

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XLIII
2 0 1 3
SUPPLEMENT 2**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Ninela Irga-Jaworska

**Inwazyjne zakażenia grzybicze u dzieci leczonych
z powodu schorzeń rozrostowych
układu krwiotwórczego
i ciężkiej anemii aplastycznej
– nowe aspekty diagnostyki i terapii**

*Invasive fungal infections in children with hematological
proliferative diseases and severe aplastic anemia
– new aspects of diagnostics and therapy*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska

GDAŃSK 2013

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
Marek Grzybiak

HONOROWY REDAKTOR NACZELNY
HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Stefan Raszeja

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – Adam Szarszewski
sekretarz redakcji – Włodzimierz Kuta
redaktor techniczny – Tadeusz Skowrya
Tomasz Bączek, Zdzisław Bereznowski, Dariusz Kozłowski, Anna Grygorowicz,
Andrzej Hellmann, Jerzy Kuczkowski, Krzysztof Narkiewicz, Michał Obuchowski,
Zbigniew Kmiec, Julian Świerczyński, Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales Academiae Medicae Gedanensis
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales Academiae Medicae Gedanensis are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Najserdeczniejsze podziękowania składam Pani Profesor Annie Balcerskiej za skierowanie moich kroków na drogę hematologii dziecięcej, za niezwykle cenne uwagi merytoryczne oraz nieustającą pozytywną motywację

Słowa wielkiej wdzięczności kieruję do Pani Profesor Elżbiety Adamkiewicz-Drożyńskiej za wielką życzliwość, nieocenione uwagi merytoryczne podczas pisania pracy oraz za zaufanie, jakim mnie obdarzyła

Składam także gorące podziękowania:
Doktorowi Wojciechowi Kosiakowi za wieloletnią owocną i bezkonfliktową współpracę

Pani Profesor Małgorzacie Myśliwiec za cenne uwagi i życzliwość

Panu Profesorowi Piotrowi Czaudernie i Panu Profesorowi Witoldowi Rzymanowi za niezawodną pomoc na płaszczyźnie chirurgicznej

Moim cudownym koleżankom i kolegom: Katarzynie Dziurdzińskiej, Marcelinie Osak, Annie Malinowskiej, Annie Jaźwińskiej i Jackowi Zielińskiemu za nieocenioną pomoc w przygotowaniu pracy

Jolancie Juścińskiej za długoletnią współpracę

Moim Koleżankom i Kolegom z oddziału Hematologii Dziecięcej za życzliwą atmosferę, która każdego dnia motywowała mnie do dalszej pracy

Dzieciom – pacjentom Oddziału Hematologii Dziecięcej i ich Rodzicom, którzy byli i są dla mnie nieustającą inspiracją do dalszego rozwoju

Serdecznie dziękuję Mojej Mamie i Córcie – za wszystko...

Szczególne podziękowania składam mojemu ukochanemu Mężowi, bez którego nieustającego wsparcia, bezgranicznej cierpliwości i miłości praca ta z pewnością by nie powstała...

Pracę dedykuję pamięci Mojego Taty

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	9
Spis publikacji dorobku autora zawierających częściowe wyniki prezentowane w rozprawie habilitacyjnej	12
1. Wstęp.....	13
1.1. Problematyka zakażeń grzybiczych w onkematologii	13
1.2. Epidemiologia inwazyjnych zakażeń grzybiczych.....	13
1.3. Etiologia inwazyjnych zakażeń grzybiczych	15
1.4. Odporność przeciwgrzybicza	16
1.5. Czynniki ryzyka wystąpienia inwazyjnych zakażeń grzybiczych.....	17
1.6. Postacie kliniczne inwazyjnych zakażeń grzybiczych	21
1.7. Diagnostyka inwazyjnych zakażeń grzybiczych	23
1.7.1. Badania mikologiczne i ocena histopatologiczna	23
1.7.2. Metody nieinwazyjne	24
1.7.3. Badania obrazowe	26
1.8. Kryteria rozpoznania inwazyjnego zakażenia grzybiczego	29
1.9. Leczenie przeciwgrzybicze	30
1.9.1. Leki przeciwgrzybicze	31
1.9.2. Leczenie skojarzone	32
1.9.3. Strategie leczenia przeciwgrzybiczego	32
1.9.4. Leczenie wspomagające	33
1.10. Znaczenie procedur chirurgicznych u dzieci z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym.....	35
2. Cele	36
3. Materiał i metody	37
3.1. Charakterystyka kliniczno-demograficzna badanej grupy	38
3.1.1. Płeć	38
3.1.2. Wiek	38
3.1.3. Rozpoznanie choroby podstawowej	39
3.1.4. Leczenie choroby podstawowej.....	44
3.2. Charakterystyka pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym	47
3.2.1. Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny ultrasonograficznej płuc we wczesnej diagnostyce inwazyjnej grzybicy płuc	48
3.2.2. Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych.....	50
3.2.3. Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny skuteczności transfuzji koncentratu granulocytów od dawców stymulowanych G-CSF w leczeniu wspomagającym IZG.....	52
3.2.4. Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny przydatności procedur chirurgicznych w diagnostyce i leczeniu IZG	54
3.3. Diagnostyka inwazyjnych zakażeń grzybiczych.....	55
3.3.1. Kryteria rozpoznania inwazyjnego zakażenia grzybiczego	55

3.3.2. Badania mikologiczne	57
3.3.3. Badania obrazowe	57
3.3.4. Badania laboratoryjne.....	58
3.4. Metody statystyczne.....	58
4. Wyniki.....	60
4.1. Charakterystyka pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym	60
4.1.1. Charakterystyka kliniczno-demograficzna dzieci z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym	60
4.1.2. Charakterystyka incydentów inwazyjnych zakażeń grzybiczych	68
4.1.3. Ocena przeżycia pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym	75
4.2. Analiza wybranych aspektów diagnostyki i terapii inwazyjnych zakażeń grzybiczych	77
4.2.1. Ocena przydatności badania ultrasonograficznego we wczesnej diagnostyce inwazyjnej grzybicy płuc u dzieci	77
4.2.2. Ocena wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w grupie dzieci otrzymujących glikokortykosterydy w ramach stosowanego programu terapeutycznego	81
4.2.3. Ocena skuteczności transfuzji koncentratu granulocytów od dawców stymulowanych G-CSF w leczeniu wspomagającym inwazyjnych zakażeń grzybiczych.....	90
4.2.4. Ocena przydatności procedur chirurgicznych w diagnostyce i leczeniu IZG w analizowanej grupie dzieci.....	99
5. Dyskusja	119
6. Wnioski	144
7. Piśmiennictwo	146
8. Streszczenie	163
9. Summary	168
10. Załączniki	173
10.1. Zgoda Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym	173

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABCD	roztwór koloidalny amfoterycyny B / <i>amphotericin B colloidal dispersion</i>
ABLC	amfoterycyna B kompleks lipidowy / <i>amphotericin B lipid complex</i>
ALCL	chłoniak anaplastyczny wielkomórkowy / <i>anaplastic large-cell lymphoma</i>
ALL	ostra białaczka limfoblastyczna / <i>acute lymphoblastic leukemia</i>
allo-HSCT	allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych / <i>allogenic bone marrow transplantation</i>
AML	ostra białaczka mieloblastyczna / <i>acute myeloid leukemia</i>
auto-HSCT	autologiczna transplantacja komórek krwiotwórczych / <i>autologic bone marrow transplantation</i>
BAL	płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe / <i>bronchoalveolar lavage</i>
BG	1,3β-D-glukan
BMI	<i>body mass index</i>
BMT	allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych / <i>bone marrow transplantation</i>
CGD	przewlekła choroba ziarniniakowa / <i>chronic granulomatous disease</i>
CO	całkowita odpowiedź / <i>complete response</i>
COZmR	całkowita odpowiedź ze zmianą resztkową / <i>complete response with residual change</i>
CRP	białko C-reaktywne / <i>C-reactive protein</i>
CsA	cyklosporyna / <i>cyclosporin A</i>
CzO	częściowa odpowiedź / <i>partial response</i>
DM	cukrzyca / <i>diabetes mellitus</i>
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
ECIL	European Conference on Infections in Leukemia
ELN	European LeukaemiaNet
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
EORTC/MSG	European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungi Infection Cooperative Group and National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
G-CSF	granulocytny czynnik wzrostu / <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GKS	glikokortykosterydy / <i>steroids</i>
GM	galaktomannan
GTX	transfuzja granulocytów / <i>granulocyte transfusion</i>
GUMed	Gdański Uniwersytety Medyczny / <i>Medical University of Gdansk</i>
GvHD	choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi / <i>Graft-Versus-Host Disease</i>

HIES	zespół hiper-IgE / <i>hyper-IgE syndrome</i>
HIGM	zespół hiper IgM typ I / <i>hyper-IgM type I syndrome</i>
HP	hiperglikemia posterydowa / <i>poststeroid hyperglycemia</i>
HRG	grupa wysokiego ryzyka / <i>high-risk group</i>
HSCT	transplantacja komórek krwiotwórczych / <i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
IAP	inwazyjna aspergiloza płuc / <i>invasive pulmonary aspergillosis</i>
ICHS	International Immunocompromised Host Society
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukina / <i>interleukin</i>
IRG	grupa pośredniego ryzyka / <i>intermediate-risk group</i>
IZG	inwazyjne zakażenia grzybicze / <i>invasive fungal infection</i>
j	jednostka / <i>unit</i>
JMML	młodzieńcza białaczka mielomonocytowa / <i>juvenile myelomonocytic leukemia</i>
KG	koncentrat granulocytarny / <i>granulocyte concentrate</i>
KKCz	koncentrat krwinek czerwonych / <i>erythrocyte concentrate</i>
KKP	koncentrat krwinek płytkowych / <i>thrombocyte concentrate</i>
komórki NK	komórki <i>natural killers</i>
LAmB	liposomalna amfoterycyna B / <i>liposomal amphotericin B</i>
MRI	rezonans magnetyczny / <i>magnetic resonance imaging</i>
NHL	nieziarniczy chłoniak złośliwy / <i>non-Hodgkin lymphoma</i>
NHL B	nieziarniczy chłoniak złośliwy B-komórkowy / <i>B-cell non-Hodgkin lymphoma</i>
NHL pre B	nieziarniczy chłoniak złośliwy pre B / <i>pre B-cell non-Hodgkin lymphoma</i>
NHL T	nieziarniczy chłoniak złośliwy T-komórkowy / <i>T-cell non-Hodgkin lymphoma</i>
NPV	ujemna wartość predykcyjna testu / <i>Negative Predictive Value</i>
ns	brak istotności statystycznej / <i>non significant</i>
OUN	ośrodkowy układ nerwowy / <i>central nervous system</i>
PBMC	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej / <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	prokalcytonina / <i>procalcitonin</i>
post-BMT	po transplantacji komórek krwiotwórczych / <i>after bone marrow transplantation</i>
Poz	pozakonazol / <i>posaconazole</i>
PPV	dodatnia wartość predykcyjna testu / <i>Positive Predictive Value</i>
PUBP	przezskłatkowe ultrasonograficzne badanie płuc / <i>chest ultrasound</i>
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>

RTG	klasyczne zdjęcie rentgenowskie / <i>chest x-ray</i>
SAA	ciężka anemia aplastyczna / <i>severe aplastic anemia</i>
SCID	ciężki złożony niedobór odporności / <i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	odchylenie standardowe / <i>standard deviation</i>
SRG	grupa standardowego ryzyka / <i>standard-risk group</i>
TBI	napromienianie całego ciała / <i>total body irradiation</i>
TK	tomografia komputerowa / <i>computed tomography examination</i>
TK-WR	tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości / <i>high resolution computed tomography</i>
TLR	receptory <i>Toll-like</i>
TRALI	potransfuzyjna ostra niewydolność oddechowa / <i>Transfusion-Related Acute Lung Injury</i>
USG	badanie ultrasonograficzne / <i>ultrasound examination</i>
VAT	biopsja torakoskopowa / <i>video assisted thoracoscopic biopsy</i>
vs	<i>versus</i>
Wor	worykonazol / <i>voriconazole</i>
WPSAA	Working Party on Severe Aplastic Anaemia
ZGW	zaburzenia gospodarki węglowodanowej / <i>carbohydrate metabolism disturbances</i>

**SPIS PUBLIKACJI DOROBKU AUTORA ZAWIERAJĄCYCH
CZĄSTKOWE WYNIKI PREZENTOWANE W ROZPRAWIE
HABILITACYJNEJ**

1. Irga N, Grabiec-Wisniewska A, Kosiak W, Balanda A, Balcerska A. Mucor sp. invasive infection in children treated for acute leukemia: diagnostic and therapeutic problem Onkol. Info 2008; 5, 5, 188-193.
2. Irga N, Grabiec-Wisniewska A, Kosiak W, Komarnicka J. Fungal infection in children with oncohematologic disorders : is early diagnostics possible? Onkol. Pol. 2008; 11, 2, 82-86.
3. Irga N, Kosiak W, Balcerska A. Two episodes of invasive fungal infection in a patient with biphenotypic leukemia Ph (+). Zakażenia 2009; 9, 1, 44-46, 48-50.
4. Irga N, Szalewska M, Maciejka-Kapuscinska L. Infekcje jako przyczyna zgonów u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Forum Med. Rodz. 2009; 3, 2, 136-142.
5. Irga N, Rzyman W, Niedzwiecki M, Kosiak W, Tomaszewski M, Adamkiewicz-Drozynska E. Lethal pulmonary hemorrhage in aspergillosis in 14 years old patient with acute myeloblastic leukaemia. Mikologia Lekarska 2009; 16: 115-117.
6. Irga N, Szalewska M, Wisniewski J, Balcerska A. Combination treatment of invasive fungal infections in patients with hemato-oncologic diseases. Zakażenia 2010; 6: 2-5.

1. WSTĘP

1.1. Problematyka zakażeń grzybiczych w onkohematologii

W ostatnich kilkudziesięciu latach dokonał się przełom w leczeniu dzieci ze schorzeniami onkohematologicznymi. Jeszcze w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku, profesor Włodzimierz Ławkowicz w swoim podręczniku „Hematologia wieku dziecięcego”, definiował białaczkę jako schorzenie postępujące i prowadzące nieuchronnie do śmierci [121]. Obecnie odsetek wyleczeń u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną sięga 80%, natomiast u dzieci z ostrą białaczką mieloblastyczną – około 50-70%. Postęp ten osiągnięto przede wszystkim dzięki wprowadzeniu skutecznych programów wielolekowej chemioterapii, jednak nie byłby on możliwy bez poprawy jakości leczenia wspomagającego, między innymi dzięki coraz doskonalszym metodom diagnostyki i leczenia przeciwniekcyjnego oraz udoskonaleniu metod intensywnej terapii dzieci. W dobie tak ogromnego postępu należy jednak podkreślić, że schorzenia infekcyjne dominują wśród przyczyn zgonów w grupie dzieci z ostrymi białaczkami. Zakażenia grzybicze stanowią natomiast najczęstszą przyczynę zgonów spośród czynników infekcyjnych u pacjentów leczonych z powodu schorzeń nowotworowych układu krwiotwórczego oraz poddawanych przeszczepom komórek krwiotwórczych [74;185;198].

W ostatnich latach znacząco wydłużył się także czas przeżycia dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności, a szczególnie z ciężkimi złożonymi niedoborami odporności, które do niedawna uważane były za schorzenia letalne. Wśród niedoborów odporności szczególnie predysponujących do zakażeń grzybiczych należy wymienić ciężki złożony niedobór odporności (SCID) oraz przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD). Inne niedobory, w których obserwuje się zwiększone ryzyko wystąpienia zakażeń grzybiczych to niedobór ligandu CD40 (dawniej zespół hiper-IgM typ I – HIGM), kompletny zespół Di George’a, czy zespół hiper-IgE (HIES) [153]. Wcześniej przeprowadzony przeszczep komórek krwiotwórczych pozwala w wielu przypadkach uzyskać całkowitą rekonstrukcję układu immunologicznego, jednak w okresie przed przeszczepem, jak i w okresie okołoprzeszczepowym dzieci te są szczególnie narażone na rozwój inwazyjnych zakażeń grzybiczych [7;79;109;232].

Inwazyjne zakażenia grzybicze (IZG), określane także jako inwazyjna choroba grzybicza stanowią jednak przede wszystkim narastający problem w onkohematologii dziecięcej [86]. Tendencja ta jest, paradoksalnie, ceną za ogromny postęp, jaki dokonał się w leczeniu pacjentów ze schorzeniami rozrostowymi układu krwiotwórczego, między innymi dzięki wprowadzeniu coraz bardziej agresywnych protokołów terapeutycznych, przeszczepom komórek krwiotwórczych, czy nowym lekom głęboko ingerującym w układ odpornościowy człowieka [159].

1.2. Epidemiologia inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w ostatnich latach znacząco wzrosła. Zjawisko to zaobserwowano już w latach siedemdziesiątych XX wieku, kiedy to stwierdzono zdecydowany wzrost liczby rozpoznawanych autopsyjnie przypadków aspergilozy [127]. Dane dotyczące częstości występowania IZG są jednak bardzo zróżnicowane w poszczególnych opracowaniach. U chorych z ostrymi białaczkami i u

pacjentów poddawanych allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych podawana jest częstość 2-40% [171]. Doniesienia dotyczące epidemiologii zakażeń grzybiczych u dzieci są bardzo nieliczne, a podawane dane dotyczące częstości występowania zakażeń o etiologii grzybiczej także są bardzo rozbieżne: 4,9-29% dzieci poddawanych intensywnej chemioterapii rozwija IZG [139].

Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych jest uzależniona od podstawowego rozpoznania choroby nowotworowej i według większości autorów jest najwyższa u chorych z ostrą białaczką mieloblastyczną [41;69;110;149]. W obszernych analizach Pagano i Chamilos wykazano, że IZG najczęściej obserwowane jest w ostrej białaczce mieloblastycznej (AML), rzadziej w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL), a najrzadziej w niezziarnicznym chłoniaku złośliwym (NHL) [35;159]. U pacjentów poddawanych allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (allo-HSCT) częstość ta waha się: od 3,9-15,2%, natomiast w transplantacjach autologicznych (auto-HSCT) wynosi około 3%. Częstość występowania zakażeń grzybiczych uzależniona jest także od etapu leczenia choroby nowotworowej. W badaniu Pagano i wsp. z 2006 roku wykazano, że 43% przypadków zakażeń miało miejsce w trakcie leczenia indukcyjnego białaczki, 8% w trakcie konsolidacji, 28% podczas leczenia wznowy choroby podstawowej, natomiast u pozostałych 21% chorych zakażenie rozwinęło się w trakcie chemioterapii kolejnych linii [159]. W grupie dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności szczególnie predysponującymi do wystąpienia IZG (ciężki złożony niedobór odporności czy przewlekła choroba ziarniniakowa), częstość występowania inwazyjnej aspergilozy wynosi 15-40% [153].

Śmiertelność w inwazyjnych zakażeniach grzybiczych, pomimo stosowania coraz doskonalszych metod diagnostyki i terapii, nadal pozostaje wysoka i wynosi 20-90% w zależności od opracowania [32;78;106;110;149;159]. Na podstawie analizy 34-letnich doświadczeń u dzieci leczonych z powodu chorób nowotworowych, Abbassi udokumentował śmiertelność sięgającą 85%, natomiast w pracy Crassard i wsp. odsetek dzieci, które zginęły z powodu IZG po transplantacji komórek krwiotwórczych był jeszcze wyższy i wynosił 90% [1;46]. Neofytos i wsp. na podstawie analizy 234 chorych, u których stwierdzono 250 incydentów IZG wykazał śmiertelność na poziomie 46,7% [155]. Lund i wsp. przeanalizowali 2.735 dzieci leczonych w pięciu krajach nordyckich z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej. Spośród 88 dzieci, które zmarły z przyczyn niezwiązanych z progresją choroby, u 72% (63 pacjentów) przyczynę zgonu stanowiły infekcje, wśród nich inwazyjne zakażenie grzybicze rozpoznano u 11 chorych [130]. W prospektywnym badaniu Castagnola i wsp. dotyczącym dzieci leczonych z powodu chorób nowotworowych i poddawanych transplantacjom, wykazano śmiertelność sięgającą 28% [32]. U pacjentów dorosłych inwazyjna aspergiloza stanowi najczęstszą przyczynę zgonów wśród przyczyn infekcyjnych u pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych [19;28;40]. Wysoką śmiertelność obserwuje się także w kandydemii [115;159].

Podkreślana jest także zależność częstości zgonów z powodu aspergilozy od fazy leczenia choroby nowotworowej. W analizie Pagano i wsp. wykazano, że w przypadku, gdy zakażenie grzybicze wystąpiło podczas protokołu indukcyjnego, śmiertelność wynosiła 28%. Wśród pacjentów, u których zakażenie obserwowano podczas leczenia nawrotu choroby nowotworowej zmarło 63% chorych. W wyniku aspergilozy zmarło 20% chorych znajdujących się w całkowitej remisji choroby nowotworowej [159].

1.3. Etiologia inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Wprawdzie do chwili obecnej opisano już ponad 100.000 gatunków grzybów, jednakże jedynie niewielki odsetek spośród nich jest chorobotwórczych dla człowieka [194]. Wyróżnia się dwie grupy grzybów chorobotwórczych: grzyby będące prawdziwymi patogenami oraz grzyby oportunistyczne. Prawdziwe patogeny bardzo rzadko występują w Polsce. Blastomykoza występuje endemicznie w południowo-wschodniej i południowo-środkowej części Stanów Zjednoczonych, a kokcidiomykoza – głównie w południowo-zachodnich stanach USA, północnym Meksyku i niektórych obszarach Ameryki Południowej. Grzyby oportunistyczne należące do rodzajów *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Fusarium spp.*, *Zygomycetes spp.* i *Trichosporon spp.* są odpowiedzialne za zakażenia przede wszystkim u osób z upośledzeniem układu immunologicznego [59;228].

Jeszcze w latach dziewięćdziesiątych dwudziestego wieku najczęstszym czynnikiem etiologicznym inwazyjnych zakażeń grzybiczych były grzyby z rodzaju *Candida spp.* W ostatnich latach obserwuje się jednak wyraźny trend polegający na systematycznym zmniejszaniu się częstości występowania zakażeń drożdżakami na rzecz rosnącej częstości występowania zakażeń grzybami pleśniowymi. Wśród nich, najczęściej obserwowana jest inwazyjna aspergiloza, a najczęstszymi czynnikami etiologicznymi są *Aspergillus fumigatus*, rzadziej *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* i *A. nidulans* [60;79;159]. Pagano i wsp. przeanalizowali 11.802 chorych powyżej 16 roku życia leczonych w 18 ośrodkach hematologicznych z powodu białaczek i chłoniaków [159]. Rozpoznano u nich 538 zakażeń grzybiczych w kategoriach rozpoznania pewnego i prawdopodobnego wg kryteriów EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungi Infection Cooperative Group and National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group). W tej grupie dominującym czynnikiem etiologicznym były grzyby pleśniowe (64%), wśród których najczęściej stwierdzano *Aspergillus spp.* (90%). Spośród zakażeń *Aspergillus* najczęściej izolowano *A. fumigatus* (53%), jednakże w ostatnim okresie zaobserwowano zwiększoną częstość występowania *Aspergillus flavus* [159]. Również inni autorzy podają, że najczęstszym czynnikiem etiologicznym wywołującym aspergilozę jest *Aspergillus fumigatus*, rzadziej *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, i *A. nidulans* [82;221]. W ostatnim okresie obserwuje się jednak wzrost częstości występowania zakażeń grzybami pleśniowymi o innej etiologii niż *Aspergillus*. Wymienia się zakażenia wywołane przez *Fusarium spp.*, *Acremonium spp.*, *Scedosporium spp.*, *Cladrosporium spp.* oraz *Mucor spp.* [19;79;137;141].

Wśród zakażeń drożdżakami zdecydowana większość zakażeń wywołana jest przez *Candida spp.* Na podstawie badań epidemiologicznych wykazano, że w ostatnim okresie zmniejsza się częstość zakażeń *Candida albicans*, która stanowiła dotychczas najistotniejszy czynnik etiologiczny wśród zakażeń *Candida* na korzyść zakażeń *Candida non-albicans* [115;159]. Pozostałe czynniki etiologiczne wśród drożdżaków to: *Cryptococcus spp.*, *Trichosporon spp.*, *Hansenula spp.* i *Rhodotorula spp.* Wydaje się, że szerokie rozpowszechnienie flukonazolu zarówno w profilaktyce, jak i leczeniu zakażeń drożdżakami spowodowało dwie opisane powyżej tendencje dotyczące etiologii zakażeń grzybiczych: po pierwsze wzrost częstości zakażeń *non-albicans Candida* w stosunku do *Candida albicans*; po drugie redukcję częstości występowania kandydemii na rzecz wzrostu częstości zakażeń grzybami pleśniowymi [29;60;105;142;231].

Zjawiskiem, które w ostatnich latach obserwuje się coraz częściej, jest pojawienie się tzw. zakażeń przełamujących, czyli takich, które występują podczas leczenia zakażenia grzybiczego o innej etiologii. Przykładowo opisano wzrost częstości występowania mukormykozy podczas stosowania worykonazolu w profilaktyce lub terapii aspergilozy [90;193]. Inny przykład stanowi zakażenie *Fusarium spp.*, które może pojawiać się podczas terapii amfoterycyną B, na którą ten patogen jest oporny [23].

1.4. Odporność przeciwgrzybicza

Podstawą ochrony organizmu przed patogenami grzybiczymi jest sprawny układ odpornościowy. Pomimo mogącej istnieć fizjologicznie kolonizacji skóry, układu oddechowego, czy przewodu pokarmowego przez *Candida albicans*, lub też drzewa oskrzelowego i zatok obocznych nosa przez *Aspergillus fumigatus*, u osoby zdrowej, dzięki współdziałaniu sprawnie funkcjonujących mechanizmów układu odpornościowego nie dochodzi do zakażenia grzybiczego.

Odporność organizmu człowieka na infekcje grzybicze opiera się, podobnie jak w przypadku bakterii, na mechanizmach nieswoistych (wrodzonych) i swoistych (nabytych). Przewaga zaangażowania odporności swoistej lub nieswoistej zależy od rodzaju patogenu. Fagocyty (neutrofile, monocyty, makrofagi) odgrywają podstawową rolę w zwalczaniu zakażeń drożdżakami i grzybami pleśniowymi. Limfocyty CD3+, a zwłaszcza CD8+ i CD4+, odpowiadają za obronę przed grzybami takimi jak: *Pneumocystis jiroveci*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* oraz zakażeniami wywołanymi przez *Candida albicans* obejmującymi błony śluzowe [36;109].

W nieswoistej odporności przeciwgrzybiczej podstawową rolę odgrywają fizjologiczne bariery fizyczne pod postacią ciągłości nieuszkodzonej skóry z odpowiednią ilością kwasów tłuszczowych na powierzchni, ciągłości nabłonka błon śluzowych z odpowiednią ilością śluzu oraz z prawidłowo funkcjonującymi rzęskami. Dodatkowo działanie przeciwgrzybicze wzmacniają substancje obecne w wydzielinach błon śluzowych, takie jak lizozym, laktoferyna, peroksydaza, czy defensyny [36]. W procesie leczenia dzieci z chorobami onkohematologicznymi naturalne bariery organizmu są wielokrotnie uszkodzane – procedury inwazyjne naruszają ciągłość skóry, agresywna chemioterapia prowadzi do uszkodzenia błon śluzowych, a często stosowana szerokospektralna antybiotykoterapia głęboko ingeruje w fizjologiczną mikroflorę organizmu, która również stanowi istotny element obrony przed inwazją grzybiczą.

Kolejnym elementem nieswoistej, wrodzonej obrony organizmu człowieka przed grzybami patogennymi są fagocyty: granulocyty wielojądrzaste, obwodowe monocyty krwi, makrofagi, makrofagi pęcherzyków płucnych, komórki dendrytyczne oraz komórki NK (*natural killers*). Funkcje komórek obrony nieswoistej w odporności przeciwgrzybiczej obejmują: pochłanianie i zabijanie zarodników przez makrofagi, fagocytowanie zarodników przez neutrofile oraz zabijanie strzępek poprzez substancje wydzielane przez nie zewnątrzkomórkowo, a także fagocytozę i prezentację antygenów grzybiczych komórkom zaangażowanym w obronę swoistą (limfocyty T dziewicze i pamięci). Prezentacja ta odbywa się w węzłach chłonnych, w konsekwencji czego pobudzone limfocyty T wydzielają interleukinę 2, która stymuluje proliferację zarówno limfocytów T jak i B. W wyniku tej stymulacji pobudzone limfocyty T CD4+ produkują interferon γ (IFN- γ), który z kolei stymuluje fagocytozę i zabijanie przez neutrofile i makrofagi [2;14;194].

Granulocyty wielojądrzaste, fagocytyując drożdżaki (blastospory), hamują ich przemianę w formy strzępkowe, następnie blastospory są zabijane wewnątrzkomórkowo w mechanizmie oksydacyjnym lub nieoksydacyjnym, przy udziale uwalnianych w procesie degranulacji ziarnistości defensyn, laktoferyny, białek kationowych, białka wiążącego cynk i innych. Z uwagi na duże rozmiary pseudostrzępek i strzępek *Aspergillus spp.* i *Candida spp.* niemożliwa jest ich fagocytoza przez granulocyty. Zabijanie tych form grzybów odbywa się pozakomórkowo przy udziale uwalnianych z granulocytów toksycznych związków tlenu, nadtlenu wodoru, kwasu podchlorowego, enzymów proteolitycznych oraz defensyn. Dodatkowo działanie grzybobójcze jest wzmacniane przez stymulację obecnych na powierzchni granulocytów receptorów dla cytokin. Same granulocyty także wytwarzają swoiste cytokiny m.in. TNF- α , interleukiny (IL): 1 β , 6, 10 i 12 [2;55;182;205].

W zwalczaniu zakażeń, do których dochodzi drogą wziewną (szczególnie *Aspergillus spp.*) dominujące znaczenie mają monocyty i makrofagi pęcherzyków płucnych [59;194]. Prawidłowo funkcjonujące mechanizmy odpornościowe umożliwiają inaktywację zarodników grzybów przez prawidłowy śluz i substancje rozpuszczalne. Następnie zarodniki są usuwane dzięki prawidłowo funkcjonującym rzęskom i odruchowi kaszlowemu. W przypadku, gdy nie uda się usunąć zarodników grzyba, komórki nabłonka dróg oddechowych rozpoczynają produkcję substancji chemotaktycznych dla komórek efektorowych zaangażowanych w obronę przeciwgrzybiczą [118].

1.5. Czynniki ryzyka wystąpienia inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Znajomość czynników ryzyka IZG jest niezwykle pomocna w planowaniu strategii postępowania dotyczącego diagnostyki, profilaktyki i terapii chorych ze schorzeniami nowotworowymi. W analizie czynników ryzyka zakażeń grzybiczych należy uwzględnić fakt istotnej różnicy pomiędzy zakażeniami drożdżakami i grzybami pleśniowymi, polegającej na tym, że zakażenia *Candida spp.* w zdecydowanej większości przypadków są pochodzenia endogennego, natomiast zakażenia grzybami pleśniowymi mają charakter egzogeny. W przypadku zakażeń *Candida spp.* zakażenie pochodzi zazwyczaj ze skolonizowanych drożdżakami błon śluzowych przewodu pokarmowego. W trakcie chemioterapii, wraz z uszkodzeniem błon śluzowych (*mucositis*) spowodowanym chemioterapią, dochodzić może do translokacji patogenu i rozwoju kandydemii. Znaczącą rolę odgrywa także dysbakterioza będąca efektem stosowania antybiotykoterapii, która toruje drogę dla kolonizacji przez *Candida spp.* Kolonizacja grzybami *Candida spp.* przy współistniejącym uszkodzeniu błon śluzowych przez chemioterapię stanowi podstawowy czynnik ryzyka inwazyjnej kandydozy [21;52].

Chociaż czynniki ryzyka są odmienne dla zakażeń grzybami pleśniowymi i drożdżakami, istotny jest fakt, że u dzieci leczonych z powodu schorzeń rozrostowych układu krwiotwórczego niemal zawsze dochodzi do ich kumulowania.

Neutropenia

Czynnikiem ryzyka IZG powszechnie uznawanym za najistotniejszy jest neutropenia [32;61;183;194]. W pracy Gerson i wsp. z 1984 roku oceniono wpływ przedłużonej granulocytopenii na częstość występowania inwazyjnej aspergilozy płuc u pacjentów z

ostrymi białaczkami [68]. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że ryzyko wystąpienia aspergilozy płuc rośnie o 1% każdego dnia od 6. do 22. doby neutropenii poniżej 0,5 G/l. Pomiędzy 22. a 26. dobą trwania neutropenii, ryzyko inwazyjnej aspergilozy płuc (IAP) wzrasta codziennie o 4,3%. W pracy Hale i wsp., w której przeanalizowano 106 przypadków IZG u dzieci z ostrymi białaczkami i poddawanych transplantacji komórek krwiotwórczych wykazano, że w momencie rozpoznania IZG u 60% pacjentów stwierdzano neutropenię [78].

Rozpoznanie podstawowe / choroby współistniejące

Rodzaj schorzenia podstawowego jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju IZG u pacjentów leczonych z powodu chorób hematologicznych. Już w 1998 roku Denning i wsp. wskazywali, że inwazyjna aspergiloza częściej występuje u chorych z ostrą białaczką mieloblastyczną niż limfoblastyczną (49% vs 21%) [53]. Zjawisko to wynika prawdopodobnie z głębokich zaburzeń jakościowych i ilościowych krwinek białych, będących rezultatem zarówno choroby podstawowej, jak i agresywnego leczenia chorych z AML. W analizie wieloczynnikowej Hale i wsp. za czynniki znacząco wpływające na rozwój IZG u dzieci leczonych z powodu nowotworów krwi uznali natomiast ostrą białaczkę limfoblastyczną wysokiego ryzyka, nawrót białaczki, hospitalizację na oddziale intensywnej terapii oraz występowanie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi [78]. Częstość występowania zakażeń grzybiczych w tym opracowaniu wynosiła 21% u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, 15% – z ostrą białaczką mieloblastyczną i 25% u dzieci poddawanych transplantacji komórek krwiotwórczych.

Biorcy przeszczepów komórek krwiotwórczych są grupą pacjentów szczególnie narażonych na rozwój IZG. Stopień ryzyka wystąpienia zakażenia jest zróżnicowany w zależności od rodzaju przeprowadzonej procedury: najniższy w przypadku transplantacji autologicznej (0,5%), wyższy po transplantacji allogenicznej od zgodnego dawcy rodzinnego (2,3%), a najwyższy po przeszczepie od dawców spokrewnionych częściowo niezgodnych i dawców niespokrewnionych (odpowiednio 3,2% i 3,9%) [110;150]. Częstość występowania IZG u dzieci poddanych transplantacji z krwi pępowinowej oceniona w badaniu Safdar z 2007 roku wynosiła 3% [187]. Istotne znaczenie dla wystąpienia poszczególnych czynników ryzyka rozwoju zakażenia ma czas, jaki upłynął od procedury przeszczepienia. We wczesnym okresie po przeszczepie istotną rolę odgrywają: rodzaj materiału użytego do transplantacji (T-deplecja, selekcja macierzystych komórek krwiotwórczych CD34+), leczenie glikokortykosteroidami, neutropenia, limfopenia, choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD), choroba cytomegalowirusowa, infekcje wirusowe układu oddechowego (wirusy grypy, paragrypy, *respiratory syncytial virus* – RSV). Późna aspergiloza, obserwowana powyżej 6 miesięcy od transplantacji, ma związek przede wszystkim z GvHD i chorobą cytomegalowirusową [19;141]. Inne czynniki ryzyka rozwoju IZG, niejednokrotnie współistniejące w tej grupie chorych to stany przeładowania żelazem, niedożywienie, wcześniejsza kolonizacja patogenami grzybiczymi, masywne uszkodzenie błon śluzowych oraz cukrzyca [207]. Częstość zakażeń grzybiczych rośnie w przypadku przebywania pacjentów z grup najwyższego ryzyka w salach niewyposażonych w przepływ laminarny i filtry HEPA. Prace budowlane prowadzone w bliskim otoczeniu pacjenta stanowią dodatkowy czynnik ryzyka zakażenia grzybami pleśniowymi (*Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*) [81].

Stosowane leki

Podaż glikokortykosterydów stosowana rutynowo w programach leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej i niezłośliwego chłoniaka złośliwego, w schematach leczenia immunoablacyjnego ciężkiej anemii aplastycznej oraz w terapii pacjentów po transplantacji szpiku stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju zakażeń grzybiczych. Mechanizm upośledzenia odporności wynikający z działania tych leków jest złożony. Glikokortykosterydy upośledzają migrację fagocytów do ogniska zapalnego, zaburzają sam proces fagocytozy, hamują uwalnianie cytokin prozapalnych i wybuch tlenowy. Dodatkowo hiperglikemia posterydowa, która może wikłać terapię glikokortykosterydami stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju IZG [194].

Hiperglikemia

Zaburzenia odporności towarzyszące hiperglikemii wynikają głównie z zaburzeń odpowiedzi nieswoistej oraz zmian w zakresie adherencji mikroorganizmów. Badania sekrecji cytokin przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej pobranych od osób zdrowych w hodowli w warunkach hiperglikemii wykazały zwiększoną sekrecję TNF- α i IL-6 przez komórki niestymulowane oraz niższą produkcję IL-2, IL-6 i IL-10 po stymulacji. Obecność glukozy prowadzi do wyższej produkcji cytokin w stanie spoczynku, lecz gorszej odpowiedzi po stymulacji [67;204]. Rassias i wsp. w pracy z 1999 roku oceniali wpływ infuzji insuliny na funkcję granulocytów wielojądrzastych u chorych z cukrzycą poddawanych zabiegom kardiochirurgicznym [178]. Wykazano, że u chorych, u których prowadzono dożylny wlew insuliny, osiągnięto niższe średnie stężenie glukozy w okresie okołoperacyjnym. W grupie tej stwierdzono lepszą funkcję fagocytarną granulocytów obojętnochłonnych w porównaniu z grupą chorych, którzy otrzymywali insulinoterapię podskórną [178]. Już w latach 70-tych ubiegłego wieku opisano także zjawisko obniżonej chemotaksji oraz upośledzonej fagocytozy u chorych ze źle kontrolowaną cukrzycą (*diabetes mellitus* – DM) [10;152]. Hiperglikemia może stwarzać sprzyjające środowisko dla zwiększenia wirulencji niektórych mikroorganizmów.

Prowadzono także badania polegające na inkubacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej z osoczem chorych na cukrzycę. Komórki w takich warunkach wykazywały większą adhezję, co może prowadzić do zwiększenia diapedezy i tworzenia się wysięków [67]. Inną substancją, której rola podnoszona jest w patogenezie infekcji u pacjentów z cukrzycą jest cynk. U pacjentów z cukrzycą zarówno typu 1 jak i typu 2 stwierdzono niższe niż u osób zdrowych stężenia cynku [67]. W badaniach *in vitro* komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) od pacjentów z DM obu typów wykazywały gorszą chemotaksję przy niedoborze cynku [67]. Jednocześnie wykazano taką samą lub gorszą zdolność fagocytozy w porównaniu do osób zdrowych. Stwierdzono jednak, że u pacjentów z lepiej kontrolowaną glikemią (niższe stężenia HbA1) fagocytoza była bardziej efektywna.

W badaniach nad wybuchem tlenowym wykazano, że chociaż potencjał oksydacyjny był wyższy u chorych z cukrzycą niż u zdrowych, odpowiedź po stymulacji była słabsza. Także limfocyty chorych z cukrzycą wykazują *in vitro* gorszą odpowiedź na stymulację. Wykazano także upośledzenie chemotaksji i fagocytozy komórek monocytarnych u pacjentów z cukrzycą [154]. Komórki od osób zdrowych w kontakcie z osoczem chorych na DM nie wykazywały podobnych nieprawidłowości, co wskazuje na wewnętrzny defekt monocytów.

Adherencja mikroorganizmów do błon śluzowych lub nabłonka stanowi istotny element w patogenezie infekcji [67]. Czynniki zależne od gospodarza mogą mieć istotne znaczenie dla adherencji. Zmiany glikozylacji białek i lipidów powierzchniowych mogą ułatwiać adherencję mikroorganizmów. Przykładowo *Candida albicans* wiąże się do lipidów zawierających reszty fruktozy i N-acetylogalaktozaminy. Komórki błony śluzowej policzka pobrane od chorych z cukrzycą wykazują zwiększoną adherencję *C. albicans*, w porównaniu z komórkami uzyskanymi od osób zdrowych [67].

Przebyte IZG

Należy podkreślić, że niezwykle istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju inwazyjnego zakażenia grzybiczego jest przebyte wcześniej IZG.

Predyspozycje genetyczne

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia na temat predyspozycji genetycznych jako czynników ryzyka rozwoju zakażeń grzybiczych. Stwierdzono, że polimorfizm genu dla IL-10 skutkuje większą lub mniejszą produkcją tej cytokiny. Przy zwiększonej produkcji IL-10 rośnie ryzyko rozwoju IZG. Genetycznie uwarunkowane wytwarzanie czynnika martwicy nowotworów oraz polimorfizm genów dla TLR (*Toll-like receptors*) również zwiększają ryzyko rozwoju IZG [22;81;146;189].

Na podstawie analizy czynników ryzyka rozwoju IZG u pacjentów ze schorzeniami onkohematologicznymi, Prentice i wsp. wyodrębnili trzy grupy ryzyka rozwoju zakażeń grzybiczych [171]. Podział ten nie tylko porządkuje różne czynniki sprzyjające zakażeniom o etiologii grzybiczej, ale także umożliwia przyjęcie optymalnej strategii postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u pacjentów z poszczególnych grup ryzyka.

Do **grupy niskiego ryzyka** rozwoju IZG zalicza się pacjentów po przeprowadzonym autologicznym przeszczepie szpiku, dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną oraz z niezróżnicowanym chłoniakiem złośliwym.

W grupie ryzyka pośredniego rozwoju IZG wyodrębniono dwie podgrupy.

Do **grupy pośredniego niskiego ryzyka** rozwoju IZG zakwalifikowano pacjentów z następującymi czynnikami ryzyka:

- z umiarkowaną neutropenią (0,1-0,5 G/l) przez okres poniżej 3 tygodni, z limfocytosą poniżej 0,5 G/l oraz otrzymujących antybiotyki np. Bactrim®
- chorych w starszym wieku
- pacjentów z implantowanym centralnym cewnikiem żylnym

Do **grupy pośredniego wysokiego ryzyka** rozwoju IZG zaliczono chorych:

- skolonizowanych uprzednio grzybem powyżej jednego miejsca lub z masywną kolonizacją jednej lokalizacji
- z neutropenią 0,1-0,5 G/l powyżej 3, a poniżej 5 tygodni
- z ostrą białaczką mieloblastyczną
- po przeprowadzonym napromienianiu całego ciała (TBI – *total body irradiation*)
- po przeprowadzonej allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych od zgodnego rodzinnego dawcy

Do **grupy wysokiego ryzyka** rozwoju IZG zakwalifikowano pacjentów z:

- neutropenią poniżej 0,1 G/l przez okres powyżej 3 tygodni

- neutropenią poniżej 0,5 G/l przez okres powyżej 5 tygodni
- otrzymujących glikokortykosterydy powyżej 1 mg/kg masy ciała przy neutropenii poniżej 1,0 G/l trwającej powyżej tygodnia
- otrzymujących glikokortykosterydy powyżej 2 mg/kg masy ciała przez tydzień
- po przeprowadzonej allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego lub od niezgodnego dawcy rodzinnego
- skolonizowanych *Candida tropicalis*

1.6. Postacie kliniczne inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Symptomatologia kliniczna inwazyjnych zakażeń grzybiczych jest różnorodna. W części przypadków zakażenie może przebiegać jako sepsa grzybicza, z objawami wstrząsu septycznego prowadząc w bardzo krótkim czasie do niewydolności wielonarządowej i zgonu. Wielokrotnie jednak zakażenie rozwija się podstępnie, nie dając we wstępnej fazie typowych objawów klinicznych; u tych chorych diagnoza jest często stawiana w bardzo zaawansowanym stadium schorzenia.

Inwazyjne zakażenia grzybicze mogą przebiegać pod postacią: sepsy grzybiczej, inwazyjnej grzybicy płuc, inwazyjnego grzybiczego zapalenia zatok przynosowych, inwazyjnej grzybicy ośrodkowego układu nerwowego i przewlekłej rozsianej kandydozy (zespół śledzionowo-wątrobowy) [115].

Sepsa grzybicza

Sepsa grzybicza w przeważającej części przypadków wywołana jest przez grzyby z rodzaju *Candida spp.* i ma pochodzenie endogenne. Potwierdzeniem rozpoznania jest hodowla patogenu z krwi, jednakże dodatnie posiewy krwi stwierdzane są jedynie u ok. 30% chorych. Dodatkowo u chorych z kandydemią dochodzić może do hematogennej rozsiewu grzyba do wielu narządów, który ujawnia się klinicznie w późniejszym okresie, w momencie ustąpienia neutropenii. W czasie krwiopochodnego wysiewu pacjenci mogą prezentować następujące objawy kliniczne: gorączkę, objawy wstrząsu septycznego, bóle mięśniowe oraz pojawienie się drobnogrudek wysypki [115]. Objawy te są mało charakterystyczne i nie pozwalają na odróżnienie sepsy grzybiczej od bakteryjnej. W badaniach laboratoryjnych stwierdzić można zazwyczaj podwyższenie wykładników stanu zapalnego (białko C-reaktywne – CRP, prokalcytonina – PCT). Istnieją doniesienia, że stężenie zarówno CRP, jak i PCT są w zakażeniach grzybiczych niższe niż w bakteryjnych, szczególnie wywołanych przez bakterie Gramm ujemne (-); obserwacje te nie mogą jednak służyć do różnicowania etiologii sepsy [188].

Inwazyjna grzybica płuc

Inwazyjna grzybica płuc w zdecydowanej większości przypadków wywołana jest przez grzyby z rodzaju *Aspergillus spp.*, jednakże w ostatnich latach wzrasta częstość zakażeń innymi grzybami pleśniowymi (*Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.*, *Zygomycetes spp.*) [203]. Objawy kliniczne są początkowo niecharakterystyczne i zazwyczaj skąpe: gorączka, nieproduktywny kaszel, tachypnoe, ból w klatce piersiowej, krwioplucie. Podstawową rolę w diagnostyce odgrywają badania obrazowe, przede wszystkim tomo-

grafia komputerowa wysokiej rozdzielczości (TK-WR) [161]. Każdorazowo należy dążyć do udokumentowania etiologii zakażenia pobierając materiał diagnostyczny do badań histopatologicznych i mikologicznych.

Grzybicze zapalenie zatok przynosowych

Inwazyjne zapalenie grzybicze zatok przynosowych najczęściej wywołane jest przez grzyby z rodziny Aspergillaceae (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* i inne), spotyka się także zakażenia o etiologii *Mucor spp.*, *Absidia spp.* czy *Rhizopus spp.* oraz rzadziej *Candida spp.* Zakażenie manifestuje się obrzękiem błony śluzowej nosa, obrzękiem tkanki okołoczołowej, bólem twarzy i okolicy pozagałkowej. Obserwuje się także niedrożność przewodów nosowych, krwawienia z nosa, owrzodzenia i ogniska martwicy przegrody nosa i podniebienia oraz wytrzeszcz. Badania obrazowe, szczególnie tomografia komputerowa i rezonans magnetyczny mają istotne znaczenie w diagnostyce zakażenia zatok [99;115].

Grzybica ośrodkowego układu nerwowego

Grzybica inwazyjna ośrodkowego układu nerwowego (OUN) jest niezwykle poważną, obarczoną wysoką śmiertelnością postacią inwazyjnego zakażenia grzybiczego. Objawy wskazujące na zajęcie OUN to bóle głowy, objawy ogniskowe, jakościowe i ilościowe zaburzenia świadomości, objawy oponowe oraz drgawki. Wśród czynników etiologicznych wywołujących zakażenia ośrodkowego układu nerwowego najczęściej spotyka się grzyby z rodziny Aspergillaceae, a także zakażenia o etiologii *Mucor spp.*, *Absidia spp.*, czy *Rhizopus spp.* [127;138]

Przewlekła rozsiana kandydoza

Przewlekła rozsiana kandydoza narządowa jest skutkiem ostrej krwiopochodnej kandydemii. W wyniku rozsiewu zakażenia dochodzić może do zajęcia wątroby, śledziony, nerek czy płuc. Rozpoznanie przewlekłej rozsianej kandydozy narządowej może być trudne, gdyż objawy pojawiają się w okresie odnowy hematologicznej. Objawami mogącymi sugerować kandydozę mogą być: przewlekające się stany gorączkowe z miernie podwyższonym stężeniem CRP, bóle brzucha, brak łaknienia oraz utrata masy ciała. Dodatkową wskazówką diagnostyczną może być narastanie stężenia fosfatazy alkalicznej. Powikłaniem kandydemii może być także zajęcie gałki ocznej (*Candida endophthalmitis*), objawiające się bólami gałki ocznej, zaburzeniami ostrości i ubytkami w polu widzenia oraz nadwrażliwością na światło. W diagnostyce rozsianej kandydozy najważniejszą rolę odgrywają badania obrazowe jamy brzusznej, rzadziej klatki piersiowej (USG, TK, MRI). Potwierdzeniem rozpoznania jest wykazanie obecności grzybów w badaniu histopatologicznym materiału uzyskanego drogą biopsji otwartej wątroby. Pobranie materiału diagnostycznego musi jednak nastąpić nie później niż dwa tygodnie od rozsiewu, gdyż w okresie późniejszym biopsja nie jest diagnostyczna [111;115;126;176;217].

W przebiegu zakażeń grzybiczych może także dojść do zajęcia innych narządów, takich jak skóra, tkanka podskórna, czy tarczyca. Diagnostyka ognisk zakażenia każdorazowo powinna uwzględniać pobranie materiału do oceny mikrobiologicznej i histopatologicznej pod kontrolą badań obrazowych.

1.7. Diagnostyka inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Diagnostyka zakażeń grzybiczych u chorych z deficytami immunologicznymi jest trudna i często nie udaje się ustalić etiologii zakażenia. Niestety często rozpoznanie IZG stawiane jest w bardzo zaawansowanym stadium, niejednokrotnie na podstawie badania autopsyjnego [126]. Stale prowadzone są prace nad udoskonaleniem metod diagnostyki IZG w celu uzyskania szybkiej i pewnej odpowiedzi na pytanie, czy mamy do czynienia z zakażeniem grzybiczym i jaka jest jego etiologia.

Badania służące udokumentowaniu zakażenia grzybiczego można podzielić na dwie grupy: badania mikologiczne i ocena histopatologiczna oraz metody niehodowlane:

1. badania mikologiczne płynów ustrojowych lub materiału pobranego drogą biopsji oraz ocenę histopatologiczną tkanek
2. metody niehodowlane (*non cultures*), do których zalicza się badania serologiczne oraz wykrywanie DNA grzyba metodą PCR (*Polymerase Chain Reaction*); do grupy tej zalicza się także badania obrazowe

1.7.1. Badania mikologiczne i ocena histopatologiczna

Pierwszym krokiem diagnostycznym jest ocena mikroskopowa preparatu bezpośredniego. Materiał diagnostyczny może stanowić: wymaz z nosogardła, płwocina, materiał z BAL (*bronchoalveolar lavage*, płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe), materiał pozyskany drogą biopsji z zatok, oskrzeli, płuc, wątroby, śledziony, skóry, tarczycy, tkanki mózgowej i innych podejrzewanych o zakażenie narządów. Następnie uzyskany materiał tkankowy jest poddawany hodowli w celu izolacji i identyfikacji patogenu oraz w wybranych przypadkach określenia lekowrażliwości grzyba. Identyfikacja gatunku możliwa poprzez hodowlę grzyba ma istotne znaczenie w wyborze skutecznej terapii. Przykładowo większość gatunków *Aspergillus* wykazuje wrażliwość na amfoterycynę B, natomiast *Aspergillus terreus* zazwyczaj jest na nią odporny [137]. Zamrożenie próbek umożliwia wykorzystanie materiału diagnostycznego do wykonania badań molekularnych przy pomocy metody PCR [109;232].

Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń grzybiczych u pacjentów z zaburzeniami odporności jest obarczona szeregiem ograniczeń. Przede wszystkim problem stanowi uzyskanie wiarygodnego materiału do badań. Poza płynami ustrojowymi fizjologicznie jałowymi takimi jak krew, mocz, czy płyn mózgowo-rdzeniowy – materiał diagnostyczny mogą stanowić fragmenty tkanek uzyskane drogą biopsji aspiracyjnej lub otwartej, bronchoskopii, czy płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Do badań mikologicznych można także wykorzystywać wymazy z ran, materiał pobierany śródoperacyjnie, kał, masy martwicze, a także usunięte cewniki. Wobec coraz doskonalszego sprzętu pozwalającego na pobieranie tkanek oraz większego doświadczenia lekarzy przeprowadzających zabiegi – obecnie częściej podejmowane są decyzje o przeprowadzeniu tych procedur, także u dzieci.

