КТ.

#### Клінічний випадок № 2

**Пацієнт К.**, 15 років, основний діагноз — гострий мієлобластний лейкоз. При надходженні до стаціонару проведено одночасне обстеження методом КТ та визначення рівня ГА. На КТ-зображеннях — зміни у верхніх дихальних шляхах, у ділянці лівої гайморової пазухи (рис. 6), типові для ІА. Результат мікробіологічного дослідження при цьому був негативним. Кількість нейтрофілів становила  $0,16 \cdot 10^9/\text{л}$ . Рівень ГА підвищений: ІП = 4,68 (рис. 7). Встановлено супутній діагноз — ІА верхніх дихальних шляхів (лівої гайморової пазухи).

Моніторинг антимікотичної терапії проводили 1 раз на тиждень. Як свідчать дані рис. 7, після 3 тиж терапії відбулося зниження рівня ГА в сироватці крові пацієнта. Зареєстровано також покращення клінічних проявів та регресію вогнищ інфекції за результатами КТ-дослідження (рис. 8).

Таким чином, як і у попередньому випадку, діагностична та прогностична інформативність визначення сироваткового рівня ГА повністю підтвердилася результатами КТ-дослідження.

#### Клінічний випадок № 3

**Пацієнтка П.**, 4 роки, основний діагноз — гострий мієлобластний лейкоз. На КТ-зображеннях на момент госпіталізації — «свіже» вогнище інфекції в легенях (рис. 9). Кількість нейтрофілів становила  $0,33 \cdot 10^9/\text{л}$ . При надходженні до стаціонару проведено визначення рівня ГА: ІП = 5,06 (рис. 10). На основі всіх проведених досліджень встановлено супутній діагноз — ІА легень. Призначено антимікотичну терапію.

Моніторинг антимікотичної терапії виконували 1 раз на тиждень, після 3 тиж виявлено зниження рівня ГА (див. рис. 10). У зв'язку із розвитком побічних токсичних ефектів при лікуванні хворій відмінили антимікотичний препарат. Моніторинг перебігу захворювання за допомогою визначення ГА продовжували без перерви. Через 10 діб після відміни антимікотичного препарату зафіксовано підвищення значень ГА. Пацієнтці було призначено інший антимікотичний препарат, і наприкінці 3-го тижня лікування цим препаратом рівень ГА знизився до слабопозитивних значень. Після

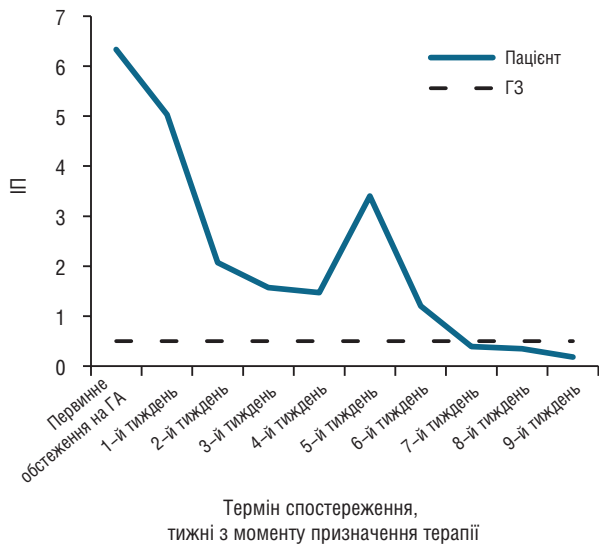


Рис. 4. Сироватковий рівень ГА у пацієнтки Р. в динаміці антимікотичної терапії



Рис. 5. КТ високої роздільної здатності легень пацієнтки Р. після проведеної антимікотичної терапії: виражена позитивна динаміка, усунення запальних змін, локальний постзапальний пневмофіброз, спайки

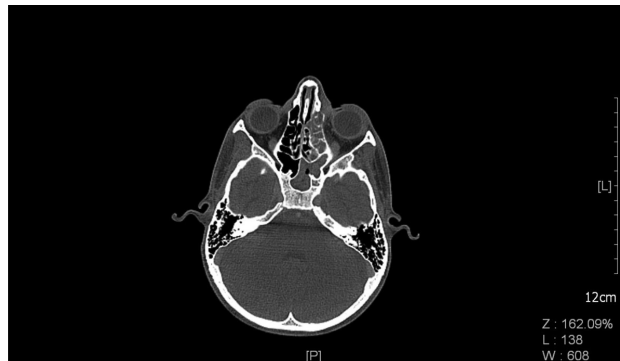


Рис. 6. КТ високої роздільної здатності навколосинових пазух пацієнта К. на момент госпіталізації: ознаки лівого бічного сфеноетмоїдиту

цього пацієнтку перевели до іншого стаціонару для подальшого лікування з приводу основного захворювання, у зв'язку з чим моніторинг ефективності антимікотичної терапії за сироватковим рівнем ГА було припинено.