Ocena histopatologiczna pobranego materiału tkankowego polega na poszukiwaniu strzępków grzybni. W preparacie histopatologicznym można wykazać strzępki grzyba w zakażonej tkance i na podstawie morfologii grzyba przeprowadzić identyfikację patogenu. Jak wcześniej wspomniano w odniesieniu do oceny mikroskopowej preparatu bezpośredniego, nie zawsze jednak możliwe jest precyzyjne rozróżnienie pomiędzy różnymi

grzybami pleśniowymi. W dobie narastającej częstości zakażeń grzybami pleśniowymi innymi niż *Aspergillus spp.* (np. *Fusarium spp.* czy *Scedosporium spp.*) jedynie hodowla pozwala na identyfikację patogenu, co ma istotne implikacje terapeutyczne.

Należy także pamiętać, że typowy sposób potwierdzenia zakażenia przez uzyskanie wzrostu patogenu w posiewach może być zawodny w przypadku uprzednio stosowanej profilaktyki przeciwgrzybiczej, czy terapii empirycznej. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę fakt, że nawet wykazanie obecności *Aspergillus spp.* w wymazie z nosogardła nie musi dowodzić istniejącego zakażenia, a może świadczyć jedynie o kolonizacji. Decyzja o wdrożeniu lub zaniechaniu leczenia przeciwgrzybiczego opierać się musi w takich sytuacjach na całościowej ocenie pacjenta z uwzględnieniem czynników ryzyka IZG, stanu klinicznego i objawów klinicznych, a także całokształtu badań laboratoryjnych i obrazowych [115].

Przy wyborze optymalnego sposobu postępowania diagnostycznego należy także każdorazowo oszacować korzyści mogące wynikać z procedury inwazyjnego pobrania materiału do badania oraz ryzyko, które ta procedura niesie. Odstąpienie od inwazyjnych metod pobierania materiału do badań często uniemożliwia ostateczne rozpoznanie i wdrożenie celowanego leczenia.

Przedstawione powyżej ograniczenia związane z udokumentowaniem zakażenia poprzez hodowlę czy ocenę histopatologiczną zakażonej tkanki sprawiły, iż stale trwają badania nad wprowadzeniem coraz doskonalszych metod tzw. niehodowlanych (*non cultures*).

1.7.2. Metody niehodowlane

Metody niehodowlane opierają się na wykrywaniu antygenów lub metabolitów grzyba lub na wykazaniu odpowiedzi serologicznej na istniejące zakażenie. Aktualnie badacze koncentrują się na metodach wykrywających przede wszystkim zakażenie grzybami rodzaju *Aspergillus* i *Candida*.

Najbardziej powszechnie wykorzystywane jest oznaczenie antygeny galaktomanna nowego w surowicy krwi (rzadziej w płuczynach z BAL, czy płynie mózgowo-rdzeniowym). Galaktomannan (GM) jest polisacharydowym składnikiem budowy ściany grzybów z rodzaju *Aspergillus*, który wykazać można u pacjentów z aspergillozą [102;196;226]. Jego obecność wykazano u *Aspergillus fumigatus*, a także u innych gatunków takich jak: *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. nidulans* czy *A. oryzae*. Test ten nie jest zatem użyteczny w wykrywaniu zakażeń o etiologii innej niż *Aspergillus* np. *Fusarium spp.* czy *Zygomycetes*. Oznaczenia powinny być wykonywane seryjnie, przynajmniej 2 razy w tygodniu z uwagi na przemijający charakter antygenemii. Aktualnie za dodatni uznawany jest wynik indeksu powyżej 0,5 (zmiana wartości *cut-off* przez producenta) [196]. Uzyskanie dodatniego wyniku co najmniej w dwóch kolejnych oznaczeniach przemawia za rozpoznaniem aspergilozy.

Za wielką zaletę testu część autorów uznaje fakt, że dodatni wynik oznaczenia GM wyprzedza średnio o 8 dni pojawienie się typowych dla aspergilozy zmian w badaniu TK wysokiej rozdzielczości. Dodatkowo, poziom antygenemii GM wykazuje dobrą korelację z całkowitą masą grzyba, w związku z czym może służyć do monitorowania efektów stosowanej terapii przeciwgrzybiczej [210].

W interpretacji wyników badania galaktomannanu należy wziąć pod uwagę możliwość uzyskania wyników zarówno fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych. Wyniki fałszywie dodatnie mogą być obserwowane u chorych otrzymujących piperacylinę z tazobactamem, czy amoksycylinę z kwasem klawulanowym. U małych dzieci przyczyną wyników fałszywie dodatnich może być także obecność w jelicie bakterii *Bifidobacterium bifidum*. Dodatkowo niektóre produkty zbożowe i mleczne zawierają galaktomannan, który przy uszkodzeniu błony śluzowej przewodu pokarmowego wskutek chemio- lub radioterapii może przenikać przez barierę jelitową powodując fałszywie dodatnie wyniki. Z drugiej strony uzyskiwane wyniki fałszywie ujemne mogą wynikać z wcześniejszego stosowania profilaktyki przeciwrzybiczej lub leczenia empirycznego [133]. W metaanalizie obejmującej 27 badań, Pfeiffer i wsp. wykazali czułość i swoistość tej metody odpowiednio na poziomie 71% i 89% [166]. Test Platelia Aspergillus Bio-Rad służący do wykrywania antygeny galaktomannanowego został wprowadzony do powszechnego użytku w 1995 roku przez Stynen i wsp. i został zaakceptowany przez FDA (*US Food and Drug Administration*) jako uzupełnienie diagnostyki inwazyjnej aspergilozy [166;208]. Maertens i wsp. podkreślają znaczenie seryjnych oznaczeń galaktomannanu w połączeniu z tomografią komputerową klatki piersiowej w diagnostyce inwazyjnej aspergilozy płuc [133]. Wyniki badań Herbrecht i wsp. przeprowadzone na dużej grupie pacjentów wykazały jednak niską czułość tego testu wynoszącą 65%, 16% i 26% odpowiednio w udokumentowanej, prawdopodobnej i możliwej aspergiliozie [83;207]. Podobnie w badaniu Pinel i wsp., które przeprowadzono na 807 pacjentach z potwierdzoną i prawdopodobną aspergiliozą leczonych na oddziałach hematologicznych i intensywnej terapii, uzyskano niską czułość testu wynoszącą 50% [168]. Podejmuje się także badania mające na celu ocenę przydatności oznaczenia GM w płucach oskrzelo-wo-pęcherzykowych [50].

Kolejnym testem użytecznym w diagnostyce zakażeń grzybiczych jest oznaczenie 1,3 β -D-glukanu (BG) w surowicy krwi. Podobnie jak w przypadku testu wykrywającego galaktomannan oznaczenia należy wykonywać seryjnie, przynajmniej raz w tygodniu. Zgodnie z kryteriami EORTC już pojedynczy dodatni wynik BG stanowi kryterium rozpoznania prawdopodobnego zakażenia grzybiczego [220;226].

Istnieją także metody immunodiagnostyki zakażeń *Candida spp.* przy pomocy wykrywania, a następnie monitorowania antygeny mannanowego. Antygen mannanowy jest immunogennym antygenem polisacharydowym indukującym swoistą odpowiedź humoralną. Wykorzystanie testu Platelia Candida ELISA Ab/Ac/Ak test Bio Rad pozwala na wcześniejsze niż przy pomocy posiewów rozpoznanie zakażenia, gdyż test ten łączy wykrywanie antygeny (mannanu) i przeciwciał anty-mannanowych [161]. Z uwagi jednak na przemijający charakter antygenemii oraz niskie stężenia krążącego antygeny, jak dotychczas testy te nie uzyskały rekomendacji EORTC w rozpoznawaniu kandydozy.

Wykrywanie materiału genetycznego grzyba metodą PCR stanowi obiecującą perspektywę diagnostyczną. Do oznaczeń można wykorzystać każdy rodzaj materiału diagnostycznego. Ograniczeniem tej metody jest brak szerokiego dostępu do tego rodzaju badań, które są wykonywane tylko w placówkach wysokospecjalistycznych, brak standaryzowanych zestawów do potwierdzania niektórych zakażeń oraz stosunkowo wysoki koszt badania [104]. Metody wykrywania materiału genetycznego grzybów obarczone są także ryzykiem uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich. Trwają prace nad zminimalizowaniem problemu kontaminacji próbek oraz nad wiarygodną walidacją metody. Opracowany "*real panfungal PCR test*" pozwalający wykazać materiał genetyczny różnych patogenów grzybiczych jest obiecującą perspektywą diagnostyczną na przyszłość

[145;227]. Na podstawie obszernej metaanalizy dla testów PCR wykrywających *Aspergillus spp.* zaproponowano, by pojedyncze badanie ujemne upoważniało do wykluczenia aspergilozy, natomiast do potwierdzenia zakażenia konieczne były dwa oznaczenia dodatnie [145].

W ostatnim okresie pojawiły się także doniesienia dotyczące możliwości diagnostyki zakażeń grzybiczych przy pomocy testu ELISPOT opartego na wykrywaniu swoistych dla kropidlaka: interferonu – TH 1 oraz limfocytów T produkujących IL-10 [170].

1.7.3. *Badania obrazowe*

Badania obrazowe zajmują istotne miejsce w diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Wobec stale niedoskonałych metod wykrywania zakażeń o tej etiologii, są nieocenionym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym zastąpienie terapii empirycznej – wyprzedzającą (*pre-emptive*), co według niektórych autorów pozwoliłoby na ograniczenie odsetka pacjentów z gorączką neutropeniczną otrzymujących leczenie przeciwgrzybicze o połowę (z 60% do 30%). Umożliwiłoby to także ograniczenie toksyczności stosowanej terapii oraz redukcję kosztów leczenia [108;133].

Techniki obrazowe są wykorzystywane w wykrywaniu zmian grzybiczych w wielu narządach: w płucach, wątrobie, śledzionie, zatokach przynosowych i w ośrodkowym układzie nerwowym.

Tomografia komputerowa płuc

Obecnie wiadomo, że klasyczne zdjęcia rentgenowskie (RTG) nie mają zastosowania we wczesnej diagnostyce zakażeń grzybiczych. Odczyn zapalny u pacjentów leczonych z powodu schorzeń onkohematologicznych jest znikomy, w związku z czym uwidocznienie zmian w klasycznym badaniu RTG jest często niemożliwe. W wielu badaniach wykazano, że w momencie pojawienia się typowych zmian w tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (TK-WR) – obraz płuc na klasycznym zdjęciu rentgenowskim był prawidłowy (29% prawidłowych wyników zdjęć rentgenowskich) [80;85].

Tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości jest uznawana za podstawową metodę obrazowania w rozpoznawaniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych i znalazła miejsce w wytycznych diagnostyki IZG zarówno u dorosłych, jak i u dzieci [71;157]. Dzięki TK-WR wykrywane są zmiany grzybicze we wczesnej fazie ich rozwoju, badanie to umożliwia także ocenę liczby i rozległości zmian w płucach, dokładnie lokalizując ich położenie, a także opisując ich charakter. Opisano szereg typowych dla inwazyjnej aspergilozy zmian w badaniu TK-WR. Objaw *halo* jest traktowany jako najbardziej typowa, wczesna manifestacja zakażenia; jest to obwódka wokół zmiany guzkowej zlokalizowanej z reguły obwodowo w obrębie płuc, często podopłucnowo. Obwódka ta spowodowana jest występowaniem obrzęku lub zmian krwotocznych w obrębie tkanki płucnej wywołanych rozprzestrzenianiem się strzępek kropidlaka. Objaw ten udaje się uwiocznic jedynie wówczas, gdy badanie TK-WR zostanie wykonane we wczesnej fazie zakażenia tzn. w ciągu pierwszego tygodnia gorączki neutropenicznej, której przyczyną jest infekcja grzybicza [73;120]. Niekiedy pojawiają się także trójkątne zmiany skierowane wierzchołkiem w kierunku wnęk. Ewolucja w obrębie zmiany grzybiczej polega na pojawieniu się układającego się obwodowo powietrznego rąbka (objaw po-

wietrznego rąbka w kształcie półksiężyca; *air crescent sign*); objaw ten widoczny jest typowo w trzecim tygodniu trwania zakażenia, jednak u dzieci pojawia się rzadko (1,6% pacjentów pediatrycznych) [28]. Kolejnym etapem infekcji jest wytworzenie jamy, czasami z obecnością grzybniaka wewnątrz zmiany (*aspergiloma*). Ostatecznym efektem leczenia zakażenia przy pozytywnym efekcie terapeutycznym, jest wytworzenie zmian włóknistych.

Zdefiniowano standardowe określenia dotyczące obrazowania płuc w badaniu TK [31]:

- Guzek (*nodule*) określany jest jako owalne zacienienie w obrębie tkanki miękkiej, które całkowicie przysłania tło jakie stanowi struktura naczyniowo-oskrzelikowa tkanki płucnej. Guzki mogą mieć postać dużych guzków (*macronodule*), o średnicy >1 cm i małych guzków (*micronodule*) o średnicy <1 cm
- Objaw matowego szkła (*ground-glass opacity*) definiuje się jako matowe wzmocnienie gęstości radiologicznej tkanki płucnej z pogranicza powietrza i płynu z zachowaną widocznością tła jakie stanowi struktura naczyniowo-oskrzelikowa płuca
- Objaw *halo* (*halo sign*) definiuje się jako makroguzek otoczony przez obwódkę z objawem matowego szkła
- Objaw "półksiężyca powietrznego" (*air crescent sign*) jest definiowany jako półksiężycowata kieszonka powietrzna zajmująca przestrzeń pomiędzy częścią płuca przylegającą do ogniska martwicy i brzegiem zdrowej tkanki płucnej
- Ogniska konsolidacji (*consolidation*) definiuje się jako odbiegające od normy kontrastowanie brzeżnych przestrzeni powietrznych tak, że znajdująca się w tle struktura naczyniowo-oskrzelikowa tkanki płucnej jest całkowicie zacieniona. Ognisku konsolidacji towarzyszy niekiedy bronchogram powietrzny

Badanie TK-WR jest badaniem pomocnym także w ocenie ewolucji zmian grzybiczych i odpowiedzi na stosowane leczenie przeciwgrzybicze. W związku z dobrze poznanym zjawiskiem progresji zmian radiologicznych stwierdzanym w badaniu TK (zwiększenie objętości zmian patologicznych) nieświadczącym jednak zazwyczaj o nieskuteczności prowadzonego leczenia przeciwgrzybiczego należy wstrzymać się z modyfikacją terapii, jeśli stan kliniczny pacjenta jest stabilny [31;115;190].

Przezskłatkowe ultrasonograficzne badanie płuc

Przezskłatkowe ultrasonograficzne badanie płuc (PUBP) to ultrasonograficzna ocena płuc, opłucnej ściennej, opłucnej płucnej i przestrzeni pomiędzy tymi błonami. Jest częścią ultrasonograficznego badania klatki piersiowej, w którym oceniane są także struktury powierzchniowe ograniczające jamę klatki piersiowej, przepona, śródpiersie i serce. PUBP znajduje zastosowanie między innymi w diagnostyce płynu w opłucnej, obrzęku płuc, odmy opłucnowej, a także coraz częściej w przypadku podejrzenia zatorowości płucnej. Istnieją nieliczne doniesienia dotyczące oceny narządów klatki piersiowej u dzieci [179].

Wydaje się, że należy szerzej niż dotychczas wykorzystać PUBP u dzieci leczonych z powodu schorzeń onkohematologicznych, a także innych dzieci z grup ryzyka rozwoju IZG [113]. Argumentami przemawiającymi za stosowaniem ultrasonograficznej oceny płuc są: brak udokumentowanych do chwili obecnej działań niepożądanych metody,

duża dostępność badania, możliwość wykonania badania w dowolnym czasie, a co szczególnie istotne, przy łóżku chorego dziecka. Niezwykle cenna jest także możliwość wielokrotnego powtarzania badania w celu oceny ewolucji zmian i efektywności leczenia przeciwgrzybiczego. Nie bez znaczenia jest też aspekt ekonomiczny zastąpienia oceny za pomocą tomografii komputerowej – badaniem ultrasonograficznym, z uwzględnieniem kosztów badania, transportu chorego i kosztów znieczulenia ogólnego koniecznych w przypadku tomografii komputerowej.

Tomografia komputerowa zatok przynosowych

Wskazaniem do wykonania badania TK zatok przynosowych jest pojawienie się początkowo niebolesnych owrzodzeń pokrytych strupami na przegrodzie nosa, małżowinach nosowych lub bocznych ścianach nosa z towarzyszącym rumieniem i obrzękiem twarzy oraz objawami ucisku na oczodół (wytrzeszcz, ograniczenie ruchomości gałek ocznych, zaburzenia widzenia). W tomografii komputerowej na wczesną postać inwazyjnej grzybicy zatok wskazuje znaczne pogrubienie (>8 mm) tkanek miękkich w obrębie jam nosa i zatok, zwłaszcza jednostronne. Cechy późnej fazy zakażenia to erozja kostna i naciekanie okolicznych tkanek. U pacjentów z podejrzeniem zajęcia wnętrza czaszki konieczne jest wykonanie badania rezonansu magnetycznego (MRI) [28;99].

Badania obrazowe ośrodkowego układu nerwowego

W przypadku podejrzenia zajęcia ośrodkowego układu nerwowego niezbędne jest wykonanie tomografii komputerowej mózgowia lub MRI. Zmiany w obrębie mózgowia w zależności od etiologii zakażenia mogą ujawniać się pod postacią zmian obrzękowych, ognisk krwotocznych, zawałów, tętniaków, litych zmiany naciekowych lub ropni grzybiczych. W przypadku mukormykozy ośrodkowego układu nerwowego – charakterystycznymi zmianami mogącymi sugerować infekcję o tej etiologii są zmiany o charakterze angioinwazyjnym. W zakażeniach *Candida spp.* obecne mogą być zmiany zapalne w obrębie opon mózgowo-rdzeniowych oraz mikroropnie [96;144].

Badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej

Pierwsze doniesienia o możliwości wykorzystania ultrasonografii (USG) do diagnostyki zmian grzybiczych w narządach mięsistych jamy brzusznej pochodzą z wczesnych lat 80-tych XX wieku i dotyczyły zmian stwierdzanych w układzie moczowym. Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie diagnostyki ultrasonograficznej sprawił, że obecnie możliwe jest zobrazowanie zmian w obrębie narządów mięsistych i wysunięcie sugestii zakażenia grzybiczego. Określono ultrasonograficzne wzorce zmian grzybiczych w narządach mięsistych jamy brzusznej, wywołanych głównie przez drożdżaki i kropidlaka [26].

Ocena ultrasonograficzna narządów jamy brzusznej dotyczy przede wszystkim obrazowania wątroby i śledziony w poszukiwaniu zmian typowych dla przewlekłej rozsianej kandydozy (*chronic disseminated candidiasis*) (rozsiane drobne nacieki o charakterze mikroropni i/lub ogniska większych rozmiarów o wyglądzie tarczy strzelniczej („koło w kole”) lub „bawolego oka”). Badanie ultrasonograficzne służy także do wykrywania zmian w nerkach pod postacią ropni grzybiczych czy hiperechogennych zmian na granicy zatoki i rdzenia nerki [126;176].

1.8. Kryteria rozpoznania inwazyjnego zakażenia grzybiczego

W związku z dużymi trudnościami w diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych, w 2008 roku grupa badawcza EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungi Infection Cooperative Group and National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group) zrewidowała własne kryteria z 2002 roku i dokonała podziału rozpoznanych inwazyjnych zakażeń grzybiczych na trzy grupy prawdopodobieństwa zakażeń: pewne (udokumentowane) – *proven*, prawdopodobne – *probable* i możliwe – *possible* [8;51].

Klasyfikację oparto na 3 grupach czynników:

- zależnych od gospodarza
- kryteriach klinicznych
- kryteriach mikrobiologicznych

Kryteria zależne od gospodarza

Kryteria zależne od gospodarza to przede wszystkim neutropenia w wywiadzie ($<0,5$ G/l; >10 dni) czasowo związana z początkiem zakażenia grzybiczego, allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych w wywiadzie, przedłużona terapia kortykosteroidami (poza pacjentami z alergiczną aspergilozą oskrzelowo-płucną) z minimalną średnią dawką $0,3$ mg/kg masy ciała/dobę w przeliczeniu na prednizon przez co najmniej 3 tygodnie, terapia innymi określonymi lekami immunosupresyjnymi takimi jak cyklosporyna A, blokery TNF- α , specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi (alemtuzumab) lub analogami nukleozydu przez ostatnie 90 dni, niedobory odporności takie jak przewlekła choroba ziarniniakowa oraz ciężki złożony niedobór odporności.

Kryteria kliniczne

Kryteria kliniczne (z 2002 roku) obejmują objawy typowe dla poszczególnych narządów: dolne drogi oddechowe (kryteria większe: w obrazie TK-WR: *halo sign*, *air crescent sign*, jama; kryteria mniejsze: kaszel, krwiotłucie, ból w klatce piersiowej, duszność, tarcie opłucnej, płyn w jamie opłucnej, zmiany w badaniach obrazowych niewymienione wcześniej), zatoki oboczne nosa (kryteria większe: w badaniach obrazowych – erozja ścian zatok, zajęcie sąsiadujących struktur, destrukcja kości podstawy czaszki; kryteria mniejsze: wydzielina z nosa, owrzodzenia, krwawienia z nosa, obrzęk oczodołu, martwica lub perforacja podniebienia twardego), ośrodkowy układ nerwowy (kryteria większe: w badaniach obrazowych objawy zajęcia OUN, takie jak zmiany ogniskowe, obrzęk i inne; kryteria mniejsze: objawy ogniskowe, drgawki, zaburzenia zachowania, podrażnienie opon, zmiany biochemiczne i komórkowe w płynie mózgowo-rdzeniowym), uogólniona infekcja grzybicza (zmiany skórne, zmiany na dnie oka w przebiegu zakażenia grzybiczego), przewlekła rozsiana kandydoza (charakterystyczny obraz „bawolego oka” w wątrobie i/lub śledzionie w TK, MRI lub USG; wzrost fosfatazy alkalicznej) [8].

Kryteria mikrobiologiczne

Za kryteria mikrobiologiczne przyjęto (konsensus z 2002 roku): pozytywne wyniki hodowli w kierunku grzybów pleśniowych lub *Cryptococcus neoformans* lub grzybów

występujących endemicznie z płwociny lub BAL; hodowli lub badań bezpośrednich w kierunku grzybów pleśniowych z popłuczyn zatok; badań bezpośrednich w kierunku grzybów pleśniowych lub *Cryptococcus neoformans* z płwociny lub BAL; antygen *Aspergillus* (galaktomannan) dodatni w BAL, płynie mózgowo-rdzeniowym lub we krwi ≥ 2 razy; antygen *Cryptococcus* dodatni we krwi; dodatni wynik badania bezpośredniego w kierunku grzybów w fizjologicznie jałowych płynach ustrojowych; antygen *Histoplasma* we krwi, moczu lub płynie mózgowo-rdzeniowym; dwa dodatnie posiewy moczu w kierunku *Candida spp.* (przy braku cewnika moczowego); dodatni posiew krwi w kierunku *Candida spp.*

Użyteczność kryteriów EORTC z 2002 roku weryfikował Subira analizując 22 chorych, u których autopsyjnie rozpoznano inwazyjną aspergilozę płuc (IAP) [209]. Jedynie u dwóch pacjentów potwierdzono zakażenie przyżyciowo (grzybica udokumentowana), u 6 rozpoznano grzybicę prawdopodobną, a u 13 – możliwą. Aż u 64% pacjentów z potwierdzoną badaniem autopsyjnym grzybicą, nie udało się postawić rozpoznania przyżyciowo przy pomocy kryteriów EORTC. Na potrzebę weryfikacji kryteriów EORTC wskazał także Hachem, który na podstawie retrospektywnej analizy grupy 47 chorych z aspergilozą udokumentowaną na podstawie badania sekcyjnego wykazał, że jedynie 47% chorych spełniało przyżyciowo kryteria pewnej lub prawdopodobnej grzybicy [77].

Badania te wskazują na niedoskonałość stosowanych dotychczas metod diagnostycznych w IZG. Prowadzone są badania nad wykorzystaniem w diagnostyce zakażeń grzybiczych swoistych dla *Aspergillus* IFN- γ TH1 oraz limfocytów T produkujących IL-10 w diagnostyce zakażeń o tej etiologii [170].

1.9. Leczenie przeciwgrzybicze

W leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych dokonał się w ostatnich latach duży postęp związany z wprowadzeniem na rynek wielu nowych, skuteczniejszych leków przeciwgrzybiczych [6;44;86;123;164;222]. Dodatkowo, pogłębienie wiedzy dotyczącej czynników ryzyka rozwoju IZG oraz udoskonalenie metod zarówno inwazyjnej, jak i nieinwazyjnej diagnostyki spowodowało, że leczenie tych zakażeń jest coraz bardziej skuteczne. Niestety, nadal bardzo często lekarz prowadzący dziecko leczone z powodu choroby nowotworowej jest zmuszony do podjęcia decyzji o włączeniu leczenia empirycznego. Opisane powyżej trudności diagnostyczne sprawiają, że nawet 60% pacjentów z gorączką neutropeniczną oporną na stosowane antybiotyki otrzymuje ten rodzaj terapii [115].

Strategie terapeutyczne w inwazyjnych zakażeniach grzybiczych obejmują:

- profilaktykę
- leczenie empiryczne
- leczenie wyprzedzające (*pre-emptive*)
- terapię celowaną

Poszczególne rodzaje terapii opierają się na analizie objawów klinicznych, wyników badań radiologicznych i mikologicznych. Rekomendacje dotyczące pacjentów dorosłych leczonych z powodu ostrych białaczek i poddawanych transplantacjom komórek krwiotwórczych znalazły się w wytycznych ECIL (European Conference on Infections in Leukemia) z 2005 roku, następnie zweryfikowanych w roku 2007. Grupa ECIL to wspólne przedsięwzięcie czterech towarzystw naukowych zajmujących się problematyką

zakażeń u pacjentów w immunosupresji: EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation), EORTC (Infectious Diseases Group of the European Organisation for Research and Treatment), ELN (Supportive Care group of the European LeukaemiaNet) i ICHS (International Immunocompromised Host Society). W roku 2011 ta sama grupa badawcza opracowała wytyczne dla dzieci z zakażeniami grzybiczymi [206;220].

1.9.1. Leki przeciwgrzybicze

W terapii inwazyjnych zakażeń grzybiczych stosowane są następujące grupy leków: polieny, echinokandyny, azole oraz inhibitory syntezy kwasów nukleinowych [115;123;135;223].

Polieny

Amfoterycyna B była pierwszym lekiem przeciwgrzybiczym o szerokim spektrum stosowanym w leczeniu zakażeń grzybiczych. Mechanizm działania leku polega na uszkodzeniu błony komórkowej grzyba, co prowadzi do zaburzeń przepuszczalności błony i śmierci komórki. Spektrum działania amfoterycyny B obejmuje drożdżaki, w tym *Cryptococcus spp.*, grzyby pleśniowe, w tym *Aspergillus spp.* (poza *Aspergillus terreus*, który wykazuje oporność na amfoterycynę), *Mucor spp.* i *Fusarium spp.* Podaż konwencjonalnej postaci leku (dezoksycholan amfoterycyny), pomimo dużej skuteczności, obarczona była dużą liczbą działań niepożądanych, między innymi nefrotoksycznością oraz głębokimi zaburzeniami elektrolitowymi, w tym hipokaliemią wymagającą dożylną podaży potasu. W związku z dużą toksycznością – postać konwencjonalna nie jest obecnie rekomendowana. Obecnie stosowane postacie leku mają porównywalną skuteczność przy zdecydowanie ograniczonej toksyczności. Na rynku obecne są: postać liposomalna (Ambisome®) oraz kompleks lipidowy (Abelcet®). W przypadku stosowania Abelcetu® uwzględnić należy podaż premedykacji przed wlewem leku w celu zapobiegania objawom niepożądanym podczas infuzji (gorączka, dreszcze). Liposomalna postać amfoterycyny ma najwyższy stopień rekomendacji u dzieci zarówno w terapii empirycznej, jak i wyprzedzającej [37;114;147].

Echinokandyny

Echinokandyny są stosunkowo nową grupą leków przeciwgrzybiczych, których mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy 1,3β-D-glukanu, który jest ważnym składnikiem ściany komórkowej wielu grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych. Do grupy tej należą kaspofungina, mikafungina i anidulafungina. Leki z tej grupy wykazują silne działanie grzybobójcze w stosunku do grzybów z rodzaju *Candida*, nie obejmują swoim spektrum grzybów *Mucor spp.*, czy *Fusarium spp.* W publikacji Herbrechta z 2010 roku udokumentowano także skuteczność kaspofunginy w terapii pierwszej linii udokumentowanej aspergilozy u pacjentów poddawanych transplantacji komórek krwiotwórczych [84]. Dużą zaletą echinokandyn jest bardzo wysoki profil bezpieczeństwa, działania niepożądane występują rzadko [37;44;84;100;164;230].

Azole

Leki azolowe pierwszej generacji (ketokonazol, flukonazol) mają działanie grzybostatyczne i obejmują swoim spektrum jedynie drożdżaki. Leki nowej generacji, triazole (itakonazol, worykonazol, pozakonazol, rawukonazol), wykazują aktywność zarówno w stosunku do grzybów drożdżopodobnych, jak i grzybów pleśniowych. Leki z tej grupy często wchodzi w interakcje z innymi lekami, także immunosupresyjnymi, co zawsze należy uwzględnić w planowaniu terapii przeciwgrzybiczej. Worykonazol, najczęściej stosowany spośród leków trzeciej generacji ma najwyższą rekomendację w leczeniu aspergilozy, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci. Lek ten bardzo dobrze penetruje do ośrodkowego układu nerwowego. Dużą zaletą worykonazolu jest także jego dostępność zarówno w postaci dożylniej, jak i doustnej, co umożliwia prowadzenie terapii sekwencyjnej. Niezwykle istotne jest także, że pozakonazol, jeden z nowszych leków tej grupy, jest aktywny także w stosunku do grzybów *Mucor spp.* i *Fusarium spp.*, które wykazują oporność na większość leków przeciwgrzybiczych. Pozakonazol natomiast jest w chwili obecnej zarejestrowany jedynie w postaci doustnej, co niekiedy utrudnia jego podaż u chorych z zaawansowanym uszkodzeniem błony śluzowej przewodu pokarmowego. Postać dożylna pozakonazolu jest aktualnie w fazie badań klinicznych. Należy podkreślić, że lek ten nie jest zarejestrowany u dzieci [37;103;117;143].

Inhibitory syntezy kwasów nukleinowych

Do grupy inhibitorów syntezy kwasów nukleinowych należy flucytozyna, która jest obecnie stosowana bardzo rzadko.

1.9.2. Leczenie skojarzone

Leczenie skojarzone nie jest obecnie rekomendowane jako terapia pierwszej linii, jednakże coraz więcej badań wskazuje na zasadność takiego sposobu postępowania. Argumenty za szerszym stosowaniem tego typu terapii to możliwość redukcji dawki leków stosowanych w monoterapii i ograniczenie indukcji lekooporności przy równoczesowym poszerzeniu spektrum, co ma szczególne znaczenie w przypadku braku identyfikacji patogenu. Argumenty przeciwko terapii skojarzonej to: wysokie koszty, dodatkowe ryzyko interakcji pomiędzy lekami oraz możliwość nasilenia toksyczności [207]. W badaniu Aliff i wsp. pozytywnie oceniono skuteczność terapii skojarzonej kaspofunginą i liposomalną amfoterycyną B w przypadku odpornej na monoterapię aspergilozy płucnej [5]. Inne połączenia leków (mikafungina lub kaspofungina z innymi lekami) pozytywnie ocenili między innymi Maertens, Denning i Marr [54;131;140].

1.9.3. Strategie leczenia przeciwgrzybiczego

Profilaktyka przeciwgrzybicza

Profilaktyka może być stosowana jako pierwotna lub wtórna. Profilaktyka pierwotna w założeniu ma nie dopuścić do zakażenia grzybiczego u chorego z grupy ryzyka [136].

Ten sposób postępowania stale budzi wiele wątpliwości zarówno z uwagi na możliwość selekcjonowania szczepów opornych podczas długotrwałego stosowania leków przeciwgrzybiczych, jak i możliwość wystąpienia zakażeń przełamujących. Nie bez znaczenia jest też wysoki koszt leków wyższej generacji (np. pozakonazol, worykonazol), a także liczne interakcje lekowe obserwowane podczas stosowania leków z grupy azoli.

Profilaktyka wtórna stosowana jest u chorych, u których w wywiadzie stwierdzono przebyte inwazyjne zakażenie grzybicze, a którzy wymagają kontynuacji leczenia immunosupresyjnego, podaży kolejnych cykli chemioterapii, czy transplantacji komórek hematopoetycznych. Ten sposób postępowania jest powszechnie zaakceptowany i znalazł swoje miejsce między innymi w rekomendacjach ECIL [42].

Leczenie empiryczne

Terapia empiryczna polega na wdrożeniu leku przeciwgrzybiczego jako leczenia gorączki neutropenicznej trwającej ponad 3-5 dni lub dłużej, niereagującej na stosowanie antybiotykoterapii szerokospektralnej [88]. Duże trudności w udokumentowaniu zakażeń grzybiczych oraz wysoka śmiertelność w przypadku opóźnionego wdrożenia leczenia uzasadniają stosowanie terapii empirycznej. Fakt ten potwierdzają opracowania, w których wskazuje się na wysoki odsetek grzybic rozpoznawanych autopsyjnie [115;169].

Leczenie empiryczne wiąże się jednak z możliwością terapii nieuzasadnionych, niejednokrotnie naraża chorego na długotrwałą terapię, podwyższa koszty leczenia oraz zwiększa możliwość wystąpienia toksyczności związanej z leczeniem. Dodatkowo stwarza ryzyko selekcjonowania szczepów opornych.

Leczenie wyprzedzające

Terapia wyprzedzająca (*pre-emptive*) polega na wdrożeniu leków przeciwgrzybiczych na podstawie wyników badań dodatkowych takich jak: TK, obecności antygenów grzybiczych w surowicy krwi takich jak galaktomannan, czy 1,3 β -D–glukan lub pozytywnym badaniu PCR. W badaniach dotyczących pacjentów dorosłych dowiedziono, że ten rodzaj terapii pozwala znacząco ograniczyć odsetek chorych otrzymujących leczenie przeciwgrzybicze w stosunku do otrzymujących leczenie empiryczne. Niestety brak jest podobnych badań w populacji dziecięcej [70;133].

Terapia celowana

Leczenie celowane to terapia stosowana w potwierdzonym zakażeniu grzybiczym. Z uwagi na duże trudności w udokumentowaniu zakażenia, ten rodzaj terapii stosowany jest stosunkowo rzadko.

1.9.4. Leczenie wspomagające

Planowanie terapii wspomagającej uwzględnia przede wszystkim fakt, że neutropenia jest podstawowym czynnikiem ryzyka rozwoju inwazyjnych zakażeń grzybiczych.

Czynniki wzrostu granulocytów

Duże nadzieje wiązano z wprowadzeniem granulocytarnych czynników wzrostu (G-CSF) do terapii wspomagającej inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Jednakże w obszernej meta-analizie Gurion i wsp. z 2012 roku nie wykazano korzystnego wpływu stosowania G-CSF u pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną na ostateczne wyniki leczenia [76].

Transfuzje koncentratów granulocytów

Obiecującą opcją terapeutyczną, która wymaga jednak szerszych badań jest procedura transfuzji granulocytów (GTX) od dawców stymulowanych G-CSF.

Pierwsze doniesienia na temat zastosowania transfuzji granulocytów w leczeniu wspomagającym infekcji u chorych w neutropenii pojawiły się już w 1934 roku, kiedy Strumia wstrzyknął domięśniowo rodzaj kremu leukocytnego. W latach 60. ubiegłego wieku Freireich i wsp. [63] wstrzykiwał granulocyty chorym z neutropenią i współistniejącą infekcją, uzyskując pozytywny efekt terapeutyczny [48;219]. Co ciekawe, materiał pozyskiwano od chorych z nieleczoną przewlekłą białaczką szpikową. W kolejnych latach metodę zarzucono, w związku z niedostateczną komórkowością preparatu pozyskiwanego od niestymulowanych dawców. Próby stymulacji przy pomocy deksametazonu okazały się mało skuteczne [48].

W chwili obecnej koncentrat granulocytarny pozyskiwany jest od zdrowych dawców, którzy poddawani są stymulacji G-CSF, w części ośrodków równoległe z podażą deksametazonu. G-CSF podaje się zazwyczaj w dawce 5 µg/kg masy ciała/dawkę przed kolejnymi separacjami, zazwyczaj przez 3-5 dni [56]. Podaż G-CSF związana jest z możliwością wystąpienia działań niepożądanych, między innymi objawów grypopodobnych: gorączki, dreszczy, bólów kostnych oraz bezsenności. Nie wykazano, jak dotychczas odległych skutków ubocznych stosowania G-CSF u zdrowych dawców, tym niemniej konieczne są obserwacje w dłuższym przedziale czasowym. Kolejnym problemem jest bezpieczeństwo przetoczeń u biorcy. Reakcje związane z transfuzją są zazwyczaj nieznaczne, rzadko pojawia się konieczność przerwania wlewu [48;172].

Kryteriami kwalifikującymi do zastosowania transfuzji są według większości autorów: głęboka neutropenia (zazwyczaj poniżej 0,5 G/l) u pacjenta z rozpoznaniem schorzenia onkohematologicznego, udokumentowana klinicznie i/lub mikrobiologicznie ciężka infekcja, brak odpowiedzi na stosowane leczenie przeciwbakteryjne i/lub przeciwgrzybicze, brak odpowiedzi na G-CSF. Dawca i biorca muszą być zgodni w zakresie ABO i czynnika Rh. Dawcami granulocytów mogą być zdrowi dorośli spokrewnieni lub spowinowaceni z biorcą, przyjaciele biorcy lub zdrowi ochotnicy [107;172]. Skuteczność transfuzji granulocytów zarówno w profilaktyce, jak i leczeniu wspomagającym ciężkich zakażeń u chorych w neutropenii jest szeroko dyskutowana. Niektórzy autorzy pozytywnie oceniają tę metodę zarówno jako leczenie wspomagające zakażeń, jak i postępowanie profilaktyczne. Większość autorów podkreśla, że do ostatecznej oceny metody konieczne jest przeprowadzenie randomizowanych badań na znaczącej liczbie chorych.

Usunięcie / wymiana wkłucia centralnego

W leczeniu wspomagającym należy pamiętać o konieczności usunięcia/wymiany wkłucia centralnego u pacjentów z kandydemią. Optymalny czas usunięcia wkłucia to okres do 48 godzin od potwierdzenia zakażenia. Należy jednak każdorazowo wziąć pod uwagę konieczność zabezpieczenia pewnego dostępu dożylnego u chorego z zagrażającą życiu infekcją [165].

1.10. Znaczenie procedur chirurgicznych u dzieci z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym

Wskazania do interwencji chirurgicznej w inwazyjnych zakażeniach grzybiczych nie są ostatecznie sprecyzowane, doniesienia dotyczące pacjentów pediatrycznych są nieliczne. Wątpliwości budzi zarówno miejsce chirurgii w zakażeniach zlokalizowanych w płucach, jak i w innych narządach. Postępowanie chirurgiczne ma niejednokrotnie na celu sprecyzowanie diagnozy i podejmowane jest w przypadku, gdy wyczerpano metody diagnostyki nieinwazyjnej. W niektórych przypadkach możliwe jest radykalne usunięcie zmienionej tkanki, a w wybranych – zmniejszenie masy grzyba pozwala na bardziej skuteczne leczenie zachowawcze. U pacjentów nieodpowiadających na terapię przeciwgrzybiczą oraz u dzieci z niedostateczną odpowiedzią na zastosowane leczenie, uzyskanie materiału diagnostycznego umożliwia weryfikację wstępnego rozpoznania i ewentualną modyfikację leczenia. U dzieci ze schorzeniami hematologicznymi, ograniczenie dla zastosowania procedury chirurgicznej stanowi niejednokrotnie ciężki stan ogólny, niski poziom płytek, głębokie zaburzenia w zakresie układu krzepnięcia oraz konieczność zastosowania znieczulenia ogólnego do zabiegu. Procedura BAL u małych dzieci jest często niemożliwa do przeprowadzenia ze względu na brak sprzętu o odpowiednich rozmiarach oraz brak doświadczonej kadry medycznej. Optymalny sposób postępowania w inwazyjnej aspergillozie płuc stale budzi kontrowersje zarówno w odniesieniu do rodzaju, jak i czasu zastosowania procedur chirurgicznych [4]. Podczas gdy resekcja zmiany w przypadku aspergiloma jest powszechnie zalecana, to wskazania do resekcji tkanki płucnej u pacjentów w immunosupresji budzą wątpliwości [28;220].

2. CELE

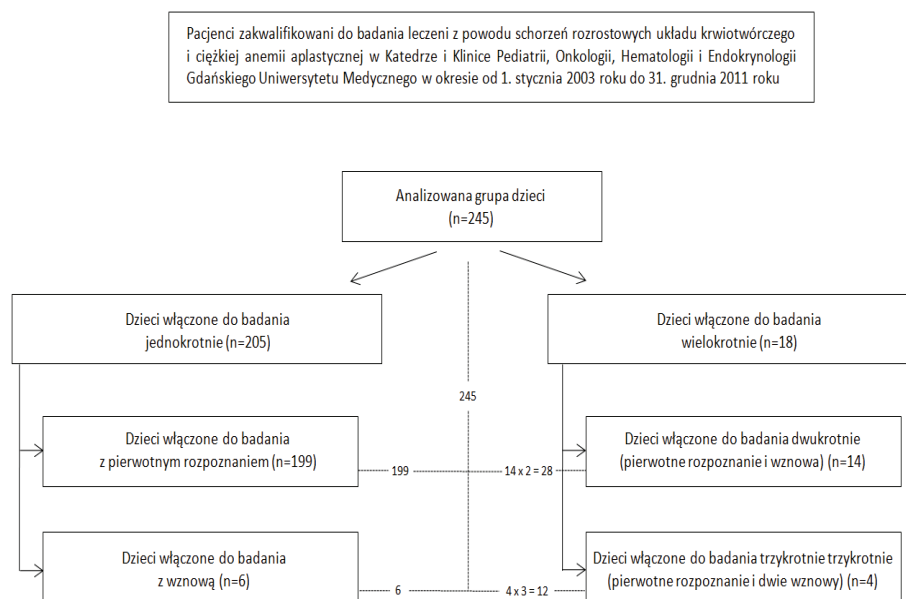
Podstawowym celem niniejszej rozprawy była optymalizacja wybranych procedur w zakresie wczesnej diagnostyki i leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej, a w konsekwencji poprawa wyników leczenia dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi.

Przedstawiony cel pracy realizowano poprzez:

1. Analizę częstości występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej z uwzględnieniem kryteriów rozpoznania i uzyskanych efektów terapeutycznych
2. Ocenę możliwości zastosowania przezklatkowego badania ultrasonograficznego płuc we wczesnej diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci oraz próbę walidacji metody
3. Ocenę wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych oraz poprawę wykrywalności hiperglikemii posterydowej w oparciu o opracowany program wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej
4. Próbę oceny przydatności transfuzji koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców jako metody leczenia wspomagającego inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci
5. Ocenę znaczenia procedur chirurgicznych w diagnostyce i leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci

3. MATERIAŁ I METODY

Materiał kliniczny w niniejszym opracowaniu stanowiła grupa 245 dzieci obojga płci leczonych w Katedrze i Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) (Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Anna Balcerska) w okresie od 1 stycznia 2003 roku do 31 grudnia 2011 roku z powodu schorzeń rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej (ryc. 1). Sto dziewięćdziesięcioro dziewięć dzieci zostało włączonych do badania jednokrotnie z pierwotnym rozpoznaniem choroby podstawowej. Osiemnaścioro dzieci zostało włączonych do analizy kilkakrotnie. Były to dzieci, które w okresie obserwacji były leczone zarówno z powodu pierwszego rozpoznania, jak i kolejnych wznów choroby podstawowej. Czternaścioro dzieci z tej grupy zostało włączonych do badania dwukrotnie (pierwotne rozpoznanie i wznowa), natomiast czworo dzieci – trzykrotnie (pierwotne rozpoznanie i dwie wznowy). Spośród 245 dzieci ujętych w badaniu – sześć zostało do analizy jedynie z rozpoznaniem wznowy, gdyż pierwotne rozpoznanie postawione było w okresie poprzedzającym rozpoczęcie okresu obserwacji tj. przed 1 stycznia 2003 roku. Celem wykonania analizy przeżycia okres obserwacji (*follow-up*) włączonych do badania w okresie od 1 stycznia 2003 roku do 31 grudnia 2011 roku chorych zakończono 31 stycznia 2013 roku.



Ryc. 1. Pacjenci włączeni do badania, leczeni w okresie od 1 stycznia 2003 roku do 31 grudnia 2011 roku w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Fig. 1. Patients enrolled into the study, treated from 1 January 2003 to 31 December 2011 in Department of Pediatrics, Hematology, Oncology and Endocrinology Medical University of Gdansk

Przyjęto następujące kryteria włączenia dzieci do badania:

1. Dzieci leczone w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii, Endokrynologii GUMed w okresie od 1. stycznia 2003 roku do 31. grudnia 2011 roku z następującymi rozpoznaniem:
 - pierwsze rozpoznanie ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), ostrej białaczki mieloblastycznej (AML), nieziarniczego chłoniaka złośliwego (NHL), młodzieńczej białaczki mielomonocytowej (JMML)
 - wznowy chorób wymienionych powyżej
 - ciężka anemia aplastyczna
2. Dzieci do 18. roku życia

W pierwszym etapie pracy szczegółowej analizie poddano grupę pacjentów, u których w czasie leczenia choroby podstawowej rozpoznano inwazyjne zakażenie grzybicze.

Następnie przeanalizowano wybrane cztery aspekty diagnostyki i terapii inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG) u dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego i ciężką anemią aplastyczną:

- oceniono przydatność badania ultrasonograficznego we wczesnej diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych płuc u dzieci
- oceniono wpływ hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG w grupie chorych otrzymujących glikokortykosterydy w ramach programu terapeutycznego
- dokonano próby oceny skuteczności transfuzji koncentratu granulocytów od dawców stymulowanych G-CSF w leczeniu wspomagającym IZG w oparciu o opracowany autorski program
- oceniono miejsce procedur chirurgicznych w diagnostyce i leczeniu IZG w analizowanej grupie dzieci

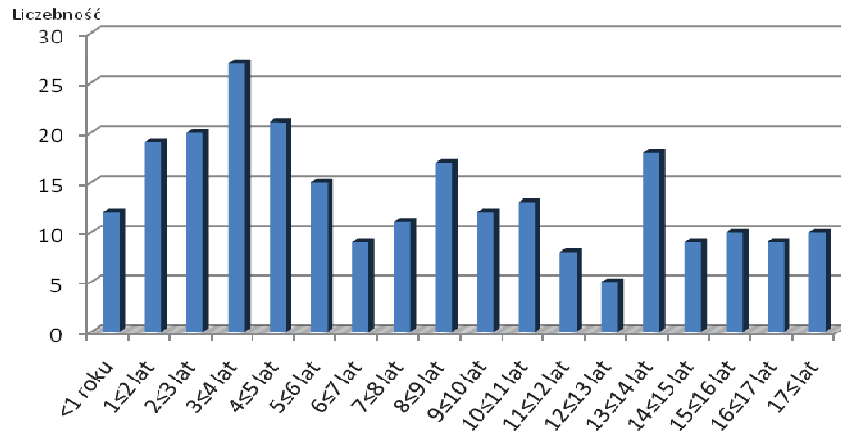
3.1. Charakterystyka kliniczno-demograficzna badanej grupy

3.1.1. Płeć

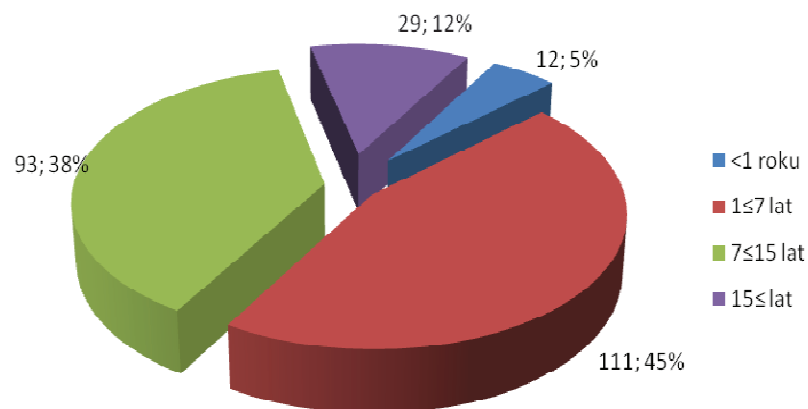
W analizowanej grupie znalazło się 135 chłopców, co stanowiło 55,1% całej grupy oraz 110 dziewczynek, co stanowiło 44,9% pacjentów.

3.1.2. Wiek

Średnia wieku dzieci w analizowanej grupie wynosiła 7,7 lat (SD=5,1 lat; minimum 39 dni, maksimum 18 lat). Rozkład wieku przedstawiono na rycinie 2 i 3. Najliczniejszą grupę dzieci wśród analizowanych pacjentów stanowiły dzieci w wieku 3-4 lat (n=27) oraz w wieku 4-5 lat (n=21) i w wieku 2-3 lat (n=20). W badanej grupie było 12 niemowląt.



Ryc. 2. Struktura wieku pacjentów zakwalifikowanych do analizy (n=245)
 Fig. 2. Age distribution of patients enrolled into the study (n=245)



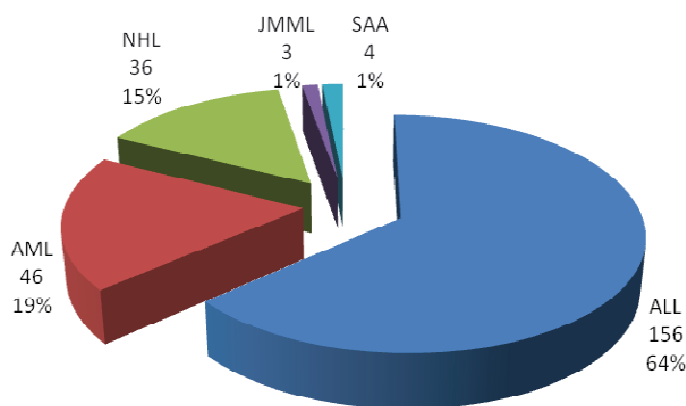
Ryc. 3. Struktura wieku włączonych do badania (n=245) w podziale na grupy: niemowlęta, dzieci w wieku 1-7 lat, dzieci w wieku 7-15 lat oraz dzieci >15 roku życia
 Fig. 3. Age distribution of patients enrolled into the study (n=245) in subgroups: infants, 1-7, 7-15 and >15 years old children accordingly

3.1.3. Rozpoznanie choroby podstawowej

Wśród 245 dzieci leczonych w analizowanym okresie znalazły się dzieci z następującymi rozpoznaniem: ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) u 156 dzieci (63,7%), ostra białaczka mieloblastyczna (AML) u 46 dzieci (18,8%), nieziarniczy chłoniak złośliwy (NHL) u 36 dzieci (14,7%), młodzieńcza białaczka mielomonocytoza (JMML) u

trzech pacjentów (1,2%), ciężka anemia aplastyczna (SAA) u czworga dzieci (1,6%) (ryc. 4) (tab. 1).

W analizowanej grupie 241 dzieci ze schorzeniami rozrostowymi układu krwiotwórczego (wyłączono 4 dzieci z ciężką anemią aplastyczną) znalazło się 213 chorych (88,4%) z pierwotnym rozpoznaniem i 28 dzieci ze wznową choroby (11,6%). Wśród 213 chorych z pierwotnym rozpoznaniem w badanej grupie znalazło się 195 dzieci włączonych do badania jednokrotnie, 14 dzieci, które w późniejszym czasie włączono po raz drugi do badania w związku z wznową choroby nowotworowej, oraz 4 dzieci, które włączono po raz drugi i po raz trzeci do badania w związku z kolejnymi wznowami choroby nowotworowej. Wśród 28 chorych włączonych do badania ze wznową choroby nowotworowej znalazło się 6 pacjentów włączonych do analizy tylko ze wznową choroby (pierwotne rozpoznanie postawione było w okresie poprzedzającym rozpoczęcie okresu obserwacji tj. przed 1 stycznia 2003 roku), 14 pacjentów ze wznową choroby nowotworowej włączonych uprzednio z powodu pierwotnego rozpoznania oraz 4 pacjentów włączonych dwukrotnie z powodu pierwszej i drugiej wznowy, a których włączono również z powodu pierwotnego rozpoznania (ryc. 5).



Ryc. 4. Rozpoznanie choroby podstawowej u dzieci włączonych do analizy (n=245); ALL – ostra białaczka limfoblastyczna; AML – ostra białaczka mieloblastyczna; NHL – nieziarniczy chłoniak złośliwy; JMML – młodzieńcza białaczka mielomonocytoza; SAA – ciężka anemia aplastyczna

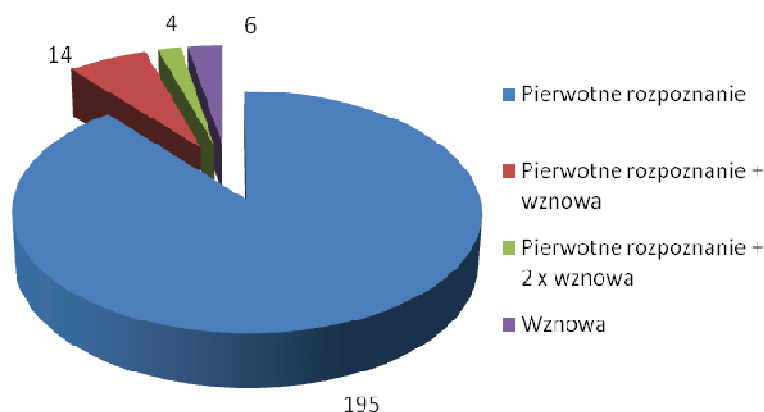
Fig. 4. Underlying disease in children enrolled into the study (n=245); ALL – acute lymphoblastic leukemia; AML – acute myeloid leukemia; NHL – non-Hodgkin lymphoma; JMML – juvenile myelomonocytic leukemia; SAA – severe aplastic anemia

Tabela 1. Rozpoznanie kliniczne w analizowanej grupie 245 dzieci zakwalifikowanych do badania
Table 1. Underlying disease in 245 children enrolled into the study

Rozpoznanie <i>Diagnosis</i>	Liczebność <i>Number</i>	Odsetek <i>Percentage</i>
ALL	156	63,7%
AML	46	18,8%
NHL B	23	9,4%
NHL T	6	2,5%

Rozpoznanie <i>Diagnosis</i>	Liczebność <i>Number</i>	Odsetek <i>Percentage</i>
NHL pre B	1	0,4%
ALCL	4	1,6%
<i>composite lymphoma</i>	2	0,8%
JMML	3	1,2%
SAA	4	1,6%

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna / *acute lymphoblastic leukemia*; AML – ostra białaczka mieloblastyczna / *acute myeloid leukemia*; NHL B – nieziarniczny chłoniak złośliwy B-komórkowy / *B-cell non-Hodgkin lymphoma*; NHL T – nieziarniczny chłoniak złośliwy T-komórkowy / *T-cell non-Hodgkin lymphoma*; NHL pre B – nieziarniczny chłoniak złośliwy pre B / *pre B-cell non-Hodgkin lymphoma*; ALCL – chłoniak anaplastyczny wielkokomórkowy / *anaplastic large-cell lymphoma*; JMML – młodzieńcza białaczka mielomonocytoza / *juvenile myelomonocytic leukemia*; SAA – ciężka anemia aplastyczna / *severe aplastic anemia*



Ryc. 5. Struktura pacjentów włączonych do badania z rozpoznaniem chorób rozrostowych (n=241), z wyłączeniem 4 dzieci z ciężką anemią aplastyczną (SAA): 195 dzieci włączonych do badania jednokrotnie z pierwotnym rozpoznaniem choroby podstawowej; 14 dzieci włączonych do badania dwukrotnie (pierwotne rozpoznanie i wznowa); 4 dzieci włączonych trzykrotnie (pierwotne rozpoznanie i dwie wznowy) oraz 6 pacjentów włączonych tylko ze wznową choroby nowotworowej

Fig. 5. Distribution of patients enrolled into the study with proliferative diseases (n=241) excluding 4 children with severe aplastic anemia (SAA): 195 children enrolled once into the study because of primary disease; 14 children enrolled twice into the study (primary disease and recidiva); 4 children enrolled three times into the study (primary disease and two recidiva) and 6 patients enrolled into the study because of recidiva

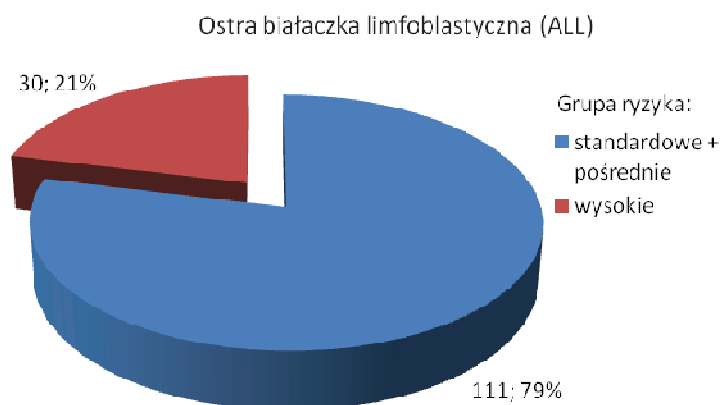
Ostra białaczka limfoblastyczna

W grupie 156 dzieci z rozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną było 141 nowych zachorowań i 15 wznów. W analizowanej grupie dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną

u 146/156 dzieci (93,6%) rozpoznano ostrą białaczkę z prekursorów komórek B, u 10/156 dzieci (6,4%) ustalono immunofenotyp T. Dziewięcioro dzieci spełniało kryteria białaczki bifenotypowej. Wśród 141 noworozpoznanych ostrych białaczek limfoblastycznych do grupy standardowego i pośredniego ryzyka zaliczono 111 chorych, natomiast 30 dzieci zakwalifikowano do grupy wysokiego ryzyka (ryc. 6).

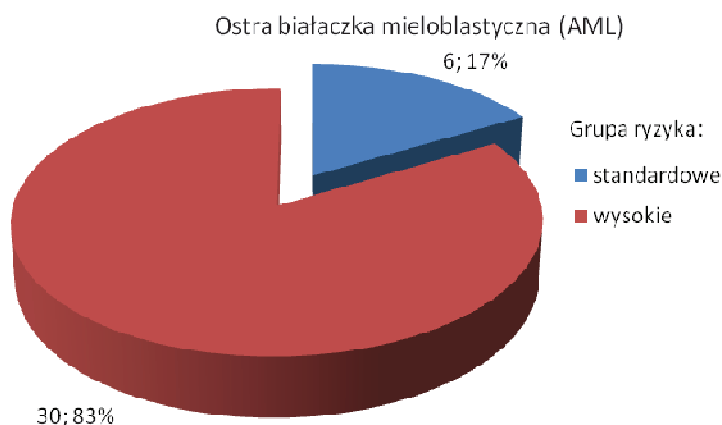
Ostra białaczka mieloblastyczna

Spośród 46 dzieci, u których rozpoznano ostrą białaczkę mieloblastyczną, u 37 było to pierwsze rozpoznanie choroby, a u 9 stwierdzono wznowę białaczki. Wśród 36 dzieci z nowym rozpoznaniem ostrej białaczki mieloblastycznej, do grupy standardowego ryzyka zakwalifikowano 6 dzieci, pozostałych 30 – spełniało kryteria grupy wysokiego ryzyka (ryc. 7).



Ryc. 6. Grupy ryzyka u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) (n=141)

Fig. 6. Risk groups of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) (n=141)

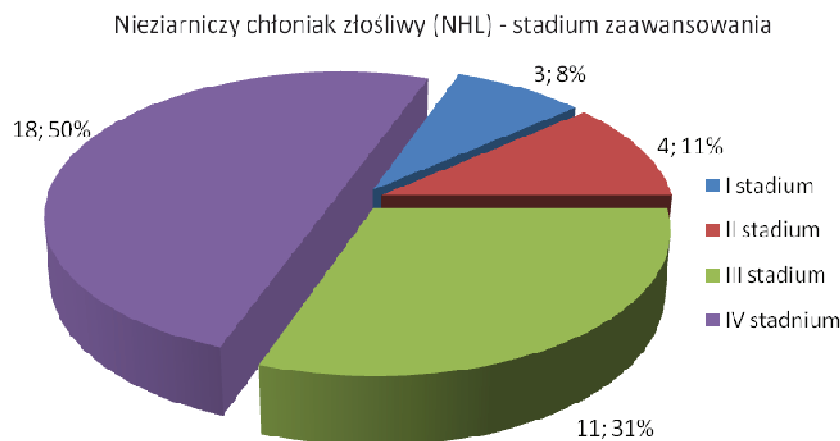


Ryc. 7. Grupy ryzyka u pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną (AML) (n=36)
Fig. 7. Risk groups of patients with acute myeloid leukemia (AML) (n=36)

Nieziarniczy chłoniak złośliwy

Wśród 36 dzieci z rozpoznaniem nieziarniczego chłoniaka złośliwego stwierdzono następujące typy chłoniaka: u 23 pacjentów (9,4%) rozpoznano nieziarniczego chłoniaka złośliwego B-komórkowego (NHL B), z czego nowych zachorowań było 22, a u 1 pacjenta – wznowa. U jednego pacjenta (0,4%) rozpoznano nieziarniczego chłoniaka złośliwego limfoblastycznego pre B (NHL pre B). U 6 dzieci (2,4%) rozpoznano nieziarniczego chłoniaka złośliwego T-komórkowego (NHL T), w tym 5 nowych zachorowań i jedna wznowa. U 4 dzieci (1,6%) rozpoznano chłoniaka anaplastycznego (ALCL), u 2 dzieci (0,8%) *composite Hodgkin i non-Hodgkin lymphoma* (u jednego pacjenta – nowe rozpoznanie, u jednego – wznowa).

Dzieci z rozpoznaniem nieziarniczego chłoniaka złośliwego zakwalifikowano do czterech stadiów zaawansowania. Do stadium pierwszego zakwalifikowano troje dzieci (8,3%), do stadium drugiego – czworo dzieci (11,1%), do stadium trzeciego – 11 chorych (30,6%), natomiast 18 dzieci (50%) zaliczono do stadium czwartego (ryc. 8).



Ryc. 8. Stadia zaawansowania nieziarniczego chłoniaka złośliwego (NHL) (n=36)

Fig. 8. Distribution of patients with non-Hodgkin lymphoma (NHL) according to the stage of the disease (n=36)

3.1.4. Leczenie choroby podstawowej

Stosowane protokoły terapeutyczne

W analizie stosowanych protokołów terapeutycznych uwzględniono 241 pacjentów. Z analizy wyłączono troje dzieci z JMML, u których nie stosowano leczenia przed procedurą allogeniczną transplantacji komórek krwiotwórczych oraz jedno dziecko z AML, które zmarło przed włączeniem protokołu terapeutycznego.

Stosowano następujące protokoły lecznicze: ALL IC-BFM 2002 u 136 dzieci (56,4%), AML-BFM 2004 INTERIM u 25 dzieci (10,4%), ALL-REZ BFM 2002 u 12 dzieci (5%), B-NHL BFM-04 u 19 chorych (7,9%), LMB 89 u czworga dzieci (1,7%) oraz pozostałe protokoły terapeutyczne u 49 chorych (20,3%) (tab. 2). W grupie pozostałych protokołów terapeutycznych stosowano: AML-BFM 98 u 11 dzieci (4,6%), IDA-FLAG u ośmiorga dzieci (3,3%), EURO-LB-02 u pięciorga dzieci (2,1%), ALCL 99 u czworga dzieci (1,6%), protokół dla ciężkich anemii aplastycznych wg WPSAA (Working Party on Severe Aplastic Anaemia) u czworga dzieci (1,6%), LMB 89 u czworga dzieci (1,6%), Interfant 99 u dwojga dzieci (0,8%), Interfant 2006 u dwojga dzieci (0,8%), blok VANDA u dwojga dzieci (0,8%), IntReALL 2010 u jednego dziecka (0,4%), ALL-REZ BFM 96 u jednego dziecka (0,4%), cykl terapeutyczny z Clofarabiną u jednego dziecka (0,4%), topotecan z kladrybiną u jednego dziecka (0,4%), BFM 93 dla non-B NHL u jednego dziecka (0,4%), a także protokół dla wznów NHL B z rytuksymabem u jednego dziecka (0,4%).

Tabela 2. Protokoły terapeutyczne stosowane u dzieci z grupy badanej (n=241); nie uwzględniono 4 dzieci: trojga z młodzieńczą białaczką mielomonocytową (JMML) i jednego z ostrą białaczką mieloblastyczną (AML)

Table 2. Treatment protocols in children enrolled into the study (n=241); excluding 4 children: three with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and one with acute myeloid leukemia (AML)

Protokół terapeutyczny / <i>Treatment protocol</i>	Liczebność / <i>Number</i>	Odsetek / <i>Percentage</i>
ALL IC-BFM 2002	136	56,4%
AML-BFM 2004 INTERIM	25	10,4%
ALL-REZ BFM 2002	12	5%
B-NHL BFM-04	19	7,9%
Inne / <i>Others</i> :	49	20,3%
- AML-BFM 98	11	4,6%
- IDA-FLAG	8	3,3%
- Euro-LB-02	5	2,1%
- ALCL 99	4	1,6%
- protokół dla SAA wg WGSAA / <i>SAA protocole according WGSAA</i>	4	1,6%
- LMB 89	4	1,6%
- Interfant 99	2	0,8%
- Interfant 2006	2	0,8%
- blok VANDA / <i>VANDA protocole</i>	2	0,8%
- IntReALL 2010	1	0,4%
- ALL-REZ BFM 96	1	0,4%
- cykl leczenia z Clofarabiną / <i>protocole with Clofarabine</i>	1	0,4%
- topotecan+cladribine		
- BFM 93 dla non-B NHL / <i>BFM 93 protocole for non-B NHL</i>	1	0,4%
- protokół dla wznów NHL B + rituximab / <i>protocole for NHL B recidiva + rituximab</i>	1	0,4%

SAA – ciężka anemia aplastyczna / *severe aplastic anaemia*; WPSAA – Working Party on Severe Aplastic Anaemia

Przeszczep komórek hematopoetycznych

W analizowanej grupie chorych, u 43 dzieci (17,6%) po zakończonym leczeniu w ośrodku gdańskim przeprowadzono transplantację komórek krwiotwórczych. Transplantacji dokonano w następujących ośrodkach przeszczepowych: Wrocław (Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej; Kierownik Kliniki: prof. dr hab. Alicja Chybicka) – 15 chorych, Poznań (Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu; Kierownik Kliniki: prof. dr hab. Jacek Wachowiak) – 3 dzieci, Bydgoszcz (Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Mariusz Wysocki) – 25 dzieci (ryc. 9).

Autologiczną transplantację komórek hematopoetycznych przeprowadzono u 5 dzieci (11,6%), allogeniczną transplantację od dawcy spokrewnionego – u 15 dzieci (34,9%), natomiast allogeniczną transplantację od dawcy niespokrewnionego – u 23 dzieci (53,5%) (ryc. 10).

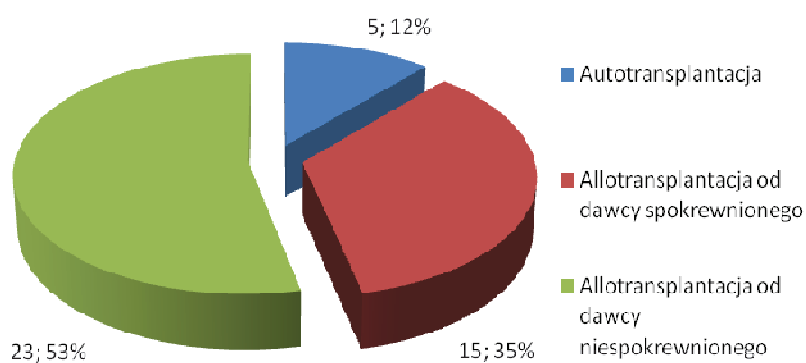
U 41 analizowanych dzieci spośród 43 poddanych transplantacji, analizie poddano okres do momentu przekazania dziecka do ośrodka transplantacyjnego. W związku z

tym dane dotyczące dalszego przebiegu klinicznego, w tym dotyczące powikłań infekcyjnych po transplantacji nie zostały ujęte w niniejszej analizie. Dwoje dzieci, które znajdowały się już pod opieką ambulatoryjną naszego ośrodka, a u których w późnym okresie po transplantacji doszło do IZG – ujęto w niniejszym opracowaniu.



Ryc. 9. Ośrodki przeszczepowe, w których dokonano transplantacji komórek krwiotwórczych u 43 dzieci z badanej grupy

Fig. 9. Transplantation centers, where hematopoietic stem cell transplantations (HSCT) in 43 children were performed



Ryc. 10. Rodzaj przeszczepu komórek krwiotwórczych u 43 pacjentów zakwalifikowanych do badania

Ryc. 10. Graft types of hematopoietic stem cell transplantations in 43 children enrolled into the study

3.2. Charakterystyka pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym

Analizie poddano częstość występowania IZG w badanej grupie 245 chorych. Określono charakterystykę kliniczno-demograficzną pacjentów, u których stwierdzono zakażenie grzybicze. Analizie poddano częstość występowania IZG dla poszczególnych rozpoznanych choroby podstawowej.

Opisano następujące parametry u pacjentów w tej grupie:

- płeć
- wiek
- rozpoznanie choroby podstawowej
- grupę ryzyka dla pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną i mieloblastyczną
- stadium zaawansowania dla nieziarniczych chłoniaków złośliwych
- zastosowany protokół terapeutyczny

Charakterystyka incydentów inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Określono czas wystąpienia IZG w odniesieniu do etapu leczenia choroby zasadniczej, a także status choroby podstawowej u chorych ze schorzeniami onkohematologicznymi. Analizowano lokalizację zakażenia oraz etiologię infekcji grzybiczej.

Zestawiono zastosowane leczenie przeciwgrzybicze z uwzględnieniem rodzaju wdrożonej terapii (empiryczna, wyprzedzająca, celowana) oraz leczenia wspomagającego. Ocenie poddano efekty stosowanej terapii przeciwgrzybiczej. Przyjęto następujące kryteria odpowiedzi na zastosowane leczenie [56]:

- Całkowita odpowiedź: ustąpienie klinicznych i laboratoryjnych objawów zakażenia, włączając odchylenia w badaniach radiologicznych oraz negatywizację dodatnich posiewów
- Całkowita odpowiedź ze zmianą resztkową: stała poprawa i kliniczna ewolucja charakterystyczna dla naturalnej historii zakażenia grzybami pleśniowymi:
 - lokalizacja płucna: ustąpienie gorączki, klinicznych i objawów infekcji, brak nowych ognisk zakażenia, ujemne posiewy z dróg oddechowych, ale obecna przetrwała jama w płucu
 - lokalizacja w zatokach przynosowych: ustąpienie gorączki oraz innych klinicznych objawów infekcji oraz ujemne posiewy; przetrwałe, niespecyficzne zmiany w badaniu RTG i TK zatok nie wykluczają pozytywnej odpowiedzi, pod warunkiem, że nie obserwuje się nawrotu objawów choroby
- Odpowiedź częściowa: poprawa kliniczna z regresją stwierdzanych wyjściowo zmian grzybiczych powyżej 50% wymiaru
- Choroba stabilna: stabilizacja objawów chorobowych bez zmiany wymiarów zmian stwierdzanych wyjściowo lub regresja mniejsza niż 50% wymiaru wyjściowego
- Niepowodzenie: progresja objawów klinicznych i/lub laboratoryjnych
- Nawrót: udokumentowana infekcja o tej samej etiologii niezależnie od jej lokalizacji, którą stwierdza się po zakończeniu leczenia pierwszego zakażenia

Za pozytywny efekt terapeutyczny uznawano odpowiedź całkowitą, całkowitą ze zmianą resztkową oraz częściową.

W leczeniu IZG stosowano trzy typy terapii: empiryczną, wyprzedzającą i celowaną. Terapię empiryczną definiowano jako wdrożenie leku przeciwgrzybiczego w celu leczenia gorączki neutropenicznej trwającej ponad 3-5 dni lub dłużej, niereagującej na stosowanie szerokospektralnej antybiotykoterapii [88]. Terapię wyprzedzającą definiowano jako wdrożenie leków przeciwgrzybiczych na podstawie wyników badań dodatkowych takich jak: tomografia komputerowa, badanie ultrasonograficzne i/lub badanie obecności galaktomannanu w surowicy krwi. Terapię celowaną definiowano jako wdrożenie leku przeciwgrzybiczego u dziecka z potwierdzonym zakażeniem grzybiczym.

U zakwalifikowanych do niniejszego badania pacjentów stosowano następujące leki przeciwgrzybicze: konwencjonalną postać amfoterycyny B (1 mg/kg masy ciała dożylnie), liposomalną postać amfoterycyny B (3-5 mg/kg masy ciała dożylnie), amfoterycynę B kompleks lipidowy (5 mg/kg masy ciała dożylnie), kaspofunginę (70 mg/m² w pierwszej dobie leczenia, następnie 50 mg/m² dożylnie), worykonazol dożylnie (dawka nasycająca: pierwsze 24 godziny 6 mg/kg masy ciała co 12 godzin; dawka podtrzymująca: po pierwszych 24 godzinach 4 mg/kg masy ciała dwa razy na dobę) oraz pozakonazol 4 razy 200 mg doustnie.

Ocena przeżycia pacjentów z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi

Na podstawie zgromadzonych danych wykonano ocenę przeżycia dzieci, u których rozpoznano zakażenie grzybicze podczas leczenia chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej. Wyniki zestawiono z przeżyciem dzieci, u których nie stwierdzono IZG podczas terapii choroby podstawowej.

3.2.1. Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny ultrasonograficznej płuc we wczesnej diagnostyce inwazyjnej grzybicy płuc

Charakterystyka grupy pacjentów

Do analizy zakwalifikowano 36 dzieci obojga płci, u których w trakcie realizacji protokołu terapeutycznego wystąpiła gorączka neutropeniczna, a w procesie diagnostycznym IZG wykonano zarówno PUBP, jak i TK klatki piersiowej.

Metodologia badania

Wszystkie badania wykonane były przez członków zespołu Pracowni Diagnostyki Ultrasonograficznej i Biopsyjnej: lek. Tomasz Batko, dr n. med. Wojciech Kosiak, dr n. med. Marek Tomaszewski.

Przyjęto następujące założenia przezklatkowej diagnostyki ultrasonograficznej umożliwiające ocenę zmian zapalnych w płucach:

- uwidocznienie zmian zapalnych w płucach w przezklatkowym ultrasonograficznym badaniu płuc (PUBP) możliwe jest wówczas, gdy zmiany patologiczne przylegają do opłucnej
- nie ma możliwości uwidocznienia zmian patologicznych w miąższu płuc w PUBP, jeśli zmiany te oddzielone są od opłucnej warstwą powietrza

- ponad 98% zmian istotnych klinicznie lokalizuje się pod linią opłucnej
- w ocenie obserwowanych w PUBP zmian zapalnych w płucach wykorzystuje się następujące kryteria opisane przez Ressing i wsp. [179]: kryteria mięszone, kryteria opłucnowe oraz kryteria naczyniowe

W każdym badaniu PUBP analizowano następujące elementy: linię opłucnej, ograniczenie obszaru konsolidacji, jego echostrukturę, obecność bronchogramu i wzorzec unaczynienia. Za cechy charakterystyczne zakażenia grzybiczego uznawano:

- nieprawidłową linię opłucnej
- obecność obszarów konsolidacji z nieregularnym zarysem brzeżnym zmiany
- niejednorodną echostrukturę
- obecność bronchogramu
- nieprawidłowy wzorzec unaczynienia zmian (ocena z wykorzystaniem opcji Dopplera kodowanego kolorem)

Obraz zmian stwierdzanych w badaniu ultrasonograficznym płuc u dzieci z podejrzeniem IZG zestawiono z równoczesną oceną za pomocą tomografii komputerowej (TK), w której oceniano obecność guzków, jam, objawu *halo*, objawu "półksiężyca" (*crescent sign*) i/lub innych. Na tej podstawie określono następujące parametry PUBP: czułość, swoistość, dodatnią wartość predykcyjną oraz ujemną wartość predykcyjną omawianego badania.

Wprowadzono poniższe definicje zmiennych:

- wyniki prawdziwie dodatnie (w PUBP wysunięto podejrzenie grzybicy płuc, co potwierdzono w badaniu TK klatki piersiowej)
- wyniki prawdziwie ujemne (w PUBP nie podejrzewano grzybicy płuc, nie stwierdzono typowych cech grzybicy płuc w badaniu TK klatki piersiowej)
- wyniki fałszywie dodatnie (w PUBP rozpoznano grzybicę płuc, którego istnienia nie potwierdzono w badaniu TK klatki piersiowej)
- wyniki fałszywie ujemne (grzybicy płuc nie rozpoznano w PUBP, aczkolwiek uwidoczniło ją w badaniu TK klatki piersiowej)

Na podstawie wprowadzonych definicji dla badania PUBP względem badania TK klatki piersiowej oceniono:

- czułość (*sensitivity*) jako miarę trafnych rozpoznań grzybicy płuc; parametr ten pozwala odpowiedzieć na pytanie, w jakim odsetku przypadków dana metoda diagnostyczna rozpoznaje istniejącą chorobę:

$$\text{czułość} = \frac{a}{a + d} \times 100\%$$

- swoistość, czyli wybiórczość testu (*specify*) jako miarę zdolności metody do wykluczenia zmian nieistniejących:

$$\text{swoistość} = \frac{b}{b + c} \times 100\%$$

- dodatnią wartość predykcyjną testu (*Positive Predictive Value*, PPV) jako prawdopodobieństwo, że u osoby z dodatnim wynikiem PUBP grzybica płuc

rzeczywiście występuje (odsetek osób z dodatnim wynikiem PUBP, u których obecność grzybicy potwierdzono badaniem TK klatki piersiowej):

$$PPV = \frac{a}{a + c} \times 100\%$$

- ujemną wartość predykcyjną testu (*Negative Predictive Value*, NPV) jako prawdopodobieństwo, że u osoby z ujemnym wynikiem PUBP grzybica w rzeczywistości nie występuje (odsetek osób z ujemnym wynikiem PUBP, u których nie wykazano grzybicy w badaniu TK klatki piersiowej):

$$NPV = \frac{b}{b + d} \times 100\%$$

3.2.2. Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Ocenę wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG przeprowadzono w dwóch etapach.

Etap pierwszy (A) obejmował opracowanie i wprowadzenie do codziennej praktyki klinicznej programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz ocenę wpływu wprowadzenia programu na częstość wykrywania hiperglikemii posterydowej (HP) u dzieci otrzymujących glikokortykosterydy (GKS) w ramach programu terapeutycznego.

Etap drugi (B) obejmował analizę częstości występowania IZG u dzieci z hiperglikemią posterydową w porównaniu do grupy dzieci, u których hiperglikemia nie występowała.

Etap pierwszy (A) – wprowadzenie programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (ZGW)

Inicjatywę wprowadzenia programu wczesnego wykrywania ZGW podjęto w 2008 roku [93]. Głównym założeniem programu było wprowadzenie intensywnej kontroli gospodarki węglowodanowej u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej, u których w programie terapeutycznym stosowano glikokortykosterydy.

W celu przeprowadzenia oceny wpływu wprowadzenia programu na częstość wykrywania hiperglikemii posterydowej (HP), grupę dzieci objętych programem wczesnego wykrywania ZGW porównano z grupą kontrolną, którą stanowili pacjenci leczeni takimi samymi protokołami terapeutycznymi w okresie poprzedzającym wprowadzenie opisywanego programu.

Grupę AI stanowiło 83 dzieci leczonych w okresie od października 2008 do grudnia 2011 roku, otrzymujących glikokortykosterydy w programie terapeutycznym, u których wdrożono program wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (ZGW).

Grupę kontrolną (grupa AII) stanowiło 69 dzieci, u których w programie terapeutycznym stosowano glikokortykosterydy leczonych w okresie od września 2005 roku do września 2008 roku. W grupie tej glikemię oznaczano jedynie przygodnie.

Grupę AI i AII porównano pod względem rozkładu wieku, płci, BMI, rozpoznania choroby podstawowej i zastosowanych schematów terapeutycznych. Ostatecznie analizie porównawczej poddano częstość występowania hiperglikemii w obu grupach.

Szczegółowe dane zawierające: rodzaj preparatu GKS, dawki sumaryczne GKS na metr kwadratowy powierzchni ciała dziecka w poszczególnych protokołach terapeutycznych oraz liczbę cykli chemioterapii z zastosowaniem glikokortykosterydów w schematach zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Protokoły terapeutyczne stosowane u analizowanych dzieci z uwzględnieniem całkowitej dawki glikokortykosterydów, rodzaju preparatu oraz liczby cykli zawierających glikokortykosterydy

Table 5. Treatment protocols used in the analysed children in regard to the total steroid dose, type of the drug and the number of cycles with steroids

Protokół terapeutyczny / <i>Treatment protocol</i>	Całkowita dawka GKS w protokole terapeutycznym (mg/m ²) oraz rodzaj preparatu / <i>Total dose of steroids in treatment protocol (mg/m²) and the type of the drug</i>	Liczba cykli terapii z GKS / <i>Number of treatment cycles with steroids</i>
ALL IC-BFM 2002 SRG, IRG	Prednizon 1740 mg/m ² ; Deksametazon 236,25 mg/m ²	2
ALL IC-BFM 2002 HRG, ramię / <i>arm A, B</i>	Prednizon 1740 mg/m ² ; Deksametazon 600 mg/m ²	7
B-NHL BFM 04 (stadium / <i>stage: II, III, IV</i>)	Deksametazon 100-490 mg/m ²	2-7
ALL-REZ BFM 2002	Deksametazon 500-700 mg/m ²	5-7
Inne / <i>other*</i>	Prednizon 210-1740 mg/m ² ; Deksametazon 236,25-500 mg/m ²	2-6

GKS – glikokortykosterydy / *steroids*; * – ALCL 99, Euro-LB02, Interfant-06, WPSAA; SRG – grupa standardowego ryzyka / *standard-risk group*; IRG – grupa pośredniego ryzyka / *intermediate-risk group*; HRG – grupa wysokiego ryzyka / *high-risk group*

Etap drugi (B) – analiza wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG u dzieci, u których stosowano program wczesnego rozpoznawania ZGW

W drugim etapie analizy, porównano częstość występowania zakażeń grzybiczych u dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową i u dzieci, u których nie obserwowano hiperglikemii. Do analizy zakwalifikowano wyłącznie grupę dzieci, u których stosowano program monitorowania zaburzeń gospodarki węglowodanowej, opracowany w etapie pierwszym (A). W analizie tej uwzględniono jedynie incydenty IZG, które wystąpiły w ciągu maksymalnie 21 dni od ostatniego incydentu hiperglikemii. Następnie analizowano wpływ hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG u dzieci leczonych poszczególnymi protokołami terapeutycznymi. Dla dzieci leczonych zgodnie z protokołem ALL IC-BFM 2002 przeprowadzono dodatkową analizę uwzględniającą grupę ryzyka ALL i jej wpływ na częstość występowania IZG z uwzględnieniem czynnika hiperglikemii posterydowej.

Oceniono także czas trwania neutropenii poprzedzającej wystąpienie IZG u pacjentów, u których stosowano program wczesnego rozpoznawania ZGW z uwzględnieniem współistniejącej hiperglikemii.

Dodatkowo oceniono rodzaj stosowanej profilaktyki przeciwgrzybiczej u dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową oraz wpływ jej stosowania na częstość występowania IZG. Analizie poddano etiologię IZG u dzieci zarówno otrzymujących, jak i nieotrzymujących profilaktyki przeciwgrzybiczej.

3.2.3. *Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny skuteczności transfuzji koncentratu granulocytów od dawców stymulowanych G-CSF w leczeniu wspomagającym IZG*

Od 2003 roku w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii GUMed istnieje możliwość stosowania transfuzji koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców w leczeniu wspomagającym IZG. Koncentrat granulocytarny stanowią zawieszone w osoczu granulocyty, pozyskane od jednego dawcy na drodze aferezy [124].

Przygotowanie koncentratu granulocytów odbywa się w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (Dyrektor Centrum: lek. Emilia Nowakowska; lek. Małgorzata Szafran). W porozumieniu z Panią Dr Jolantą Juścińską (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku) opracowano autorski program kompleksowego przygotowania i zastosowania koncentratu granulocytów od dawców stymulowanych G-CSF u dzieci z neutropenią i zagrażającymi życiu infekcjami. W grupie dzieci z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym oceniono częstość stosowania wymienionej metody leczenia wspomagającego. Analiza obejmowała wybrane aspekty kliniczne dotyczące zarówno biorców koncentratu granulocytów (dzieci leczone z powodu schorzeń rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej), jak i dawców preparatu.

Z części badania dotyczącego oceny przydatności transfuzji koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców rodzinnych w leczeniu ciężkich infekcji u dzieci w neutropenii wykluczono dzieci, których rodzice nie wyrazili zgody na udział w procedurze.

Charakterystyka dawców koncentratu granulocytów

Oceniono liczbę zakwalifikowanych dawców z uwzględnieniem:

- stopnia pokrewieństwa w stosunku do biorcy
- wieku
- płci
- liczby wykonanych stymulacji G-CSF oraz separacji granulocytów

Dodatkowo oceniono objawy niepożądane po zastosowanym G-CSF oraz samopoczucie dawcy po przeprowadzonej separacji na podstawie ich subiektywnej oceny (dobre vs złe). Po zakończonej procedurze dawcom zadawano pytanie, czy zdecydowaliby się w przyszłości ponownie poddać procedurze stymulacji i separacji granulocytów. W

odległej obserwacji dawców granulocytów przeprowadzono telefoniczną ankietę dotyczącą aktualnego stanu zdrowia.

Kryteria kwalifikacji dawcy do procedury separacji koncentratu granulocytów:

- zgodna z pacjentem grupa krwi (ABO, Rh)
- zgodna próba zgodności serologicznej pomiędzy krwią dawcy i biorcy
- dawca spokrewniony lub spowinowacony z biorcą
- wiek 18-55 lat
- uzyskanie świadomej zgody dawcy na stymulację G-CSF oraz na separację
- ujemne badania wirusologiczne
- ujemny test kiłowy
- prawidłowe podstawowe badania laboratoryjne (morfologia, AspAT, AlAT, koagulogram, BUN, kreatynina, CRP)
- prawidłowe badanie elektrokardiograficzne
- prawidłowe badanie radiologiczne klatki piersiowej
- ujemny wywiad według kwestionariusza dla krwiodawców obejmujący pytania dotyczące: zakażenia wirusami hepatotropowymi, przebytych urazów, wypadków, zabiegów chirurgicznych, zabiegów stomatologicznych, hospitalizacji, chorób serca, nadciśnienia, chorób tarczycy, cukrzycy, chorób wątroby, padaczki, porodów u kobiet (ostatni minimum rok wcześniej), miesiączki (okres separacji nie powinien przypadać w okresie krwawienia miesięcznego), leków przyjmowanych na stałe (m.in. leki przeciwkrzepliwie) oraz doraźnie w ciągu ostatniego tygodnia (aspiryna, niesterydowe leki przeciwzapalne, antybiotyki)

W latach 2003-2009 u dawców zakładano wkłucie centralne do żyły szyjnej lub podobojczykowej w celu przeprowadzenia procedury separacji. Zabieg przeprowadzany był przez anestezjologa, w znieczuleniu miejscowym, po uzyskaniu oddzielnej zgody dawcy. Od roku 2010 separacja jest prowadzona poprzez wkłucia obwodowe. Dawca jest kwalifikowany wstępnie do procedury przez wykwalifikowany personel pielęgniarski w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku na podstawie oceny żył obwodowych.

Kryteria kwalifikacji pacjentów do leczenia za pomocą transfuzji koncentratu granulocytów:

- obecność zagrażającej życiu infekcji (spełnione kryteria SIRS, wstrząs septyczny, możliwe, prawdopodobne i udokumentowane zakażenie grzybicze)
- brak poprawy po zastosowaniu szerokospektralnej antybiotykoterapii i/lub leczenia przeciwgrzybiczego
- konieczność przeprowadzenia zabiegu operacyjnego ze wskazań życiowych u dziecka w neutropenii
- przedłużająca się neutropenia; trudny do przewidzenia czas ustąpienia neutropenii
- posiadanie zgodnego w zakresie układu ABO i Rh dawcy spokrewnionego lub spowinowaconego
- pisemna, świadoma zgoda rodziców lub prawnych opiekunów na stosowanie transfuzji koncentratu granulocytów
- z badania wyłączono pacjentów w terminalnej fazie choroby nowotworowej

Charakterystyka biorców koncentratu granulocytów

W analizie uwzględniono rozpoznanie choroby podstawowej, kategorię rozpoznania IZG (pewne, prawdopodobne, możliwe), lokalizację zakażenia, udokumentowany lub prawdopodobny czynnik etiologiczny oraz zastosowane poprzedzające leczenie przeciwwgrzybicze.

Analiza skuteczności procedury przetaczania koncentratu granulocytów

Określono liczbę przetoczeń koncentratu granulocytów dla poszczególnych pacjentów. Analizie poddano lokalizację i etiologię zakażenia grzybiczego, jak również rodzaj leczenia przeciwwgrzybiczego oraz czas trwania neutropenii poprzedzającej procedurę przetoczenia KG. Oceniano skuteczność stosowania koncentratu na podstawie oceny poprzetoczeniowego wzrostu liczby granulocytów i obniżenia wartości białka C-reaktywnego (CRP) po zakończeniu procedury przetoczenia koncentratu granulocytów. Oceniono także poprzetoczeniowy wzrost liczby płytek krwi u biorcy preparatu. Dodatkowo dokonano próby oceny skuteczności łącznej podaży leczenia przeciwwgrzybiczego i KG w terapii IZG po 3 tygodniach i po 3 miesiącach od zakończenia przetoczeń KG. Powyższej oceny dokonano na podstawie opisanych wcześniej kryteriów odpowiedzi na leczenie IZG. Analizie poddano również częstość występowania i rodzaj powikłań poprzetoczeniowych oraz przeżycie dzieci po przetoczeniu KG. W analizie dotyczącej skuteczności zastosowania transfuzji KG uwzględniono dzieci, u których dokonano co najmniej dwóch przetoczeń. U dzieci, u których przeprowadzono po jednym przetoczeniu oceniano jedynie bezpieczeństwo zastosowanej procedury.

3.2.4. *Charakterystyka pacjentów i metodologia badania dzieci zakwalifikowanych do oceny przydatności procedur chirurgicznych w diagnostyce i leczeniu IZG*

W grupie 59 obserwowanych dzieci, u których rozpoznano lub podejrzewano IZG analizie poddano częstość i rodzaj wdrażanych procedur inwazyjnych mających na celu diagnostykę i/lub leczenie IZG. Analizie poddano wskazania do zabiegu operacyjnego, rodzaj leczenia przeciwwgrzybiczego stosowanego w okresie przedoperacyjnym oraz pooperacyjnym, badania laboratoryjne w okresie poprzedzającym zabieg obejmujące liczbę leukocytów, granulocytów, płytek krwi i stężenie hemoglobiny, przebieg okresu pooperacyjnego z uwzględnieniem czasu pobytu dziecka poza oddziałem macierzystym, a także konieczność przetaczania preparatów krwiopochodnych w okresie przed-, śród- i pooperacyjnym. Dodatkowo analizowano czas trwania wynikającej z konieczności zastosowania procedur inwazyjnych przerwy w planowej chemioterapii. Oceniono efektywność i bezpieczeństwo zastosowanej procedury chirurgicznej w leczeniu IZG oraz wartość diagnostyczną uzyskanych materiałów biologicznych w ocenie histopatologicznej.

W związku z małą liczebnością analizowanej grupy dzieci z IZG poddanej procedurom inwazyjnym, analizę oparto o szczegółowe opisy poszczególnych przypadków klinicznych.

Zabiegi operacyjne w obrębie klatki piersiowej u dzieci objętych analizą wykonywano w Klinice Chirurgii i Urologii Dzieci i Młodzieży GUMed (Kierownik Kliniki:

prof. dr hab. med. Piotr Czauderna) oraz w Katedrze i Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej (Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Witold Rzyman). Biopsję tarczycy u jednego spośród analizowanych dzieci wykonano w znieczuleniu ogólnym, natomiast biopsję skóry u innego dziecka w znieczuleniu miejscowym w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii GUMed (oddział macierzysty) (dr n. med. Robert Rzepko). Diagnostyczne nakłucie jamy opłucnowej przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym w Klinice Chirurgii i Urologii Dzieci i Młodzieży GUMed (Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Piotr Czauderna). Biopsję zatoki przynosowej przeprowadzono w Klinice Otolaryngologii GUMed (Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Czesław Stankiewicz).

Badania histopatologiczne uzyskanych materiałów biologicznych wykonywano w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii GUMed (Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Kazimierz Jaśkiewicz; prof. dr hab. med. Wojciech Biernat).

3.3. Diagnostyka inwazyjnych zakażeń grzybiczych

3.3.1. Kryteria rozpoznania inwazyjnego zakażenia grzybiczego

Tabela 3. Kryteria rozpoznania potwierdzonej grzybicy inwazyjnej wg EORTC 2008*
Table 3. Criteria for diagnosis of confirmed fungal infection according EORTC 2008*

	Grzyby pleśniowe / <i>Moulds</i>	Drożdżaki / <i>Yeasts</i>
Analiza mikroskopowa (materiał jałowy) / <i>Microscopic analysis (aseptic material)</i>	Histopatologiczne, cytopatologiczne lub bezpośrednie badanie mikroskopowe materiału uzyskanego z biopsji lub aspiracji igłowej, w którym wykazano obecność strzępek z towarzyszącym uszkodzeniem tkanek	Histopatologiczne, cytopatologiczne lub bezpośrednie badanie mikroskopowe materiału uzyskanego z biopsji lub aspiracji igłowej ze zwykle jałowych miejsc (innych niż błony śluzowe) wskazujące na obecność komórek drożdży
Hodowla / <i>colony</i>		
materiał jałowy / <i>aseptic material</i>	Izolacja pleśni lub "czarnych drożdży" w hodowli z materiału uzyskanego za pomocą sterylnych procedur z miejsc zwykle jałowych i wykazujących nieprawidłowości kliniczne i radiologiczne związane z procesem zakażenia, wykluczając popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, wydzielinę z zatok czołowych oraz mocz	Izolacja drożdży w hodowli z materiału uzyskanego za pomocą sterylnych procedur z miejsc zwykle jałowych i wykazujących nieprawidłowości kliniczne i radiologiczne związane z procesem zakażenia
krw / <i>blood</i>	Dodatni posiew krwi, z którego wyhodowano grzyby pleśniowe (np. <i>Fusarium spp.</i>), z obrazem kliniczny wskazującym na zakażenie	Dodatni posiew krwi, z którego wyhodowano drożdże (np. <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i>) lub grzyby drożdżopodobne (np. <i>Trichosporon</i>)
Badanie serologiczne (płyn mózgowo-rdzeniowy) / <i>Serological examination (cerebrospinal fluid)</i>	Nie zalecane	Antygen kryptokokowy w płynie mózgowo-rdzeniowym wskazuje na rozsianą kryptokokozę

* EORTC – European Organization for Research and Treatment of Cancer [51]

Tabela 4. Kryteria rozpoznania prawdopodobnej grzybicy inwazyjnej wg EORTC 2008*
 Table 4. Criteria for diagnosis of probable fungal infection according EORTC 2008

Czynniki zależne od gospodarza / On the host dependent factors
– neutropenia ($<0,5 \times 10^9$ neutrofilów/ml >10 dni) w momencie rozpoczęcia zakażenia – allogeniczny przeszczep komórek macierzystych – długotrwała kortykosteroidoterapia (z wyjątkiem pacjentów z alergiczną aspergilozą oskrzelowo-płucną) przy minimalnej dawce średniej wynoszącej 0,3 mg/kg/dobę równoważnej dawki prednizonu – stosowanie leczenia innymi lekami immunosupresyjnymi hamującymi limfocyty T (cyklosporyna, blokery TNF-α, niektóre przeciwciała monoklonalne np. alemtuzumab) w trakcie ostatnich 90 dni – wrodzone ciężkie niedobory odporności (przewlekła choroba ziarniniakowa lub SCID)
Kryteria kliniczne / Clinical criteria
Grzybica dolnych dróg oddechowych / Fungal infection of the lower respiratory tract: obecność jednego z 3 następujących obrazów w badaniu TK: – jednolity, dobrze odgraniczony naciek bez/z obłoczkowatymi zmianami halo – objaw powietrznego rąbka w kształcie półksiężyca – jama Grzybica tchawicy i oskrzeli / Fungal infection of the trachea and bronchi: – obecność owrzodzenia, guzków, błon rzekomych, blaszek i strupów w bronchoskopii Grzybica zatok przynosowych / Fungal infection of paranasal sinuses: zapalenie zatok widoczne w badaniu obrazowym i jeden z 3 następujących objawów: – ostry miejscowy ból (także promieniujący w okolicę oka) – owrzodzenia jamy nosowej z wytworzeniem czarnych strupów – rozprzestrzenienie zakażenia z zatok nosowych przez barierę kostną do oczodołów Grzybica układu nerwowego / Fungal infection of the nervous system: jeden z 2 następujących objawów: – zmiany ogniskowe w badaniach obrazowych – pogrubienie opon mózgowo-rdzeniowych w obrazie MRI i TK Rozsiana kandydoza / Disseminated candidiasis: przynajmniej jeden z 2 następujących objawów po przebytej kandydemii w ciągu ostatnich dwóch tygodni: – małe, punktowe ropnie w śledzionie lub w wątrobie (objaw "bawolego oka") – postępujący wysięk siatkówkowy w badaniu oftalmoskopowym
Kryteria mikologiczne / Mycological criteria
Testy bezpośrednie / Direct tests: obecność grzybów w płwocinie, popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych, w wymazach szczoteczkowych i materiale aspiracyjnym z zatok potwierdzona przez: – wykrycie elementów grzybnii w badaniu mikroskopowym – uzyskanie hodowli grzybów (np. <i>Aspergillus</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Zygomycetes</i>, <i>Scedosporium</i>) Testy pośrednie / Indirect tests: wykrycie specyficznych antygenów grzybiczych: – aspergiloza - antygen galaktomannanowy wykryty w osoczu, surowicy, popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych, płynie mózgowo-rdzeniowym – inwazyjna grzybica inna niż kryptokokoza lub zygomycykoza - 1,3β-D-glukan w surowicy

Do rozpoznania prawdopodobnej grzybicy niezbędne jest spełnienie wszystkich trzech kryteriów; przypadki, w których spełnione są kryteria kliniczne i występują czynniki zależne od gospodarza ale bez obecności kryteriów mikologicznych definiuje się jako możliwe grzybice inwazyjne / *The probable fungal infection diagnosis is necessary to meet all 3 criteria; cases where the clinical criteria are met and there are on the host dependent factors without the presence of mycological criteria are defined as a possible invasive fungal infections*; * EORTC – European Organization for Research and Treatment of Cancer; SCID – ciężki złożony niedobór odporności / *severe combined immunodeficiency*

Rozpoznanie IZG stawiano w oparciu o zmodyfikowane kryteria European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) z roku 2008 (pierwotna wersja – 2002 rok) [51;54;209]. Wyróżniono trzy typy rozpoznań: udokumentowane (*proven*), prawdopodobne (*probably*) i możliwe (*possible*). Szczegółowy opis kryteriów rozpoznania prawdopodobnego i udokumentowanego przedstawiono w tabelach 3 i 4. Rozpoznanie możliwej grzybicy inwazyjnej definiowano według przedstawionych kryteriów wówczas, gdy spełnione były kryteria kliniczne i występowały czynniki zależne od gospodarza, ale bez obecności kryteriów mikologicznych, co różnicuje ten typ rozpoznania od rozpoznania prawdopodobnego

3.3.2. *Badania mikologiczne*

Badania mikologiczne w analizowanej grupie dzieci wykonywano w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, Kierownik Laboratorium; dr n. med. Alfred Samet). W celu wykonania hodowli materiałów (krew i inne płyny ustrojowe) wykorzystywano automatyczne systemy Bactec i BactAlert, hodowle na podłożach agarowych w tym Sabourauda z dodatkiem antybiotyków oraz agar Columbia z krwią baranią. Oznaczanie antygenu galaktomannanowego w surowicy krwi wykonywano z wykorzystaniem immunoenzymatycznego, kanapkowego testu Platelia firmy BioRad z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Za wynik pozytywny w surowicy krwi uznawano wartość indeksu $\geq 0,5$.

3.3.3. *Badania obrazowe*

W ocenie pacjentów, u których podejrzewano IZG wykonywano następujące badania obrazowe: badanie radiologiczne klatki piersiowej, tomografię komputerową klatki piersiowej, tomografię komputerową zatok przynosowych i tomografię komputerową jamy brzusznej, badanie ultrasonograficzne klatki piersiowej, jamy brzusznej, zatok przynosowych, skóry i tkanki podskórnej oraz tarczycy. Badania radiologiczne konieczne do ustalenia rozpoznania wykonywano w Zakładzie Radiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Michał Studniarek. Wykonane one były zgodnie z potrzebami klinicznymi i zasadami sztuki medycznej w najlepiej pojętym interesie pacjenta i wykorzystywane w dalszym postępowaniu terapeutycznym. Na zamieszczenie dokumentacji z badań tomografii komputerowej klatki piersiowej i zatok przynosowych w niniejszym opracowaniu uzyskano zgodę Kierownika Zakładu.

Badania ultrasonograficzne wykonywane były w latach 2007-2011 w Pracowni Diagnostyki Ultrasonograficznej i Biopsyjnej (Kierownik Pracowni: dr n. med. Wojciech Kosiak), Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Kierownicy Kliniki: prof. dr hab. med. Anna Balcerska; prof. dr hab. med. Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska), a w latach 2003-2007 w Gabinetzie Ultrasonograficznym Kliniki Chorób Nerek i Nadciśnienia Dzieci i Młodzieży Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Aleksandra Żurowska).

Badania ultrasonograficzne płuc wykonywane były w Pracowni Diagnostyki Ultrasonograficznej i Biopsyjnej Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii GUMed, za pomocą dwóch aparatów ultrasonograficznych: GE Logiq 7 (GE Medical Systems, Waukesha, WI, USA) i Philips iU 22 (Philips Medical Systems, Bothell, WA, USA) z zastosowaniem głowic typu convex (o częstotliwości 3,5-5,0 MHz) i głowic liniowych (o częstotliwości 8,0-12,0 MHz). Wykorzystywano ustawienia wstępne aparatu przeznaczone do badań jamy brzusznej. PUBP wykonywane były zgodnie ze standardami Polskiego Towarzystwa Ultrasonograficznego [113;97] i zgodnie z kryteriami przyjętymi w diagnostyce pacjentów dorosłych [125;179].

3.3.4. Badania laboratoryjne

Badania laboratoryjne wykonywano w Uniwersyteckim Centrum Medycyny Laboratoryjnej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, Kierownik Centrum: dr n. med. Zenon Jakubowski. Badania morfologii krwi obwodowej wykonywano na analizatorze Sysmex XE, stężenie białka C-reaktywnego (CRP) na analizatorze Architect c8000 metodą immunoturbidymetrii, a stężenie glukozy metodą heksokinazową na tym samym aparacie. Metodą immunochemiluminescencji oznaczano stężenie C-peptydu na analizatorze Immulite 1000, a stężenie insuliny na analizatorze Architect I2000.

3.4. Metody statystyczne

Zmienne ciągle opisywano za pomocą wartości średniej, mediany, odchylenia standardowego (SD) oraz wartości minimalnej i maksymalnej. Zmienne kategoryzowane opisano za pomocą liczebności i odsetka w podgrupach, zaokrąglając wyniki do pierwszego miejsca po przecinku (dziesiątne).

Analizy danych o rozkładzie normalnym dokonano za pomocą testu t-Studenta po uprzednim sprawdzeniu normalności rozkładu danych za pomocą testu Kołmogorow-Smirnow'a.

Analizy danych, które nie posiadały rozkładu normalnego dokonano z zastosowaniem testu nieparametrycznego U Mann-Whitney'a, a w przypadku danych powiązanych z zastosowaniem testu Wilcoxon'a.

Porównań zmiennych kategoryzowanych dokonano z zastosowaniem testu chi-kwadrat według Pearsona, a w przypadku niskich liczebności w podgrupach zastosowano dokładny test Fishera z poprawką Yetsa.

Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość p równą 0,05. W przypadku, gdy nie wykazano istotności statystycznej w prezentacji graficznej umieszczano oznaczenie "*non significant*" – ns.

Analizy czasu przeżycia wykonano z zastosowaniem funkcji Kaplan-Meier'a. Wszyscy pacjenci, których włączono do analizy czasu przeżycia zginęli z powodu choroby podstawowej i/lub jej powikłań, lub czas obserwacji przeżycia zakończono z dniem 31 stycznia 2013 roku. W celu porównania czasu przeżycia w podgrupach zastosowano test log-rank.