Загальною закономірністю усіх досліджених випадків була наявність ГА в сироватці крові обстежених пацієнтів на тлі вираженої нейтропенії, що

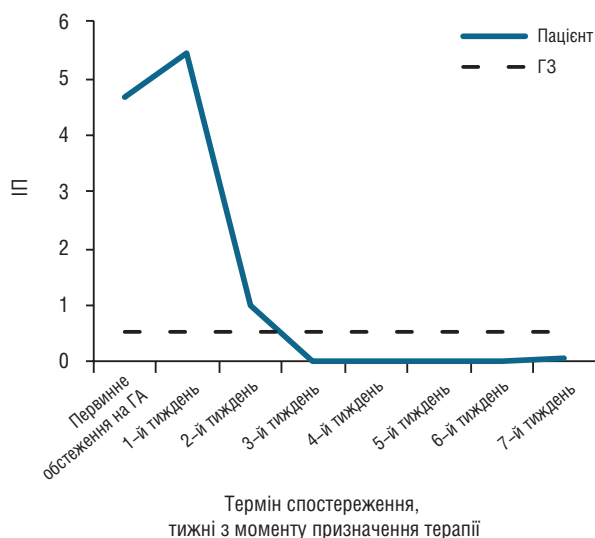


Рис. 7. Сироватковий рівень ГА у пацієнта К. в динаміці антимікотичної терапії

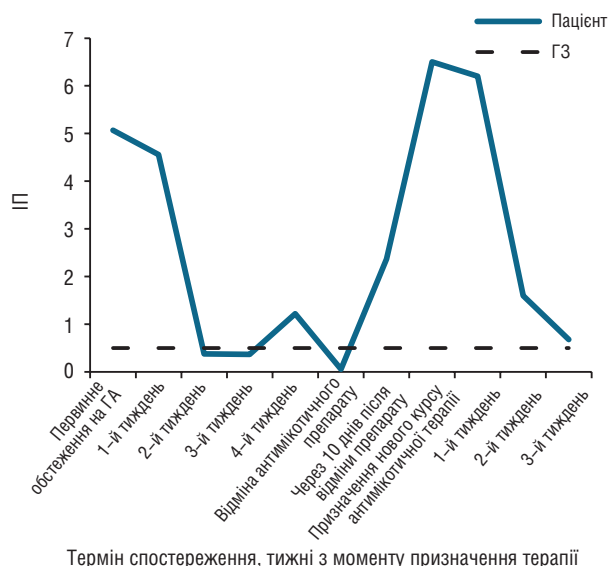


Рис. 10. Сироватковий рівень ГА у пацієнтки П. в динаміці антимікотичної терапії



Рис. 8. КТ високої роздільної здатності навколоносових пазух пацієнта К. після антимікотичної терапії: пневматизація пазух відновилася



Рис. 9. КТ високої роздільної здатності легень пацієнтки П. з онкогематологічною патологією на момент госпіталізації: порушення пневматизації обох легень за типом «матового скла»

збігається з даними літератури, згідно з якими нейтропенія — основний фактор ризику розвитку ІА в імуноскомпрометованих осіб [1, 7, 15].

## ВИСНОВКИ

Таким чином, неінвазивний, швидкий у використанні метод виявлення ГА в сироватці крові має високу чутливість і є достатньо інформативним підходом