Wszystkie dane dotyczące analizowanych wartości zmiennych były analizowane z wykorzystaniem Microsoft Excel (z 2007 r.). Do obliczeń statystycznych wykorzystano program statystyczny SPSS v.13.0 (SPSS Inc, USA).

4. WYNIKI

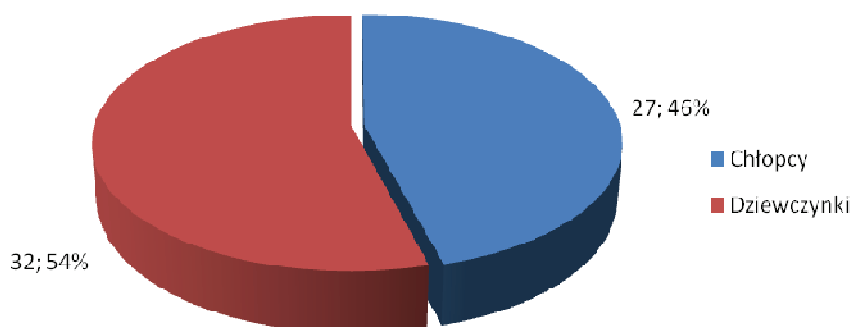
4.1. Charakterystyka pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym

W analizowanej grupie 245 dzieci leczonych w okresie od 1 stycznia 2003 do 31 grudnia 2011 roku w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, inwazyjne zakażenie grzybicze stwierdzono u 59 chorych, co stanowiło 24,1%. U dwojga dzieci IZG wystąpiło dwukrotnie podczas realizacji protokołu leczniczego, w związku z czym sumaryczna liczba incydentów IZG, którą poddano analizie wynosiła 61. Analiza kliniczno-demograficzna dotyczyła natomiast 59 chorych.

4.1.1. Charakterystyka kliniczno-demograficzna dzieci z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym

Wiek i płeć

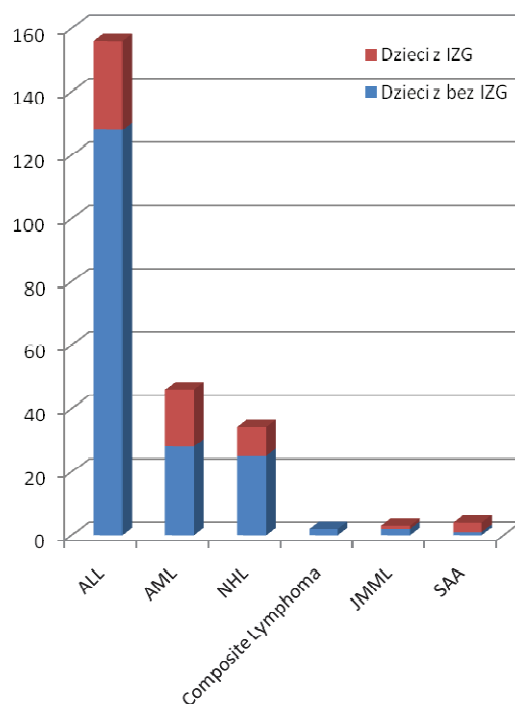
Wśród 59 chorych z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym było 27 chłopców (45,8%) i 32 dziewczynki (54,2%) (ryc.11). Średnia wieku w badanej grupie wynosiła 9,6 lat, mediana wieku wynosiła 10,1 lat (SD=5,2; minimum 1,26 roku, maksimum 17,6 lat).



Ryc. 11. Płeć dzieci w grupie pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym
Fig. 11. Gender distribution of children with invasive fungal infections

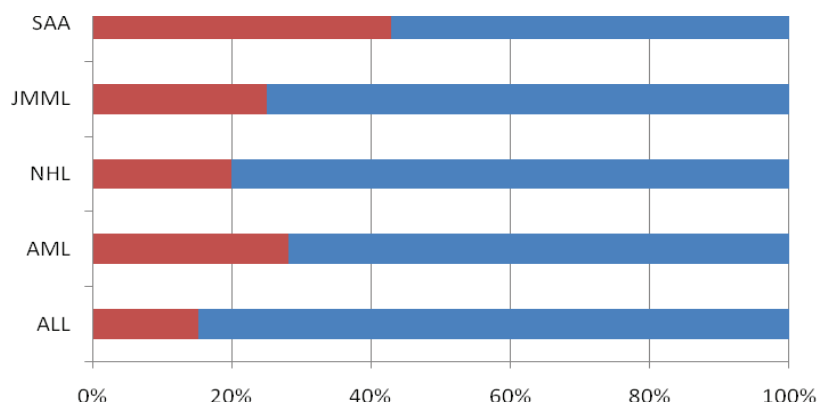
Rozpoznania choroby podstawowej z uwzględnieniem grupy ryzyka oraz rozpoznania pierwotnego vs wznowa

Analizowane incydenty IZG występowały u dzieci z następującymi rozpoznaniem choroby podstawowej: ostra białaczka limfoblastyczna – 28 dzieci (47,5%) (u jednego dziecka stwierdzono dwa niezależne incydenty IZG, w związku z czym sumaryczna liczba incydentów IZG w ALL wyniosła 29), ostra białaczka mieloblastyczna u 18 chorych (30,5%) (u jednego dziecka stwierdzono dwa niezależne incydenty IZG, w związku z czym sumaryczna liczba incydentów IZG w AML wyniosła 19), nieziarniczy chłoniak złośliwy – 9 dzieci (15,3%), młodzieńcza białaczka mielomonocytoza – jedno dziecko (1,7%) i ciężka anemia aplastyczna – troje dzieci (5,1%) (ryc. 12, 13 i 14). Obserwowano statystycznie istotne różnice w częstości występowania IZG u dzieci z poszczególnymi rozpoznaniem choroby podstawowej ($p=0,026$).



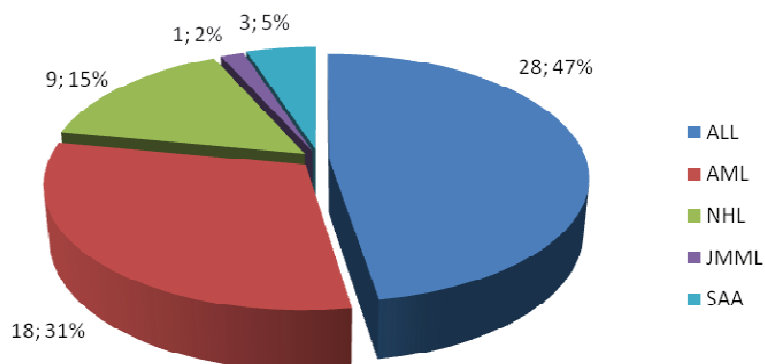
Ryc. 12. Występowanie inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG) u dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), ostrej białaczki mieloblastycznej (AML), nieziarniczego chłoniaka złośliwego (NHL), *composite lymphoma*, młodzieńczej białaczki mielomonocytozy (JMML) oraz ciężkiej anemii aplastycznej (SAA) ($p=0,026$)

Fig. 12. Incidence of invasive fungal infections (IZG) in children treated for acute lymphoblastic leukemia (ALL) acute myeloid leukemia (AML), non-Hodgkin lymphoma (NHL), composite lymphoma, juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and severe aplastic anemia (SAA) ($p=0.026$)



Ryc. 13. Odsetek częstości występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), ostrej białaczki mieloblastycznej (AML), nieziarniczego chłoniaka złośliwego (NHL), młodzieńczej białaczki mielomonocytovej (JMML) oraz ciężkiej anemii aplastycznej (SAA)

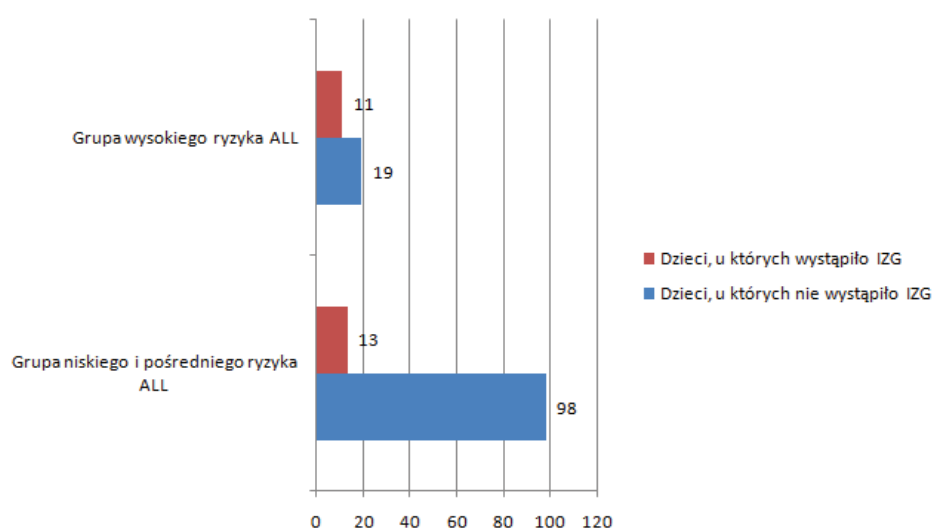
Fig. 13. Incidence ratio of invasive fungal infections (IZG) in children treated for acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid leukemia (AML), non-Hodgkin lymphoma (NHL), juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and severe aplastic anemia (SAA)



Ryc. 14. Rozpoznanie choroby podstawowej u dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi: ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), ostra białaczka mieloblastyczna (AML), nieziarniczy chłoniak złośliwy (NHL), młodzieńcza białaczka mielomonocytovej (JMML) oraz ciężka anemia aplastyczna (SAA)

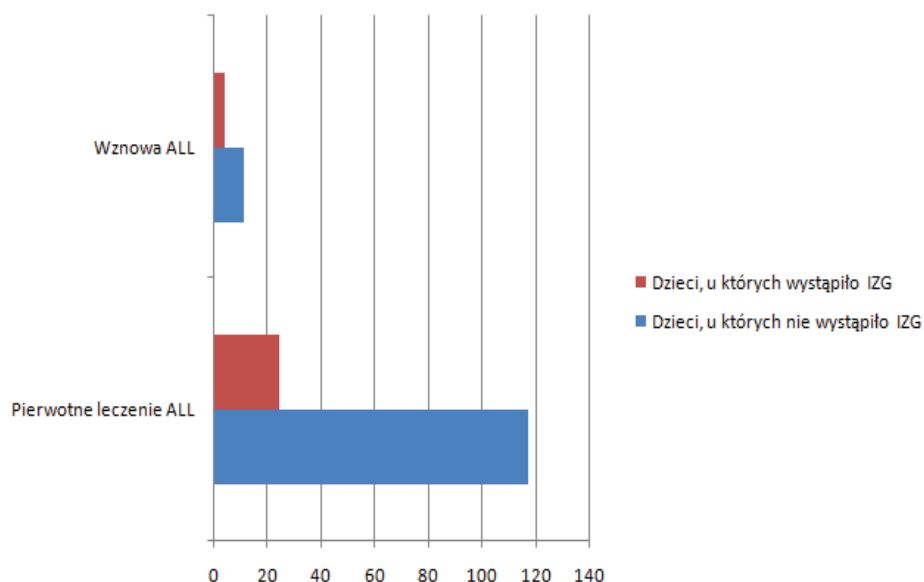
Fig. 14. Underlying disease in children with invasive fungal infections: acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid leukemia (AML), non-Hodgkin lymphoma (NHL), juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and severe aplastic anemia (SAA)

Spośród 156 dzieci z ALL leczonych w obserwowanym okresie, inwazyjne zakażenie grzybicze wystąpiło u 28 dzieci (18%). Wśród 111 dzieci z ALL z grupy niskiego i pośredniego ryzyka, IZG wystąpiło u 13 dzieci (11,7%), natomiast wśród 30 dzieci z grupy wysokiego ryzyka IZG wystąpiło u 11 dzieci (36,7%) (ryc. 15). Obserwowane różnice w częstości występowania IZG pomiędzy opisywanymi grupami wykazywały statystyczną istotność ($p=0,001$). W grupie 141 pacjentów z ALL, którzy byli leczeni z powodu pierwotnego rozpoznania, IZG rozpoznano u 24 dzieci (17%), natomiast u dzieci leczonych z powodu wznowy ALL (15 pacjentów), IZG wystąpiło u 4 chorych (26,7%) (ryc. 16). Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w częstości występowania IZG u dzieci z ALL z uwzględnieniem pierwotnego leczenia i wznów ($p=0,476$).



Ryc. 15. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG) u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) w podziale na grupy ryzyka ($p=0,001$)

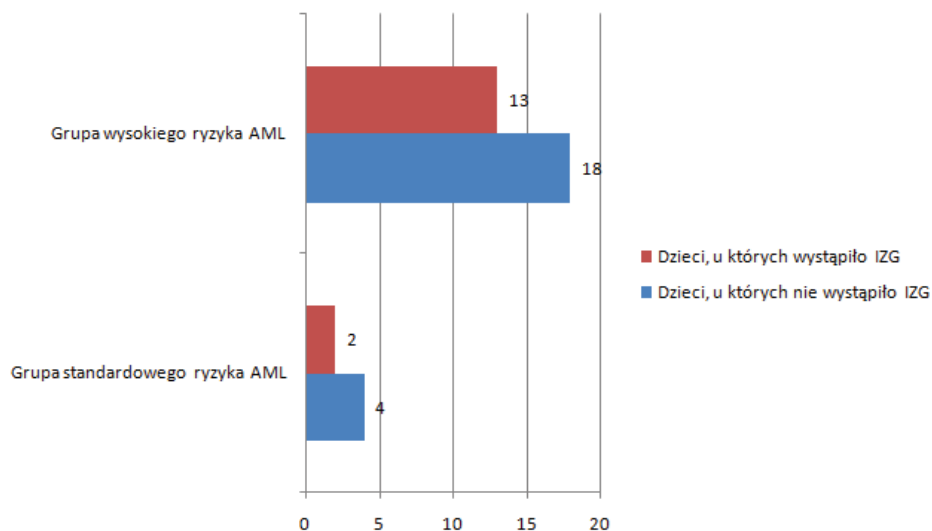
Fig. 15. Incidence of invasive fungal infections (IZG) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) according to the risk group (high risk group vs intermediate-risk and standard-risk group) ($p=0.001$)



Ryc. 16. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG) u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) leczonych pierwotnie lub z powodu wznowy ($p=ns$)

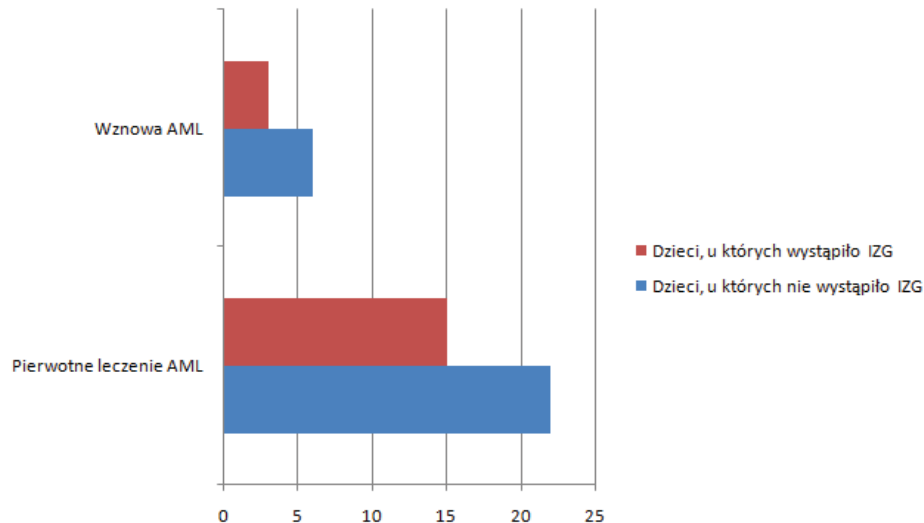
Fig. 16. Incidence of invasive fungal infections (IZG) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) treated for primary diagnosis or relapse ($p=ns$)

Spośród 46 dzieci z AML, IZG wystąpiły u 18 pacjentów (39,1%). Wśród 6 dzieci z AML z grupy standardowego ryzyka, IZG wystąpiło u 2 dzieci (33,3%), natomiast spośród 31 pacjentów z grupy wysokiego ryzyka IZG wystąpiło u 13 dzieci (41,9%) (ryc. 17). Obie grupy nie różniły się w sposób istotnie statystyczny. W grupie 37 pacjentów z AML, którzy byli leczeni z powodu pierwotnego rozpoznania, IZG wystąpiło u 15 dzieci (40,5%), natomiast wśród 9 chorych ze wznową AML, IZG rozpoznano u 3 dzieci (33,3%) (ryc. 18). Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w występowaniu IZG u dzieci z AML z uwzględnieniem pierwotnego leczenia i wznów.



Ryc. 17. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG) u dzieci z ostrą białaczką mieloblastyczną (AML) w podziale na grupy ryzyka ($p=ns$)

Fig. 17. Incidence of invasive fungal infections (IZG) in children with acute myeloid leukemia (AML) according to the risk group (high risk group vs standard-risk group) ($p=ns$)

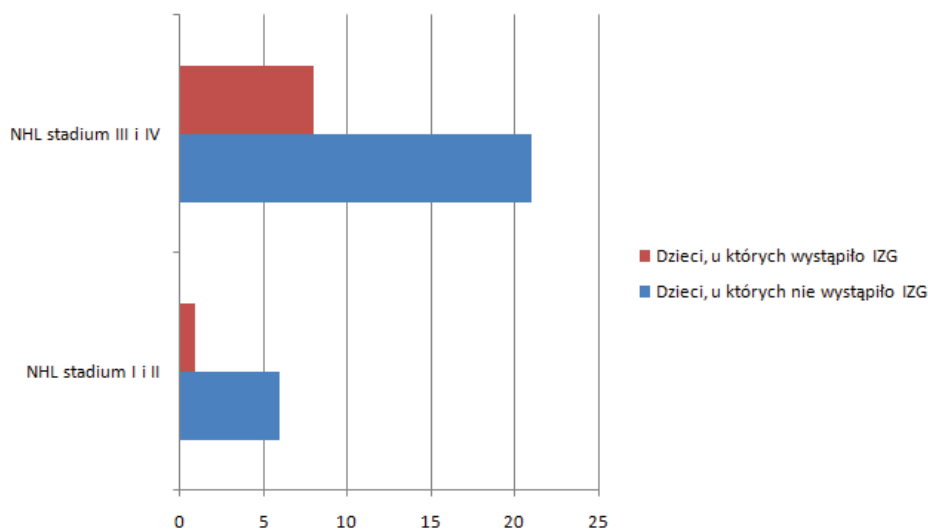


Ryc. 18. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG) u dzieci z ostrą białaczką mieloblastyczną (AML) leczonych pierwszorazowo lub z powodu wznowy ($p=ns$)

Fig. 18. Incidence of invasive fungal infections (IZG) in children with acute myeloid leukemia (AML) treated for primary diagnosis or relapse ($p=ns$)

Wśród 34 dzieci z NHL, IZG stwierdzono u 9 pacjentów (26,5%). Wśród 7 dzieci z NHL w I i II stadium zaawansowania, IZG wystąpiło u jednego dziecka (14,3%), natomiast w grupie 29 dzieci z NHL w III i IV stadium zaawansowania IZG rozpoznano u 8 pacjentów (27,6%) (ryc. 19). Grupy nie różniły się w sposób istotny statystycznie ($p=0,652$).

Wśród pacjentów z *composite lymphoma* (2 chorych), z JMML (3 chorych) i z SAA (4 chorych) IZG obserwowano odpowiednio u 0, 1 i 3 pacjentów.

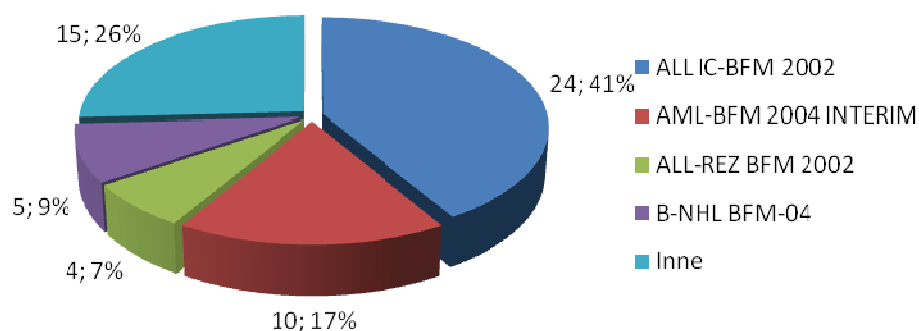


Ryc. 19. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG) u dzieci z nieziarniczym chłoniakiem złośliwym (NHL) w podziale na stadia ($p=ns$)

Fig. 19. Incidence of invasive fungal infections (IZG) in children with non-Hodgkin lymphoma (NHL) according to the stage of disease (stage I and II vs stage III and IV) ($p=ns$)

Stosowane protokoły terapeutyczne

U pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym stosowano następujące protokoły terapeutyczne: ALL IC-BFM 2002 u 24 dzieci (40,7%), AML-BFM 2004 INTERIM u 10 dzieci (17%), ALL-REZ BFM 2002 u 4 dzieci (6,8%), B-NHL BFM-04 u 5 dzieci (8,5%) (ryc. 20). Pozostałe protokoły terapeutyczne stosowano u 15 pacjentów (25,4%): AML-BFM 98 u 5 dzieci (8,5%), IDA FLAG u 3 dzieci (5,1%), protokół dla ciężkich anemii aplastycznych wg WPSAA (Working Party on Severe Aplastic Anaemia) u 3 dzieci (5,1%), ALCL 99 u 2 dzieci (3,4%), IntReALL 2010 u jednego dziecka (1,7%) oraz protokół dla wznów NHL B z rituximabem u jednego dziecka (1,7%). Jedno dziecko z IZG z rozpoznaniem JMML (1,7%) nie otrzymywało leczenia przeciwnowotworowego przed transplantacją komórek krwiotwórczych.

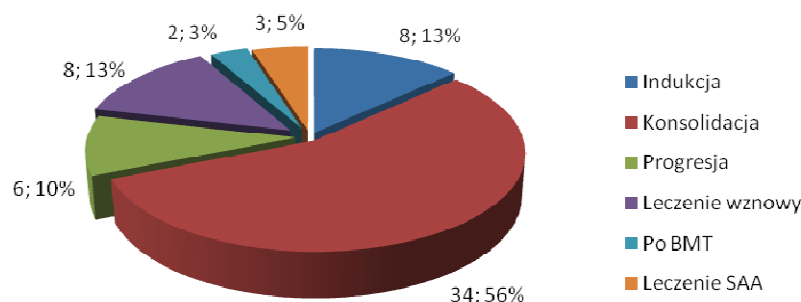


Ryc. 20. Protokoły terapeutyczne w leczeniu choroby podstawowej u dzieci z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym

Fig. 20. Treatment protocols for underlying disease in children with invasive fungal infection

Etap leczenia choroby podstawowej

Rozpoznanie IZG (61 incydentów) postawiono na następujących etapach leczenia choroby podstawowej: indukcja – 8 incydentów (13,1%), konsolidacja – 34 incydenty (55,7%) oraz w trakcie leczenia wznowy – 8 incydentów (13,1%). U 6 dzieci IZG rozpoznano na etapie progresji choroby podstawowej (9,8%). Zakażenie grzybicze stwierdzono także u 2 pacjentów po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych (3,3%) oraz u 3 pacjentów w trakcie realizacji protokołów dla ciężkiej anemii aplastycznej (4,9%) (ryc. 21).



Ryc. 21. Etapy leczenia choroby podstawowej, w czasie których rozpoznano inwazyjne zakażenie grzybicze; BMT – allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych; SAA – ciężka anemia aplastyczna

Fig. 21. Underlying disease treatment periods, when invasive fungal infection was diagnosed; BMT – bone marrow transplantation; SAA – severe aplastic anemia

4.1.2. Charakterystyka incydentów inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Definicja rozpoznania inwazyjnego zakażenia grzybiczego

Rozpoznanie możliwego zakażenia grzybiczego postawiono u 26 dzieci (42,6%), prawdopodobne zakażenie grzybicze rozpoznano u 17 dzieci (27,9%), natomiast udokumentowane zakażenie grzybicze – u 18 dzieci (29,5%) (ryc. 22, tab. 6).

Tabela 6. Definicje rozpoznania inwazyjnego zakażenia grzybiczego wśród analizowanych 61 incydentów zakażenia

Table 6. Definition of invasive fungal infection diagnosis in 61 analysed episodes of infection

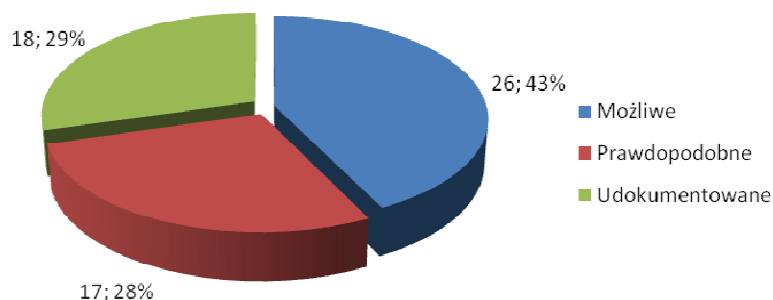
Definicja rozpoznania zakażenia grzybiczego / Fungal infection diagnosis definition	Liczebność Number	Odsetek / Ratio
Udokumentowane / proven:	18	29,5%
- posiew / culture:	12	19,7%
- moczu / urine	7	11,5%
- krwi / blood	5	8,2%
- płyn z jamy opłucnej / pleural fluid	1	1,6%
- badanie histopatologiczne / histopathological examination	6*	9,8%*
Prawdopodobne / probable	17	27,9%
Możliwe / possible	26	42,6%

*w jednym przypadku podstawą rozpoznania było badanie histopatologiczne i posiew płynu z jamy opłucnej / in one child diagnosis was based on histopathological examination and positive pleural fluid culture

Tabela 7. Charakterystyka rozpoznania prawdopodobnej i możliwej grzybicy wg EORTC 2008
 Table 7. Probable and possible fungal infection diagnosis characteristics according EORTC 2008

	Liczba Number
Czynniki zależne od gospodarza / Factors dependent on host	
– neutropenia	43
– allogeniczny przeszczep komórek macierzystych	0
– długotrwała kortykosteroidoterapia	23
– stosowanie leczenia innymi lekami immunosupresyjnymi	1
– wrodzone ciężkie niedobory odporności	0
Kryteria kliniczne / Clinical criteria	
Grzybica dolnych dróg oddechowych / Fungal infection of the lower respiratory tract:	40
– jednolity, dobrze odgraniczony naciek bez/z obłoczkowatymi zmianami <i>halo</i>	35
– objaw powietrznego rąbka w kształcie półksiężyca	2
– jama	3
Grzybica tchawicy i oskrzeli / Trachea and bronchi fungal infection:	0
– obecność owrzodzenia, guzków, błon rzekomych, blaszek i strupów w bronchoskopii	0
Grzybica zatok przynosowych / Paranasal sinuses fungal infection: zapalenie zatok widoczne w badaniu obrazowym oraz:	0
– ostry miejscowy ból	
– owrzodzenia jamy nosowej z wytworzeniem czarnych strupów	
– rozprzestrzenienie zakażenia z zatok nosowych przez barierę kostną do oczodołów	
Grzybica układu nerwowego / Nervous system fungal infection:	0
– zmiany ogniskowe w badaniach obrazowych	
– pogrubienie opon mózgowo-rdzeniowych w obrazie MRI i TK	
Rozsiana kandydoza / Disseminated candidiasis:	3
– małe, punktowe ropnie w śledzionie lub w wątrobie	3
– postępujący wysięk siatkówkowy w badaniu oftalmoskopowym	0
Kryteria mikologiczne / Mycological criteria	
Testy bezpośrednie / Direct tests:	
– wykrycie elementów grzybnii w badaniu mikroskopowym	1
– uzyskanie hodowli grzybów	0
Testy pośrednie / Indirect tests:	1
– aspergiloza – antygen galaktomannanowy	17
– inwazyjna grzybica inna niż kryptokokoza lub zygomycykoza – 1,3 β-D-glukanu w surowicy	17
	0

Szczegółowy opis tabeli – w tab. 4 / Detailed description in table 4



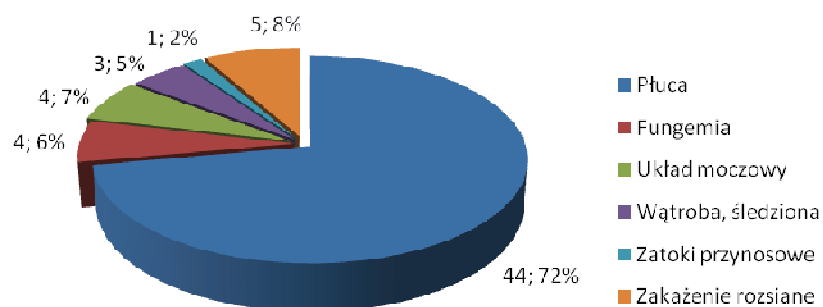
Ryc. 22. Definicja rozpoznania inwazyjnego zakażenia grzybiczego

Fig. 22. Definitions of invasive fungal infection diagnosis

Do rozpoznania prawdopodobnej grzybicy niezbędne było spełnienie wszystkich trzech kryteriów (zależnych od gospodarza, klinicznych i mikologicznych). Przypadki, w których były spełnione kryteria kliniczne i wystąpiły czynniki zależne od gospodarza, bez obecności kryteriów mikologicznych, zakwalifikowano jako możliwe grzybice inwazyjne. Szczegółową charakterystykę kryteriów kwalifikujących do rozpoznania grzybicy prawdopodobnej przedstawiono w tabeli 7.

Lokalizacja inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Zakażenia grzybicze w analizowanej grupie dzieci występowały w następującej lokalizacji narządowej: płuca – 44 incydenty (72,1%), fungemia – 4 incydenty (6,6%), zakażenie układu moczowego – 4 incydenty (6,6%), wątroba i śledziona – 3 incydenty (4,9%) oraz zatoki przynosowe – 1 incydent (1,6%) (ryc. 23). W pięciu przypadkach stwierdzono zakażenie rozsiane (8,2% incydentów IZG), które obejmowało następujące lokalizacje narządowe: wątroba i śledziona + zakażenie układu moczowego – 2 incydenty, jeden incydent współistniejącego zakażenia obu płuc i tarczycy, jeden incydent zajęcia płuc z fungemią oraz jeden incydent jednoczasowego zajęcia płuc, wątroby, śledziony, skóry i gałki ocznej.

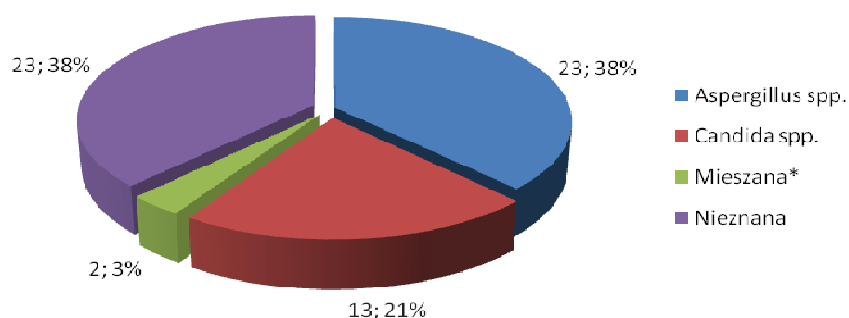


Ryc. 23. Lokalizacja inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Fig. 23. Localization of invasive fungal infections

Etiologia inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Wśród 61 analizowanych incydentów IZG w 23 przypadkach (37,7%) stwierdzono prawdopodobne lub udokumentowane zakażenie *Aspergillus spp.*, w 13 przypadkach (21,3%) – zakażenie *Candida spp.*, natomiast w 23 incydentach (37,7%) nie ustalono etiologii zakażenia grzybiczego (ryc. 24). W jednym przypadku (1,6%) stwierdzono współistniejące zakażenie *Candida spp.* i *Aspergillus spp.* (fungemia i aspergiloza płuc), a w jednym przypadku (1,6%) stwierdzono współistnienie zakażenia w płucach o etiologii *Mucor spp.* i *Aspergillus spp.*



Ryc. 24. Etiologia inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Fig. 24. Etiology of invasive fungal infections

Wśród 13 przypadków zakażeń *Candida*, u 7 pacjentów stwierdzono *Candida glabrata*, w dwóch przypadkach – *Candida parapsilosis*, w jednym przypadku – *Candida albicans*, a w jednym przypadku – *Candida kefyr*. U dwojga dzieci rozpoznanie wątrobowo-śledzionowej kandydiazy ustalono na podstawie typowego obrazu ultrasonograficznego (obraz bawolego oka) oraz obecności antygenu mannanowego w surowicy krwi. Dodatkowo u jednego dziecka z aspergilozą płucną izolowano *Candida glabrata* z krwi, jako drugi patogen. Opisywane patogeny odpowiadały za zakażenia układu moczowego u 7 dzieci (u 6 pacjentów *Candida glabrata*, u 1 pacjenta *Candida albicans*). Fungemię stwierdzoną u 5 dzieci wywołały: *Candida parapsilosis* (dwa przypadki), *Candida glabrata* (dwa przypadki, w tym jeden współistniejący z aspergilozą płuc) oraz *Candida kefyr* (jeden przypadek).

Spośród 23 przypadków aspergilozy, w 22 przypadkach stwierdzono zajęcie płuc, w jednym przypadku *Aspergillus fumigatus* wyizolowano z zatok przynosowych. Udokumentowaną aspergilozę stwierdzono w 9 przypadkach, w tym u dwojga dzieci rozpoznano zakażenie mieszane: *Aspergillus spp.* + *Candida glabrata* oraz *Aspergillus spp.* + *Mucor spp.* U pozostałych 14 dzieci rozpoznano prawdopodobną aspergilozę.

W jednym przypadku rozpoznano zakażenie *Mucor spp.* na podstawie badania mikrobiologicznego płynu z jamy opłucnowej, badania histopatologicznego usuniętego płuca oraz materiału uzyskanego z biopsji gruczołu tarczowego. U tej samej pacjentki stwierdzono dodatni wynik oznaczenia galaktomannanu we krwi (I=0,58; 2,8; 2,1) oraz strzępki *Aspergillus spp.* w badaniu histopatologicznym usuniętego płuca.

Leczenie incydentów inwazyjnego zakażenia grzybiczego

W leczeniu IZG monoterapię zastosowano w 49 przypadkach (80,3%). Stosowano następujące leki przeciwgrzybicze: amfoterycyna B kompleks lipidowy (ABLC, Abelcet®) w 20 przypadkach (32,8%), liposomalna amfoterycyna B (LAmB, Ambisome®) w 18 przypadkach (29,5%), roztwór koloidalny amfoterycyny B (ABCD, Amphocil®) w jednym przypadku (1,6%), kaspofungina (Cancidas®) w 7 przypadkach (11,5%), konwencjonalna postać amfoterycyny B (Fungizone®) w 2 przypadkach (3,3%) oraz worykonazol (Vfend®) w jednym przypadku (1,6%).

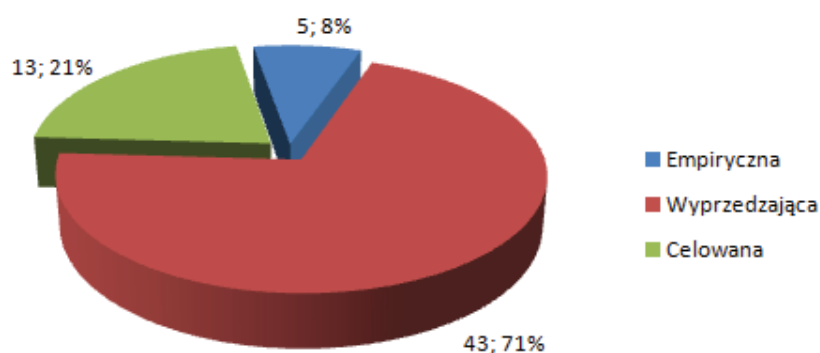
Leczenie skojarzone zastosowano w 12 incydentach zakażenia (19,7%). W terapii skojarzonej zakażeń grzybiczych stosowano następujące leki: Abelcet® + Cancidas® w jednym przypadku (1,6%), Abelcet® + Vfend® w trzech przypadkach (4,9%), Abelcet® + Cancidas® w jednym przypadku (1,6%), Ambisome® + pozakonazol (Noxafil®) w jednym przypadku (1,6%), Ambisome® + Vfend® w 3 przypadkach (4,9%), Ambisome® + Cancidas® w dwóch przypadkach (3,3%) oraz Cancidas® + Vfend® w jednym przypadku (1,6%) (tab. 8).

Wśród 61 incydentów IZG terapię empiryczną wdrożono w 5 przypadkach (8,2%), terapię wyprzedzającą w 43 przypadkach (70,5%), natomiast leczenie celowane włączyło w 13 incydentach (21,3%) (ryc. 25).

Tabela 8. Leczenie przeciwgrzybicze w analizowanej grupie 61 incydentów zakażenia
Table 8. Antifungal treatment in analysed group of 61 infection episodes

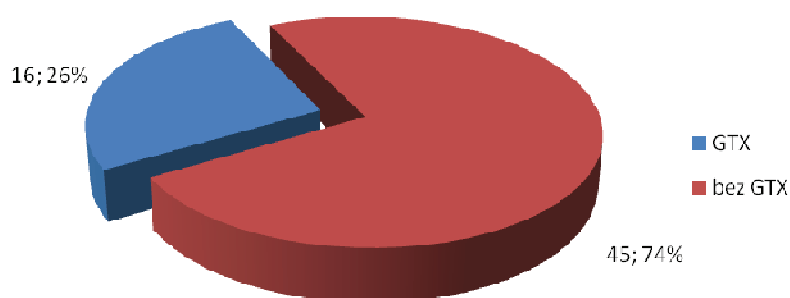
	Liczba Number	Odsetek Ratio
Leki przeciwgrzybicze w monoterapii / <i>Fungal infection treatment in monotherapy:</i>	49	80,3%
– amfoterycyna B kompleks lipidowy (ABLC, Abelcet®)	20	32,8%
– liposomalna amfoterycyna B (LAmB, Ambisome®)	18	29,5%
– roztwór koloidalny amfoterycyny B (ABCD, Amphocil®)	1	1,6%
– kaspofungina (Cancidas®)	7	11,5%
– konwencjonalna postać amfoterycyny B (Fungizone®)	2	3,3%
– worykonazol (Vfend®)	1	1,6%
Leki przeciwgrzybicze w terapii skojarzonej / <i>Combined fungal infection treatment:</i>	12	19,7%
– Abelcet® + Cancidas®	1	1,6%
– Abelcet® + Vfend®	3	4,9%
– Abelcet® + Cancidas®	1	1,6%
– Ambisome® + pozakonazol (Noxafil®)	1	1,6%
– Ambisome® + Vfend®	3	4,9%
– Ambisome® + Cancidas®	2	3,3%
– Cancidas® + Vfend®	1	1,6%

We wszystkich 5 analizowanych incydentach IZG, w których włączono terapię empiryczną, w kolejnych dniach po włączeniu leczenia przeciwgrzybiczego wykonywano badania obrazowe i/lub mikologiczne w celu uzasadnienia włączonej terapii empirycznej. Analiza powyższych incydentów wykazała, że tylko w jednym przypadku nie uzyskano wyniku sugerującego IZG w wymienionych badaniach, podczas gdy u 4 dzieci uzyskano wyniki sugerujące grzybiczą etiologię infekcji.



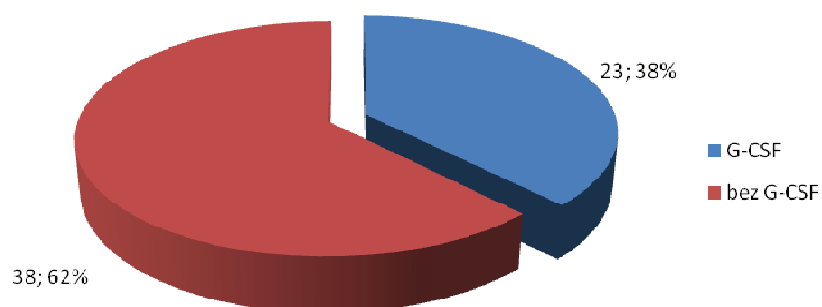
Ryc. 25. Rodzaj zastosowanej terapii przeciwgrzybiczej
Fig. 25. Type of antifungal treatment

Wśród analizowanych 61 incydentów IZG w 16 przypadkach (26%) zastosowano leczenie wspomagające przy pomocy transfuzji koncentratu granulocytów, podczas gdy w 45 przypadkach (74%) nie stosowano tego rodzaju terapii (ryc. 26).



Ryc. 26. Zastosowanie transfuzji koncentratu granulocytów (GTX) w leczeniu infekcji grzybiczej
Fig. 26. Granulocyte units transplantation (GTX) in fungal infection treatment

W 23 incydentach (37,7%) IZG stosowano G-CSF przed rozpoznaniem zakażenia, natomiast w 38 przypadkach (62,3%) nie stosowano tego leku (ryc. 27).



Ryc. 27. Zastosowanie G-CSF w leczeniu zakażenia grzybiczego
Fig. 27. G-CSF in fungal infection treatment

Po 3 tygodniach od włączenia terapii przeciwgrzybiczej całkowitą odpowiedź na zastosowane leczenie uzyskano w 18 przypadkach (29,5%), w 37 odpowiedzi oceniono jako częściową (60,7%), w 4 przypadkach stwierdzono stabilizację choroby (6,6%), natomiast w 2 efekt leczenia oceniono jako niepowodzenie (3,3%). W związku z tym pozytywny efekt terapeutyczny po 3 tygodniach od włączenia leczenia zgodnie z przyjętymi kryteriami uzyskano w 55 incydentach IZG (90,2%).

Po 3 miesiącach od włączenia terapii przeciwgrzybiczej całkowitą odpowiedź na zastosowane leczenie uzyskano w 53 przypadkach (86,9%), w 6 odpowiedzi oceniono jako całkowitą z obecnością masy resztkowej (9,8%), natomiast w 2 przypadkach efekt leczenia oceniono jako niepowodzenie (3,3%). W związku z tym pozytywny efekt terapeutyczny po 3 miesiącach od włączenia leczenia zgodnie z przyjętymi kryteriami uzyskano w 59 incydentach IZG (96,7%).

Współistniejącą inną infekcję niż grzybicza, stwierdzono w 22 przypadkach (36%): w 21 przypadkach było to współistniejące zakażenie bakteryjne potwierdzone mikrobiologicznie, a w jednym – wirusowe (zakażenie wirusem grypy A H1N1).

Średni czas trwania neutropenii przed incydentami IZG wynosił 13,3 dni (minimum 0 dni, maksimum 51 dni). W 59 incydentach (96,7%) czas trwania neutropenii w okresie poprzedzającym IZG wynosił powyżej 3 dni, natomiast w pięciu przypadkach (8,2%) czas trwania neutropenii przekraczał 30 dni. W 56 incydentach czas trwania neutropenii poprzedzającej IZG wynosił mniej niż 30 dni.

Średnia liczba dni stosowanej glikokortykoterapii (GKS) przed wystąpieniem IZG w analizowanej grupie dzieci wynosiła 9 dni (minimum 0, maksimum 42 dni). Czas trwania podaży GKS przed incydentem IZG wynosił mniej niż 3 dni w 20 przypadkach (32,8%), natomiast 3 dni i więcej GKS stosowano w 41 przypadkach (61,2%) (tab. 9).

Tabela 9. Poprzedzająca neutropenia i stosowanie glikokortykosterydów oraz współistniejąca infekcja u dzieci przed rozpoznaniem inwazyjnego zakażenia grzybiczego

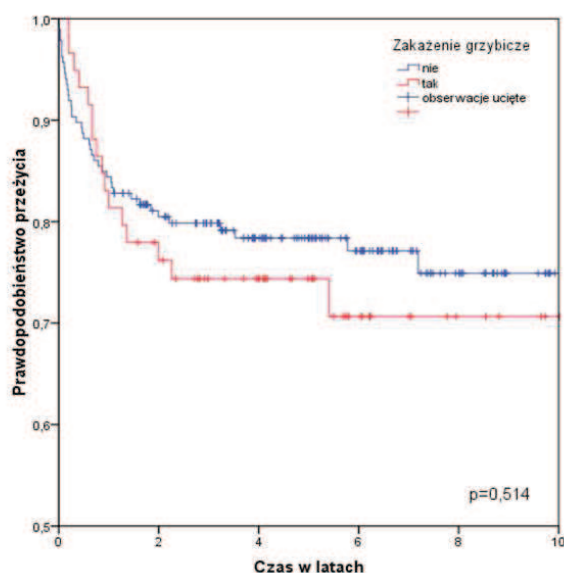
Table 9. Prior neutropenia, steroidotherapy and coexisting infection in children with invasive fungal infection diagnosis

	Liczba Number	Odsetek Ratio
Poprzedzająca neutropenia / Prior neutropenia (średnio dni / mean days: 13,3)	59	96,7%
Terapia glikokortykosterydami / Steroidotherapy (średnio dni / mean days: 9)	41	61,2%
Współistniejąca infekcja / Coexisting infection:		
- bakteryjna / bacterial	21	34,4%
- wirusowa / viral	1	1,6%

4.1.3. Ocena przeżycia pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym

Do momentu zakończenia obserwacji (31 styczeń 2013 roku) żyło 43 z 59 dzieci, u których wystąpiło inwazyjne zakażenie grzybicze, co stanowi 73%. Szesnaścioro dzieci (27%) z tej grupy zmarło. Zakażenie grzybicze było w tej grupie pacjentów przyczyną zgonu u dwójga dzieci (3,4%). Inne przyczyny zgonów w tej grupie chorych to: progresja choroby podstawowej u pięciorga dzieci (31,3%), infekcja inna niż IZG u jednego dziecka (6,3%), siedmiorgo dzieci (43,8%) zginęło z powodu powikłań BMT, natomiast jedno dziecko (6,3%) zmarło z powodu powikłań leczenia przeciwnowotworowego.

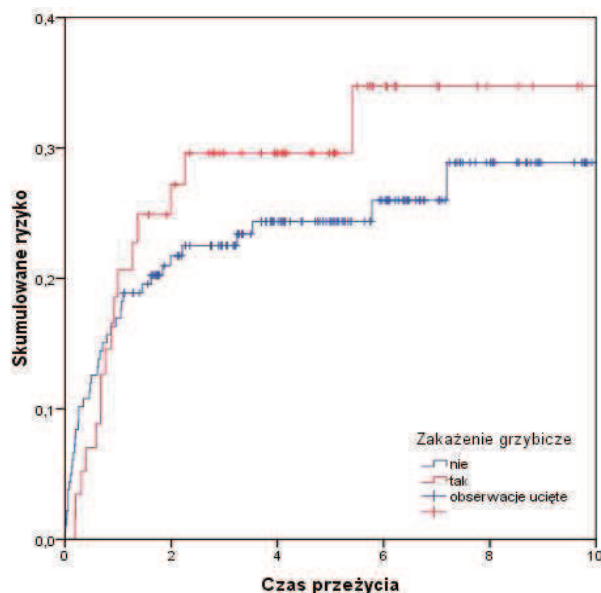
Pięcioletnie przeżycie w całej analizowanej grupie dzieci ($n=245$) wynosiło 77,4% natomiast 10-letnie – 73,7%. Średnie obserwowane przeżycie dzieci ze schorzeniami rozrostowymi układu krwiotwórczego i ciężką anemią aplastyczną z przebyłym IZG w analizowanym okresie wynosiło 90 miesięcy, natomiast u dzieci, u których IZG nie wystąpiło – 96,5 miesiąca. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w długości przeżycia pomiędzy obiema grupami ($p=0,514$) (ryc. 28). Obliczono, iż prawdopodobieństwo przeżycia roku od rozpoznania choroby podstawowej w grupie dzieci z IZG wynosiła 81,4%, natomiast u dzieci bez IZG – 84,4%. Pięcioletnie przeżycie i 10-letnie przeżycie w analizowanej grupie pacjentów ze schorzeniami rozrostowymi układu krwiotwórczego i ciężką anemią aplastyczną z przebyłym IZG wynosiło odpowiednio 74,4% i 70,7%, natomiast u dzieci, u których IZG nie wystąpiło odpowiednio 78,4% i 74,9%. Wykres skumulowanego ryzyka zgonu w zależności od czasu od rozpoznania choroby podstawowej w obu grupach przedstawiono na rycinie 29.



Czas obserwacji (lata)	0	1	2	3	4	5	10
Pozostało w obserwacji – bez zakażenia grzybiczego	186	157	133	118	94	77	3
Pozostało w obserwacji – zakażenie grzybicze	59	49	43	35	31	23	1

Ryc. 28. Wykres funkcji przeżycia Kaplan-Meier'a dzieci ze schorzeniami rozrostowymi układu krwiotwórczego i ciężką anemią aplastyczną z uwzględnieniem wystąpienia inwazyjnego zakażenia grzybiczego ($p=0,514$)

Fig. 28. Kaplan-Meier survival plots for children with hematological proliferative diseases and severe aplastic anemia according to invasive fungal infection occurrence ($p=0.514$)



Ryc. 29. Wykres skumulowanego ryzyka zgonu w zależności od czasu od rozpoznania choroby podstawowej z uwzględnieniem wystąpienia inwazyjnego zakażenia grzybiczego

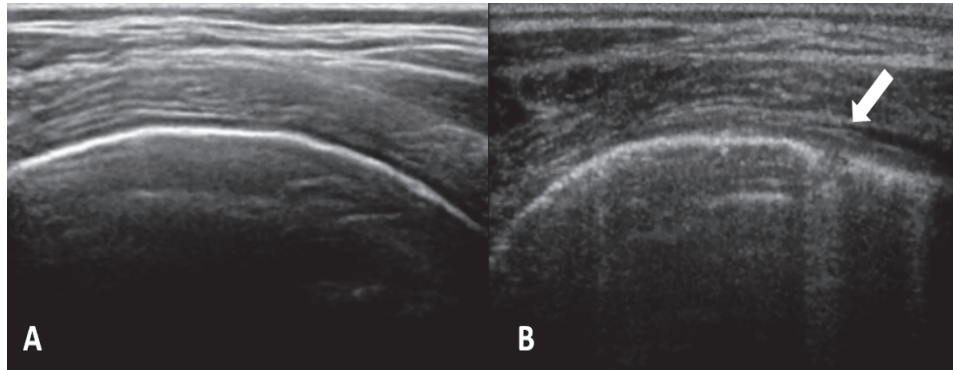
Fig. 29. Hazard function in survival analysis depending on the time from the diagnosis of underlying disease according to invasive fungal infection occurrence

4.2. Analiza wybranych aspektów diagnostyki i terapii inwazyjnych zakażeń grzybiczych

4.2.1. Ocena przydatności badania ultrasonograficznego we wczesnej diagnostyce inwazyjnej grzybicy płuc u dzieci

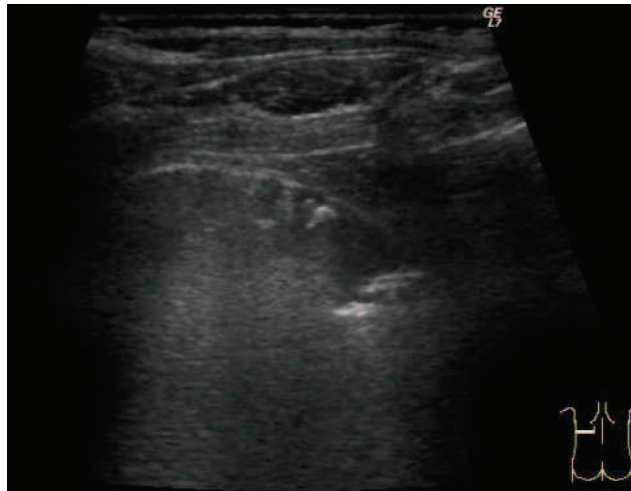
Do badań zakwalifikowano 36 dzieci z gorączką neutropeniczną, u których w procesie diagnostycznym zakażenia grzybiczego wykonano zarówno PUBP, jak również badanie TK klatki piersiowej. Na podstawie obrazu klinicznego mogącego sugerować IZG podejmowano decyzję o wykonaniu PUBP, które weryfikowano badaniem TK klatki piersiowej.

Podejrzanie zakażenia grzybiczego płuc na podstawie PUBP wysunięto u 25 z 36 dzieci. Wśród charakterystycznych cech dla zakażenia grzybiczego w PUBP opisano: nieprawidłową linię opłucnej u 24 dzieci (ryc. 30), obecność obszarów konsolidacji z nieregularnym zarysem brzeżnym zmiany u 18 dzieci (ryc. 31), niejednorodną echosukturę u 25 dzieci (w tym u 2 pacjentów stwierdzono obecność ropnia w mięszu płuca) (ryc. 32), obecność bronchogramu u 17 pacjentów (ryc. 33) natomiast nieprawidłowy wzorec unaczynienia zmian (ocena z wykorzystaniem opcji Dopplera kodowanego kolorem) u 24 dzieci (ryc. 34).



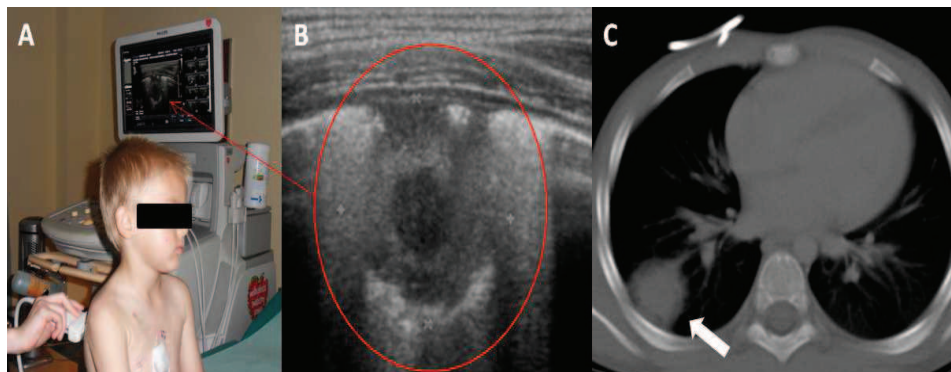
Ryc. 30. Przekłatkowe ultrasonograficzne badanie płuc: A) prawidłowy obraz linii opłucnej – obrazowanie głowicą liniową, przyłożenie głowicy poprzeczne; B) widoczne zmiany w linii opłucnej: odcinkowe pogrubienie linii opłucnej (strzałka), lokalny zespół śródmiąższowo-pęcherzykowy i artefakty linii I i artefakty linii Z – obrazowanie głowicą liniową, przyłożenie głowicy poprzeczne

Fig. 30. Chest ultrasound: A) normal pleural line - linear transducer, transverse scan ; B) pathological changes in pleural line: focal pleural line thickening, local alveolar-interstitial syndrome with line I and line Z artifacts - linear transducer, transverse scan



Ryc. 31. Podopłucnowy obszar konsolidacji z nieregularnym i źle ograniczonym zarysem brzeżnym, z niejednorodną echostrukturą i hiperechogenną zmianą odpowiadającą obecności pułapki powietrznej.

Fig. 31. Hyperechogenic subplural consolidaton with irregular, blurred borders, heterogenous echostructure and with air trapping



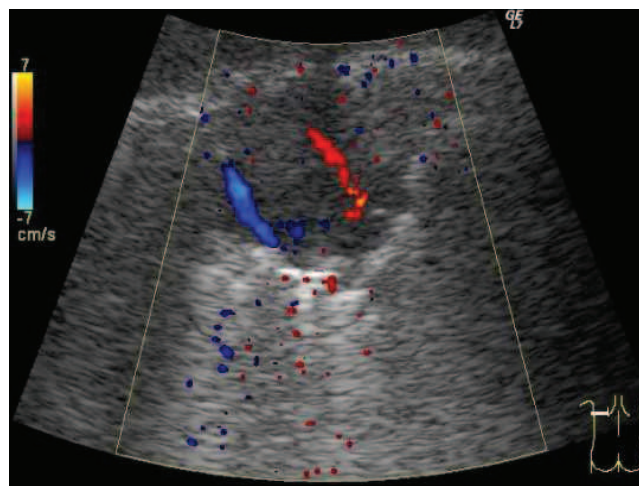
Ryc. 32. Ropień w mięszu płuca o etiologii grzybiczej: A) pacjent podczas przezklatkowego ultrasonograficznego badania płuc; B) obraz ropnia uwidoczniony w przezklatkowym ultrasonograficznym badaniu płuc; C) ropień prawego płuca o etiologii grzybiczej (strzałka) w badaniu tomografii komputerowej klatki piersiowej

Fig. 32. Fungal abscess in the lung: A) patient during chest ultrasound; B) ultrasound image of lung abscess; C) CT examination – fungal abscess in the right lung (arrow)



Ryc. 33. Podopłucnowy obszar konsolidacji z niejednorodną echostrukturą i nieprawidłowym bronchogramem powietrznym

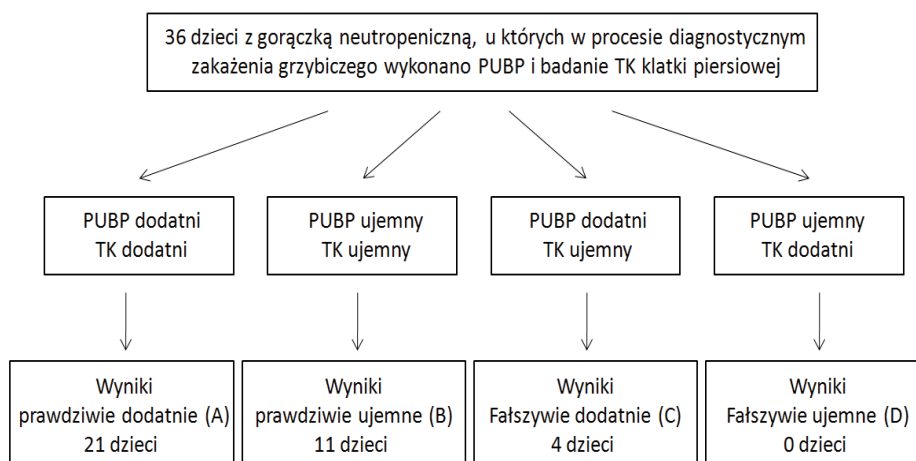
Fig. 33. Subpleural consolidation with heterogeneous echostructure and abnormal air bronchogram



Ryc. 34. Podopłucnowy obszar konsolidacji z nieregularnym zarysem brzeżnym, z niejednorodną echostrukturą i nieprawidłowym wzorcem unaczynienia w opcji dopplera kodowanego kolorem
Fig. 34. Subpleural consolidation, with irregular, blurred borders, heterogenous echostructure and with abnormal vascular pattern in color-doppler examination

Wstępną sugestię IZG płuc wysuniętą na podstawie PUBP potwierdzono badaniem TK klatki piersiowej u 21 dzieci (wyniki prawdziwie dodatnie – A), natomiast nie potwierdzono jej u 4 dzieci (wyniki fałszywie dodatnie – C). U 11 dzieci z badanej grupy nie wykazano zmian charakterystycznych dla grzybicy płuc w badaniu PUBP co potwierdzono prawidłowym wynikiem badania TK klatki piersiowej (wyniki prawdziwie ujemne – B). W analizowanej grupie nie było żadnego dziecka, u którego nie podejrzewano IZG na podstawie obrazu PUBP, a w badaniu TK klatki piersiowej wykazano cechy charakterystyczne dla IZG (wyniki fałszywie ujemne – D) (ryc. 35). W badaniu TK klatki piersiowej rozpoznanie IZG płuc postawiono w oparciu o obecność: guzków (13 dzieci) lub obszarów konsolidacji (8 dzieci), jam w miąższu płucnym (2 pacjentów), objawu *halo* (6 dzieci), objawu "półksiężyca" (*crescent sign*) (1 pacjent). U 2 pacjentów stwierdzono obecność ropnia w miąższu płuc.

Na podstawie uzyskanych danych obliczono, iż czułość PUBP w rozpoznawaniu IZG płuc weryfikowana badaniem TK klatki piersiowej wynosi 100%, natomiast swoistość metody wynosi 73,3%. Dodatnia wartość predykcyjna (PPV) opisywanego badania wynosi 65,6%, natomiast ujemna wartość predykcyjna (NPV) – 100%.



Ryc. 35. Wyniki przezklatkowego ultrasonograficznego badania płuc (PUBP) i badania tomografii komputerowej klatki piersiowej (TK) u 36 dzieci z gorączką neutropeniczną z podejrzeniem inwazyjnego zakażenia grzybiczego (opis w tekście)

Fig. 35. Transthoracic lung ultrasonography (PUBP) and computed tomography examination (TK) in 35 children with neutropenic fever and suspicion of invasive fungal infection (details in text)

4.2.2. Ocena wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w grupie dzieci otrzymujących glikokortykosterydy w ramach stosowanego programu terapeutycznego

Etap pierwszy (A) - wprowadzenie programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (ZGW)

U wszystkich dzieci zakwalifikowanych do programu przeprowadzany był wywiad dotyczący rodzinnego obciążenia cukrzycą, obliczany BMI oraz wykonywane wstępne badania laboratoryjne: C-peptyd oraz poziom insuliny na czczo. Ze względu na ciężki stan ogólny pacjentów związany z chorobą podstawową nie wykonywano krzywej po doustnym obciążeniu glukozą.

Na podstawie uzyskanych wyników wyodrębniano **grupę dzieci z podwyższonym ryzykiem rozwoju hiperglikemii posterydowej**. Były to dzieci spełniające jedno z następujących kryteriów: C-peptyd $<0,9$ lub $>2,5$ ng/ml, insulina na czczo <3 lub >15 mU/l, wywiad u krewnych 1 i/lub 2 stopnia dodatni w kierunku cukrzycy i otyłości oraz BMI >95 centyla (tab. 10). W tej grupie dzieci codziennie oznaczano glikemię na czczo oraz glikemię poposiłkową (2 godziny po głównych posiłkach). U pozostałych dzieci zakwalifikowanych do programu – oznaczano codziennie glikemię na czczo. Przy stwierdzeniu jakichkolwiek nieprawidłowości w gospodarce węglowodanowej pacjentom odstawiano płyny infuzyjne z glukozą, wprowadzano dietę z ograniczeniem węglowodanów oraz systematycznie monitorowano glikemię (na czczo oraz 2 godziny po głównych posiłkach). Każdorazowo w takich przypadkach przeprowadzano konsultację

diabetologiczną oraz szkolenie rodziców i dzieci na temat stosowania odpowiedniej diety. Przy rozpoznaniu cukrzycy włączano insulinoterapię (insulinę bazalną lub intensywną insulinoterapię). W przypadku, gdy glikokortykosterydy były stosowane pierwszorazowo w cyklu chemioterapii lub nie stwierdzono zaburzeń gospodarki węglowodanowej (ZGW) w poprzednim cyklu leczenia stosowano schemat A (ryc. 36). Jeśli w trakcie pierwszego cyklu chemioterapii u dziecka stwierdzano zaburzenia gospodarki węglowodanowej, w kolejnym cyklu wdrażano monitorowanie glikemii zarówno na czczo, jak i po posiłkach (schemat B – ryc. 37). W przypadku, gdy hiperglikemię stwierdzano w dwóch kolejnych cyklach chemioterapii, przy kolejnym wdrożeniu GKS, po konsultacji diabetologicznej, równolegle włączano insulinę (schemat C – ryc. 38). Kryterium zastosowania insuliny było stężenie glukozy w osoczu krwi żyłnej na czczo wynoszące 126 mg/dl i powyżej oraz stężenie glukozy w osoczu krwi żyłnej 2 godziny po posiłku wynoszące 200 mg/dl i powyżej.

Tabela 10. Kryteria włączenia do grupy podwyższonego ryzyka rozwoju hiperglikemii posterydowej

Table 10. Inclusion criteria for the group of increased risk of steroid-induced hyperglycemia development

Spełnienie jednego z poniższych kryteriów / <i>One of the following criteria</i>	
–	C-peptyd <0,9 lub >2,5 ng/ml
–	poziom insuliny na czczo <3 lub >15 mU/l
–	wywiad u krewnych 1 i/lub 2 stopnia dodatni w kierunku cukrzycy i otyłości
–	BMI >95 centyla

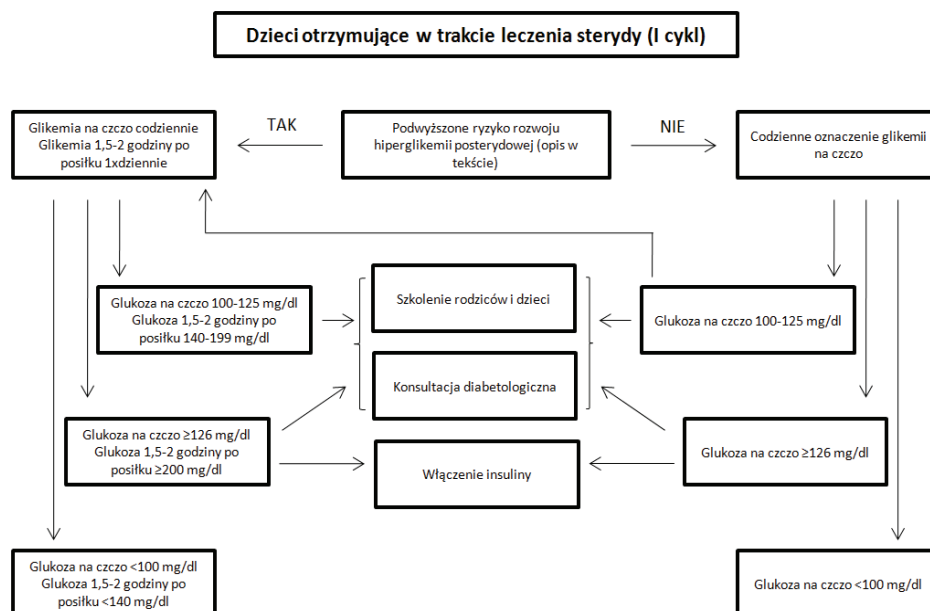
BMI – *body mass index*

Tabela 11. Charakterystyka grupy objętej programem wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (AI) oraz grupy kontrolnej (AII)

Table 11. Characteristics of the patient group screening for the early carbohydrate metabolism disturbances (AI) and the control group (AII)

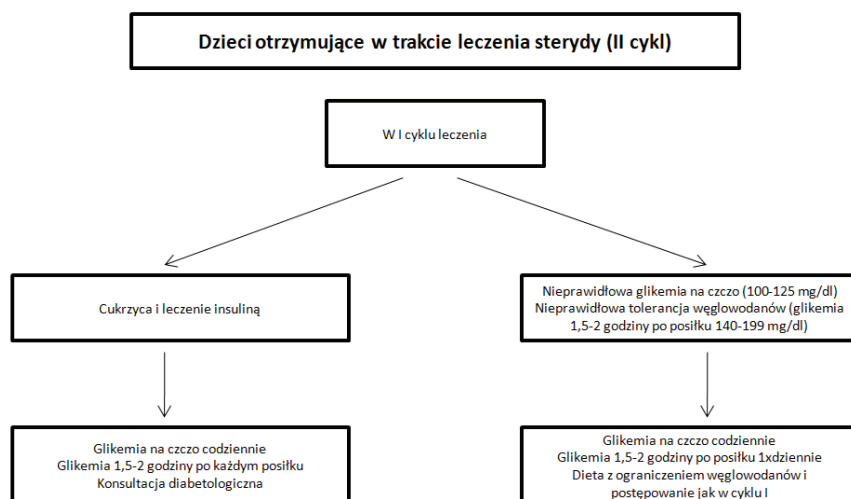
	Grupa / <i>group</i> AI (n=83)	Grupa / <i>group</i> AII (n=69)	<i>p</i>
Płeć / <i>gender</i>	52 chłopców; 31 dziewczynek	33 chłopców; 36 dziewczynek	0,067
Wiek / <i>age</i> (średnia / <i>mean</i> (SD))	7,3 (4,3)	6,9 (4,8)	0,368
BMI (średnia / <i>mean</i> (SD))	17,1 (2,96)	16,9 (3,1)	0,703

SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*; BMI – *body mass index*



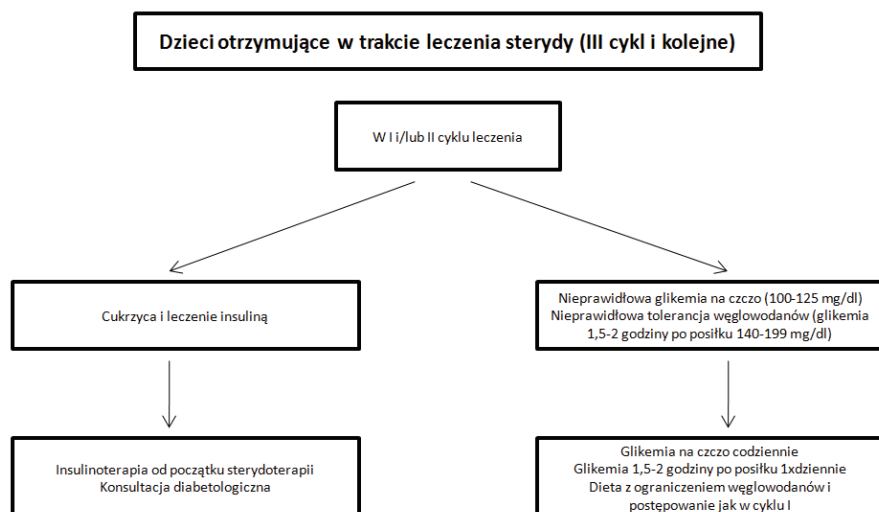
Ryc. 36. Schemat A programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (opis w tekście)

Fig. 36. Early detection of carbohydrate metabolism disturbances programme – protocole A (description in text)



Ryc. 37. Schemat B programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (opis w tekście)

Fig. 37. Early detection of carbohydrate metabolism disturbances programme – protocole B (description in text)



Ryc. 38. Schemat C programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (opis w tekście)

Fig. 38. Early detection of carbohydrate metabolism disturbances programme – protocole C (description in text)

Od października 2008 roku programem wczesnego wykrywania ZGW objęto 83 dzieci (grupa AI). Na podstawie wstępnych badań do grupy zwiększonego ryzyka wystąpienia ZGW w tej grupie zakwalifikowano 45 dzieci (54,2%). Grupę kontrolną (grupa AII) stanowiło 69 dzieci leczonych w okresie od września 2005 roku do września 2008 roku. Charakterystykę obu grup przedstawiono w tabeli 11.

W grupie AI średnia wieku dzieci wynosiła 7,3 lat (SD=4,3 lat; minimum 0,75 roku; maksimum 17,4 lat), natomiast w grupie AII 6,9 lat (SD=4,8 lat; minimum 0,25 roku; maksimum 17,6 lat). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie wieku dzieci w obu grupach ($p=0,368$).

W grupie AI było 52 chłopców i 31 dziewczynek, podczas gdy w grupie AII było 33 chłopców i 36 dziewczynek. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie płci w obu grupach ($p=0,067$).

Średnia wartość BMI w grupie AI wynosiła 17,1 (SD=2,96; minimum 12,9; maksimum 25,7), natomiast w grupie AII 16,9 (SD=3,1; minimum 11,3; maksimum 26,3). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie wartości BMI w obu analizowanych grupach ($p=0,703$).

W grupie AI znalazło się 66 dzieci z rozpoznaniem ALL (79,5%), 11 dzieci z NHL B (13,3%), 3 dzieci z NHL T (3,6%), jedno dziecko z NHL pre B (1,2%) oraz 2 dzieci z SAA (2,4%). W grupie AII znalazło się 57 dzieci z rozpoznaniem ALL (82,6%), 6 dzieci z NHL B (8,7%), jedno dziecko z NHL T (1,5%), 3 dzieci z ALCL (4,4%) oraz 2 dzieci z SAA (2,9%) (tab. 12). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie rozpoznania choroby podstawowej pomiędzy analizowanymi grupami dzieci ($p=0,343$).

W grupie AI zgodnie z protokołem ALL IC-BFM 2002 leczono 54 dzieci (65,1%), zgodnie z protokołem ALL-REZ BFM 2002 leczono 8 dzieci (9,6%), zgodnie z protokołem B-NHL BFM-04 leczono 11 dzieci (13,3%), natomiast 10 dzieci (12,1%) leczono pozostałymi programami terapeutycznymi. W grupie AII zgodnie z protokołem ALL IC-

BFM 2002 leczono 51 dzieci (73,9%), zgodnie z protokołem ALL-REZ BFM 2002 leczono 4 dzieci (5,8%), zgodnie z protokołem B-NHL BFM-04 leczono 5 dzieci (7,3%), natomiast 9 dzieci (13%) leczono pozostałymi programami terapeutycznymi (tab. 12). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy rozkładem stosowanych protokołów terapeutycznych w obu ocenianych grupach ($p=0,491$).

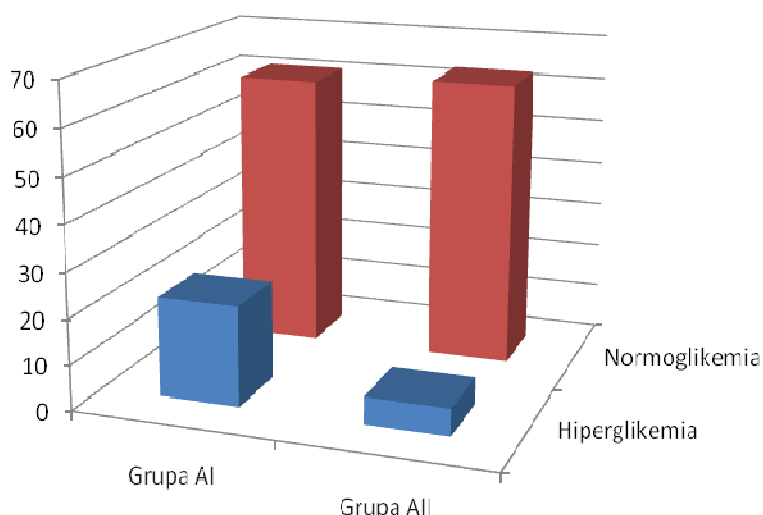
Tabela 12. Rozpoznanie choroby podstawowej i stosowane protokoły terapeutyczne w grupie pacjentów objętych programem wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (AI) oraz w grupie kontrolnej (AII)

Table 12. Underlying disease and treatment protocols in the group of patients with early detection of carbohydrate disturbances programme implementation (AI) and in the control group (AII)

	Grupa / group AI	Grupa / group AII	p
Rozpoznanie choroby podstawowej / underlying disease			
– ALL	66 (79,5%)	57 (82,6%)	0,343
– NHL B	11 (13,3%)	6 (8,7%)	
– NHL T	3 (3,6%)	1 (1,5%)	
– NHL pre B	1 (1,2%)	-	
– ALCL	-	3 (4,4%)	
– SAA	2 (2,4%)	2 (2,9%)	
Stosowane protokoły lecznicze / treatment protocols			
– ALL IC-BFM 2002	54 (65,1%)	51 (73,9%)	0,491
– ALL-REZ BFM 2002	8 (9,6%)	4 (5,8%)	
– B-NHL BFM-04	11 (13,3%)	5 (7,3%)	
– inne / others*	10 (12,1%)	9 (13%)	

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna / *acute lymphoblastic leukemia*; NHL B – nieziarniczy chłoniak złośliwy B-komórkowy / *B-cell non-Hodgkin lymphoma*; NHL T – nieziarniczy chłoniak złośliwy T-komórkowy / *T-cell non-Hodgkin lymphoma*; NHL pre B – nieziarniczy chłoniak złośliwy pre B / *pre B-cell non-Hodgkin lymphoma*; ALCL – chłoniak anaplastyczny wielkokomórkowy / *anaplastic large-cell lymphoma*; SAA – ciężka anemia aplastyczna / *severe aplastic anemia*; * – ALCL 99, Euro-LB02, Interfant-06, WPSAA

W analizie porównawczej częstości występowania hiperglikemii posterydowej wykazano, że w grupie AI hiperglikemię rozpoznano u 22 dzieci (26,5%), natomiast w grupie AII u 6 pacjentów (8,7%) (ryc. 39). Obie grupy różniły się istotnie statystycznie pod względem częstości występowania hiperglikemii posterydowej ($p=0,005$). W żadnej z grup nie było dzieci, u których przed włączeniem leczenia przeciwnowotworowego stwierdzono cukrzycę.



Ryc. 39. Częstość występowania hiperglikemii posterydowej w grupie pacjentów objętych programem wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej (AI) oraz w grupie kontrolnej (AII)($p=0,005$)

Fig. 39. Incidence of steroid-induced hyperglycaemia in the group of patients with early detection of carbohydrate disturbances programme implementation (AI) and in the control group (AII)($p=0.005$)

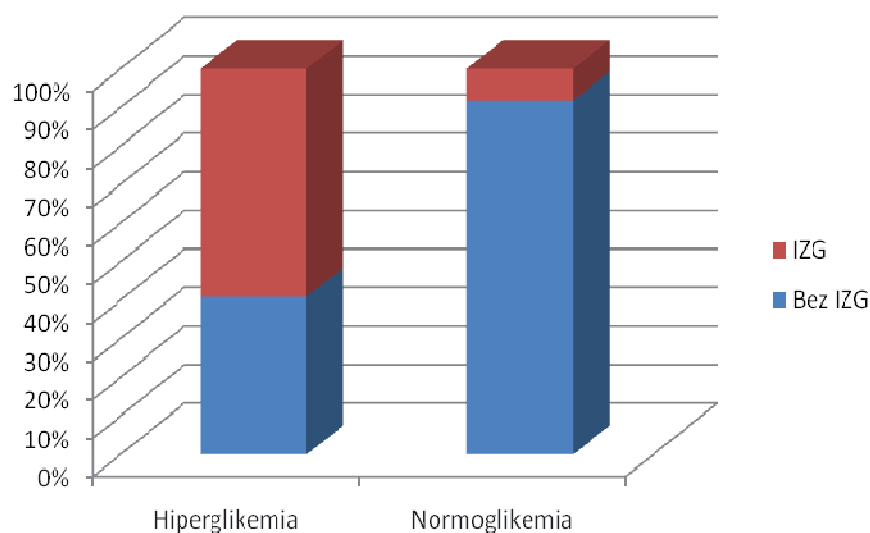
Etap drugi (B) – analiza wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych u 83 dzieci, u których stosowano program wczesnego rozpoznawania ZGW (grupa AI)

W grupie 22 dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową (grupa BI) – IZG rozpoznano u 13 pacjentów (59,1%). W grupie 61 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii posterydowej (grupa BII), IZG stwierdzono u 5 pacjentów (8,2%). Obie grupy różniły się istotnie statystycznie pod względem częstości występowania IZG ($p<0,001$) (ryc. 40, tab. 13).

Tabela 13. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w grupie dzieci, u których wystąpiła hiperglikemia posterydowa (BI) oraz w grupie dzieci, u których hiperglikemia posterydowa nie wystąpiła (BII)

Table 13. Incidence of invasive fungal infections in the group of children with steroid-induced hyperglycaemia (BI) and in the group of children with normoglycaemia (BII)

	Inwazyjne zakażenie grzybicze / <i>Invasive fungal infection</i>		<i>p</i>
	Tak / <i>yes</i>	Nie / <i>no</i>	
Dzieci z posterydową hiperglikemią / <i>post-steroid hyperglycaemia children group (BI)</i>	13	9	<0,001
Dzieci z normoglikemią / <i>normoglycaemia children group (BII)</i>	5	56	



Ryc. 40. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w grupie dzieci, u których wystąpiła hiperglikemia posterydowa oraz w grupie dzieci, u których hiperglikemia posterydowa nie wystąpiła

Fig. 40. Incidence of invasive fungal infections in the group of children with steroid-induced hyperglycaemia and in the group of children with normoglycaemia

W analizie czasu trwania neutropenii poprzedzającej wystąpienie IZG nie wykazano różnic pomiędzy dziećmi, u których wystąpiła hiperglikemia i u których hiperglikemii nie obserwowano ($p=0,268$). Czas trwania neutropenii u dzieci z hiperglikemią posterydową i IZG (13 dzieci) wynosił średnio 16,5 dni (minimum 5 dni; maksimum 51 dni), natomiast u dzieci z IZG i bez hiperglikemii posterydowej średni czas neutropenii wynosił 9,6 dni (minimum 6 dni; maksimum 15 dni).

Następnie analizowano wpływ hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG u dzieci leczonych poszczególnymi protokołami terapeutycznymi (tab. 14).

Grupa dzieci leczonych wg protokołu ALL IC-BFM 2002

W grupie pacjentów leczonych zgodnie z protokołem ALL IC-BFM 2002, wśród 8 dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową – IZG rozpoznano u 4 pacjentów (50%), natomiast spośród 45 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii, IZG rozpoznano u 5 dzieci (11,1%). Obie podgrupy dzieci różniły się w sposób istotny statystycznie ($p=0,021$).

Tabela 14. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych, u dzieci u których wystąpiła hiperglikemia posterydowa (BI) oraz w grupie dzieci, u których hiperglikemia posterydowa nie wystąpiła (BII) z uwzględnieniem stosowanego protokołu terapeutycznego

Table 14. Incidence of invasive fungal infections in the group of children with steroid-induced hyperglycaemia (BI) and in the group of children with normoglycaemia (BII) according to the treatment protocol

Protokół terapeutyczny <i>Treatment protocol</i>	Hiperglikemia posterydowa / <i>post-steroid hyperglycaemia</i> (BI)		Normoglikemia / <i>normogly-</i> <i>caemia</i> (BII)		<i>p</i>
	Inwazyjne zakażenie grzybicze <i>/ invasive fungal infection</i>		Inwazyjne zakażenie grzybi- <i>cze / invasive fungal infection</i>		
	Tak / <i>yes</i>	Nie / <i>no</i>	Tak / <i>yes</i>	Nie / <i>no</i>	
ALL IC-BFM 2002	4 (50%)	4 (50%)	5 (11,1%)	40 (88,9%)	0,021
ALL-REZ BFM 2002	2 (40%)	3 (60%)	0	3 (100%)	0,464
B-NHL BFM-04	3 (75%)	1 (25%)	0	7 (100%)	0,024
Inne / <i>others*</i>	4 (80%)	1 (20%)	0	6 (100%)	0,015

* – ALCL 99, Euro-LB02, Interfant-06, WPSAA

W szczegółowej analizie pacjentów leczonych zgodnie z protokołem ALL IC-BFM 2002 oceniono częstość występowania IZG u dzieci z hiperglikemią i bez hiperglikemii posterydowej z uwzględnieniem grupy ryzyka (grupa standardowego i pośredniego ryzyka vs grupa wysokiego ryzyka). W grupie standardowego i pośredniego ryzyka, wśród 4 dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową, IZG rozpoznano u jednego dziecka (25%), natomiast spośród 38 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii posterydowej, IZG rozpoznano u 3 pacjentów (7,9%) (tab. 15).

Tabela 15. Częstość występowania hiperglikemii posterydowej w grupie dzieci leczonych zgodnie z protokołem ALL IC-BFM 2002, u których wystąpiły inwazyjne zakażenia grzybicze z uwzględnieniem grupy ryzyka

Table 15. Incidence of steroid-induced hyperglycaemia in children with invasive fungal infections, treated with ALL IC-BFM 2002 protocole, according to the risk group

ALL IC-BFM 2002 – risk group	Inwazyjne zakażenia grzybicze <i>Invasive fungal infections</i>		Inwazyjne zakażenie grzybicze nie wystąpiło / <i>without invasive fungal infection</i>		<i>p</i>
	Hiperglikemia posterydowa <i>Post-steroid hyperglycaemia</i>	Normoglikemia <i>Normoglycaemia</i>	Hiperglikemia posterydowa <i>Post-steroid hyperglycaemia</i>	Normoglikemia <i>Normoglycaemia</i>	
Standardowe i pośrednie <i>Standard and intermediate</i>	1	3	3	35	0,341
Wysokie <i>High</i>	3	2	1	5	0,242

Pomimo obserwowanych różnic w odsetku występowania IZG w omawianych podgrupach pacjentów, nie wykazano pomiędzy nimi statystycznie istotnych różnic ($p=0,341$). W grupie wysokiego ryzyka, spośród 4 dzieci, u których hiperglikemię poste-

rydową stwierdzono, IZG rozpoznano u 3 pacjentów (75%), natomiast wśród 7 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii posterydowej, IZG rozpoznano u 2 pacjentów (28,6%). Pomimo obserwowanych różnic w odsetku występowania IZG w omawianych podgrupach pacjentów nie wykazano pomiędzy nimi statystycznie istotnych różnic ($p=0,242$).

Grupa dzieci leczonych wg protokołu ALL-REZ BFM 2002

W grupie pacjentów leczonych zgodnie z protokołem ALL-REZ BFM 2002 wśród 5 dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową, IZG rozpoznano u 2 pacjentów (40%), natomiast wśród 3 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii, IZG nie rozpoznano u żadnego dziecka. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy obiema analizowanymi podgrupami dzieci ($p=0,464$).

Grupa dzieci leczonych wg protokołu B-NHL BFM-04

W grupie pacjentów leczonych zgodnie z protokołem B-NHL BFM-04 wśród 4 dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową, IZG rozpoznano u 3 pacjentów (75%), natomiast wśród 7 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii, IZG nie rozpoznano u żadnego dziecka. Wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy obiema analizowanymi podgrupami dzieci ($p=0,024$).

Grupa dzieci leczonych pozostałymi protokołami terapeutycznymi

W grupie pacjentów leczonych pozostałymi protokołami terapeutycznymi wśród 5 dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową, IZG rozpoznano u 4 pacjentów (80%), natomiast wśród 6 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii, IZG nie rozpoznano u żadnego dziecka. Wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy obiema analizowanymi podgrupami dzieci ($p=0,015$).

Profilaktyka przeciwgrzybicza u dzieci z hiperglikemią posterydową

W analizowanej grupie 22 pacjentów z hiperglikemią posterydową objętych programem wczesnego rozpoznawania ZGW profilaktykę przeciwgrzybiczą stosowano u 6 dzieci. U jednego dziecka stosowano worykonazol, natomiast u 5 pacjentów – flukonazol.

Wśród 16 dzieci nieotrzymujących profilaktyki przeciwgrzybiczej IZG stwierdzono u 10 pacjentów (62,5%), natomiast wśród 6 dzieci otrzymujących profilaktykę przeciwgrzybiczą IZG stwierdzono u 3 pacjentów (50%). Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy obiema grupami dzieci ($p=0,655$). U wszystkich 3 dzieci, które otrzymywały profilaktykę przeciwgrzybiczą i wystąpiło u nich IZG – rozpoznano prawdopodobną aspergilozę. W grupie dzieci nieotrzymujących profilaktyki przeciwgrzybiczej u 7 pacjentów rozpoznano aspergilozę, u jednego dziecka zakażenie *Candida glabrata*, natomiast u dwojga dzieci nie ustalono czynnika etiologicznego IZG (możliwe zakażenie grzybicze).

4.2.3. Ocena skuteczności transfuzji koncentratu granulocytów od dawców stymulowanych G-CSF w leczeniu wspomagającym inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Opis programu transfuzji koncentratu granulocytów

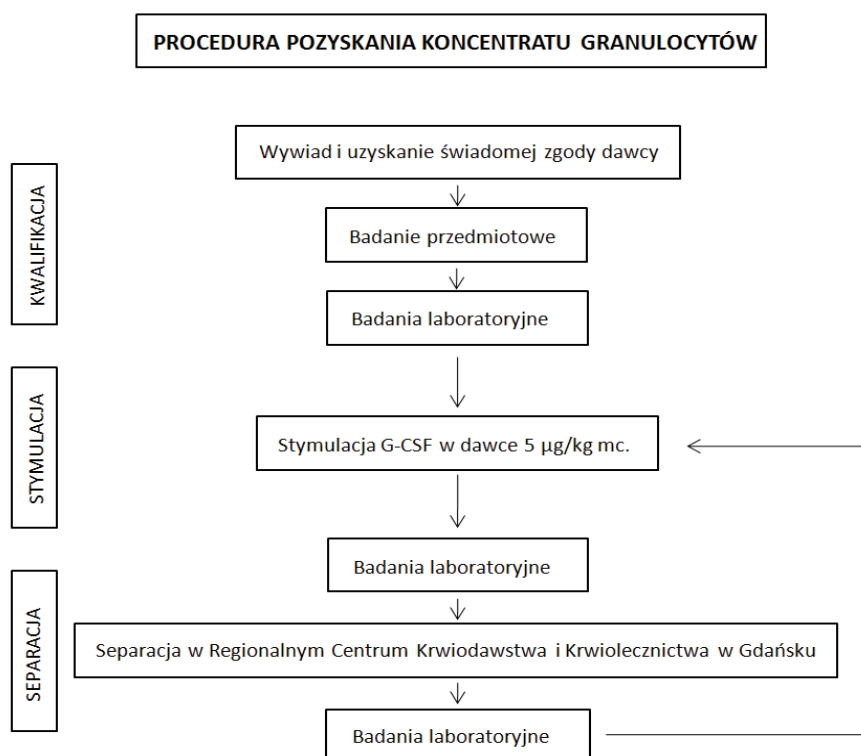
Po przeprowadzeniu szczegółowego wywiadu i uzyskaniu świadomej zgody na procedurę – dawca koncentratu granulocytarnego (KG) był przyjmowany na Oddział Hematologii Dziecięcej Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii GUMed. Po przeprowadzeniu badania fizykalnego z uwzględnieniem pomiaru ciśnienia tętniczego, wagi i wzrostu, wykonywano następujące badania laboratoryjne: grupę krwi i próbę zgodności serologicznej z krwią biorcy, morfologię, CRP, ALAT, AspAT, BUN, kreatyninę, glukozę, Na, K, Ca, koagulogram, IgM i IgG CMV, antygen HBs, przeciwciała anty-HBs i anty-HCV. Wykonywano także badanie elektrokardiograficzne oraz RTG klatki piersiowej. Po uzyskaniu prawidłowych wyników badań i spełnieniu wszystkich kryteriów kwalifikacji do procedury separacji KG, dawcę ostatecznie kwalifikowano do procedury stymulacji granulocytarnym czynnikiem wzrostu (G-CSF). O godzinie 21.00 w dniu poprzedzającym separację dawca otrzymywał G-CSF w dawce 5 µg/kg masy ciała podskórną. Następnego dnia rano dawca udawał się do Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku, gdzie wykonywano morfologię krwi obwodowej, a następnie po kwalifikacji lekarskiej poddawany był procedurze separacji granulocytów. Stosowano następujące separatory komórkowe: w latach 2003-2009 separator komórkowy CS300 plus, a w latach 2009-2011 separator COM.TEC (ryc. 41).



Ryc. 41. Separatory komórkowe do leukoaferezy: A) CS3000 plus; B) COM.TEC

Fig. 41. Leukapheresis cell-separators: A) CS3000 plus; B) COM.TEC

Po zakończeniu separacji, dawca transportem sanitarnym był przewożony na Oddział Hematologii Dziecięcej, gdzie ponownie przeprowadzano badanie przedmiotowe oraz pobierano kontrolne badania laboratoryjne (morfologia, poziom Na, K, Ca i Mg). W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości – uzupełniano elektrolity drogą dożylną. O godzinie 21.00 ponownie podawano G-CSF w dawce jak poprzednio. Procedurę stymulacji i separacji powtarzano maksymalnie pięciokrotnie (ryc. 42).



Ryc. 42. Schemat procedury pozyskania koncentratu granulocytów
 Fig. 42. Diagram of granulocyte concentrate collecting procedure

W przypadku przetoczenia u biorcy innych preparatów krwiopochodnych pomiędzy przetoczeniami KG, wykonywano powtórnie próbę krzyżową pomiędzy krwią biorcy, a preparatem granulocytów. Wynika to z faktu, iż koncentrat granulocytarny jest składnikiem „zanieczyszczonym” krwinkami czerwonymi. W przypadku, gdy „zanieczyszczenie” wynosi powyżej 5 ml wymagane jest wykonanie próby zgodności serologicznej. Zgodnie z obowiązującymi procedurami dla kwalifikacji składników krwi do lecznictwa u dawcy każdorazowo wykonywane były badania kwalifikujące składnik do użycia: badania metodami serologicznymi (HBsAg, anty-HCV, anty-HIV oraz test kiłowy) oraz badanie metodami biologii molekularnej (DNA HBV, RNA HCV oraz RNA HIV) [124]. Dawcę dyskwalifikowano z dalszych etapów procedury we wcześniejszym niż przewidziano okresie na podstawie: prośby dawcy, złego samopoczucia dawcy, pogorszenia

stanu ogólnego dawcy, obniżenie poziomu płytek poniżej 100 G/l i/lub stwierdzenia objawów infekcji.

Koncentrat granulocytarny (KG) przygotowany był w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (ryc. 43), gdzie poddawany był napromienianiu przy pomocy radiatora GammaCell 3000 Elan w dawce 25 Gy. Po zakończeniu procedury, składnik przekazywany był niezwłocznie do Banku Krwi Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego, a następnie na Oddział Hematologii Dziecięcej GUMed. Biorca KG przed przetoczeniem otrzymywał premedykację: glikokortykosteryd, lek przeciwgorączkowy (paracetamol, metamizol) oraz klemastynę w dawkach odpowiednich do wieku i masy ciała. U pacjentów otrzymujących w leczeniu przeciwgrzybiczym amfoterycynę B, zachowywano ośmiogodzinny odstęp od transfuzji KG. Przed, w trakcie i po przetoczeniu u biorcy monitorowano temperaturę ciała, akcję serca, ciśnienie krwi tętniczej oraz saturację krwi.



Ryc. 43. Koncentrat granulocytarny

Fig. 43. Granulocyte concentrate

Charakterystyka dawców koncentratu granulocytów

Preparaty KG uzyskano od 23 dawców, spełniających kryteria kwalifikacji do programu. Wśród dawców preparatów KG było 8 rodziców biorców, jeden brat biorcy, jeden kuzyn biorcy, natomiast 13 dawców rekrutowało się spośród rodzeństwa rodziców lub ich kuzynostwa. Średni wiek dawcy wynosił 37 lat (SD=8,5 lat; minimum 23 lat;

maksimum 49 lat). W analizowanej grupie było 5 kobiet (21,7%) i 18 mężczyzn (78,3%).

U 23 dawców przeprowadzono łącznie 54 procedury stymulacji G-CSF, po których wykonano 54 procedury separacji preparatów KG. Dalsza analiza wykazała, że 6 dawców separowano jednokrotnie, 5 dawców – dwukrotnie, 11 dawców – trzykrotnie, a jednego dawcę pięciokrotnie.

U 3 dawców KG po zastosowaniu G-CSF obserwowano wystąpienie objawów grypopodobnych, jednakże nie były one powodem odstąpienia od dalszych stymulacji i separacji preparatu KG. U jednej dawczyni po zakończeniu pierwszej procedury stymulacji i separacji preparatu KG odstąpiono od kolejnych stymulacji z uwagi na wystąpienie krwawienia miesięcznego. Jednego dawcę po pierwszej stymulacji i separacji zdyskwalifikowano z dalszych procedur z uwagi na objawy infekcji układu oddechowego. U jednego dawcy w trakcie procedury zakładania wkłucia centralnego w znieczuleniu miejscowym doszło do powstania krwiaka. W subiektywnej ocenie dawców po zakończeniu procedur stymulacji i separacji samopoczucie opisywane jako "dobre" podało 22 osób (95,7%)(w tym dawca, u którego wystąpił krwiak), natomiast jako "złe" – 1 osoba (4,3%).

Na pytanie zadawane po zakończeniu całej procedury donacji, czy dawca zdecydowałby się w przyszłości ponownie poddać się tej procedurze odpowiedź pozytywną uzyskano od 21 osób (91,3%). W telefonicznej ankiecie przeprowadzonej w grudniu 2012 roku na temat aktualnego stanu zdrowia dawców informację uzyskano od 19 spośród 23 dawców (82,6%). Średni czas od donacji wśród osób, które udzieliły odpowiedzi w ankiecie wynosił 52 miesiące (SD=28,2 miesiące; minimum 15 miesięcy; maksimum 9 lat). Wszyscy z ankietowanych deklarowali dobry stan zdrowia, u żadnego z dawców preparatów KG nie stwierdzono dotychczas żadnych niepokojących objawów mogących sugerować schorzenie hematologiczne.

Charakterystyka biorców koncentratu granulocytów

W analizowanej grupie dzieci, u których obserwowano 61 incydentów inwazyjnych zakażeń grzybiczych, procedurę przetoczenia koncentratu granulocytów od 2003 roku wykonano u 16 pacjentów (tab. 16). Łącznie przeprowadzono u nich 54 transfuzje KG. W grupie 16 dzieci, u których stosowano przetoczenia KG, udokumentowane zakażenie stwierdzono u 2 dzieci, prawdopodobne zakażenie grzybicze rozpoznano u 5 dzieci, natomiast możliwe zakażenie grzybicze stwierdzono u 7 pacjentów. U 14 chorych zakażenie obejmowało płuca, u jednego dziecka stwierdzono zajęcie zatok przynosowych, natomiast u jednego dziecka zakażenie było rozsiane i obejmowało oba płuca, tarczycę, śledzionę i nerkę. U wszystkich dzieci, u których rozpoznano IZG zdefiniowano jako „możliwe”, stwierdzano typowe zmiany w badaniach obrazowych płuc (tomografia komputerowa klatki piersiowej i przezklatkowe ultrasonograficzne badanie płuc).

U 15 pacjentów z opisywanej grupy w okresie poprzedzającym przetoczenia KG w leczeniu przeciwgrzybiczym stosowano amfoterycynę B (u 8 amfoterycynę B kompleks lipidowy, a u 7 liposomalną amfoterycynę B). U jednego dziecka stosowano leczenie skojarzone: worykonazol i kaspofunginę. U wszystkich analizowanych pacjentów w okresie poprzedzającym kwalifikację do przetoczeń stwierdzono neutropenię. Średni czas trwania neutropenii w tej grupie dzieci wynosił 19 dni (minimum 6 dni, maksimum 47 dni).

Tabela 16. Charakterystyka biorców koncentratu granulocytów

Table 16. Characteristics of granulocyte concentrate recipients

Biorca / recipient	Choroba podstawowa / underlying disease	Etiologia zakażenia / infection etiology	Kategoria rozpoznania / diagnosis type	Lokalizacja / localization	Leczenie przeciwgrzybicze przed przetoczeniem / antifungal treatment before transplantation	Poprzedzająca neutropenia (dni) / preceding neutropenia (days)
1	ALL	<i>Aspergillus</i>	Prawdopodobne	Płuca	ABLC	8
2	ALL	<i>Aspergillus</i>	Udokumentowane	Płuca	ABLC	6
3	AML	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	LAmB	13
4	ALL	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	ABLC	11
5	AML	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	LAmB	11
6	AML	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	ABLC	9
7	AML rez	<i>Aspergillus</i>	Udokumentowane	Zatoki przynosowe	LAmB	21
8	AML	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	LAmB	32
9	NHL B	<i>Aspergillus</i>	Prawdopodobne	Płuca	ABLC	8
10	ALL rez	<i>Aspergillus</i>	Prawdopodobne	Płuca	LAmB	9
11	AML	<i>Aspergillus</i>	Prawdopodobne	Płuca	ABLC	22
12	ALL	<i>Mucor</i> + <i>Aspergillus</i>	Udokumentowane	Płuca + tarczyca + nerka + śledziona	ABLC	21
13	AML	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	LAmB	47
14	ALL	<i>Aspergillus</i>	Prawdopodobne	Płuca	ABLC	21
15	SAA	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	kaspofungina + worykonazol	41
16	AML	<i>Aspergillus</i>	Możliwe	Płuca	LAmB	24

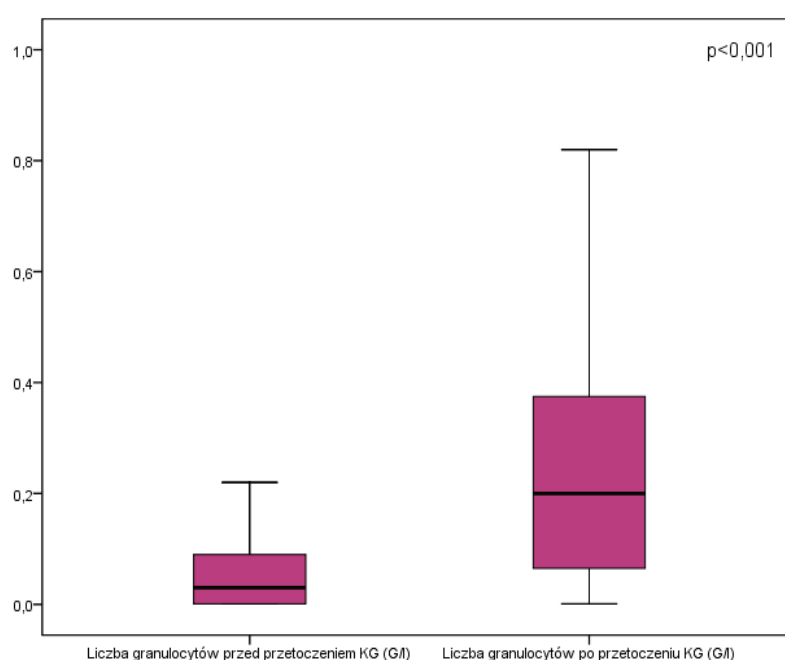
ALL – ostra białaczka limfoblastyczna / *acute lymphoblastic leukemia*; ALL rez – wznowa ostrej białaczki limfoblastycznej / *acute lymphoblastic leukemia recidiva*; AML – ostra białaczka mieloblastyczna / *acute myeloid leukemia*; AML rez – wznowa ostrej białaczki mieloblastycznej / *acute myeloid leukemia recidiva*; NHL B – nieziarniczy chłoniak złośliwy B-komórkowy / *B-cell non-Hodgkin lymphoma*; SAA – ciężka anemia aplastyczna / *severe aplastic anemia*; ABLC – amfoterycyna B kompleks lipidowy / *amphotericin B lipid complex*; LAmB – liposomalna amfoterycyna B / *liposomal amphotericin B*

Analiza skuteczności procedury przetaczania koncentratu granulocytów na podstawie wybranych parametrów laboratoryjnych u biorców

W analizowanej grupie 61 incydentów IZG procedurę przetoczenia preparatu KG od 2003 roku wykonano 54 razy u 16 pacjentów w tym: u 4 dzieci po jednym przetoczeniu KG; u 3 pacjentów po dwa przetoczenia; u 6 pacjentów po trzy przetoczenia; u 2 dzieci po 7 przetoczeń; u jednego dziecka wykonano 13 przetoczeń KG.

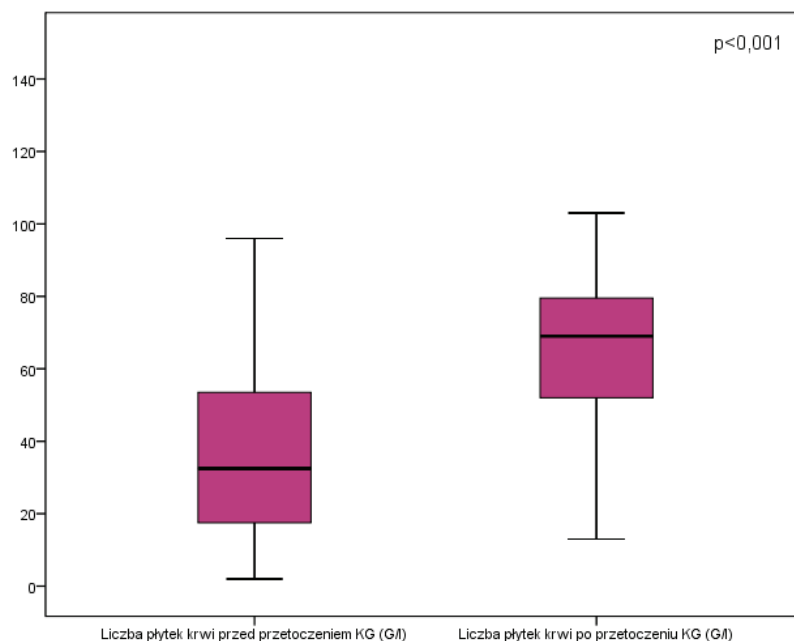
Średnia liczba granulocytów u biorcy przed przetoczeniem KG wynosiła 0,064 G/l (mediana 0,03 G/l; SD=0,091 G/l; minimum 0; maksimum 0,4 G/l), natomiast po prze-

toczeniu średnia liczba granulocytów wynosiła 0,304 G/l (mediana 0,2 G/l; SD=0,363 G/l; minimum 0; maksimum 2 G/l) (ryc. 44). Stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby granulocytów po przetoczeniu KG ($p<0,001$). Średni wzrost poprzetoczeniowy liczby granulocytów u biorców KG wynosił 0,239 G/l (mediana 0,17 G/l). U dwojga dzieci zaobserwowano poprzetoczeniowy spadek liczby granulocytów (o 0,04 G/l i o 0,01 G/l), u 3 dzieci obserwowano takie same wartości granulocytów przed i po przetoczeniu. Maksymalny zanotowany wzrost liczby granulocytów po przetoczeniu KG wyniósł 1,86 G/l.