до ранньої діагностики ІА в імуноскомпрометованих пацієнтів, а також моніторингу перебігу хвороби та ефективності антимікотичної терапії. Слід зазначити, зважаючи на виявлені хибнопозитивні результати, про необхідність особливого підходу до призначення тесту у пацієнтів, що приймають піперацилін і тазобактам та їх аналоги, та утримання від проведення дослідження впродовж не менше 5 днів після прийому (чи відміни) цих антибіотиків.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Evans SE, Ost DE. Pneumonia in the neutropenic cancer patient. *Curr Opin Pulm Med* 2015; **21** (3): 260–71.
2. Дягіль ІС, Маргіна ЗВ, Товстоган АО та ін. Інвазивний аспергіллез у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію. *Клин онкол* 2013; **1** (9): 102–7.
3. Пересада ЛА. Інвазивний легочний аспергіллез — случай из практики. *Укр пульмонол журнал* 2005; **1**: 56–8.
4. Cadena J, Thompson GR 3<sup>rd</sup>, Patterson TF. Invasive aspergillosis: current strategies for diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am* 2016; **30** (1): 125–42.
5. Halpern AB, Lyman GH, Walsh TJ, et al. Primary antifungal prophylaxis during curative-intent therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2015; **126** (26): 2790–7.
6. Buchheidt D, Reinwald M, Spiess B, et al. Biomarker-based diagnostic work-up of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised paediatric patients — is *Aspergillus* PCR appropriate? *Mycoses* 2016; **59** (2): 67–74.
7. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; **12**: CD007394.
8. Ramos JT, Francisco L, Daoud Z, et al. Invasive fungal infections in children: similarities and differences with adults. *Rev Esp Quimioter* 2016; **29** (Suppl 1): 59–65.
9. Gefen A, Zaidman I, Shachor-Meyouhas Y, et al. Serum galactomannan screening for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in children after stem cell transplantation or with high-risk leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2015; **32** (2): 146–52.
10. Lehrnbecher T, Robinson PD, Fisher BT, et al. Galactomannan, Beta-D-Glucan and PCR-based assays for the diagnosis of invasive fungal disease in pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2016; pii: ciw592.

11. **Obar JJ, Hohl TM, Cramer RA.** New advances in invasive aspergillosis immunobiology leading the way towards personalized therapeutic approaches. *Cytokine* 2016; **84**: 63–73.

12. **De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly 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**: 1813–21.

13. **Hope W, Walsh T.** Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 609–22.

14. **Hadrich I, Makni F, Cheikhrouhou F, et al.** Clinical utility and prognostic value of galactomannan in neutropenic patients with invasive aspergillosis. *Pathol Biol (Paris)* 2012; **60** (6): 357–61.

15. **Pechlivanoglou P, Le HH, Daenen S, et al.** Mixed treatment comparison of prophylaxis against invasive fungal infections in neutropenic patients receiving therapy for haematological malignancies: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69** (1): 1–11.

### DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC INFORMATIVENESS OF THE DETECTION OF ASPERGILLUS GALACTOMANNAN ANTIGEN IN THE BLOOD SERUM OF ONCOHAEMATOLOGIC PATIENTS WITH INVASIVE ASPERGILLOSIS

*T.V. Tryliska, H.V. Bondarenko, V.A. Pliatsek, L.M. Skivka, V.G. Yanovska*

**Summary. Aim:** to investigate diagnostic significance and prognostic informativeness of the method of the galactomannan antigen (GA) detection in blood serum of pediatric patients with haematologic malignancies for early diagnosis of invasive aspergillosis (IA) and monitoring of antimycotic treatment efficacy. **Objects and methods:** 144 blood samples from

*immunocompromised pediatric patients were investigated. 95% were patients with haematologic malignancies. All patients underwent standard laboratory testing procedures, which included microbiological methods and computer tomography studies aimed at identifying the IA. Determination of the serum level of Aspergillus GA was performed using ELISA test kits «Platelia Aspergillus Ag» (Bio-Rad) once a week during the hospital stay and in the course of antimycotic therapy. Results: GA in the serum was detected in 7 of 144 patients. The diagnosis of IA in patients with present in the serum GA was confirmed by the results of computer tomographic study in 85.7% of cases. False negative results were absent. Number of false positive results was 3%. One of the causes of false positive results may be drug cross-reactivity caused by the treatment with piperacillin and tazobactam or its analogues. Conclusion: method of the detection of GA serum level has high sensitivity and is quite informative methodical approach for early diagnosis of IA in immunocompromised patients with haematologic malignancies as well as for the evaluation of the efficacy of antimycotic therapy.*

**Key Words:** oncohaematologic malignancies, invasive aspergillosis, galactomannan antigen.

**Адреса для листування:**

Сківка Л.М.

03127, Київ, просп. Академіка Глушкова, 2

E-mail: realmed@i.com.ua

Одержано: 12.09.2016