Ryc. 44. Liczba granulocytów u biorców koncentratu granulocytów (KG) przed i po przetoczeniu
Fig. 44. Granulocyte count in granulocyte concentrate recipients (KG) before and after transplantation

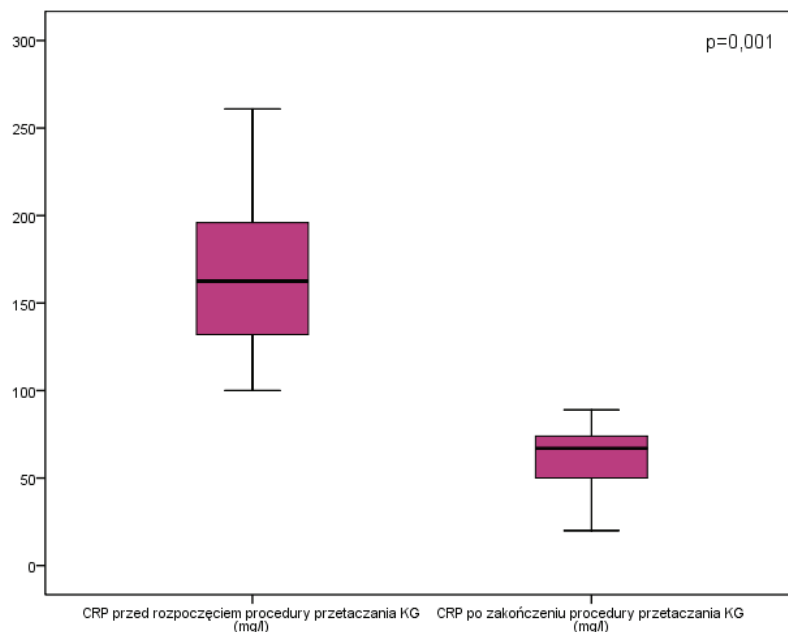
Średnia liczba płytek krwi biorcy przed przetoczeniem KG wynosiła 44,1 G/l (mediana 36,5 G/l; SD=30,62 G/l; minimum 2 G/l; maksimum 102 G/l), natomiast po przetoczeniu średnia liczba płytek krwi wynosiła 79,5 G/l (mediana 69 G/l; SD=85,85 G/l; minimum 4 G/l; maksimum 519 G/l) (ryc. 45). Stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby płytek po przetoczeniu KG ($p<0,001$).



Ryc. 45. Liczba płytek krwi u biorców koncentratu granulocytów (KG) przed i po przetoczeniu

Fig. 45. Thrombocyte count in granulocyte concentrate recipients (KG) before and after transplantation

Średnia wartość białka C-reaktywnego u biorcy przed rozpoczęciem procedury przetoczenia KG wynosiła 177 mg/l (mediana 171 mg/l; SD=58,7 mg/l; minimum 100 mg/l; maksimum 300 mg/l), natomiast po zakończeniu procedury (tj. do pięciu dni po ostatnim przetoczeniu KG) średnia wartość CRP wynosiła 63 mg/l (mediana 67 mg/l; SD=28,8 mg/l; minimum 7 mg/l; maksimum 126 mg/l) (ryc. 46). Średnio wartość CRP po przeprowadzeniu opisywanej procedury obniżyła się o 106 mg/l (mediana 89 mg/l; SD=62,5 mg/l; minimum 44 mg/l; maksimum 254 mg/l). Stwierdzono statystycznie istotny spadek wartości CRP po przetoczeniu KG ($p=0,001$).



Ryc. 46. Poziom białka reaktywnego C (CRP) u biorców koncentratu granulocytów (KG) przed i po przetoczeniu

Fig. 46. C reactive protein concentration (CRP) in granulocyte concentrate recipients (KG) before and after transplantation

Spośród 12 dzieci, u których zastosowano co najmniej dwa przetoczenia, ostateczny pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano u wszystkich dzieci. W ocenie efektu terapeutycznego po 3 tygodniach od ostatniego przetoczenia KG wykazano, że całkowitą regresję zmian obserwowano u 2 pacjentów, natomiast u pozostałych 10 obserwowano częściową regresję (tab. 17). Ostatecznej oceny efektywności procedury dokonano po 3 miesiącach. Wykazano, że u 10 dzieci stwierdzono całkowitą regresję zmian, a u jednego dziecka stwierdzono obecność zmiany resztkowej. Jedno dziecko zmarło przed upływem 3 miesięcy od ostatniego przetoczenia. W badaniu autopsyjnym nie stwierdzono cech inwazyjnego zakażenia grzybiczego, w związku z tym odpowiedź na leczenie przeciwgrzybicze zgodnie z obowiązującymi kryteriami uznano za całkowitą.

Tabela 17. Charakterystyka biorców koncentratu granulocytów po zakończeniu procedury
Table 17. Characteristics of granulocyte concentrate recipients after transplantation

Biorca / recipient	Liczba przetoczeń KG / number of KG transplantations	Średni wzrost granulocytów po przetoczeniu KG / mean granulocyte increase after KG transplantation (G/l)	CRP przed/5 dni po ostatnim przetoczeniu KG / CRP before/5 days after the last KG transplantation (mg/dl)	Powód zakończenia procedury / the reason of procedure discontinuation	Efekt leczenia zakażenia / infection treatment result		Powikłania poprzetoczeniowe / post-transplantation complications
					3 tyg po ostatnim przetoczeniu / 3 weeks after the last KG transplantation	12 tygodni po ostatnim przetoczeniu KG / 12 weeks after the last KG transplantation	
1	1	1,86	153/77	Odnowa hematologiczna	nd	nd	Odczyn gorączkowy
2	6	0,083	196/89	Poprawa kliniczna	CzO	COZmR	Nie obserwowano
3	3	-	108/64	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano
4	3	0,797	100/50	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano
5	1	0,18	191/126	Brak dawcy	nd	nd	Nie obserwowano
6	3	0,349	171/63	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano
7	7	0,088	146/70	Poprawa kliniczna	CO	CO	Nie obserwowano
8	3	0,196	239/72	Poprawa kliniczna	CzO	CO*	Nie obserwowano
9	2	0,215	132/74	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano
10	3	0,05	154/45	Poprawa kliniczna	CO	CO	Nie obserwowano
11	1	0,31	110/52	Poprawa kliniczna	nd	nd	Nie obserwowano
12	1	0,38	300/280	Brak dawcy	nd	nd	Nie obserwowano
13	2	0,085	-	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano
14	3	0,297	226/20	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano
15	13	0,134	261/7	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano
16	3	0,4	173/71	Poprawa kliniczna	CzO	CO	Nie obserwowano

KG – koncentrat granulocytów / *granulocyte concentrate*; CO – całkowita odpowiedź / *complete response*; COZmR – całkowita odpowiedź ze zmianą resztkową / *complete response with residual change*; CzO – częściowa odpowiedź / *partial response*; nd – nie dotyczy / *not applicable*; * – pacjent zmarł przed upływem 12 tygodni od ostatniego przetoczenia, w badaniu autopsyjnym bez cech IZG, w związku z tym zgodnie z przyjętymi kryteriami odpowiedź na leczenie przeciwegry-

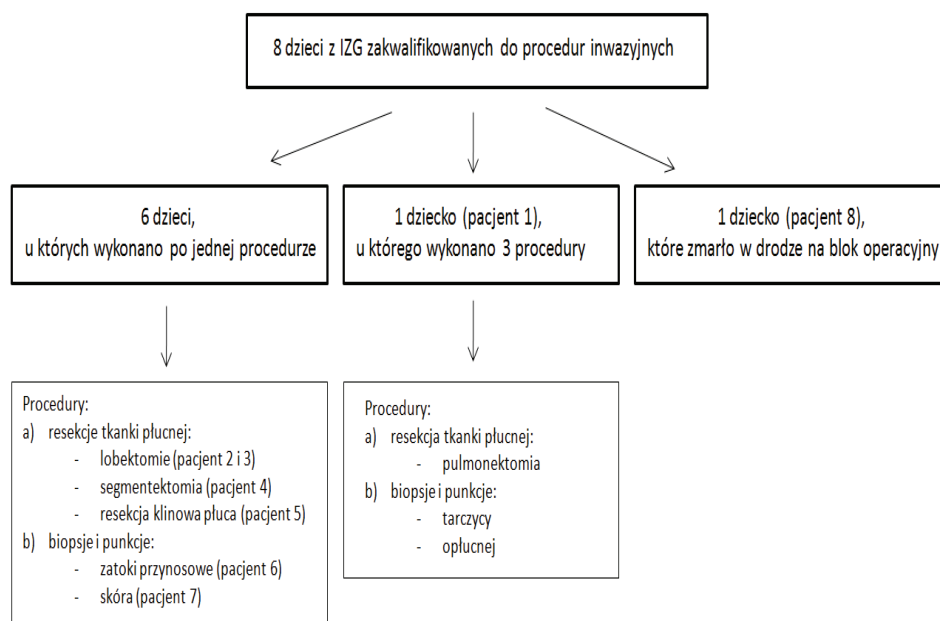
bicze zakwalifikowano jako całkowitą / *the patient died before 12 weeks after the last KG transplantation, without invasive fungal infection manifestation in autopsy resulting in qualification as complete response to antifungal treatment according to defined criteria*

W analizowanej grupie dzieci, podczas realizacji 54 przetoczeń KG obserwowano jeden odczyn poprzetoczeniowy pod postacią zwyżki ciepłoty ciała powyżej 38°C. W związku z powyższym zwolniono tempo transfuzji oraz podano leki przeciwgorączkowe. Po normalizacji temperatury ciała transfuzję kontynuowano bez dalszych powikłań. U żadnego dziecka nie przerwano procedury przetaczania KG.

4.2.4. Ocena przydatności procedur chirurgicznych w diagnostyce i leczeniu IZG w analizowanej grupie dzieci

W analizowanej grupie 59 dzieci z zakażeniem grzybiczym, do inwazyjnych procedur diagnostycznych i/lub terapeutycznych zakwalifikowano 8 dzieci co stanowi (13,6%). W analizowanej grupie było sześcioro dzieci z ostrą białaczką (dwoje z AML, czworo z ALL), jedno dziecko z nieziarniczym chłoniakiem złośliwym oraz jedno dziecko z ciężką anemią aplastyczną. W grupie tej przeprowadzono 9 procedur inwazyjnych. U 6 dzieci wykonano po jednej procedurze: u czworga z nich chirurgicznie usunięto zmienioną zapalnie tkankę płucną (dwa zabiegi lobektomii, jeden zabieg segmentektomii i jedna resekcja klinowa); u jednego dziecka wykonano biopsję zatoki przynosowej; u jednego dziecka wykonano biopsję skóry. U jednego dziecka przeprowadzono trzy procedury inwazyjne (punkcja jamy opłucnowej + pulmonektomia + biopsja tarczycy). Jedno dziecko spośród 8 zakwalifikowanych do procedur inwazyjnych dzieci zmarło w czasie transportu na blok operacyjny przed wykonaniem planowanej lobektomii (ryc. 47).

W związku z małą liczbą dzieci z IZG poddanych procedurom inwazyjnym analizę oparto o prezentację przebiegu klinicznego poszczególnych pacjentów.

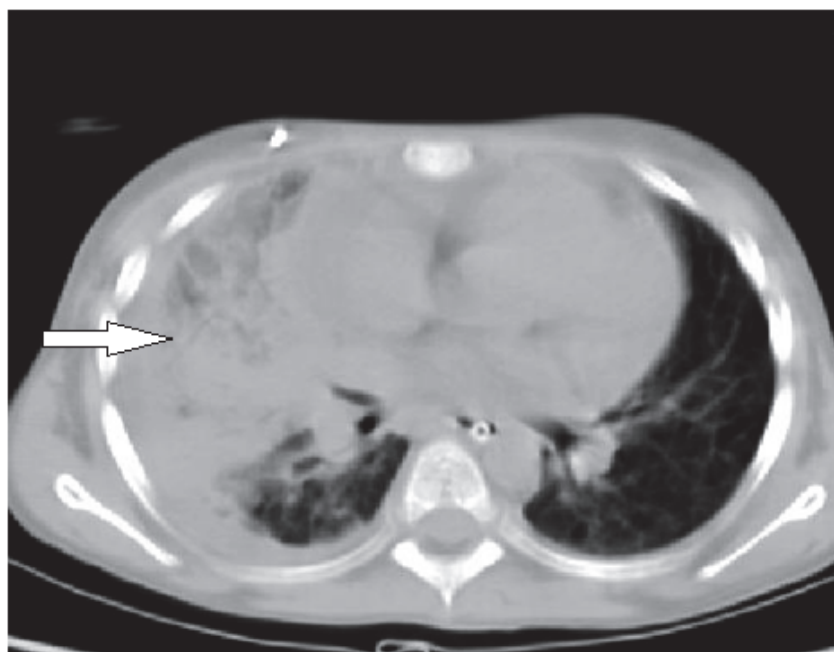


Ryc. 47. Procedury chirurgiczne u dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi
 Fig. 47. Surgical procedures in children with invasive fungal infections

Opis przypadku – pacjent 1

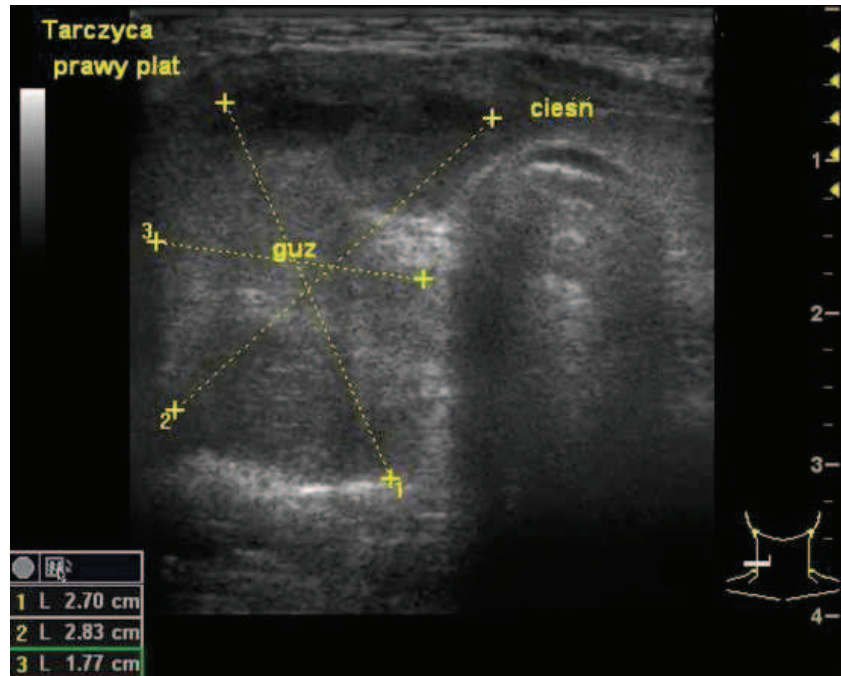
Dziewczynka 12-letnia leczona w Klinice Hematologii Dziecięcej GUMed z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej (protokół ALL IC-BFM 2002, grupa IR). W 21. dobie terapii przeciwnowotworowej stan dziecka pogorszył się, obserwowano duszność wdechowo-wydechową. W wykonanym badaniu TK klatki piersiowej stwierdzono rozległy naciek zapalny obejmujący prawie całe płuco prawe oraz płyn w prawej jamie opłucnowej (ryc. 48). Dziecko wymagało stosowania oddechu zastępczego przez 7 dni. Z uwagi na nieustalony czynnik etiologiczny nacieku w płucu oraz narastanie niewydolności oddechowej pomimo stosowanego leczenia przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego zdecydowano o diagnostyczno-terapeutycznej punkcji jamy opłucnowej. Z uzyskanego płynu wyhodowano grzyby z rodzaju *Mucor spp.* Dodatkowo wykazano obecność antygenu galaktomannanowego w surowicy krwi ($I=0,58$; $I=2,3$; $I=2,1$). Na tej podstawie rozpoznano zakażenie mieszane: *Mucor spp.* i *Aspergillus spp.* Zastosowano skojarzone leczenie przeciwgrzybicze (ABLC, pozakonazol). Pomimo stosowanego kompleksowego leczenia przeciwgrzybiczego obserwowano dalszą progresję zakażenia: narastanie duszności oraz progresję zmian w PUBP i badaniu TK klatki piersiowej. Dodatkowo stwierdzono powiększenie gruczołu tarczowego. Wykonano biopsję cienkoigłową gruczołu pod kontrolą USG (ryc. 49). W badaniu histopatologicznym wykazano obecność strzępek grzyba *Mucor spp.* (ryc. 50). W związku z progresją zmian płucnych zdecydowano o przeprowadzeniu zabiegu pulmonektomii prawostronnej. Czas od rozpoznania IZG do zabiegu pulmonektomii wyniósł 30 dni. W badaniu histopatologicznym

tkanki płucnej wykazano obecność strzępek grzyba odpowiadających mukormykozie oraz aspergilozie. Pomimo usunięcia płuca doszło do dalszego rozprzestrzeniania się zakażenia na nerkę prawą, śledzionę oraz drugie płuco. Dziecko zmarło wśród objawów niewydolności wielonarządowej spowodowanej uogólnionym zakażeniem grzybiczym o mieszanej etiologii.



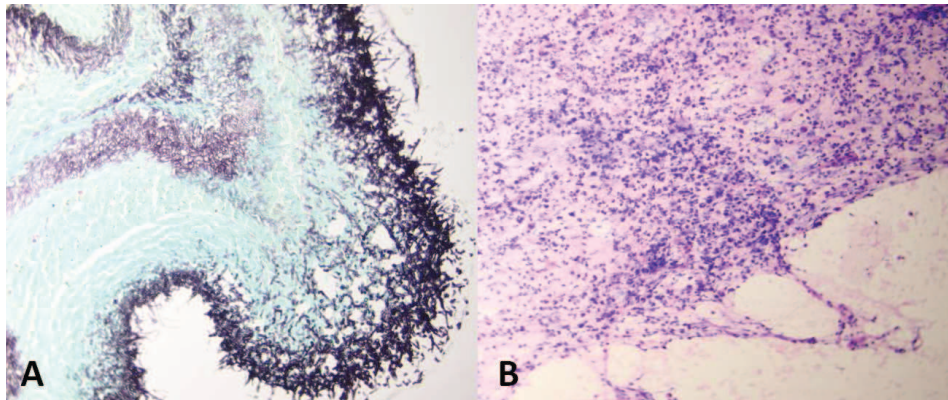
Ryc. 48. Tomografia komputerowa klatki piersiowej z widocznym naciekiem grzybiczym (strzałka) płuca prawego

Fig. 48. Chest computed tomography showing fungal infiltration (arrow) in the right lung



Ryc. 49. Badanie ultrasonograficzne gruczołu tarczowego z widocznym guzem zapalnym o etiologii *Mucor spp.*

Fig. 49. Ultrasonographic examination of the thyroid gland with inflammatory tumor of *Mucor spp.* etiology



Ryc. 50. Preparaty histopatologiczne u pacjenta 1: A) strzępki grzybni w tkance tarczycy; barwienie srebrem wg Gomoriego, powiększenie $\times 100$; B) strzępki grzybni w tkance tarczycy; barwienie metodą Grama, powiększenie $\times 200$

Fig. 50. Histopathological examination in patient 1: A) hyphae in the tissue of the thyroid gland; Gomori's methenamine silver staining ($\times 100$); B) hyphae in the tissue of the thyroid gland; Gram staining ($\times 200$)

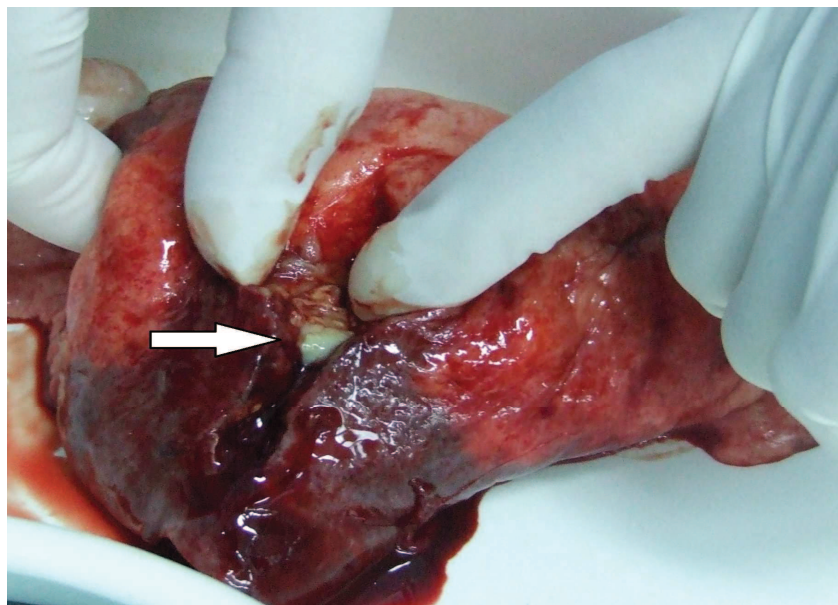
Opis przypadku – pacjent 2

Dziewczynka 8-letnia leczona z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej (protokół ALL IC-BFM 2002, grupa IR). W trakcie realizacji protokołu konsolidującego dziewczynka otrzymywała wysokodawkową sterydoterapię (prednison 60 mg/m²). W 12. dobie neutropenii u pacjentki pojawił się suchy, nieproduktywny kaszel, gorączka, a w badaniach laboratoryjnych obserwowano narastanie parametrów stanu zapalnego. W wykonanym PUBP opisano cechy mogące sugerować inwazyjne zakażenie grzybicze płuc; sugestię potwierdzono w badaniu TK klatki piersiowej (ryc. 51). Włączono liposomalną amfoterycynę B (LAmB) w dawce 3 mg/kg masy ciała jako terapię wyprzedzającą. Uzyskano ustąpienie gorączki oraz stopniową normalizację wykładników stanu zapalnego. Po 3 tygodniach leczenia przeciwgrzybiczego u dziewczynki zaobserwowano krwioplucie; w wykonanym kontrolnym badaniu TK klatki piersiowej nie stwierdzono regresji opisywanych wcześniej zmian. Z uwagi na brak efektu terapeutycznego zastosowanego leczenia dziecko zakwalifikowano do chirurgicznej resekcji zmiany. Czas od podejrzenia zakażenia IZG do zabiegu wyniósł 28 dni. Dokonano usunięcia płata dolnego płuca lewego. Przebieg pooperacyjny był niepowikłany. W badaniu histopatologicznym usuniętej tkanki opisano strzępki grzyba *Aspergillus spp.* (ryc. 52). Leczenie przeciwgrzybicze LAmB stosowano przez okres 4 tygodni po zabiegu, następnie włączono worykonazol jako profilaktykę wtórną każdorazowo w okresie neutropenii po chemioterapii. Nie obserwowano nawrotu IZG podczas całego cyklu chemioterapii.



Ryc. 51. Tomografia klatki piersiowej z widocznym naciekiem grzybiczym płuca lewego (strzałka)

Fig. 51. Chest computed tomography showing fungal infiltration in the left lung (arrow)

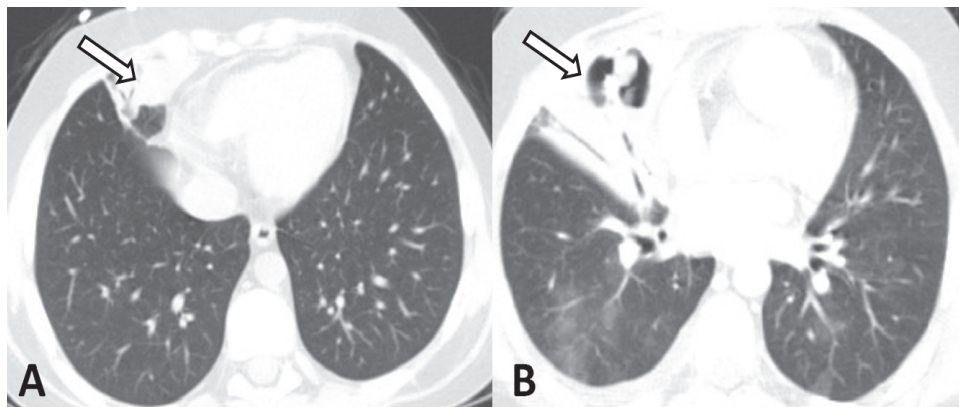


Ryc. 52. Obraz makroskopowy usuniętego płata dolnego płuca lewego z widocznym naciekiem grzybiczym (strzałka) o etiologii *Aspergillus spp.*

Fig. 52. Macroscopic appearance of the resected inferior lobe of the left lung with fungal infiltration of *Aspergillus spp.* etiology (arrow)

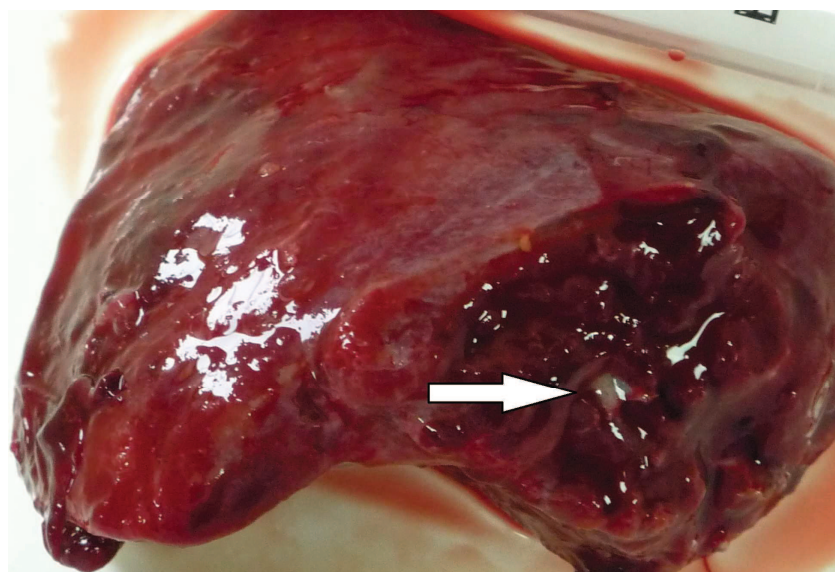
Opis przypadku – pacjent 3

Chłopiec 10-letni leczony z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej (protokół ALL IC-BFM 2002, grupa IR). W trakcie realizacji protokołu konsolidującego u dziecka stwierdzono hiperglikemię posterydową wymagającą podaży insuliny. Stan ogólny pacjenta pogarszał się, wystąpiła gorączka, pojawił się kaszel i duszność. W PUBP stwierdzono zmiany sugerujące zakażenie grzybicze. Sugestię IZG potwierdzono w badaniu TK klatki piersiowej (ryc. 53). Włączono leczenie przeciwgrzybicze (ABLC w dawce 5 mg/kg masy ciała). W kolejnych dniach stan ogólny dziecka uległ stabilizacji, jednak pomimo leczenia przeciwgrzybiczego nadal utrzymywała się gorączka. W ponownie wykonanych badaniach obrazowych (PUBP, TK klatki piersiowej) uwidoczniono nacieki zapalne w obrębie płata środkowego płuca prawego, z rozpadem i powietrzem wewnątrz zmiany. Dziecko zakwalifikowano do resekcji zmienionego płata płuca. Czas od pierwszego badania TK klatki piersiowej do zabiegu wyniósł 19 dni. Dokonano lobektomii prawostronnej (ryc. 54). W badaniu histopatologicznym płuca wykazano nieliczne strzępki grzyba o morfologii *Aspergillus spp.* oraz nasilone zmiany martwicze. Przebieg zabiegu i okresu pooperacyjnego był niepowikłany. Kontynuowano leczenie przeciwgrzybicze ABLC przez okres 6 tygodni. Następnie stosowano worykonazol jako profilaktykę wtórną zakażenia grzybiczego każdorazowo w okresie neutropenii po chemioterapii. Nie obserwowano nawrotu IZG.



Ryc. 53. Tomografia komputerowa klatki piersiowej z widocznym naciekiem grzybiczym w płucu prawym (strzałka): A) przed włączeniem leczenia przeciwgrzybiczego; B) progresja nacieku zapalnego 14 dni po wdrożeniu leczenia przeciwgrzybiczego

Fig. 53. Chest computed tomography showing fungal infiltration in the right lung (arrow): A) before antifungal treatment; B) progression of the infection after 14 days of antifungal treatment



Ryc. 54. Obraz makroskopowy usuniętego płata środkowego płuca prawego z widocznym naciekiem grzybiczym (strzałka) o etiologii *Aspergillus spp.*

Fig. 54. Macroscopic appearance of the resected middle lobe of the right lung with fungal infiltration (arrow) of *Aspergillus spp.* etiology

Opis przypadku – pacjent 4

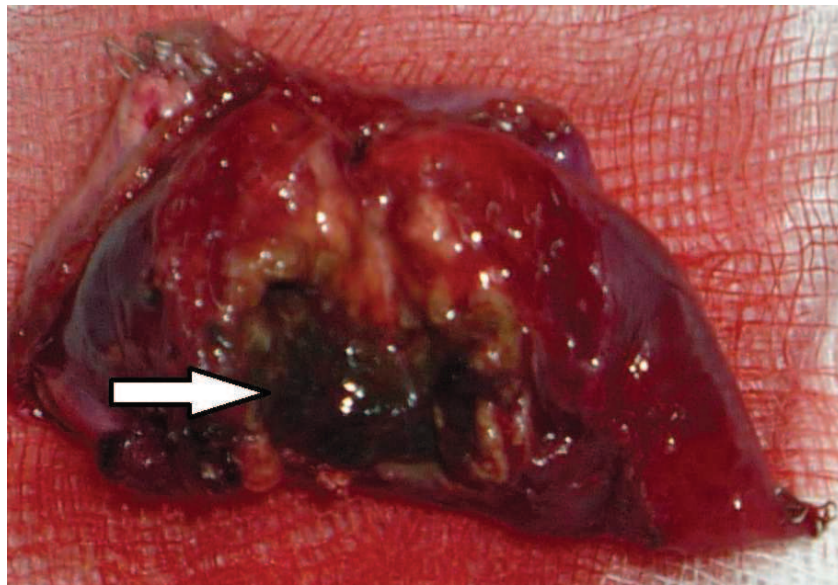
Dziewczynka 16-letnia z ciężką anemią aplastyczną (SAA), u której 4 miesiące wcześniej dokonano allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych od dawcy

rodzinnego, zgłosiła się do Kliniki z powodu gorączki i bólu w klatce piersiowej. Dziewczynka otrzymywała cyklosporynę A oraz glikokortykosterydy z uwagi na cechy choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD). W wykonanych badaniach laboratoryjnych stwierdzono podwyższenie parametrów stanu zapalnego oraz dwukrotnie dodatni antygen galaktomannanowy w surowicy krwi ($I=1,05$; $I=0,99$). W PUBP stwierdzono zlokalizowaną podopłucnowo zmianę naciekową mogącą sugerować zakażenie grzybicze. W badaniu TK klatki piersiowej w segmencie 6 prawego płuca stwierdzono podopłucnowy naciek o wymiarach $21 \times 32 \times 40$ mm z cechami rozpadu; drugi o podobnym charakterze mierzący $24 \times 18 \times 17$ mm w segmencie 4 prawego płuca (ryc. 55). Włączono LAmB w dawce 3 mg/kg masy ciała; terapię kontynuowano przez 6 tygodni. Uzyskano znaczną regresję nacieku, jednak z uwagi na konieczność kontynuacji leczenia immunosupresyjnego zdecydowano o usunięciu zmiany resztkowej z płuca. Dokonano segmentektomii płuca prawego (ryc. 56); przebieg pooperacyjny był niepowikłany. Czas od pierwszego badania TK klatki piersiowej do zabiegu operacyjnego wyniósł 48 dni. W badaniu histopatologicznym usuniętej tkanki płucnej opisano strzępki *Aspergillus spp.* potwierdzając wstępne rozpoznanie IZG. W okresie pooperacyjnym (8 tygodni) stosowano worykonazol. Nie obserwowano nawrotu zakażenia grzybiczego.



Ryc. 55. Tomografia komputerowa klatki piersiowej z widocznym naciekami grzybiczymi płuca prawego (strzałka)

Fig. 55. Chest computed tomography showing fungal infiltrations of the right lung (arrow)

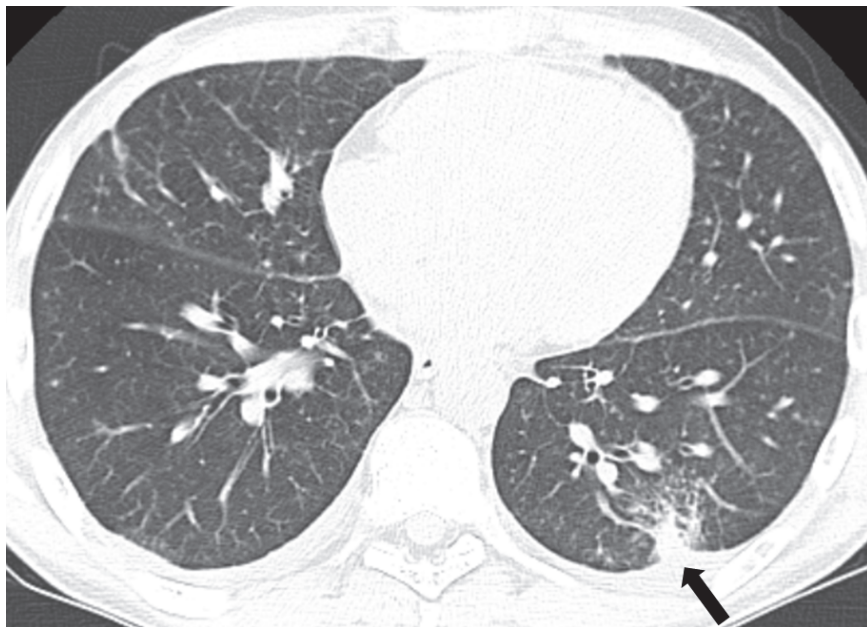


Ryc. 56. Obraz makroskopowy usuniętego segmentu płuca prawego z widocznym naciekiem grzybiczym (strzałka) o etiologii *Aspergillus spp.*

Fig. 56. Macroscopic appearance of the resected segment of the right lung with fungal infiltration (arrow) of *Aspergillus spp.* etiology

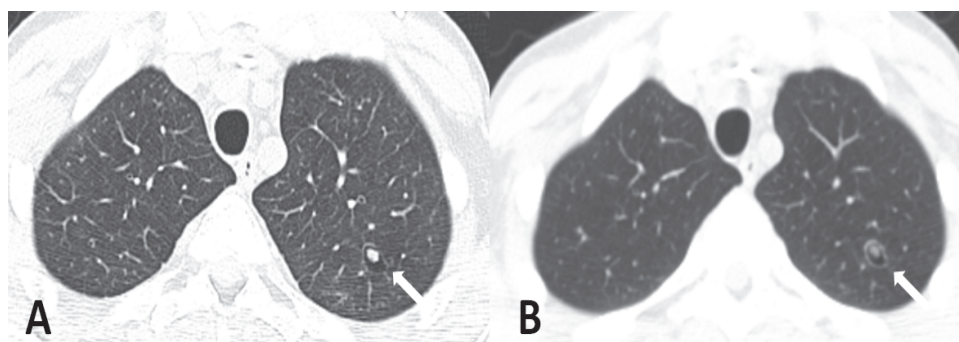
Opis przypadku – pacjent 5

Chłopiec 18-letni, u którego z powodu wczesnej wznowy ALL dokonano allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego. Otrzymawał przewlekłe glikokortykosterdy oraz cyklosporynę A z uwagi na rozpoznane GvHD; podczas sterydoterapii stwierdzono hiperglikemię wymagającą podaży insuliny. W ósmym miesiącu po transplantacji pacjent zaczął gorączkować, pojawił się suchy kaszel oraz nasilone dolegliwości bólowe w okolicy międzyżebrowej lewej. Zarówno w PUBP, jak również w badaniu TK klatki piersiowej opisano zmianę naciekową zlokalizowaną podopłucnowo po stronie lewej sugerującą etiologię grzybiczą (ryc. 57). Stwierdzono dodatni antygen galaktomannanowy w surowicy krwi (dwa kolejne oznaczenia: $I=1,04$; $I=0,85$). Rozpoznano prawdopodobną inwazyjną aspergilozę płuc. Włączono worykonazol, jednakże z uwagi na poważne zaburzenia widzenia, które obserwowano po dobie od włączenia leku – terapię zmodyfikowano włączając ABLC. Po 4 tygodniach leczenia uzyskano znaczącą regresję opisywanej wstępnie zmiany w obrębie płuc, jednakże po kolejnych 2 tygodniach podaży ABLC nie uzyskano dalszego zmniejszenia się nacieku (ryc. 58). Z uwagi na konieczność kontynuacji leczenia immunosupresyjnego zdecydowano o usunięciu zmiany resztkowej z płuca. Dokonano resekcji klinowej płuca lewego. Zabieg operacyjny powikłany był masywnym krwawieniem wymagającym reoperacji. W badaniu histopatologicznym potwierdzono obecność strzępek grzyba *Aspergillus spp.* Leczenie przeciwgrzybicze ABLC kontynuowano przez 4 tygodnie po zabiegu. Następnie stosowano pozakonazol jako profilaktykę wtórną do czasu zakończenia leczenia immunosupresyjnego. Nie obserwowano nawrotu zakażenia grzybiczego.



Ryc. 57. Tomografia komputerowa klatki piersiowej z widocznym podopłucnowym naciekiem grzybiczym w płucu lewym

Fig. 57. Chest computed tomography showing subpleural fungal infiltration in the left lung

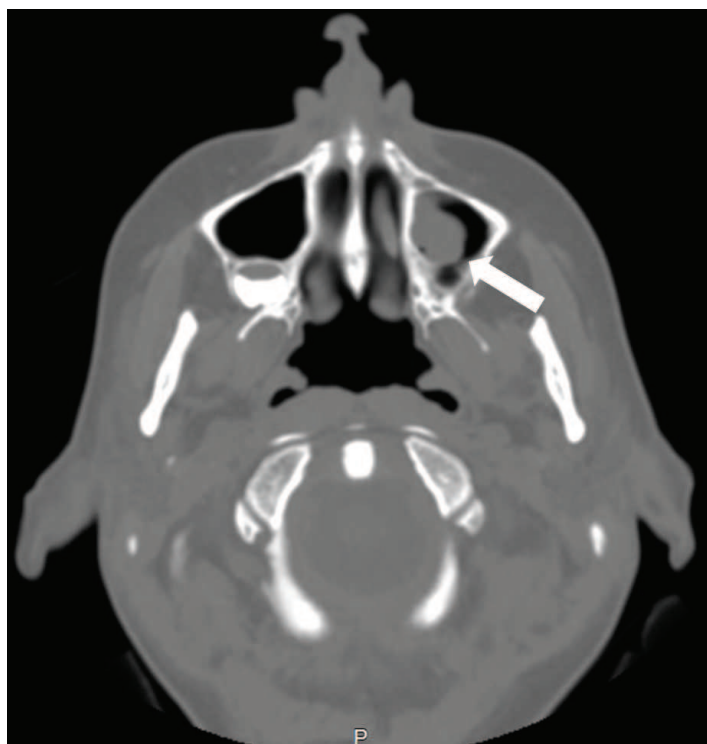


Ryc. 58. Tomografia komputerowa klatki piersiowej z widocznym naciekiem grzybiczym w płucu lewym (strzałka): A) regresja zmian po 4 tygodniach od włączenia leczenia; B) brak regresji zmian po kolejnych 2 tygodniach leczenia

Fig. 58. Chest computed tomography showing fungal infiltration in the left lung (arrow): A) regression observed after 4 weeks of antifungal treatment; B) no regression observed after the next 2 weeks of antifungal treatment

Opis przypadku – pacjent 6

Dziewczynka 16-letnia leczona z powodu wznowy ostrej białaczki mieloblastycznej. W 31. dobie agranulocytozy u pacjentki pojawiła się gorączka, ból w okolicy ujścia zatoki szczękowej oraz niedrożność przewodu nosowego. Obserwowano szybkie narastanie parametrów stanu zapalnego. Wykonano badanie ultrasonograficzne zatok przynosowych. W obu zatokach szczękowych nie uwidoczniło powietrza (bez artefaktów linii A). Widoczny był obrzęk błony śluzowej i przestrzeń płynowa, a w lewej zatoce przynosowej stwierdzono obecność patologicznej masy tkankowej. Wysłano sugestię etiologii grzybiczej obserwowanych zmian. Następnie wykonano badanie TK zatok, w którym również stwierdzono obecność zacinienia zatoki szczękowej lewej z obszarami o wyższej gęstości bez cech wzmocnienia po podaniu środka kontrastowego i ewidentnych cech destrukcji kostnej (ryc. 59).



Ryc. 59. Tomografia komputerowa głowy z widocznym naciekiem grzybiczym w zatoce szczękowej lewej (strzałka)

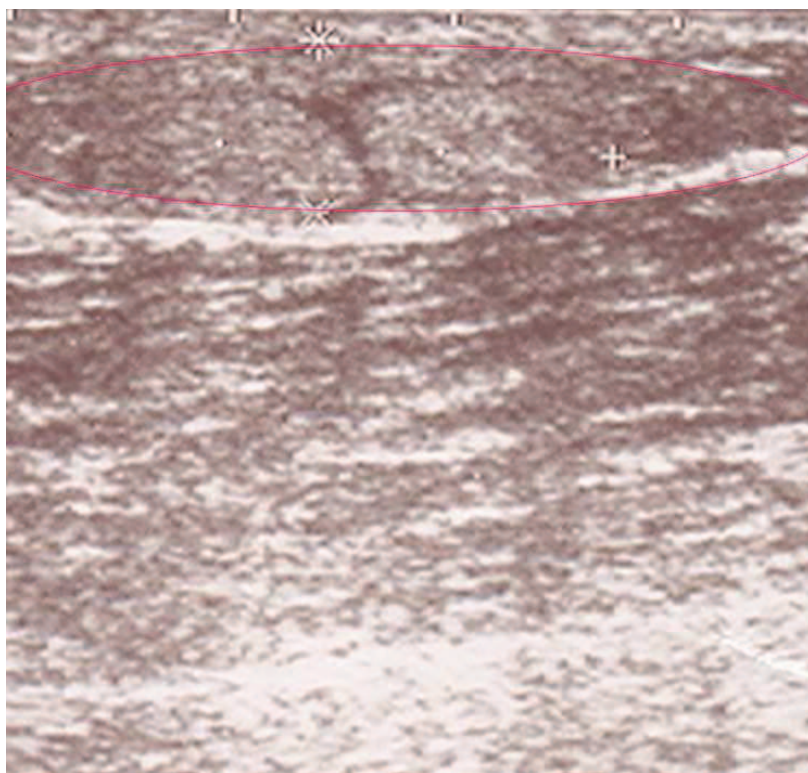
Fig. 59. Head computed tomography showing fungal infiltration in the left maxillary sinus (arrow)

Dodatkowo wykazano obecność antygenu galaktomannanowego w surowicy krwi ($I=0,7$; $I=0,62$). Włączono LAmB w dawce 3 mg/kg masy ciała. Po konsultacji laryngologicznej dziecko zakwalifikowano do zabiegu biopsji zatoki szczękowej. Zabieg przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym w Klinice Otolaryngologii GUMed. W przebiegu

poopreacyjnym wystąpiło masywne krwawienie z przewodu nosowego; dziewczynka wymagała przetoczenia koncentratu krwinek czerwonych i płytkowych. W pobranym materiale wyhodowano *Aspergillus fumigatus*. Po zabiegu kontynuowano podaż LAmB przez okres 6 tygodni. Po ustąpieniu klinicznych i laboratoryjnych objawów infekcji grzybiczej dziewczynkę przekazano do ośrodka przeszczepowego w celu przeprowadzenia allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego.

Opis przypadku – pacjent 7

Dziewczynka 15-letnia leczona z powodu nieziarniczego chłoniaka złośliwego B-komórkowego. W 21 dobie neutropenii u pacjentki stwierdzono obecność sinoczerwonego, nieznacznie tkliwego guzka na tylnej powierzchni uda. Parametry stanu zapalnego były niskie. Wykonano badanie ultrasonograficzne zmiany. W miejscu badanego palpacyjnie guzka na udzie prawym uwidoczniono nieprzekraczającą powięzi mięśniowej litą zmianę ogniskową o wymiarach 10×5,5 mm (ryc. 60), z wąskim bezechowym obszarem do 2 mm grubości przylegającym do dolnego bieguna zmiany.



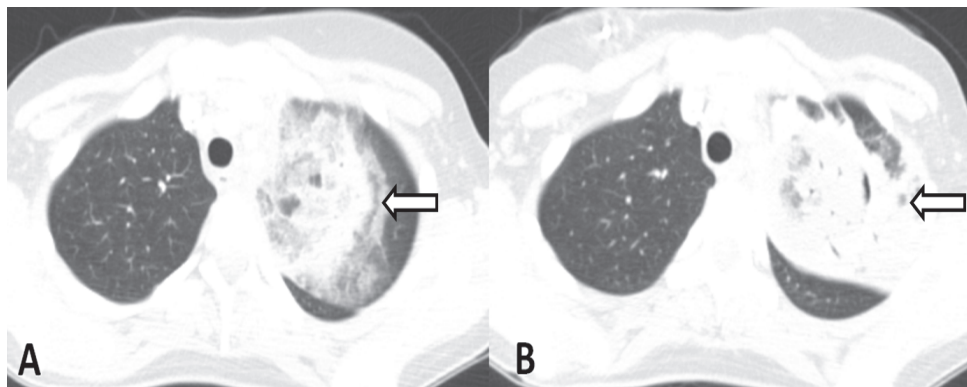
Ryc. 60. Badanie ultrasonograficzne skóry i tkanki podskórnej uda; widoczny owalny naciek zapalny o etiologii grzybiczej *Aspergillus* spp. (otoczony obwódką)

Fig. 60. Ultrasonography of the skin and subcutaneous tissue of thigh; oval-shaped inflammatory infiltration of *Aspergillus* spp. etiology (surrounded by a border)

W zmianie nie uwidoczniło przepływu krwi w opcjach *color Doppler* i *power Doppler*. Oceniono, że obraz ultrasonograficzny zmiany nie był typowy dla infekcji bakteryjnej. Wysłano sugestię zakażenia grzybiczego skóry. Tego samego dnia, w znieczuleniu miejscowym wykonano biopsję cienkoigłową zmiany. W badaniu cytologicznym stwierdzono strzępki grzyba *Aspergillus spp.* W wykonanej również tego dnia tomografii komputerowej klatki piersiowej stwierdzono liczne podopłucnowe guzki sugerujące zakażenie grzybicze. W badaniu okulistycznym stwierdzono rozległe zmiany zapalne siatkówki i naczyniówki mogące odpowiadać zakażeniu grzybiczemu. Włączono skojarzone leczenie przeciugrzybicze (LAmB + kaspofungina) uzyskując stopniowe ustąpienie zmian patologicznych w płucach oraz siatkówce. Leczenie skojarzone prowadzono przez 4 tygodni, następnie kontynuowano monoterapię LAmB przez 4 miesiące. Nie obserwowano nawrotu IZG.

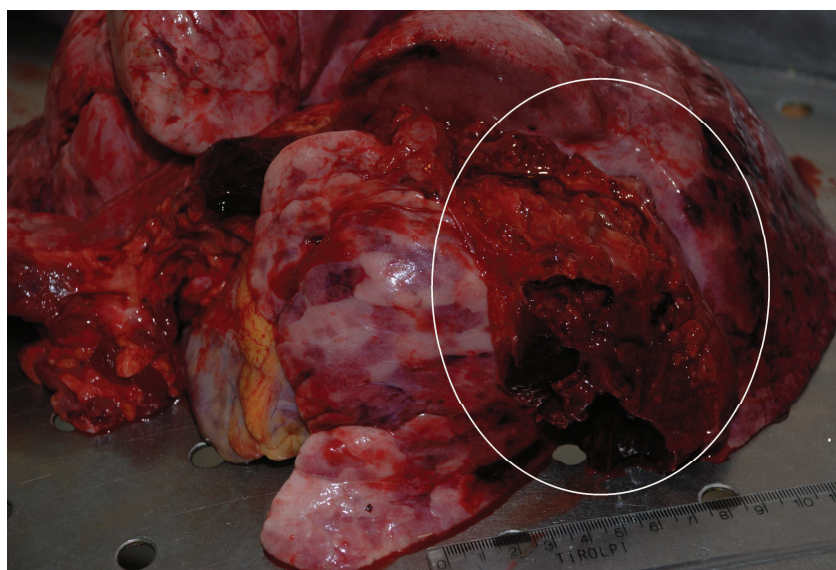
Opis przypadku – pacjent 8

Dziewczynka 14-letnia leczona w Klinice Hematologii Dziecięcej GUMed z powodu AML (protokół AML-BFM 2004 INTERIM). Po bloku terapeutycznym HAM, w 38. dobie agranulocytozy, dziewczynka zaczęła zgłaszać silny ból ramienia lewego. W badaniu przedmiotowym stwierdzono zmiany osłuchowe nad szczytem płuca lewego o charakterze rzeżeń drobnobańkowych i trzeszczeń. W obrazie klinicznym dominował suchy, nieproduktywny kaszel. Wykładowki stanu zapalnego były znacznie podwyższone. Wykonano PUBP, w którym opisano nacieki w tkance płucnej o wymiarach 50×35 mm zlokalizowany w górnych przednich partiach płuca lewego; zmiany o podobnej sonomorfologii uwidoczniło także podopłucnowo. Wykonano równocześnie badanie TK klatki piersiowej, w którym potwierdzono obecność zmiany naciekowej o wymiarach 64×62×46 mm zlokalizowanej w płacie górnym płuca lewego (ryc. 61); wysłano sugestię grzybiczej etiologii zmiany. Włączono leczenie przeciugrzybicze (ABLC w dawce 5 mg/kg masy ciała/dobę) oraz jako leczenie wspomagające granulocytarny czynnik wzrostu (5 µg/kg masy ciała/dobę). Z uwagi na brak rodzinnego dawcy nie zastosowano w terapii wspomagającej transfuzji koncentratu granulocytów. Po dwóch tygodniach leczenia wykonano kontrolne badanie TK klatki piersiowej, w którym wykazano progresję stwierdzanych uprzednio zmian. W tym okresie obserwowano systematyczną odnowę hematologiczną. Z uwagi na brak spodziewanego efektu terapeutycznego oraz pojawienie się krwioplucia – podjęto decyzję o kwalifikacji pacjentki do zabiegu operacyjnego. Planowany zakres zabiegu obejmował usunięcie płata górnego płuca lewego. W dniu zabiegu dziewczynka miała zadowalające parametry hematologiczne oraz prawidłowy układ krzepnięcia. W trakcie transportu chorej na blok operacyjny podczas napadu kaszlu doszło do masywnego krwotoku z płuc z zatrzymaniem oddechu i krążenia. Pomimo natychmiastowej akcji reanimacyjnej oraz wielokrotnej ewakuacji krwi za pomocą bronchofiberoskopu – nie uzyskano zahamowania krwawienia i powrotu czynności życiowych. W badaniu autopsyjnym w wycinkach z płata górnego płuca lewego opisano zawał krwotoczny płuca oraz krwotok płucny (ryc. 62). Na obwodzie zmian opisano przewlekłe aktywne zapalenie płuc. Potwierdzono obecność zwyrodniałych strzępek grzybni odpowiadających *Aspergillus spp.*; potwierdzono ustalone przyżyciowo rozpoznanie angioinwazyjnej aspergilozy płuc [94].



Ryc. 61. Tomografia komputerowa klatki piersiowej z widocznym naciekiem grzybiczym w płucu lewym (strzałka): A) przed włączeniem leczenia przeciwgrzybiczego; B) progresja nacieku zapalnego 14 dni po wdrożeniu leczenia przeciwgrzybiczego

Fig. 61. Chest computed tomography showing fungal infiltration in the left lung (arrow): A) before antifungal treatment; B) progression of inflammatory infiltration 14 days after antifungal treatment implementation



Ryc. 62. Autopsyjny obraz makroskopowy płuca lewego z widocznym naciekiem grzybiczym (obwódka) o etiologii *Aspergillus spp.*

Fig. 62 Autopsy macroscopic appearance of the left lung with fungal infiltration (border) of *Aspergillus spp.* etiology

W analizowanej grupie 8 dzieci z IZG wskazaniami do zastosowania procedur inwazyjnych były: diagnostyka, pogorszenie stanu klinicznego dzieci, usunięcie zmian resztkowych oraz brak skuteczności zastosowanego leczenia przeciwgrzybiczego przy obecności zlokalizowanych zmian podejrzanych o etiologię grzybiczą (tab. 18). Głównym

efektem zastosowanych procedur interwencyjnych było uzyskanie materiału diagnostycznego, możliwość potwierdzenia etiologii grzybiczej i identyfikacji patogenu oraz usunięcie ogniska zakażenia grzybiczego.

Tabela 18. Wskazania do procedury inwazyjnej i jej efektywność u dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi

Table 18. Indications and efficacy of surgical procedure in children with invasive fungal disease

Rodzaj procedury inwazyjnej / <i>type of surgical procedure</i>	Wskazanie do zabiegu / <i>procedure indications</i>	Pacjent / <i>patient</i>	Efektywność zabiegu / <i>efficacy of the procedure</i>
punkcja opłucnej / <i>pleural puncture</i>	diagnostyka, niewydolność oddechowa	1	rozpoznanie mikrobiologiczne IZG, poprawa wydolności oddechowej
biopsja tarczycy / <i>thyroid biopsy</i>	diagnostyka, ocena zaawansowania IZG	1	rozpoznanie histopatologiczne IZG
biopsja skóry / <i>skin biopsy</i>	diagnostyka	7	rozpoznanie histopatologiczne IZG
biopsja zatoki przynosowej / <i>paranasal sinus biopsy</i>	diagnostyka	6	rozpoznanie mikrobiologiczne IZG
resekcja klinowa tkanki płucnej / <i>pulmonary tissue wedge resection</i>	usunięcie zmiany resztkowej, potwierdzenie rozpoznania	5	rozpoznanie histopatologiczne IZG, wyleczenie
segmentektomia / <i>segmentectomy</i>	usunięcie zmiany resztkowej, potwierdzenie rozpoznania	4	rozpoznanie histopatologiczne IZG, wyleczenie
lobektomia / <i>lobectomy</i>	brak skuteczności leczenia zachowawczego przy obecności zmiany zlokalizowanej, potwierdzenie rozpoznania	2	rozpoznanie histopatologiczne IZG, wyleczenie
lobektomia / <i>lobectomy</i>	brak skuteczności leczenia zachowawczego przy obecności zmiany zlokalizowanej, potwierdzenie rozpoznania	3	rozpoznanie histopatologiczne IZG, wyleczenie
lobektomia / <i>lobectomy</i>	brak skuteczności leczenia zachowawczego przy obecności zmiany zlokalizowanej, potwierdzenie rozpoznania	8	—*
pulmonektomia / <i>pulmonectomy</i>	brak skuteczności leczenia zachowawczego przy jednostronnym zajęciu płuca	1	brak skuteczności leczenia, zgon z progresji zakażenia grzybiczego

* zabiegu nie wykonano, dziecko zmarło podczas transportu na salę operacyjną

Tabela 19. Przedoperacyjna charakterystyka pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym zakwalifikowanych do procedur inwazyjnych

Table 19. Preoperative characteristics of patients with invasive fungal infections qualified for surgery

Pacjent / patient	Wiek / age	Płeć / gender	Rozpoznanie podstawowe / underlying disease	Protokół leczniczy/etap leczenia/leki immunosupresyjne / treatment protocol/treatment phase/immunosuppressive pharmacotherapy	Objawy / symptoms	Wstępne leczenie przeciwwgrzybicze / initial antifungal treatment	Przedoperacyjna diagnostyka IZG / pre-operative IZG diagnostics	Localizacja / localization	Czas od podejrzenia IZG do zabiegu (dni) / time from IZG suspicion to surgery (days)
1	9	d	ALL	ALL IC-BFM 2002/indukcja/-	gorączka, duszność	ABLC	PUBP, TK, GM+	płuca, tarczyca	30
2	8	d	ALL	ALL IC-BFM 2002/konsolidacja/-	kaszel, krwiotłucie	LAmB	PUBP, TK	płuca	28
3	10	c	ALL	ALL IC-BFM 2002/konsolidacja/-	gorączka, duszność	ABLC	PUBP, TK	płuca	19
4	16	d	SAA	~post-BMT/glikokortykosterydy, CsA	gorączka, ból w klatce piersiowej	LAmB	PUBP, TK, GM+	płuca	48
5	18	c	ALL rez	~post-BMT/glikokortykosterydy, CsA	gorączka, kaszel, ból w klatce piersiowej	ABLC	PUBP, TK, GM+	płuca	56
6	15	d	AML rez	IDA-FLAG/indukcja/-	gorączka, ból ujęcia zatoki, niedrożność nosa	LAmB	USG, TK, GM+	zatoki przynosowe	7
7	15	d	NHL B	B-NHL BFM-04/konsolidacja/-	guzek na tylnej powierzchni uda	-	USG	skóra	0
8	13	d	AML	AML-BFM 2004 INTERIM/indukcja/-	gorączka, ból ramienia, kaszel, krwiotłucie	ABLC	PUBP, TK	płuca	19

IZG – inwazyjne zakażenie grzybicze / *invasive fungal infection*; d – dziewczynka / *girl*; c – chłopiec / *boy*; ALL – ostra białaczka limfoblastyczna / *acute lymphoblastic leukemia*; rez – wznowa / *recidiva*; SAA – ciężka anemia aplastyczna / *severe aplastic anaemia*; AML – ostra białaczka mieloblastyczna / *acute myeloid leukemia*; NHL B – nieziarniczy chłoniak złośliwy B-komórkowy / *B-cell non-Hodgkin lymphoma*; post-BMT – po transplantacji komórek krwiotwórczych / *after bone marrow transplantation*; CsA – cyklosporyna A / *cyclosporin A*; ABLC – amfoterycyna B kompleks lipidowy / *amphotericin B lipid complex*; LAmB – liposomalna amfoterycyna B / *liposomal amphotericin B*; PUBP – przekłatkowe ultrasonograficzne badanie płuc / *transthoracic pulmonary ultrasound examination*; TK – tomografia komputerowa / *computed tomography*; GM+ – dodatni antygen galaktomannanowy w surowicy krwi / *positive galactomannan antigen in serum* (index ≥ 5)

U 7 dzieci spośród 8 pacjentów z IZG zakwalifikowanych do procedur inwazyjnych w okresie przedoperacyjnym stosowano leczenie przeciwwgrzybicze kwalifikowane jako terapia wyprzedzająca. U wszystkich 7 dzieci z tej grupy stosowano amfoterycynę B. Podejrzenie IZG wysuwano na podstawie objawów klinicznych występujących u dzieci z czynnikami ryzyka wystąpienia IZG (gorączka, kaszel, duszność, krwiotłucie, ból w klatce piersiowej, niedrożność przewodów nosowych, obecność wyczuwalnego guzka),

badan obrazowych (USG w tym PUBP, TK), a także obecności antygenu galaktomanna-nowego w surowicy krwi. Średni czas, który upłynął od wysunięcia podejrzenia IZG do wykonania procedury inwazyjnej wynosił 26 dni (SD=19 dni; minimum 0 dni; maksimum 56 dni). Szczegółową charakterystykę dzieci z IZG, które zakwalifikowano do procedur inwazyjnych przedstawiono w tabeli 19.

W tabeli 20 zestawiono wybrane parametry hematologiczne (liczba granulocytów i płytek krwi) w dniu interwencji; u trojga dzieci stwierdzono agranulocytozę; u dwójga dzieci obserwowano liczbę płytek krwi 30 G/l.

Tabela 20. Liczba granulocytów i płytek krwi w dniu zabiegu oraz transfuzje preparatów krwiopochodnych w okresie okołoperacyjnym u dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi zakwalifikowanych do procedur inwazyjnych

Table 20. Granulocyte and thrombocyte count on the day of surgical procedure and blood products transfusions in the perioperative period in children with invasive fungal disease qualified for surgery

Pa- cjent / Pa- tient	Planowana procedu- ra inwazyjna / <i>Planned surgical procedure</i>	Liczba granulocy- tów / <i>Gra- nulocytes count (G/l)</i>	Liczba płytek krwi / <i>Thrombo- cytes count (G/l)</i>	Transfuzje / <i>Transfusions of KKCz</i>	Transfuzje / <i>Transfusions of KKP</i>
1	Punkcja opłucnej	0,01	21	Nie	Przed zabiegiem 4j
1	Biopsja tarczycy	2	45	Nie	Przed zabiegiem 5j
1	Pulmonektomia	3	33	Przed zabie- giem 2j / po zabiegu 4j	Przed zabiegiem 4j / po zabiegu 4j
2	Lobektomia	4,5	120	Po zabiegu 1j	nie
3	Lobektomia	1,5	33	Przed zabie- giem 2j / po zabiegu 4j	Przed zabiegiem 4j/ po zabiegu 4j
4	Segmentektomia	2,5	99	Po zabiegu 2j	Nie
5	Resekcja klinowa tkanki płucnej	3,5	100	Po zabiegu 6j	Nie
6	Biopsja zatoki przynosowej	0,22	31	Przed zabie- giem 2j / po zabiegu 4j	Przed zabiegiem 5j / po zabiegu 15j
7	Biopsja skóry	0,1	31	Nie	Nie
8	Lobektomia	150	50	Przed zabie- giem 2j	Przed zabiegiem 5j

KKCz – koncentrat krwinek czerwonych / *erythrocyte concentrate*; KKP – koncentrat krwinek płytkowych / *thrombocyte concentrate*; j – jednostka / *unit*

Transfuzje koncentratu krwinek czerwonych przed zabiegiem wykonano u czworga dzieci (tab. 20); transfuzje koncentratu krwinek płytkowych przed sześcioma interwencjami u czworga dzieci. Wśród dzieci z IZG, u których wykonano procedury inwazyjne u jednej pacjentki przeprowadzono 3 procedury inwazyjne: w obrębie tkanki płucnej, jamy opłucnowej i gruczołu tarczowego. Procedury inwazyjne w obrębie tkanki płucnej

wykonano u 4 dzieci. Biopsję guzka znajdującego się w obrębie tylnej powierzchni skóry uda przeprowadzono u jednej dziewczynki. U innej pacjentki wykonano biopsję zatoki przynosowej. Jedno dziecko zakwalifikowane do procedury inwazyjnej (lobektomia) zmarło przed jej wykonaniem. U 2 z 7 dzieci po interwencjach (29%) wystąpiły powikłania leczenia chirurgicznego pod postacią krwawienia pooperacyjnego; u jednego dziecka w związku z masownością krwawienia konieczna była reoperacja. Transfuzje koncentratu krwinek czerwonych w okresie pooperacyjnym wykonano u sześciorga dzieci, natomiast koncentratu krwinek płytkowych u trojga dzieci.

Tabela 21. Rodzaj zabiegu i pooperacyjna charakterystyka dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi

Table 21. Type of surgical procedure and postoperative characteristics of children with invasive fungal infections

Pacjent / patient	Rodzaj procedury inwazyjnej / type of surgical procedure	Rodzaj leczenia przeciwrzybiczego po zabiegu / type of antifungal treatment after surgery	Powikłania po zabiegu / surgery complications	Czas pobytu na oddziale chirurgicznym (dni) / surgical ward postoperative stay (days)	Rozpoznanie ostateczne / definitive diagnosis	Wynik leczenia przeciwrzybiczego / antifungal treatment result	Opóźnienie chemioterapii w wyniku IZG (tygodnie) / delay in chemotherapy due to IZG (weeks)
1	punkcja opłucnej biopsja tarczycy pulmonektomia	ABLC + Poz ABLC + Poz ABLC + Poz	nie nie nie	0** 0** 5	mukormykoza + aspergiloza	zgon	–
2	lobektomia	LAmB, następnie Wor	nie	7	aspergiloza	wyleczony	8
3	lobektomia	ABLC, następnie Wor	nie	7	aspergiloza	wyleczony	6
4	segmentektomia	Wor	nie	5	aspergiloza	wyleczony	–
5	resekcja klinowa tkanki płucnej	ABLC, następnie Poz	tak*	5	aspergiloza	wyleczony	–
6	biopsja zatoki przynosowej	LAmB	tak*	1	aspergiloza	wyleczony	3
7	biopsja skóry	LAmB + kaspofungina, następnie Poz	nie	0**	aspergiloza	wyleczony	–
8	zgon podczas transportu na blok operacyjny	–	–	–	aspergiloza***	zgon	–

IZG – inwazyjne zakażenie grzybicze / *invasive fungal infection*; ABLC – amfoterycyna B kompleks lipidowy / *amphotericin B lipid complex*; LAmB – liposomalna amfoterycyna B / *liposomal amphotericin B*; Poz – pozakonazol / *posaconazole*; Wor – worykonazol / *voriconazole*; * – krwawienie / *bleeding*; ** – zabieg wykonany na oddziale macierzystym / *surgery in hematology ward*; *** – rozpoznanie postawione na podstawie badania sekcyjnego / *diagnosis based on autopsy*

Czas pobytu dzieci na oddziale chirurgicznym nie przekraczał 7 dni (tab. 21). U wszystkich dzieci, u których wykonano zabiegi inwazyjne udokumentowano czynnik etiologiczny; u jednego pacjenta na podstawie badania mikologicznego, u 5 dzieci na podstawie badania histopatologicznego, a u jednego dziecka na podstawie zarówno badania mikologicznego, jak i histopatologicznego. U jednego dziecka potwierdzono histopatologicznie zakażenie mieszane tkanki płucnej o etiologii *Aspergillus spp.* i *Mucor spp.*; u tej pacjentki w posiewie płynu z jamy opłucnowej oraz w preparacie biopsyjnym z tarczycy wykazano obecność *Mucor spp.* Obecność strzępek grzyba *Aspergillus spp.* wykazano w materiale biopsyjnym ze skóry oraz u wszystkich operowanych dzieci, u których zakażenie grzybicze obejmowało tkankę płucną. W posiewie z punktu z zatoki szczękowej u pacjenta 6 wyhodowano *Aspergillus fumigatus*.

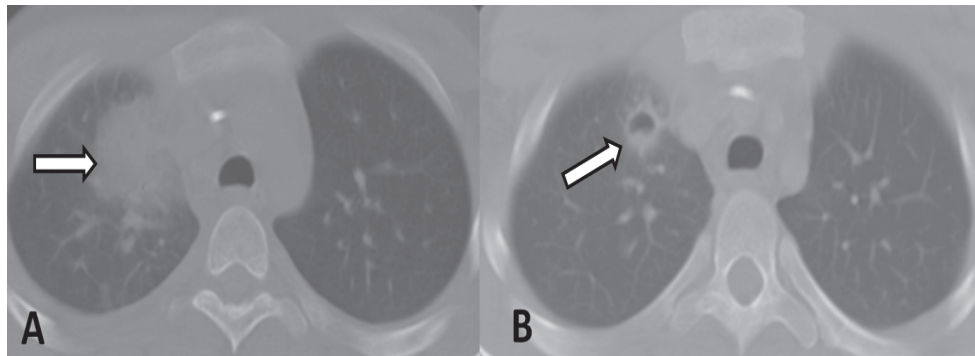
Ostateczny, pozytywny wynik leczenia przeciwgrzybiczego z wykorzystaniem m.in. procedur inwazyjnych osiągnięto u 6 dzieci. Jedno z dzieci, które zakwalifikowano do lobektomii zginęło podczas transportu na salę operacyjną, a drugie zmarło z powodu progresji zakażenia grzybiczego pomimo zastosowania kompleksowego leczenia przeciwgrzybiczego z wykorzystaniem procedur inwazyjnych. Szczegółowe zestawienie procedur inwazyjnych i uzyskanych wyników przedstawiono w tabeli 21.

Pacjent z IZG, u którego odstąpiono od zabiegu operacyjnego – opis przypadku

Dodatkowo, przedstawiono opis przypadku dziecka, u którego pomimo wstępnej kwalifikacji do zabiegu lobektomii odstąpiono od interwencji z uwagi na bardzo wysokie ryzyko okołoperacyjne.

Pacjent 15-letni z ostrą białaczką mieloblastyczną w trakcie leczenia konsolidującego (po bloku AI wg AML-BFM 2004 INTERIM). W 20. dobie agranulocytozy pacjent zaczął septycznie gorączkować; w czwartej dobie gorączki pojawił się nasilony ból zlokalizowany w prawej okolicy podłopatkowej nasilający się podczas oddychania. Nie stwierdzano odchyłań w badaniu fizykalnym płuc, natomiast obserwowano znacząco podwyższone wykładniki stanu zapalnego. Wykonano PUBP, a następnie badanie TK klatki piersiowej, w których opisano zmianę ogniskową zlokalizowaną w płucu prawym (4×4 cm) o charakterze masywnego zgęszczenia mięsistego, z powietrznym bronchogramem (ryc. 63). Jednocześnie uzyskano dodatni wynik badania antygenu galaktomananowego w surowicy krwi (I=0,7; I=0,57). Rozpoznano prawdopodobne inwazyjne zakażenie grzybicze zgodnie ze zmodyfikowanymi kryteriami EORTC. Z uwagi na wcześniej stosowaną profilaktykę worykonazolem i LAmB, zdecydowano o włączeniu kaspofunginy. Jednocześnie dziecko konsultowano z torakochirurgami pod kątem ewentualnych wskazań do zabiegu operacyjnego. Rozległość zmiany patologicznej wydawała się przemawiać za decyzją o zabiegu operacyjnym, zwłaszcza w kontekście pilnej transplantacji komórek krwiotwórczych u analizowanego chorego. Jednakże ciężki ogólny stan pacjenta, głęboka mielosupresja, a przede wszystkim bardzo niekorzystna lokalizacja nacieku w sąsiedztwie wielkich naczyń przesądziły o odroczeniu interwencji chirurgicznej.

gicznej i kontynuacji leczenia farmakologicznego. Stan pacjenta ulegał stopniowej poprawie, po dwóch tygodniach wykonano kontrolne PUBP oraz badanie TK klatki piersiowej, w których stwierdzono znaczną regresję nacieku z wytworzeniem ropnia. Zdecydowano o kontynuacji leczenia zachowawczego. Kolejne badania kontrolne wykazały jedynie obecność drobnej jamy pozapalnej. Po zakończeniu leczenia kasprofunginą pacjent otrzymywał do czasu przeszczepu i w trakcie procedury przeszczepowej wtórną profilaktykę przeciwgrzybiczą pozakonazolem.



Ryc. 63. Tomografia komputerowa klatki piersiowej z widocznym naciekiem grzybiczym w płucu prawym (strzałka): A) przed włączeniem leczenia przeciwgrzybiczego; B) regresja nacieku zapalnego 14 dni po wdrożeniu leczenia przeciwgrzybiczego

Fig. 63. Chest computed tomography showing fungal infiltration in the right lung (arrow): A) before antifungal treatment; B) regression of the infiltration after 14 days of antifungal treatment implementation

5. DYSKUSJA

Problematyka zakażeń grzybiczych znana jest od połowy XIX wieku, kiedy w roku 1853 Banley i Raynal opisali po raz pierwszy grzybicę u zwierząt, natomiast w roku 1856 Rudolf Virchow rozpoznał i opisał aspergilozę płuc [2]. Niemal 100 lat później, w roku 1953, po raz pierwszy opisano pacjenta z upośledzeniem układu immunologicznego i z rozsianą aspergilozą płuc [177].

Inwazyjne zakażenia grzybicze stanowią narastający problem na oddziałach onkohaematologicznych [184] stanowiąc najczęstszą przyczyną zgonów związanych z zakażeniem u chorych w indukcji ostrych białaczek [139;185]. Efekty leczenia zarówno zakażeń wywołanych przez grzyby rodzaju *Aspergillus spp.* jak i *Candida spp.* są nadal niezadowalające. Śmiertelność związana z inwazyjną aspergilozą w ostrej białaczce mieloblastycznej jest wprawdzie niższa niż latach 1987-1998, kiedy wynosiła 48%, jednakże nadal jest bardzo wysoka (30-40%) [160]. W opracowaniu Crassard i wsp. retrospektywnej analizie poddano 24 pacjentów pediatrycznych z inwazyjną aspergilozą wykazując bardzo wysoką śmiertelność w tej grupie dzieci wynoszącą prawie 90% [45]. Obecnie, z uwagi na wprowadzenie nowych, bardziej skutecznych leków przeciwgrzybiczych uzyskano wprawdzie poprawę uzyskiwanych wyników terapeutycznych, tym niemniej śmiertelność w aspergilozie pozostaje nadal wysoka. Burgos i wsp. w opracowaniu z 2008 roku podaje, że 53% dzieci z inwazyjną aspergilozą umiera, natomiast u biorców przeszczepu szpiku śmiertelność jest jeszcze wyższa i wynosi 78% [28].

W analizowanej grupie 245 pacjentów leczonych w latach 2003-2011 w ośrodku hematologii dziecięcej w Gdańsku z powodu ostrych białaczek, niezłośliwych chłoniaków złośliwych i ciężkiej anemii aplastycznej rozpoznano 61 incydentów incydentów inwazyjnych zakażeń grzybiczych (24,1%).

Przedstawiana w literaturze częstość występowania IZG u pacjentów onkohaematologicznych waha się w zakresie 5-24% [195]. Autorzy podają bardzo rozbieżne wyniki dotyczące częstości występowania IZG zarówno u pacjentów poddawanych chemioterapii, jak i poddawanych allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych (2-40%) [171].

Poszukiwano odpowiedzi na pytanie, dlaczego częstość występowania IZG w ośrodku gdańskim jest wyższa niż podawana w literaturze. Wydaje się, że wyjaśnienie tego zjawiska stanowić może odmienny sposób kwalifikacji chorych do badań. Brak sprecyzowanych kryteriów diagnostycznych, jako przyczynę znacznych różnic w częstości występowania IZG podaje między innymi Sieniawski i wsp. w doniesieniu z 2004 roku [195].

Z uwagi na powszechnie znane trudności w udokumentowaniu etiologii grzybiczej zakażenia, w analizie wykorzystano kryteria sformułowane przez EORTC [51;53]. W oparciu o czynniki zależne od gospodarza, kryteria kliniczne i mikologiczne, wprowadzono trzy kategorie rozpoznania IZG: możliwego, prawdopodobnego i udokumentowanego. Wśród 61 incydentów zakażeń grzybiczych uwzględnionych w niniejszym opracowaniu, zakażenie pewne stwierdzono u 18 dzieci, prawdopodobne – u 17 dzieci, natomiast w pozostałych przypadkach zakażenie grzybicze zdefiniowano jako możliwe. Udokumentowanie zakażenia grzybiczego jest bardzo trudne, natomiast również spełnienie kryteriów rozpoznania prawdopodobnego napotyka na wiele trudności związanych między innymi z dostępnością oznaczeń antygenów grzybiczych oraz trudności w interpretacji wyników dodatnich. W przypadku uwzględnienia w niniejszej analizie

jedynie zakażeń prawdopodobnych i udokumentowanych odsetek zakażeń grzybiczych byłby niższy i wynosiłby 14,3%.

W większości opracowań, w analizach uwzględniane są jedynie zakażenia grzybicze udokumentowane i prawdopodobne. Wydaje się jednak, że dane uzyskane na podstawie takiego sposobu kwalifikacji chorych do badań obarczone są dużym błędem. Należy podkreślić, że do rozpoznania prawdopodobnego zakażenia grzybiczego u pacjenta z czynnikami ryzyka konieczne jest nie tylko wykazanie odchyleń w badaniach obrazowych, ale także stwierdzenie dodatnich markerów mikologicznych takich jak galaktomannan czy 1,3 β -D-glukan. W codziennej praktyce klinicznej kryteria te są trudne do spełnienia, zwłaszcza u dzieci i niejednokrotnie mamy do czynienia z sytuacją, kiedy przy ujemnych badaniach mikologicznych stwierdza się nasilone zmiany w badaniach obrazowych o morfologii typowej dla etiologii grzybiczej. W takim przypadku można postawić jedynie rozpoznanie możliwego zakażenia grzybiczego. W związku z powyższym w niniejszym opracowaniu w analizie częstości występowania IZG ujęto także zakażenia „możliwe”. W oparciu o przedstawione argumenty wydaje się, że być może bardziej precyzyjnym kryterium kwalifikacji pacjentów do analiz byłby rodzaj stosowanej terapii przeciugrzybiczej z wykluczeniem pacjentów poddawanych terapii empirycznej, natomiast z uwzględnieniem chorych leczonych wyprzedzająco. Istotne dla zrozumienia problemu niedoszacowania częstości występowania zakażeń grzybiczych wyniki przedstawił Chamilos w badaniu z 2006 roku [35]. Na podstawie badań autopsyjnych ocenianych w trzech przedziałach czasowych: lata 1989-1993, 1994-1998 i 1999-2003 stwierdzono narastającą częstość występowania IZG w analizowanym materiale klinicznym, która wyniosła 31%. Najistotniejszy wydaje się jednak fakt, iż jedynie u 25% chorych rozpoznano ustalono przyżyciowo [35].

W dalszej części rozprawy przeanalizowano częstość występowania IZG w zależności od rozpoznania choroby podstawowej. W grupie 156 dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej zakażenie grzybicze rozpoznano u 28 dzieci, co stanowiło 18% całej grupy. Zdecydowanie częściej infekcję rozpoznano u dzieci leczonych zgodnie z ramieniem terapeutycznym HR (grupa wysokiego ryzyka); różnicę tę potwierdzono statystycznie.

Wśród 46 dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki mieloblastycznej, inwazyjne zakażenie grzybicze stwierdzono u 18 pacjentów (39%). W odróżnieniu od przedstawianej grupy dzieci z ALL, u dzieci z AML nie obserwowano różnic w częstości występowania zakażeń pomiędzy dziećmi z grupy standardowego i wysokiego ryzyka. Wydaje się, że wyjaśnieniem tego zjawiska może być fakt, że różnice w intensywności chemioterapii pomiędzy ramionami terapeutycznymi dla poszczególnych grup ryzyka są większe w przypadku dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej.

Co ciekawe, w odróżnieniu od części autorów, nie wykazano różnic w częstości występowania IZG pomiędzy dziećmi leczonymi z powodu pierwotnego rozpoznania i wznowy zarówno ALL, jak i AML, co być może wynika ze stosunkowo małej liczebności grupy [78].

Porównując częstość występowania IZG u dzieci z ALL i AML uzyskano wyniki potwierdzające obserwacje innych autorów dokumentując wyższą częstość zakażeń u pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną (18% vs 39%). Już w 1998 roku Denning i wsp. wskazywali, że inwazyjna aspergiloza częściej występuje u chorych dorosłych z ostrą białaczką mieloblastyczną niż limfoblastyczną (49% vs 21%) tłumacząc te różnice głębokimi zaburzeniami jakościowymi i ilościowymi krwinek białych wynikającymi zarówno z choroby podstawowej, jak i agresywnego leczenia [53]. W analizie uwzględ-

niającej dzieci z AML również udokumentowano wysokie ryzyko rozwoju IZG (powyżej 29%) zarówno w pierwotnym rozpoznaniu, jak i we wznowie [58].

W analizowanym w niniejszym opracowaniu materiale klinicznym, wysoką częstość zakażeń grzybiczych obserwowano jednak także w przypadku dzieci z nieziarniczymi chłoniakami złośliwymi (26,5%). Być może zjawisko to można tłumaczyć faktem, że zdecydowana większość pacjentów zakwalifikowana była wstępnie do wysokich stadiów zaawansowania klinicznego i w związku z tym otrzymywała bardzo agresywną chemioterapię. Wydaje się, że w przypadku tego rozpoznania, możliwości redukcji częstości występowania IZG należy upatrywać we wcześniejszym rozpoznaniu choroby nowotworowej, co skutkowałoby stosowaniem mniej agresywnej chemioterapii.

Interesujące wydaje się zestawienie etapów choroby nowotworowej, na jakich stwierdzano IZG. Najwięcej epizodów obserwowano w trakcie realizacji protokołów konsolidacyjnych, natomiast w trakcie indukcji remisji IZG stwierdzano zdecydowanie rzadziej. Wyniki te różnią się zdecydowanie od uzyskanych przez Pagano i wsp. [159]. Wprawdzie w badaniu tym także wykazano zależność częstości występowania zakażeń grzybiczych od etapu leczenia choroby nowotworowej, ale zdecydowana większość spośród analizowanych przypadków IZG (43%) miała miejsce w trakcie leczenia indukcyjnego białaczki, natomiast jedynie 8% – w trakcie konsolidacji. Podczas leczenia wznowy choroby podstawowej stwierdzono 28% incydentów, natomiast u pozostałych 21% chorych rozpoznanie IZG postawiono podczas stosowania chemioterapii kolejnych linii [159]. Wydaje się, że rutynowe stosowanie w ośrodku gdańskim profilaktyki przeciwgrzybiczej u dzieci w trakcie leczenia indukcyjnego, a także u dzieci leczonych z powodu wznowy choroby nowotworowej ogranicza częstość występowania zakażeń na tych etapach leczenia [58].

Wśród czynników etiologicznych inwazyjnych zakażeń grzybiczych w analizowanej grupie dzieci najczęściej rozpoznawano zakażenie *Aspergillus spp.* (23 przypadki). Wśród pacjentów z aspergilozą, zakażenie potwierdzono w 9 przypadkach, natomiast u 14 pacjentów rozpoznanie postawiono w oparciu o odchylenia w badaniach obrazowych oraz wykazaniu obecności antygenu galaktomannanowego w surowicy krwi. Kolejnym co do częstości występowania czynnikiem etiologicznym były grzyby z rodzaju *Candida*. W analizowanej grupie dzieci najczęściej izolowano *Candida glabrata* (7 przypadków), które były czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego oraz stanowiły czynnik etiologiczny fungemii u dwojga dzieci. U dwóch pacjentów stwierdzono kandydemię odcewnikową wywołaną przez *Candida parapsillosis*. Ten gatunek *Candida* jest szczególnie często przyczyną zakażeń u pacjentów z implantowanym cewnikiem centralnym. Grzyby z gatunku *Candida kefyr* i *Candida albicans* hodowane były w analizowanej grupie dzieci jednokrotnie. Uzyskane w niniejszej analizie wyniki badań mikologicznych potwierdzają obserwowaną aktualnie tendencję epidemiologiczną polegającą na zdecydowanej redukcji częstości występowania zakażeń *Candida albicans* w stosunku do gatunków *non-albicans*. Obserwowana tendencja wynika prawdopodobnie z wcześniejszego powszechnego stosowania profilaktyki przeciwgrzybiczej flukonazolem.

U dwojga dzieci udokumentowano zakażenie mieszane: u jednej pacjentki mukoromycyza współistniała z aspergilozą, natomiast u drugiego pacjenta – aspergiloza z kandydemią. W obu przypadkach etiologię zakażenia potwierdzono histopatologicznie lub mikologicznie. Należy podkreślić konieczność dążenia do ustalenia czynnika etiologicznego zakażenia, co ma szczególne znaczenie w przypadku zakażeń mieszanych, gdyż ustalenie właściwej opcji terapeutycznej może być bardzo trudne.

Zgodnie z danymi z literatury zdecydowanie najczęstszą lokalizacją narządową zakażeń grzybiczych były płuca (44 przypadki) [46;110]. W opisywanej grupie dzieci, w czterech przypadkach rozpoznano fungemię, w czterech – zakażenie układu moczowego, natomiast u jednego dziecka stwierdzono zapalenie zatok przynosowych. U pięciorga dzieci rozpoznano zakażenie rozsiane. W jednym przypadku zakażenie obejmowało oba płuca, tarczycę, śledzionę i nerkę. U drugiego dziecka udokumentowano natomiast zajęcie skóry, płuc, wątroby, śledziony i gałki ocznej. W analizowanej grupie pacjentów z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym nie stwierdzono żadnego przypadku zakażenia ośrodkowego układu nerwowego, co prawdopodobnie wynika ze skuteczności wczesnego wdrażania terapii przeciwgrzybiczej w ośrodku gdańskim.

Historia skutecznego leczenia przeciwgrzybiczego sięga połowy ubiegłego wieku, kiedy to po raz pierwszy zsyntetyzowano nystatynę. Przełomem w terapii grzybic układu moczowego było jednak wyizolowanie przez Squibb Institute for Medical Research w 1955 roku Amfoterycyny B – antybiotyku przeciwgrzybiczego z grupy polienów, który do dziś jest powszechnie stosowany w leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Została ona wyizolowana z bakterii *Streptomyces nodosus*, które znajdowały się w glebie pobranej z okolic rzeki Orinoko w Wenezueli. Amfoterycynę B po raz pierwszy zastosowano w terapii IZG u człowieka w 1960 roku [134].

Pomimo wprowadzenia nowych leków przeciwgrzybiczych, amfoterycyna B, a zwłaszcza jej nowe, bardziej bezpieczne formy nadal pozostaje skuteczną opcją terapeutyczną u pacjentów z zakażeniami grzybiczymi. W terapii przeciwgrzybiczej, poza amfoterycyną B, stosuje się leki z następujących grup: azole, echinokandyny oraz najrzadziej – inhibitory syntezy kwasów nukleinowych [2]. Wytyczne dotyczące leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych są stale przedmiotem dyskusji. Wraz z wprowadzeniem na rynek nowych, coraz doskonalszych leków przeciwgrzybiczych, rekomendacje dotyczące stosowania poszczególnych leków ulegają modyfikacji. Grupa ECIL (European Conference on Infections in Leukemia) sformułowała w 2011 roku wytyczne dotyczące populacji pediatrycznej [206].

Wyróżnia się cztery rodzaje strategii postępowania terapeutycznego: profilaktykę, terapię empiryczną, terapię wyprzedzającą i terapię celowaną.

Terapia empiryczna stosowana jest od lat 80. XX wieku, kiedy Pizzo wykazał korzystny wpływ podawania leków przeciwgrzybiczych u gorączkujących pacjentów w neutropenii. Ten rodzaj strategii terapeutycznej jest rekomendowany u pacjentów ze schorzeniami onkohematologicznymi, jednak część autorów podkreśla niekorzystne konsekwencje związane z terapią empiryczną [220]. Wiąże się ona stosunkowo często z możliwością terapii nieuzasadnionych, niejednokrotnie naraża chorego na długotrwałą terapię, toksyczności związane z leczeniem, a także generuje wysokie koszty leczenia oraz dodatkowo stwarza ryzyko selekcjonowania szczepów opornych.

Inną strategią postępowania terapeutycznego jest terapia wyprzedzająca polegająca na wdrożeniu leków przeciwgrzybiczych na podstawie wyników badań dodatkowych takich jak: tomografia komputerowa, badania obecności antygenów grzybiczych w surowicy krwi takich jak galaktomannan czy 1,3-β-D-glukan lub dodatni wynik badania PCR [102]. Ten rodzaj terapii może pozwolić na ograniczenie odsetka chorych otrzymujących leczenie przeciwgrzybicze w stosunku do otrzymujących leczenie empiryczne. W pracy z 2005 roku Maertens i wsp. zaproponowali schemat monitorowania chorych z grup ryzyka mający na celu ograniczenie terapii empirycznej na korzyść wyprzedzającej [133]. Schemat postępowania obejmował codzienne oznaczenia galaktomannanu, a u pacjentów z dwukrotnie dodatnim wynikiem wykonywano tomografię komputerową

klatki piersiowej. Do leczenia przeciwgrzybiczego liposomalną amfoterycyną B kwalifikowano chorych, u których wykazano dwa lub więcej dodatnie wyniki oznaczenia antygenu galaktomannanowego w surowicy (*cut off* >0,5) w połączeniu z wykazaniem typowych zmian w badaniu tomografii komputerowej. Możliwość ograniczenia terapii empirycznej o 43% wykazał też Girmenia i wsp. posługując się bardzo dokładnym i skrupulatnym monitorowaniem pacjentów z grup ryzyka przy pomocy między innymi codziennych oznaczeń antygeny galaktomannanowego oraz badań TK [70]. Obydwa przedstawione badania dotyczyły jednak chorych dorosłych, brak natomiast jest podobnych badań w populacji dziecięcej [70;133].

Wśród analizowanych w niniejszym opracowaniu 61 incydentów IZG, terapię empiryczną wdrożono jedynie u pięciu pacjentów. Należy dodatkowo podkreślić, że we wszystkich pięciu przypadkach IZG, w których włączono terapię empiryczną, w kolejnych dniach po włączeniu leczenia przeciwgrzybiczego wykonywano badania obrazowe i/lub mikologiczne w celu uzasadnienia włączonej terapii empirycznej. Analiza powyższych incydentów wykazała, że u czworga dzieci uzyskano wyniki sugerujące grzybiczą etiologię infekcji, a tylko w jednym przypadku nie uzyskano wyniku sugerującego IZG w wymienionych badaniach. Terapię wyprzedzającą zastosowano w 43 przypadkach IZG. Argumentem za wdrożeniem tego rodzaju strategii postępowania były zmiany typowe dla IZG w TK klatki piersiowej, przekłatkowym ultrasonograficznym badaniu płuc i/lub dodatnie wyniki antygeny galaktomannanowego w surowicy krwi. Wysoki odsetek dzieci, u których stosowano terapię wyprzedzającą w stosunku do otrzymujących terapię empiryczną dowodzi skuteczności stosowanych metod diagnostycznych. Spośród nich najistotniejsze znaczenie należy przypisać badaniu ultrasonograficznemu klatki piersiowej. Badanie to w ośrodku gdańskim wykonywane jest rutynowo raz w tygodniu u każdego dziecka w neutropenii, a w przypadku wystąpienia jakichkolwiek objawów mogących sugerować infekcję – tego samego dnia lub następnego. Taki algorytm postępowania umożliwia wykrycie zmian w płucach w bardzo wczesnej fazie, a co za tym idzie pozwala na wdrożenie wyprzedzającej terapii przeciwgrzybiczej. Wydaje się, że diagnostyka ultrasonograficzna jest nieocenionym narzędziem diagnostycznym w codziennej praktyce klinicznej. Niektórzy autorzy podkreślają, że uzyskiwane ostateczne wyniki leczenia z zastosowaniem terapii wyprzedzającej są gorsze niż w przypadku terapii empirycznej. Z drugiej strony terapia empiryczna wiąże się z przedstawionymi powyżej niekorzystnymi konsekwencjami. Wydaje się, że w przypadku populacji pediatrycznej, tomografia komputerowa nie może być wykorzystywana do seryjnej oceny zmian w płucach, jak proponuje u pacjentów dorosłych Maertens w cytowanym powyżej opracowaniu [133]. Badanie to nie może być traktowane jako podstawowe narzędzie diagnostyczne u dzieci z uwagi na konieczność transportu dziecka na badanie, wykonanie znieczulenia ogólnego, a przede wszystkim na coraz częściej podnoszoną konieczność ochrony radiologicznej populacji pediatrycznej.

Uzyskane w niniejszym opracowaniu bardzo dobre wyniki leczenia przeciwgrzybiczego mogą stanowić dowód, że systematyczne monitorowanie przy pomocy badania ultrasonograficznego płuc dzieci w neutropenii stanowi dobrą alternatywę dla tomografii komputerowej, gdyż może być przeprowadzane często, nawet codziennie.

Biorąc pod uwagę nadal niezadowalające efekty leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych u pacjentów ze schorzeniami onkohematologicznymi wydaje się, wobec niedoskonałości stosowanych metod diagnostycznych, iż u pacjentów z grup wysokiego ryzyka rozwoju IZG szczególny nacisk należy położyć na wczesne rozpoznanie zakażenia przy pomocy systematycznie wykonywanych badań obrazowych. W związku z tym,

że lokalizacja płucna zakażeń grzybiczych jest najczęstsza zarówno u dorosłych, jak i u dzieci, rutynowo stosowana ocena ultrasonograficzna klatki piersiowej wydaje się optymalną strategią diagnostyczną. W połączeniu z systematycznym monitorowaniem antygenu galaktomannanowego oraz w wybranych przypadkach z tomografią komputerową klatki piersiowej, może ona poprawić wczesną diagnostykę IZG, a co za tym idzie – efekty stosowanej terapii.

Optymalną opcją terapeutyczną w leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych jest leczenie celowane. Niestety, trudności w udokumentowaniu zakażenia sprawiają, że terapia celowana możliwa jest stosunkowo rzadko. W przedstawianej analizie leczenie celowane włączono w 13 incydentach, co stanowiło 21,3% pacjentów.

W analizowanych w niniejszym opracowaniu incydentach IZG najczęściej stosowano amfoterycynę B postać liposomalną lub kompleks lipidowy. Jedynie u dwojga dzieci zastosowano postać konwencjonalną; były to dzieci leczone w roku 2003. W pozostałych przypadkach stosowano kaspofunginę i worykonazol.

W analizowanej grupie dzieci terapię skojarzoną zastosowano u 12 dzieci, co stanowiło 19,7% wszystkich pacjentów. Wskazaniem do jej wdrożenia było duże zaawansowanie infekcji w momencie rozpoznania albo brak spodziewanych efektów monoterapii. Stosowano głównie skojarzenie lipidowych postaci amfoterycyny B z kaspofunginą i/lub worykonazolem. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi zastosowanie terapii skojarzonej nie jest rekomendowane jako postępowanie pierwszej linii. W badaniu Aliff i wsp. pozytywnie oceniono skuteczność terapii skojarzonej kaspofunginą i liposomalną amfoterycyną B w przypadku opornej na monoterapię aspergilozy płucnej [5]. Inne połączenia leków (mikafungina lub kaspofungina z innymi lekami) pozytywnie ocenili między innymi Maertens, Denning i Marr [54;131;140]. W niniejszym opracowaniu dobry efekt terapeutyczny uzyskano u 11 spośród 12 dzieci, u których zastosowano terapię skojarzoną. Biorąc pod uwagę fakt, że ten rodzaj terapii stosowano u dzieci z dużym stopniem zaawansowania zakażenia uzyskane wyniki należy uznać za bardzo dobre. Wydaje się, że u niektórych pacjentów, w przypadku znacznego zaawansowania infekcji w momencie rozpoznania należy rozważyć ten rodzaj strategii terapeutycznej [95]. Niepowodzenie terapeutyczne skojarzonego leczenia amfoterycyną B i pozakonazolem zanotowano jedynie w przypadku dziewczynki z mieszanym zakażeniem *Mucor spp.* i *Aspergillus spp.* [91].

Uzyskane w niniejszym opracowaniu ostateczne wyniki leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych należy uznać za bardzo satysfakcjonujące. Po 3 tygodniach od rozpoczęcia leczenia pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano w 55 incydentach IZG (90,2%), natomiast po 3 miesiącach od włączenia leczenia zgodnie z przyjętymi kryteriami pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano w 59 incydentach IZG (96,7%). Dwoje dzieci zmarło w wyniku zakażenia grzybiczego, co stanowi 3,3% wszystkich analizowanych przypadków. Szczegółowej analizie poddano przyczyny niepowodzenia terapeutycznego u tych dzieci. U dziewczynki, która zmarła w wyniku masywnego krwotoku płucnego, wydaje się, że kwalifikacja do zabiegu operacyjnego miała miejsce zbyt późno. Pojawienie się krwiotoku w okresie rekonstrukcji hematologicznej, który jest krytyczny dla występowania krwotoków płucnych powinno stanowić wskazanie do zabiegu operacyjnego w trybie pilnym. Wydaje się także, że należy rozważyć stosowanie granulocytarne czynniki wzrostu, aby uniknąć nagłego wzrostu liczby granulocytów, co jest powszechnie znanym czynnikiem ryzyka występowania krwiotoku.

Wydaje się, że przyczyny wysokiego odsetka uzyskiwanych wyleczeń należy upatrywać przede wszystkim we wczesnym rozpoznaniu zakażenia i wdrożeniu leczenia

przeciwgrzybiczego. Dodatkowo u części dzieci (16 pacjentów) stosowano w leczeniu wspomagającym transfuzję koncentratu granulocytów.

Uzyskane w ośrodku hematologii dziecięcej w Gdańsku wyniki leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych są zdecydowanie lepsze niż podawane przez innych autorów. Należy zauważyć również, że częstość rozpoznawania IZG w opisywanej grupie chorych jest wyższa, aniżeli podawana w literaturze. W związku z powyższym wydaje się, że przyjęta strategia postępowania (tj. wczesne wdrażanie terapii przeciwgrzybiczej w oparciu o objawy kliniczne i wyniki badań obrazowych) pomimo, iż niesie za sobą w niektórych przypadkach ryzyko terapii nieuzasadnionych skutkuje ostatecznie wyjątkowo niską śmiertelnością związaną z IZG.

W opracowaniu Rubio z 2009 roku, w którym przedstawiono analizę przebiegu klinicznego pewnych i prawdopodobnych rozpoznań aspergilozy, obserwowano śmiertelność sięgającą 55% [184]. W przypadku, gdyby w analizie gdańskiej zastosowano te same kryteria rozpoznania i kwalifikacji do leczenia IZG tzn. jedynie dzieci z pewnym i prawdopodobnym rozpoznaniem IZG (35 przypadków), śmiertelność wyniosłaby 5,7%. Co ciekawe, Rosen i wsp. w jednośrodkowym badaniu dzieci z chorobą nowotworową podaje wprawdzie bardzo niską częstość występowania IZG (4,9%), ale ze śmiertelnością sięgającą 59% [183]. Wydaje się, że bardzo wysoki odsetek niepowodzeń terapeutycznych u tych pacjentów wynika ze zbyt późnego wdrożenia leczenia przeciwgrzybiczego. Fakt ten jest niezbitym dowodem na niedoskonałość stosowanych metod rozpoznawania zakażeń o etiologii grzybiczej w grupie dzieci ze schorzeniami onkohematologicznymi.

Ocena przydatności przekłatkowego badania ultrasonograficznego płuc we wczesnej diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci

Diagnostyka inwazyjnych zakażeń grzybiczych płuc, pomimo znacznego postępu stale napotyka na wiele trudności [31;201]. Metody hodowlane, aczkolwiek pozwalające udokumentować zakażenie, obarczone są wieloma ograniczeniami, z których najpoważniejszym jest trudność w uzyskaniu reprezentatywnego materiału diagnostycznego. Inwazyjne procedury diagnostyczne służące uzyskaniu materiału do badań mikologicznych nie zawsze są możliwe do przeprowadzenia, zwłaszcza u dzieci. W badaniu Hoffera i wsp. z 2001 roku opisano grupę 24 dzieci z podejrzeniem aspergilozy płuc, u których wykonano 28 przezskórnych biopsji płuc pod kontrolą TK lub USG [87]. Wykazano czułość i swoistość metody na poziomie 100%. Choć autorzy pozytywnie ocenili zarówno przydatność, jak i bezpieczeństwo procedury, zwraca uwagę stosunkowo duży odsetek powikłań krwotocznych po zabiegu (46%), a zwłaszcza zgon jednego dziecka w wyniku powikłań związanych z biopsją [87]. Należy pamiętać, że niejednokrotnie omawiane zagadnienie dotyczy dziecka w ciężkim stanie ogólnym, z głębokimi zaburzeniami hemostazy i każdorazowo decyzja o zabiegu musi uwzględniać nie tylko ryzyko z nim związane, ale także ryzyko związane z koniecznością znieczulenia ogólnego pacjenta.

W związku z powyżej opisanymi trudnościami stale poszukuje się skutecznych metod diagnostyki nieinwazyjnej. Duże nadzieje wiązano z wprowadzeniem do codziennej praktyki klinicznej oznaczenia antygenu galaktomannanowego (GM) w surowicy krwi. Dane z literatury dokumentują przydatność seryjnych oznaczeń GM w diagnostyce aspergilozy. Martens i wsp. udowodnili znaczenie seryjnych oznaczeń galaktomannanu w połączeniu z tomografią komputerową klatki piersiowej w diagnostyce inwazyjnej

aspergilozy [133]. Wyniki badań Herbrecht'a i wsp. przeprowadzone na bardzo licznej grupie pacjentów wykazały jednak niską czułość tego testu wynoszącą 65%, 16% i 26% odpowiednio w udokumentowanej, prawdopodobnej i możliwej aspergilozie [83;207]. Podobnie w badaniu Pinel, które przeprowadzono na 807 pacjentach z potwierdzoną i prawdopodobną aspergilozą leczonych na oddziałach: hematologicznym i intensywnej terapii, uzyskano czułość testu na poziomie 50% [168].

Szczególne znaczenie w procesie rozpoznawania inwazyjnych zakażeń grzybiczych odgrywają badania obrazowe. Wiadomo, że klasyczne badanie rentgenowskie klatki piersiowej nie jest przydatne w diagnostyce zakażeń grzybiczych płuc. W badaniu Heussel i wsp. obejmującym chorych w neutropenii z podejrzeniem zapalenia płuc niezależnie od etiologii – odsetek prawidłowych obrazów rentgenowskich u chorych ze stwierdzonymi zmianami w tomografii komputerowej wynosił ponad 50% [85]. Hauggaard i wsp. wykazali, że u chorych z typowymi dla grzybicy zmianami w TK klatki piersiowej aż w 29% przypadków uzyskano prawidłowy wynik zdjęć rentgenowskich [80]. Tomografia komputerowa klatki piersiowej jest powszechnie uznaną metodą obrazowania w inwazyjnych zakażeniach grzybiczych płuc. Opisano szereg zmian w obrazie TK charakterystycznych dla zakażenia grzybiczego: guzki różnej wielkości, ogniska konsolidacji, *halo sign*, *crescent sign*. Stanowią one podstawę do wysunięcia podejrzenia aspergilozy płuc. Należy zaznaczyć, że u dzieci typowe objawy aspergilozy w tomografii komputerowej występują dużo rzadziej, aniżeli u dorosłych [28]. Dla przykładu objaw *crescent sign* (rąbek powietrza wokół nacieku) stwierdzono jedynie u trojga spośród 110 dzieci zakwalifikowanych do badania (2,2% przypadków) [73]; natomiast u dzieci poniżej 5. roku życia nie występował on wcale. Objaw *halo* stwierdzany u większości dorosłych z aspergilozą (61% w badaniu Green i wsp. [73]) opisywany był jedynie u 10,9% dzieci z aspergilozą, natomiast w badaniu Thomas i wsp. nie opisano go u żadnego dziecka [212]. Kolejnym objawem radiologicznym aspergilozy płuc jest jama (*cavitation*), której częstość występowania u dzieci w porównaniu z dorosłymi również jest niższa (14% vs. 20%). U dzieci najczęstszym stwierdzanym w tomografii komputerowej objawem była obecność guzków w tkance płucnej (59% pacjentów), które u dorosłych stwierdzane są jednak niemal u wszystkich chorych [73].

W ośrodku gdańskim od roku 2005 roku wykonywane są przezklatkowe ultrasonograficzne badania płuc (PUBP). Podstawowe założenia diagnostyki ultrasonograficznej płuc są następujące: uwidocznienie zmian zapalnych w płucach jest możliwe tylko wówczas, gdy zmiana ma kontakt z opłucną oraz nie ma możliwości uwidocznienia zmiany patologicznej w mięszu płuc, gdy jest ona oddzielona od opłucnej warstwą powietrza [125]. Co istotne, uważa się, że 98,5% zmian istotnych klinicznie ma łączność z opłucną, w związku z czym można je uwidocznić w badaniu ultradźwiękami. Przyjęty w ośrodku gdańskim algorytm postępowania zakłada wykonywanie PUBP u dzieci w neutropenii raz w tygodniu. Dodatkowo w przypadku pojawienia się objawów mogących sugerować infekcję (gorączka, kaszel, duszność, podwyższenie wykładników stanu zapalnego) PUBP wykonywano tego samego dnia. Z uwagi na brak dostępnych danych w literaturze na temat znaczenia badania ultrasonograficznego w diagnostyce zmian grzybiczych w płucach, przeprowadzone badania miały na celu próbę walidacji metody poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami TK klatki piersiowej.

W analizie uwzględniono 36 pacjentów, u których wykonano przezklatkowe ultrasonograficzne badanie płuc z powodu gorączki neutropenicznej, a następnie wynik badania weryfikowano przy pomocy tomografii komputerowej klatki piersiowej. W analizowanej grupie dzieci, u 25 dzieci opisano cechy sugerujące grzybicę płuc: nieprawi-

dłową linię opłucnej, obecność obszarów konsolidacji o nieregularnym zarysie brzeżnym i niejednorodną echo strukturą oraz o nieprawidłowym wzorcu unaczynienia. Spośród tych pacjentów sugestię zakażenia grzybiczego potwierdzono w badaniu tomografii komputerowej u 21 dzieci. Podobnie jak u innych autorów, typowe dla aspergilozy zmiany występowały rzadko [73;212]. Najczęściej obserwowanym objawem w badaniu TK były guzki oraz obszary konsolidacji (21 dzieci), natomiast jamy, objaw *halo* i *cre-scent sign* stwierdzano odpowiednio u 2, 6 i 1 dziecka. W przedstawianej grupie dzieci były tylko cztery przypadki, w których w ocenie ultrasonograficznej stwierdzano cechy typowe dla aspergilozy, natomiast w badaniu TK nie potwierdzono ich obecności.

Analizując uzyskane wyniki najistotniejszy wydaje się jednak fakt, że u żadnego dziecka, u którego w ultrasonograficznym przezklatkowym badaniu płuc nie wykazano cech sugerujących grzybicę płuc, w TK płuc nie stwierdzono cech inwazyjnej grzybicy (negatywna wartość predykcyjna PUBP wyniosła 100%). Wydaje się w związku z tym, że PUBP może stanowić cenną alternatywę we wstępnej diagnostyce zakażeń grzybiczych płuc, zwłaszcza u dzieci, u których wykonanie badania TK jest utrudnione z uwagi na ciężki stan ogólny lub przeciwwskazania do znieczulenia. Uzyskane wstępne wyniki wskazują, że PUBP może stanowić godną polecenia alternatywę dla badania TK klatki piersiowej we wstępnej diagnostyce zakażeń grzybiczych płuc. Przy bardzo dobrym profilu bezpieczeństwa, opisywana metoda cechuje się także wysoką skutecznością. Należy podkreślić, że jakkolwiek tomografia komputerowa płuc jest uznaną metodą diagnostyczną w rozpoznawaniu IZG u pacjentów w neutropenii, tym niemniej istnieją ograniczenia w stosowaniu tej metody obrazowania u dzieci. Zdecydowanie rzadziej niż u dorosłych, u dzieci występują typowe zmiany, pozwalające na wysunięcie sugestii inwazyjnej aspergilozy płuc. Tomografia komputerowa wiąże się zawsze z koniecznością transportu dziecka na badanie, co biorąc pod uwagę, że zazwyczaj pacjent znajduje się w ciężkim stanie ogólnym, stwarza zagrożenie destabilizacji jego stanu. Transport taki wiąże się także z dodatkowym zagrożeniem epidemiologicznym. U dzieci młodszych w zdecydowanej większości przypadków konieczne jest przeprowadzenie badania w znieczuleniu ogólnym, co stanowi czynnik mogący pogorszyć wydolność oddechową dziecka. Nie bez znaczenia jest także wysoka dawka promieniowania, która wiąże się z tomografią komputerową. Badania wykorzystujące do obrazowania promieniowanie rentgenowskie są bardzo szeroko wykorzystywane w onkohematologii dziecięcej zarówno w diagnostyce choroby nowotworowej i monitorowaniu odpowiedzi na leczenie, jak i w diagnostyce powikłań terapii, czy rozpoznawaniu zakażeń. W ostatnich latach coraz częściej jednak zwraca się uwagę na konieczność ograniczenia badań wykorzystujących promieniowanie rentgenowskie, szczególnie u pacjentów w wieku rozwojowym [25;38;64]. Kolejnym problemem dyskutowanym w literaturze jest kwestia monitorowania efektów terapii przeciwgrzybiczej przy pomocy badania TK. Proponowane przez autorów niektórych opracowań seryjne wykonywanie tego badania jest trudne do zaakceptowania u dzieci z uwagi na konieczność ochrony radiologicznej. Dodatkowo nie ma zgody co do optymalnego czasu wykonania badania kontrolnego. Wiadomo, że nie należy wykonywać go zbyt wcześnie, gdyż w okresie rekonstrukcji hematologicznej dochodzi do zwiększenia objętości ogniska zapalnego, co nie dowodzi nieskuteczności terapii, jeśli stan kliniczny pacjenta jest stabilny [31;115;190]. Należy podkreślić, że badanie ultrasonograficzne płuc umożliwia bezpieczne monitorowanie efektywności stosowanego leczenia przeciwgrzybiczego. W przypadku tego badania nie ma ograniczeń dla wielokrotnego powtarzania oceny płuc w celu dokumentowania efektów wdrożonego leczenia przeciwgrzybiczego. W ośrodku hematologii dziecięcej w Gdańsku w

wybranych przypadkach zrezygnowano obecnie z TK klatki piersiowej na rzecz oceny ultrasonograficznej płuc. U zdecydowanej większości pacjentów badanie TK nie jest także wykonywane do oceny efektywności stosowanej terapii. Kontrolna tomografia komputerowa klatki piersiowej jest jednak zawsze wykonywana w przypadku konieczności kwalifikacji dziecka do zabiegu chirurgicznego.

Badania obrazowe, zarówno PUBP, jak i TK stanowią ważny argument dla onkologów hematologów dziecięcych, aby podjąć decyzję o wdrożeniu leczenia przeciwgrzybiczego, umożliwiając ograniczenie terapii empirycznej na rzecz wyprzedzającej. Należy jednak zaznaczyć, że podstawowe znaczenie w ocenie ultrasonograficznej ma doświadczenie lekarza wykonującego badanie. W ostatnim okresie prowadzone są przez ultrasonografistów ośrodka gdańskiego kursy doskonalące mające na celu upowszechnienie badania ultrasonograficznego płuc wśród lekarzy różnych specjalności. Jest oczywiste, że dla oceny przydatności badania ultrasonograficznego płuc we wczesnej diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych płuc u dzieci w neutropenii konieczne jest przeprowadzenie badań na dużych grupach chorych.

Hiperglikemia posterydowa, a inwazyjne zakażenia grzybicze

Przemijająca hiperglikemia (TH) jest stosunkowo często obserwowana w przebiegu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej, niezziarnicznego chłoniaka złośliwego i ciężkiej anemii aplastycznej. Związana jest ona zazwyczaj z podażą glikokortykosteroidów, ale znane są także inne czynniki diabetogenne m.in. L-Asparaginaza stosowana w terapii ostrych białaczek limfoblastycznych. Częstość występowania hiperglikemii podczas stosowania steroidów w chorobach hematologicznych u dzieci wynosi według różnych autorów 9,7-35% [11;128;129;173;180;224]. Istnieje wiele opracowań mówiących o niekorzystnym wpływie hiperglikemii na przebieg terapii u pacjentów w stanie zagrożenia życia, a także o możliwości poprawy uzyskiwanych efektów terapeutycznych poprzez skrupulatną kontrolę glikemii [213]. W obszernym badaniu Krinsley z 2003 roku, w którym przeanalizowano heterogenną grupę 1.826 chorych hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii wykazano istotny wzrost śmiertelności w grupie chorych z nieprawidłową kontrolą glikemii [116]. W prospektywnym badaniu Berge i wsp. obejmującym 1.548 chorych leczonych na chirurgicznym oddziale intensywnej terapii wykazano zmniejszenie śmiertelności u chorych z prawidłową kontrolą glikemii [215;216;214]. W badaniu Janes i wsp. nie wykazano wprawdzie zmniejszenia śmiertelności u pacjentów poddawanych intensywnej insulinoterapii na oddziale intensywnej terapii, natomiast wykazano redukcję zachorowalności oraz skrócenie czasu hospitalizacji [98].

Dzieci leczone z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej są szczególnie narażone na zagrażające życiu powikłania infekcyjne. Wśród czynników ryzyka rozwoju zakażeń w tej grupie chorych najistotniejszą rolę odgrywa neutropenia [68;171;202], jednakże hiperglikemia może stanowić dodatkowy, często niedoceniany czynnik ryzyka rozwoju tych infekcji [12]. Wielu autorów podkreśla negatywny wpływ hiperglikemii na układ odpornościowy człowieka [20;24;98;178;204;213]. W protokołach terapeutycznych stosowanych w onkologii dziecięcej brak jest jednak szczegółowych wytycznych co do monitorowania zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Z uwagi na brak typowych objawów kwasicy ketonowej w przebiegu hiperglikemii posterydowej, jej rozpoznanie na podstawie objawów klinicznych jest bardzo trudne, a niekiedy niemożliwe. Wydaje się w związku z tym, że

wiele epizodów hiperglikemii u dzieci otrzymujących glikokortykosterydy pozostaje nierozpoznanych [200]. Jedynie skrupulatne monitorowanie glikemii u pacjentów przyjmujących glikokortykosterydy stwarza możliwość wczesnego rozpoznania, wdrożenia leczenia oraz potencjalnie ograniczenia negatywnych skutków tego zaburzenia.

Powyższe obserwacje stały się impulsem do opracowania i wdrożenia do codziennej praktyki klinicznej programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej, który miał na celu poprawę wykrywalności incydentów hiperglikemii posterydowej u dzieci ze schorzeniami hematologicznymi otrzymującymi glikokortykosterydy [93].

Program stosowany jest od 2008 roku u wszystkich dzieci z ostrymi białaczkami limfoblastycznymi, nieziarniczymi chłoniakami złośliwymi i ciężką anemią aplastyczną leczonych w ośrodku gdańskim. U wszystkich dzieci zakwalifikowanych do programu przeprowadzany jest wywiad dotyczący rodzinnego obciążenia cukrzycą, obliczany jest BMI oraz wykonywane są badania wstępne: C-peptyd oraz poziom insuliny na czczo. Na podstawie uzyskanych wyników wyodrębnia się grupę dzieci z podwyższonym ryzykiem rozwoju hiperglikemii posterydowej, u których oznacza się nie tylko glikemię na czczo, ale także 2 godziny po głównych posiłkach. Podjęto decyzję o rezygnacji z wykonywania krzywej obciążenia glukozą z uwagi na ciężki stan ogólny dzieci w momencie rozpoznania choroby nowotworowej.

Uzyskane wyniki wskazują na zdecydowanie częstsze rozpoznanie hiperglikemii w grupie dzieci, u których stosowano program wczesnego rozpoznawania ZGW. W grupie 83 dzieci, u których stosowano autorski program, hiperglikemię posterydową rozpoznano u 22 dzieci, co stanowiło 26,5% całej grupy, natomiast w grupie 69 dzieci stanowiących grupę kontrolną, u których glikemię oznaczano jedynie przygodnie – hiperglikemię posterydową stwierdzono jedynie u 6 pacjentów (8,7%). Grupy te nie różniły się pod względem wieku dzieci, płci, wartości BMI, typu choroby podstawowej oraz stosowanych schematów terapeutycznych. Biorąc pod uwagę brak różnic pomiędzy grupami, wydaje się, że w grupie kontrolnej znaczna część incydentów hiperglikemii nie została rozpoznana, a program wykrywania ZGW opracowany i stosowany w ośrodku gdańskim cechuje się wysoką przydatnością diagnostyczną. Częstość wykrywania hiperglikemii posterydowej w grupie dzieci, u których stosowano program, jest również wyższa niż podawana przez większość autorów [11;128;129;173;224]. Porównywalną częstość podają w swoim retrospektywnym badaniu Lowas i wsp. [129], którzy ocenili ją na 20,4%, natomiast jeszcze częściej hiperglikemię posterydową wykazali w swojej analizie Sonabend i wsp., którzy w retrospektywnym badaniu obejmującym 135 dzieci hiperglikemię obserwowali u 35% chorych [200]. Uzyskane w ośrodku gdańskim wyniki potwierdzają, że stosowany program jest przydatny w diagnostyce zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Zastosowane proste kryteria obejmujące wywiad, ocenę BMI oraz wstępne badania oceniające poziom C-peptydu oraz stężenie insuliny pozwalają zaplanować kontrolę ZGW u poszczególnych chorych. Opracowany algorytm postępowania diagnostyczno – terapeutycznego jest prosty, nieskomplikowany, a także nie wymaga dużych nakładów finansowych. Uwzględnia także wstępne ryzyko rozwoju hiperglikemii posterydowej oraz przebyte incydenty cukrzycy w poprzednich cyklach chemioterapii. W odróżnieniu od większości autorów, grupy badawczej nie zawężono wyłącznie do dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną [129;173;199;200;224]. Kryterium kwalifikacji do grupy badawczej była jedynie podaż glikokortykosterydów w programie terapeutycznym, w związku z czym analizie poddano także dzieci z nieziarniczymi chłoniakami złośliwymi i ciężką anemią aplastyczną. Opracowany schemat wczesnego wykrywania

zaburzeń gospodarki węglowodanowej może znaleźć zastosowanie u wszystkich dzieci otrzymujących przewlekłe glikokortykosterydy, nie tylko w przebiegu chorób układu krwiotwórczego. Wydaje się bowiem, że także u tych dzieci część epizodów hiperglikemii pozostaje nierozpoznana. Dodatkowym efektem stosowanego schematu jest możliwość wyselekcjonowania grupy dzieci zagrożonych rozwojem cukrzycy w przyszłości. Dzieci te muszą zostać objęte opieką poradni diabetologicznej po zakończeniu terapii przeciwnowotworowej.

W drugim etapie analizy poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy hiperglikemia posterydowa obserwowana podczas leczenia glikokortykosterydami dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego ma wpływ na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w tej grupie pacjentów. W analizie uwzględniono jedynie dzieci, u których stosowano opracowany program wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że inwazyjne zakażenia grzybicze zdecydowanie częściej rozpoznawano u pacjentów, u których w okresie poprzedzającym IZG stwierdzono hiperglikemię posterydową (59,1% vs 8,2%). Powszechnie wiadomo, że najistotniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju IZG jest neutropenia, w związku z czym porównano czas trwania neutropenii poprzedzającej IZG u dzieci z hiperglikemią i bez hiperglikemii. Nie stwierdzono różnic pomiędzy tymi grupami, co wydaje się dowodzić, że hiperglikemia może stanowić dodatkowy czynnik wpływający na częstość występowania IZG u dzieci otrzymujących glikokortykosterydy.

Dodatkowo przeanalizowano wpływ hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG u dzieci leczonych poszczególnymi protokołami terapeutycznymi. U dzieci leczonych zgodnie z protokołami: ALL IC-BFM 2002, B-NHL BFM-04 oraz w heterogennej grupie dzieci, u których stosowano pozostałe protokoły obserwowano wyższą częstość występowania IZG u dzieci z hiperglikemią. Interesującym jest brak takiej zależności w odniesieniu do dzieci leczonych z powodu wznowy ostrej białaczki limfoblastycznej programem ALL-REZ BFM 2002. Wydaje się, że wyjaśnieniem tego zjawiska może być fakt rutynowego stosowania w ośrodku gdańskim profilaktyki przeciwnowotworowej u dzieci leczonych z powodu wznowy ALL.

Większość autorów jest zgodna, że hiperglikemia obserwowana u pacjentów z chorobami hematologicznymi ma niekorzystny wpływ na przebieg choroby podstawowej. W analizie Sonabend i wsp. przeanalizowano grupę 167 dzieci w trakcie terapii indukcyjnej ostrej białaczki limfoblastycznej, wśród których hiperglikemię rozpoznano u 34% pacjentów [200]. W tej grupie chorych wykazano krótszy czas przeżycia wolnego od wznowy i krótsze całkowite przeżycie. Autorzy postawili tezę, że gorsze wyniki leczenia u dzieci z hiperglikemią mają związek ze zwiększoną częstością zakażeń, które wpływają na redukcję intensywności terapii przeciwnowotworowej [200]. Ci sami autorzy w publikacji z 2008 roku wykazali zwiększoną częstość powikłań infekcyjnych u dzieci z hiperglikemią w przebiegu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej [199]. Szczególnie wyraźnie tendencję tę widać w odniesieniu do bakteriemii i fungemii, które w grupie dzieci z hiperglikemią występowały 3,7 razy częściej niż u pozostałych. Analogiczne wyniki, ale w grupie pacjentów dorosłych leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej podają Weiser i wsp. w pracy z 2004 roku [224]. Wśród 278 chorych zakwalifikowanych do badania, hiperglikemię stwierdzono u 37% pacjentów. W grupie tej częściej obserwowano powikłania infekcyjne, w tym zakażenia grzybicze w porównaniu z pacjentami, u których nie obserwowano hiperglikemii (38,1% vs 25%). Podobne wyniki uzyskali także w badaniu z 2008 roku Fuji i wsp. [66], którzy w grupie 60 chorych poddanych allotransplantacji wykazali mniejszą częstość udokumentowanych zakażeń,

szczególnie bakteriemii u pacjentów, u których prowadzono intensywną kontrolę glikemii (stężenie glukozy w granicach 80-110 mg/dl) [66]. Wyniki te są zbieżne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu. Nie wszystkie badania dowodzą jednak wpływu hiperglikemii na przebieg schorzenia podstawowego. Kliniczne konsekwencje wynikające z hiperglikemii podczas leczenia indukującego remisję u dzieci z ALL badali Roberston i wsp. nie wykazując wpływu hiperglikemii na częstość uzyskiwanych remisji, przeżycie wolne od niekorzystnych zdarzeń, całkowite przeżycie oraz prawdopodobieństwo i rodzaj obserwowanych infekcji [180]. W innym badaniu, oceniającym retrospektywnie grupę 91 dorosłych chorych poddanych allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych także nie wykazano wpływu hiperglikemii na częstość występowania udokumentowanych zakażeń [65].

W analizowanej w niniejszym opracowaniu grupie dzieci, w przypadku stwierdzenia hiperglikemii, wdrażano odpowiednie postępowanie terapeutyczne: modyfikowano kroplówki nawadniające zastępując płyny infuzyjne z glukozą solą fizjologiczną, wdrażano odpowiednią dietę oraz w wybranych przypadkach stosowano insulinoterapię. Jednocześnie nadal skrupulatnie monitorowano glikemię. Jednak pomimo prowadzonej terapii mającej na celu utrzymanie normoglikemii, odsetek dzieci, u których obserwowano inwazyjne zakażenia grzybicze był znacznie wyższy niż u dzieci, u których nie występowały incydenty hiperglikemii. Być może jednak odsetek dzieci, u których wystąpiłoby IZG byłby jeszcze wyższy, gdyby nie podejmowano działań mających na celu utrzymanie normoglikemii.

W związku z uzyskanymi wynikami postawiono tezę, że w grupie dzieci, u których stwierdza się hiperglikemię posterydową należy rozważyć rutynowe stosowanie profilaktyki przeciwgrzybiczej.

Wytyczne dotyczące wskazań do wdrożenia pierwotnej profilaktyki przeciwgrzybiczej nie są ostatecznie sprecyzowane, szczególnie u dzieci [42;58;139;148]. Autorzy większości doniesień są jednak zgodni, że profilaktyka powinna być stosowana rozważnie, wyłącznie w grupie pacjentów o wysokim ryzyku rozwoju zakażeń grzybiczych, aby uniknąć selekcjonowania szczepów opornych. Dodatkowo należy uwzględnić możliwość występowania interakcji leków stosowanych w profilaktyce przeciwgrzybiczej oraz generowanie wysokich kosztów terapii. Według Hałaburdy stosowanie profilaktyki daje też lekarzowi fałszywe poczucie bezpieczeństwa, a nie zabezpiecza ona pacjenta przed wystąpieniem zakażeń przełamujących [81]. Do grupy wysokiego ryzyka rozwoju IZG zaliczani są pacjenci z ostrą białaczką mieloblastyczną, zarówno podczas pierwotnego zachorowania, jak i wznowy choroby, a także chorzy z nawrotem ostrej białaczki limfoblastycznej oraz ciężką anemią aplastyczną. Profilaktyki pierwotnej wymagają także biorcy przeszczepów komórek krwiotwórczych. Pacjenci z przebyłym zakażeniem grzybiczym w przeszłości są kwalifikowani do profilaktyki wtórnej [19;43;58;78;132;136;206;229]. Pomimo, że cukrzyca jest powszechnie uznawana za czynnik ryzyka rozwoju zakażeń grzybiczych [207], nie jest uwzględniana jako wskazanie do włączenia profilaktyki przeciwgrzybiczej u dzieci ze schorzeniami onkohematologicznymi.

W ośrodku gdańskim profilaktyka przeciwgrzybicza stosowana jest rutynowo jedynie u dzieci w trakcie agresywnej chemioterapii ostrej białaczki mieloblastycznej, u dzieci z nawrotem ostrej białaczki limfoblastycznej, ciężką anemią aplastyczną oraz jako profilaktyka wtórna u dzieci z przebyłym zakażeniem grzybiczym w wywiadzie. W związku z powyższym, w analizowanej grupie 22 dzieci z hiperglikemią posterydową, profilaktykę przeciwgrzybiczą otrzymywało jedynie 6 pacjentów. U 5 dzieci stosowano

flukonazol, u jednego dziecka – worykonazol. Nie wykazano skuteczności stosowanej profilaktyki przeciwgrzybiczej u dzieci z hiperglikemią posterydową; spośród 6 dzieci otrzymujących profilaktykę, zakażenie grzybicze stwierdzono u 3 pacjentów, natomiast w grupie dzieci nieotrzymujących profilaktyki (16 dzieci), IZG stwierdzono u 10 pacjentów. W poszukiwaniu przyczyn nieskuteczności profilaktyki przeciwgrzybiczej, analizie poddano etiologię IZG w tej grupie dzieci. Stwierdzono, że we wszystkich przypadkach prawdopodobnym czynnikiem etiologicznym IZG był *Aspergillus spp.* Wydaje się, że przyczyną niepowodzenia profilaktyki przeciwgrzybiczej był fakt, że stosowany w tej grupie dzieci lek – flukonazol, nie obejmuje swoim spektrum grzybów pleśniowych. Należy w związku z powyższym rozważyć zastosowanie w profilaktyce przeciwgrzybiczej u tych chorych leków skutecznych wobec tej grupy patogenów, aczkolwiek powyższe zagadnienie wymaga weryfikacji na większych grupach pacjentów. Rekomendacje dla profilaktyki przeciwgrzybiczej u dzieci nie są jednak ostatecznie sprecyzowane, w związku z czym planując profilaktykę u poszczególnych pacjentów napotyka się na szereg ograniczeń. Z jednej strony flukonazol, będący najdłużej stosowanym u dzieci lekiem przeciwgrzybiczym, nie jest skuteczny wobec grzybów pleśniowych. Z drugiej strony pozakonazol, który ma najsilniejszą rekomendację w profilaktyce IZG nie posiada rejestracji u dzieci. W przypadku stosowania azoli rekomendowane jest także monitorowanie stężenia leku; ta opcja jest dostępna jedynie w nielicznych ośrodkach klinicznych. Profilaktyka przy pomocy liposomalnej amfoterycyny B jest niezwykle kosztowna, może wywoływać głębokie zaburzenia elektrolitowe, nefrotoksyczność, a także z uwagi na dożylną postać leku wiąże się z koniecznością stałego pobytu dziecka na oddziale szpitalnym.

Na podstawie przeprowadzonej analizy należy stwierdzić, że hiperglikemia posterydowa może stanowić istotny, dodatkowy czynnik ryzyka rozwoju IZG niezależnie od stosowanego protokołu terapeutycznego, a także od tego, czy dziecko było leczone z powodu pierwotnego zachorowania, czy też z powodu wznowy choroby podstawowej.

Należy też podkreślić, że hiperglikemia posterydowa może pojawiać się kilkakrotnie podczas realizacji programu terapeutycznego, w kolejnych cyklach chemioterapii z zastosowaniem glikokortykosteroidów. Wczesne wykrycie tego zaburzenia przy pomocy przedstawionego wcześniej programu pozwala na podjęcie decyzji o wdrożeniu profilaktyki przeciwgrzybiczej u dzieci, u których hiperglikemia posterydowa występowała w poprzednich cyklach terapeutycznych. Konieczne są badania prospektywne na większej grupie pacjentów, które pozwoliłyby ocenić wpływ rutynowego wdrażania profilaktyki przeciwgrzybiczej na częstość występowania IZG u dzieci, u których stwierdza się hiperglikemię posterydową.

Rola transfuzji koncentratu granulocytów w leczeniu wspomagającym inwazyjnych zakażeń grzybiczych

Pomimo wprowadzenia do terapii grzybic układowych nowych, zdecydowanie bardziej skutecznych leków przeciwgrzybiczych, uzyskiwane efekty terapeutyczne nadal pozostają niezadowalające. Autorzy licznych opracowań są zgodni, że śmiertelność związana z IZG u pacjentów ze schorzeniami onkohematologicznymi, pomimo znacznego postępu, jest nadal bardzo wysoka. W obszernym opracowaniu Lin i wsp. oceniono całkowitą śmiertelność związaną z aspergilozą na 58%, natomiast u biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych jest ona jeszcze wyższa i wynosi 86,7% [127]. Śmiertelność związana z inwazyjną aspergilozą u pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną

jest wprawdzie obecnie niższa niż w latach 1987-1998, kiedy wynosiła 48% [160], ale nadal pozostaje bardzo wysoka i wynosi 30-40%. W opracowaniu Crassard i wsp, w którym retrospektywnej analizie poddano 24 pacjentów pediatrycznych z inwazyjną aspergilozą hospitalizowanych w jednym ośrodku hematologicznym w okresie od 1986-2000 roku śmiertelność wyniosła 87,5% [46].

Neutropenia wynikająca z chemioterapii stosowanej w leczeniu schorzeń rozrostowych układu krwiotwórczego i kondycjonowania przed transplantacją komórek krwiotwórczych stanowi najistotniejszy czynnik ryzyka rozwoju inwazyjnych zakażeń grzybiczych [79;89;158;183;186]. Stale poszukuje się bardziej skutecznych metod leczenia zakażeń o tej etiologii, w tym leczenia wspomagającego. Wprowadzenie do codziennej praktyki klinicznej granulocytarnego czynnika wzrostu (G-CSF) nie spowodowało radykalnej poprawy wyników leczenia zakażeń grzybiczych [186]. Obiecującą opcją terapeutyczną jest procedura transfuzji koncentratu granulocytów (KG) od dawców stymulowanych G-CSF. Już w latach trzydziestych XX wieku podjęto próby podawania koncentratu granulocytów chorym w neutropenii z zagrażającymi życiu infekcjami. Pomimo uzyskanego pozytywnego efektu terapeutycznego u części chorych, metodę zarzucono, z uwagi na brak możliwości uzyskania odpowiedniej liczby granulocytów podczas pobierania preparatu od dawców niestymulowanych [89;112;174;219]. W kolejnych latach w celu zwiększenia komórkowości koncentratu, podejmowano próby stymulacji dawców przy pomocy deksametazonu, które jednak nie okazały się wystarczająco skuteczne [48;56]. W chwili obecnej zdrowi dawcy granulocytów poddawani są stymulacji przy pomocy granulocytarnego czynnika wzrostu (G-CSF), co umożliwia uzyskanie preparatu o zdecydowanie wyższej komórkowości. G-CSF podaje się zazwyczaj w dawce 5 µg/kg masy ciała/dawkę przed kolejnymi separacjami przez 3-5 dni [56;107]. Część autorów rekomenduje stymulację przy pomocy łącznie stosowanych granulocytarnego czynnika wzrostu i deksametazonu [172;191;218]. Po stymulacji, granulocyty są izolowane od dawcy przy pomocy separatora komórkowego, co pozwala częściowo zwrócić dawcy krwinki czerwone i płytki krwi.

Biorąc pod uwagę dane z literatury dokumentujące korzystny wpływ transfuzji koncentratu granulocytów na przebieg infekcji u pacjentów w neutropenii, w 2003 roku podjęto decyzję o wprowadzeniu tej procedury do praktyki klinicznej w ośrodku gdańskim [18;75;89;107;151]. Na badanie uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy GUMed.

Pierwszym etapem badania było opracowanie szczegółowych wytycznych dotyczących kwalifikacji zarówno biorców, jak i dawców do procedury. Dobór dawców koncentratu granulocytów prowadzony jest różnie w poszczególnych ośrodkach. W gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej przyjęto założenie, że dawca musi być spokrewniony lub spowinowacony z biorcą; kryterium to zostało zaakceptowane przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy GUMed. Wśród dawców KG przeważało rodzeństwo rodziców lub ich kuzynostwo, było także 8 rodziców biorców, jeden brat i jeden kuzyn biorcy. W niektórych ośrodkach dawcami mogą być, podobnie jak w gdańskiej klinice, zdrowi dorośli dawcy spokrewnieni lub spowinowaceni z biorcą, w innych – dawców poszukiwano wśród rodziny i przyjaciół biorcy, w niektórych ośrodkach natomiast dawcami mogli być także zdrowi ochotnicy [89;107;172;174].

Kryteriami włączenia biorcy do procedury transfuzji KG była przede wszystkim obecność zagrażającej życiu infekcji u dziecka z przedłużającą się neutropenią oraz trudny do przewidzenia czas jej trwania, brak poprawy po zastosowaniu szerokospektralnej antybiotykoterapii i/lub leczenia przeciugrzybiczego i/lub konieczność przepro-

wadzenia zabiegu operacyjnego ze wskazań życiowych u dziecka w neutropenii. Podobne kryteria włączenia do badań nad skutecznością transfuzji KG podają także inni autorzy [57;175;191]. Dodatkowo przyjęto kryterium wyłączenia z leczenia koncentratem granulocytów pacjentów w terminalnej fazie choroby nowotworowej. Rodzicom i dziecku każdorazowo udzielano wyczerpującej informacji o zasadności podaży KG oraz możliwych powikłaniach procedury. Warunkiem niezbędnym do wszczęcia procedury było uzyskanie pisemnej, świadomej zgody rodziców lub prawnych opiekunów na stosowanie transfuzji koncentratu granulocytów. U wszystkich dzieci w analizowanej grupie, zgodnie z kryteriami włączenia do badania stwierdzano głęboką neutropenię w okresie poprzedzającym zakażenie (średni czas trwania neutropenii wynosił 19 dni). Wszystkie dzieci otrzymywały uprzednio leki przeciwgrzybicze jako terapię empiryczną lub wyprzedzającą; w zdecydowanej większości przypadków stosowana była amfoterycyna B. Ważną kwestią dotyczącą przetoczeń KG jest bezpieczeństwo biorcy preparatu. Na podstawie danych z piśmiennictwa wiadomo, że transfuzje koncentratu granulocytów są dobrze tolerowane przez pacjentów. Reakcje związane z transfuzją są zazwyczaj łagodne, rzadko pojawia się konieczność przerwania wlewu [48;56;107;172;175;191;192]. Potencjalnie najpoważniejszym powikłaniem po zastosowaniu KG jest możliwość wystąpienia potransfuzyjnej ostrej niewydolności oddechowej (*Transfusion-Related Acute Lung Injury* – TRALI) [27;30;112;172;234]

W analizowanej grupie pacjentów, u każdego dziecka przed przetoczeniem stosowano premedykację obejmującą podaż glikokortykosterydu, leku przeciwhistaminowego i przeciwgorączkowego. Premedykacja przed przetoczeniem KG jest zalecana przez większość autorów [151;191]. Każde dziecko, u którego przeprowadzano transfuzję koncentratu granulocytów było także skrupulatnie monitorowane podczas przetoczenia i w okresie poprzetoczeniowym. Monitorowano akcję serca, ciśnienie tętnicze, saturację krwi oraz temperaturę ciała. U dzieci otrzymujących w leczeniu przeciwgrzybiczym amfoterycynę B zachowywano ośmiogodzinny odstęp pomiędzy lekiem a transfuzją KG. Takie postępowanie ma na celu zapobieganie ostrej niewydolności oddechowej [107;172;175], która jest opisywana podczas łącznej podaży KG i amfoterycyny B [174;181]. W analizowanej grupie 16 dzieci, u których przeprowadzono 54 transfuzje koncentratu granulocytów, tylko u jednego dziecka obserwowano niepożądaną reakcję w trakcie przetoczenia pod postacią zwyżki ciepłoty ciała. U żadnego dziecka nie stwierdzono potransfuzyjnej ostrej niewydolności oddechowej. U żadnego dziecka nie było też konieczności przerwania wlewu. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów opisujących dobrą tolerancję podaży KG.

Kolejnym aspektem ocenianej procedury transfuzji KG było bezpieczeństwo dawcy koncentratu. Szereg autorów prezentuje badania oceniające tolerancję granulocytarnych czynników wzrostu u zdrowych dawców. Podaż G-CSF związana jest z możliwością wystąpienia działań niepożądanych, między innymi objawów grypopodobnych: gorączki, dreszczy, bólów kostnych oraz bezsenności, jednak większość autorów podaje, że podaż G-CSF jest dobrze tolerowana przez dawców KG, a objawy niepożądane są łagodne i przemijające [30;107;158]. W analizowanej w niniejszym opracowaniu grupie dawców jedynie 3 dawców zgłosiło objawy grypopodobne, jednakże nie były one powodem odstąpienia od dalszych stymulacji i separacji. W odróżnieniu od obserwacji Bux i wsp., nie obserwowano wzrostu częstości występowania działań niepożądanych w kolejnych dniach stymulacji [30]. Po zakończeniu realizacji procedury, dawcom zadano pytanie o subiektywne samopoczucie podczas jej trwania. Zdecydowana większość spośród nich podała dobre samopoczucie w trakcie stymulacji i separacji oraz wyrażała

chęć poddania się separacji w przyszłości, co dowodzi wysokiej pozytywnej motywacji u dawców spokrewnionych lub spowinowaconych z biorcą.

Bezpieczeństwo dawcy w kontekście odległych skutków podaży granulocytarnego czynnika wzrostu stale jest przedmiotem badań. Systematycznie prowadzone są rejestry dawców otrzymujących G-CSF, w których oceniane jest ryzyko rozwoju nowotworów układu krwiotwórczego [15;34;39;107]. Bux i wsp. ocenili stan zdrowia dawców KG po 2-4 tygodniach oraz po 2 latach od donacji, nie stwierdzając odległych objawów ubocznych związanych z podażą G-CSF [30]. W analizie ośrodka gdańskiego oceniono stan zdrowia dawców w okresie od 15 miesięcy do 9 lat od podaży G-CSF. W telefonicznej ankiecie przeprowadzonej w grudniu 2012 roku na temat aktualnego stanu zdrowia dawców informację uzyskano od 19 spośród 23 dawców. Wszyscy z ankietowanych deklARowali dobry stan zdrowia, u żadnego z dawców nie stwierdzono dotychczas żadnych niepokojących objawów mogących sugerować schorzenie hematologiczne. Niewątpliwie wymagają oni systematycznej oceny stanu zdrowia w dłuższym przedziale czasu.

Skuteczność transfuzji koncentratu granulocytów zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu wspomagającym zakażeń stale jest dyskutowana. Kerr i wsp. pozytywnie ocenili transfuzje granulocytów jako profilaktykę zakażeń grzybiczych u chorych z przebyłym wcześniej zakażeniem o tej etiologii (profilaktyka wtórna) [107]. W innych ośrodkach także z powodzeniem stosowano transfuzje granulocytów w skojarzeniu z lekami przeciwgrzybiczymi jako profilaktykę wtórną u pacjentów z przebyłym uprzednio zakażeniem grzybiczym [18;75;89;107;151].

Wobec równoczesnego stosowania wielolekowej antybiotykoterapii oraz leków przeciwgrzybiczych u chorych poddawanych transfuzjom KG, wiarygodna ocena skuteczności przetoczeń bez randomizowanych badań jest praktycznie niemożliwa. Uczestniczący w badaniu Seidel i wsp. zgłaszali jednak szereg zastrzeżeń natury etycznej dotyczących randomizacji pacjentów, co spowodowało drastyczny spadek liczby rekrutowanych do badania chorych [192]. Pacjenci i lekarze uczestniczący w badaniu wyrażali sprzeciw wobec alternatywy otrzymywania placebo przez pacjentów z zagrażającymi życiu infekcjami. Podobne wątpliwości sprawiły, że także w gdańskim ośrodku zrezygnowano z badania z randomizacją i wszystkie dzieci wymagające leczenia wspomagającego kwalifikowano wstępnie do procedury.

Oceniając efektywność procedury przetoczeń, analizie poddano poprzetoczeniowy wzrost liczby granulocytów. Stwierdzono, że liczba neutrocytów wzrosła średnio o 230 komórek/mm³. Jedynie u jednego dziecka obserwowano znacznie większy wzrost liczby granulocytów (o 1.860 komórek/mm³), co należy jednak wiązać z równoczesną odnową hematologiczną u tej pacjentki. Równocześnie w analizowanej grupie dzieci obserwowano obniżenie wartości CRP średnio o 106 mg/dl w stosunku do poziomu wyjściowego; oceny dokonywano po 5 dniach od zakończenia procedury. Dodatkowo obserwowany poprzetoczeniowy wzrost liczby płytek krwi pozwolił ograniczyć częstość przetoczeń koncentratu krwinek płytkowych w analizowanej grupie dzieci [158].

Zgodnie z danymi z literatury, w ocenie ostatecznego efektu terapeutycznego uwzględniono dzieci, które otrzymały dwa lub więcej przetoczenia koncentratu granulocytów [56;158], w związku z czym analizie poddano 12 dzieci. Oceny dokonywano po 3 i 12 tygodniach od zakończenia transfuzji. Zgodnie z kryteriami oceny efektów leczenia opracowanymi przez Dignani i wsp., częściową odpowiedź na leczenie po 3 tygodniach stwierdzono u 10 dzieci, natomiast całkowitą odpowiedź na leczenie stwierdzono u dwojga dzieci [56]. Po 12 tygodniach u wszystkich dzieci stwierdzono całkowitą regresję zmian; u jednego pacjenta stwierdzono jedynie obecność zmiany resztkowej w płucu.

W ostatecznej ocenie efektów podaży KG nie ujęto dziewczynki z mieszanym zakażeniem *Mucor spp.* i *Aspergillus spp.*, która zmarła w wyniku progresji zakażenia, z uwagi na fakt, że dokonano u niej tylko jednego przetoczenia. Powodem przerwania procedury była rezygnacja dawcy z dalszych stymulacji i separacji oraz brak dostępności kolejnych dawców. Wydaje się jednak, że w tym przypadku nawet kontynuacja przetoczeń nie przyniosłaby pozytywnego efektu terapeutycznego z uwagi na rozległość zmian narządowych w momencie rozpoznania zakażenia grzybiczego.

Uzyskane w niniejszym opracowaniu bardzo dobre ostateczne wyniki terapii przeciwgrzybiczej, w porównaniu z uzyskanymi przez innych autorów, należy prawdopodobnie wiązać z wdrożeniem leczenia przeciwgrzybiczego skojarzonego z podażą KG w stosunkowo wczesnej fazie zakażenia. Do przetoczeń kwalifikowano nie tylko dzieci z udokumentowanym zakażeniem grzybiczym, ale także z zakażeniem prawdopodobnym i możliwym. Wydaje się, że to właśnie zbyt późna kwalifikacja chorych z zakażeniami grzybiczymi do przetoczeń granulocytów może być przyczyną niedostatecznych efektów terapeutycznych. Podobne wnioski z analizy 19 chorych po transplantacji komórek krwiotwórczych wyciągnęli Price i wsp. w opracowaniu z 2000 roku [172]. Uznali oni, że niedostateczna efektywność KG w grupie pacjentów z inwazyjną aspergilozą wynika najprawdopodobniej ze zbyt późnej kwalifikacji do procedury. U chorych z infekcjami bakteryjnymi wyniki były lepsze, prawdopodobnie z uwagi na mniejszą inwazję tkanek w porównaniu z zakażeniami grzybiczymi. Autorzy postulują wdrożenie transfuzji KG we wcześniejszej fazie zakażenia, w związku z czym wskazują na konieczność poprawy wczesnej diagnostyki zakażeń grzybiczych zarówno przy pomocy TK klatki piersiowej, jak i technik molekularnych. Zbieżne wnioski podają także inni autorzy sugerując konieczność wcześniejszej kwalifikacji pacjentów do procedury transfuzji KG [34;191].

Przyjęty w gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej algorytm postępowania diagnostycznego z uwzględnieniem rutynowego wykonywania przezklatkowego ultrasonograficznego badania płuc u dzieci w neutropenii umożliwia precyzyjną wczesną diagnostykę oraz włączenie leczenia przeciwgrzybiczego z uwzględnieniem transfuzji granulocytów jako postępowania wspomagającego. Dobra współpraca z Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku pozwala na szybkie przygotowanie dawcy i przeprowadzenie procedury separacji. Jest oczywiste, że bez randomizowanych badań przeprowadzonych na dużych grupach chorych nie można formułować ostatecznych wniosków co do skuteczności transfuzji koncentratu granulocytów [18;89;151]. W świetle uzyskanych wyników własnych oraz danych z literatury należy jednak podkreślić, że zastosowanie koncentratu granulocytów może stanowić obiecującą opcję terapeutyczną u dzieci w neutropenii. Biorąc pod uwagę, że wyniki leczenia zakażeń grzybiczych u dzieci ze schorzeniami onkohematologicznymi, pomimo znacznego postępu w farmakoterapii nadal są niezadowalające, każda możliwość leczenia wspomagającego powinna być wykorzystana w tej grupie pacjentów. Dodatkowym argumentem na rzecz stosowania tej formy leczenia wspomagającego jest bardzo dobra tolerancja koncentratu granulocytów przez biorców preparatu.

Inwazyjne procedury diagnostyczne i terapeutyczne u dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi

Wskazania do interwencji chirurgicznej w inwazyjnych zakażeniach grzybiczych nie są ostatecznie sprecyzowane, a doniesienia dotyczące pacjentów pediatrycznych są bardzo nieliczne [33]. Wątpliwości budzi rola procedur inwazyjnych zarówno w diagnostyce

ce, jak i w terapii zakażeń grzybiczych. Procedury chirurgiczne wykonywane w celu sprecyzowania diagnozy, podejmowane są w przypadku, gdy wyczerpano metody diagnostyki nieinwazyjnej. U dzieci nieodpowiadających na zastosowaną terapię przeciwgrzybiczą oraz z niedostateczną odpowiedzią na zastosowane leczenie, uzyskanie materiału diagnostycznego umożliwia weryfikację wstępnego rozpoznania i ewentualną modyfikację leczenia. W niektórych przypadkach zabieg pozwala na radykalne usunięcie zmienionej tkanki, a w wybranych – na zmniejszenie masy grzyba, co umożliwia bardziej skuteczne leczenie zachowawcze [115].

U dzieci ze schorzeniami hematologicznymi ograniczenia dla zastosowania procedury chirurgicznej stanowią może ciężki stan ogólny, niski poziom płytek krwi, głębokie zaburzenia w zakresie układu krzepnięcia oraz konieczność zastosowania znieczulenia ogólnego do zabiegu [13]. Dodatkowy problem stanowi transport dziecka będącego w głębokiej mielosupresji poza oddział macierzysty, na którym jest ono hospitalizowane z zachowaniem szczególnych zasad aseptyki, a tym samym narażanie go na dodatkowe ryzyko infekcji. Procedury diagnostyczne takie jak płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (*bronchoalveolar lavage*, BAL), czy biopsja torakoskopowa (*video assisted thoracoscopic biopsy*, VAT) są często niemożliwe do przeprowadzenia u małych dzieci ze względu na brak sprzętu o odpowiednich rozmiarach oraz brak doświadczonej kadry medycznej [115].

W analizowanej grupie 59 dzieci, u których rozpoznano 61 incydentów IZG, do inwazyjnych procedur diagnostycznych i terapeutycznych wstępnie zakwalifikowano 8 dzieci (jedno dziecko zmarło podczas transportu na blok operacyjny); przeprowadzono u nich łącznie 9 procedur inwazyjnych. W czterech przypadkach wskazanie do zabiegu stanowiły wątpliwości diagnostyczne. Wśród procedur diagnostycznych wykonanych w tej grupie dzieci, przeprowadzono nakłucie opłucnej, biopsję skóry, biopsję tarczycy i biopsję zatok przynosowych. W sześciu przypadkach zabiegi wykonywane były z powodu niedostatecznej odpowiedzi na wstępnie zastosowane leczenie przeciwgrzybicze. W tej grupie dzieci wykonano pięć zabiegów resekcji tkanki płucnej: pulmonektomię w jednym przypadku, lobektomię w dwóch przypadkach, segmentektomię w jednym przypadku oraz resekcję klinową płuca u jednego pacjenta.

Aż trzy procedury inwazyjne przeprowadzono u dziewczynki z mieszanym zakażeniem *Mucor spp.* i *Aspergillus spp.*: nakłucie jamy opłucnowej, pulmonektomię prawostronną i biopsję tarczycy. Wskazania do każdej procedury były inne: nakłucie opłucnej przeprowadzono w celu ustalenia czynnika etiologicznego zmian w płucach oraz w celu poprawy wydolności oddechowej dziecka, pulmonektomia była wykonana w celu radykalnego usunięcia zakażonej tkanki, natomiast biopsję tarczycy wykonano w celu ustalenia stopnia zaawansowania zakażenia. W badaniu mikologicznym płynu z opłucnej uzyskano wzrost grzyba *Mucor spp.*, co umożliwiło modyfikację wstępnego leczenia przeciwgrzybiczego. Pacjentka z uwagi na wstępne podejrzenie aspergilozy wysunięte na podstawie TK klatki piersiowej i dodatniego wyniku antygenu galaktomannanowego w surowicy krwi otrzymywała początkowo worykonazol jako leczenie wyprzedzające. Po uzyskaniu wyniku posiewu płynu z opłucnej, worykonazol odstawiono jako lek nieskuteczny w terapii mukormykozy i włączono amfoterycynę B początkowo jako monoterapię, a następnie w skojarzeniu z pozakonazolem. Dodatkowo, w wyniku ewakuacji płynu z opłucnej u dziecka uzyskano poprawę wydolności oddechowej. Z uwagi na stwierdzoną w kontrolnym badaniu TK klatki piersiowej progresję zmian zapalnych w płucu prawym oraz brak zmian patologicznych w obrębie płuca lewego zdecydowano o przeprowadzeniu pulmonektomii prawostronnej. Decyzję o przeprowadzeniu pulmonek-

tomii u analizowanej pacjentki podjęto w oparciu o dane z literatury dokumentujące, że resekcja chirurgiczna zlokalizowanej zmiany płucnej poprawia rokowanie u chorych z mukormykozą. W jednoośrodkowym badaniu amerykańskim obejmującym 30 chorych, wykazano zdecydowaną redukcję śmiertelności u pacjentów, u których dokonano resekcji zmiany w stosunku do grupy leczonej wyłącznie zachowawczo (11% vs 68%) [211]. Inni autorzy także wskazują na redukcję śmiertelności u pacjentów poddawanych skojarzonemu z zachowawczym leczeniu chirurgicznemu [211;162;122]. Diagnostyczne nakłucie tarczycy u tej samej dziewczynki wykonano w celu ustalenia stopnia zaawansowania zakażenia. U dziecka stwierdzono powiększenie gruczołu tarczowego z towarzyszącymi objawami nadczynności tarczycy; na podstawie wykonanego badania ultrasonograficznego tarczycy wysunięto sugestię zajęcia narządu przez proces grzybiczy [92]. Sugestię potwierdzono badaniem histopatologicznym materiału biopsyjnego, gdzie opisano liczne strzępki *Mucor spp.* W tym okresie, w badaniu TK klatki piersiowej wysunięto sugestię zajęcia lewego płuca przez proces grzybiczy, natomiast w badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej wykazano cechy zajęcia śledziony i prawej nerki. W związku z rozsiewem zakażenia i brakiem skuteczności stosowanego skojarzonego leczenia przeciwgrzybiczego, podjęto decyzję o odstąpieniu od agresywnego leczenia zarówno przeciwgrzybiczego, jak i przeciwnowotworowego; dziecko zakwalifikowano do leczenia paliatywnego.

Wydaje się, że u przedstawianej pacjentki w momencie zabiegu pulmonektomii zakażenie grzybicze nie było zlokalizowane jedynie do prawego płuca. Wykonane tydzień po zabiegu badanie TK klatki piersiowej, które ujawniło zmiany w lewym płucu oraz cechy zajęcia gruczołu tarczowego, nerki i śledziony wykazane w badaniu ultrasonograficznym potwierdzają tę tezę. Autorzy licznych opracowań są zgodni, że w postaci rozsianej mukormykozy postępowanie chirurgiczne powinno być szczególnie starannie rozważane i nie ma jednoznacznych dowodów na skuteczność tego rodzaju postępowania. Zgodnie z wytycznymi ECIL w przypadku rozsianej mukormykozy nie ma dostatecznych dowodów na skuteczność tej opcji terapeutycznej [197]. Omawiany przypadek stanowi potwierdzenie niezwykle agresywnego przebiegu zakażenia o etiologii *Mucor spp.*, zwłaszcza w skojarzeniu z aspergilozą. Pomimo jednak ostatecznie niekorzystnego efektu leczenia należy podkreślić, że zgodnie z danymi z literatury jedynie usunięcie ognisk zakażenia mukormykozą daje szansę na eliminację patogenu [119;161;47]. Wydaje się, że wczesna interwencja chirurgiczna polegająca na radykalnej resekcji tkanek objętych zakażeniem skojarzona z leczeniem przeciwgrzybiczym może dać szansę na powodzenie terapeutyczne.

W analizowanej grupie dzieci znalazło się 4 pacjentów z podejrzeniem aspergilozy płuc, u których kryterium kwalifikacji do zabiegu operacyjnego była niedostateczna odpowiedź na leczenie zachowawcze. U dwojga dzieci znajdujących się w okresie agresywnej chemioterapii, u których nie uzyskano regresji zmian grzybiczych pomimo stosowanego leczenia przeciwgrzybiczego, przeprowadzona lobektomia umożliwiła eradycję zakażenia i kontynuację leczenia przeciwnowotworowego. W przypadku dwóch innych pacjentów, u których zakażenie grzybicze rozpoznano po allotransplantacji komórek krwiotwórczych, zabieg operacyjny wykonano w celu resekcji zmiany resztkowej, co pozwoliło na dalsze stosowanie leczenia immunosupresyjnego. Dodatkowym efektem przeprowadzonego zabiegu operacyjnego było potwierdzenie etiologii grzybiczej i identyfikacja patogenu.

Optymalny sposób postępowania w inwazyjnej aspergilozie płuc stale budzi kontrowersje zarówno w odniesieniu do rodzaju leku przeciwgrzybiczego, jak rodzaju i

czasu zastosowania procedur chirurgicznych [4]. Podczas gdy resekcja zmiany w przypadku aspergiloma jest powszechnie zalecana, to wskazania do resekcji tkanki płucnej u pacjentów w immunosupresji budzą wątpliwości [17].

Wobec wprowadzenia do terapii coraz skuteczniejszych leków przeciwgrzybiczych, aktualnie rutynowym sposobem postępowania w aspergiliozie płuc jest leczenie zachowawcze oraz równoczesne dążenie do rekonstrukcji hematologicznej. Większość autorów jest jednak zgodna, że w przypadku progresji infekcji lub utrzymywania się zmian radiologicznych pomimo stosowania leczenia przeciwgrzybiczego, interwencja chirurgiczna może być użyteczna. Zlokalizowana aspergilioza płucna niereagująca na leczenie zachowawcze jest wskazaniem do interwencji chirurgicznej, która ma na celu: postawienie rozpoznania, zapobieganie śmiertelnym krwotokom z płuc, eradykację przetrwałego zakażenia oraz zapobieganie nawrotom infekcji podczas dalszego leczenia immunosupresyjnego [4;33;167;233]. Zabieg chirurgiczny jest zdecydowanie rekomendowany w przypadku pojawienia się krwiopłucia lub zajęcia obszarów płuca zlokalizowanych w pobliżu wielkich naczyń. Zabieg sugerowany jest także w przypadku pacjentów, u których istnieje konieczność kontynuowania leczenia immunosupresyjnego [161]. Danner i wsp. w publikacji z 2008 roku rekomendują przeprowadzenie zabiegu operacyjnego, gdy stwierdza się przetrwałe zmiany radiologiczne i istnieje konieczność kontynuacji leczenia przeciwnowotworowego, w przypadku pojawienia się krwiopłucia oraz u chorych z zagrażającą życiu lokalizacją zmiany (w pobliżu wielkich naczyń), przy progresji zmian radiologicznych oraz w zmianach ogniskowych [49]. Pidhorecky i wsp. także podają, że zlokalizowana aspergilioza płucna niereagująca na leczenie zachowawcze jest wskazaniem do interwencji chirurgicznej [167]. Celem zabiegu jest potwierdzenie rozpoznania i udokumentowanie czynnika etiologicznego, zapobieganie śmiertelnym krwotokom z płuc, eradykacja przetrwałego zakażenia oraz zapobieganie nawrotom infekcji podczas dalszego leczenia immunosupresyjnego. Autorzy proponują następujący algorytm postępowania: wstępne badanie TK klatki piersiowej, wdrożenie leczenia zachowawczego, a następnie po 14 dniach leczenia – ponowne badanie TK. Jeśli zmiana w obrazie TK jest nadal obecna, wskazana jest resekcja pod warunkiem, że zmiana jest zlokalizowana [167]. Przydatność resekcji chirurgicznej tkanki zajętej przez *Aspergillus spp.* pozytywnie ocenia także Walsh i wsp. [220]. Zabieg polecany jest wówczas, gdy zmiana przylega do dużych naczyń lub osierdzia, pojedyncze ognisko powoduje krwiopłucie oraz gdy zmiana powoduje erozję opłucnej i/lub ściany klatki piersiowej i żeber. Wskazaniem względnym do resekcji chirurgicznej jest resekcja zmiany grzybiczej u chorego wymagającego dalszej intensywnej chemioterapii bądź transplantacji komórek krwiotwórczych, gdyż ryzyko nawrotu aspergiliozy w przetrwałych jamach rośnie podczas neutropenii i immunosupresji. Wskazania do interwencji chirurgicznej płuc sklasyfikowano jako nagłe i planowe. Planowe zabiegi rozważa się u pacjentów z dobrą odpowiedzią na chemioterapię na zakończenie leczenia, przed planowaną transplantacją szpiku dla zredukowania ryzyka nawrotu zakażenia oraz dla sprecyzowania diagnozy. Wskazania do interwencji nagłej to zamknięcie naczynia przez masy grzybicze oraz krwotok z płuc [13;16;156]. Istnieją doniesienia dotyczące pacjentów dorosłych, że agresywne postępowanie chirurgiczne ma korzystny wpływ na przeżycie i jest zalecane zarówno jako postępowanie planowe (resekcja masy resztkowej), jak i nagłe (w przypadku krwotoku) [16;161;220;233]. Wg Endo i wsp. podstawową korzyścią z zabiegu operacyjnego jest natomiast zapobieganie śmiertelnym krwotokom z płuc [62]. Część autorów podkreśla rolę wczesnej interwencji chirurgicznej w skojarzeniu z terapią worykonazolem, która jest bezpieczna, efektywna, a także pozwala udokumentować czynnik etiologiczny [9].

Wybór zakresu zabiegu uzależniony jest od lokalizacji i wielkości zmiany. Resekcje powinny być w miarę możliwości oszczędzające; rekomendowana jest resekcja klinowa zmiany, segmentektomia lub lobektomia. Pulmonektomia, jako zabieg okaleczający powinna być przeprowadzana jedynie w wyjątkowych sytuacjach [16]. Interwencja nie jest wskazana przy rozsiewie zmian.

Krwiopłucie każdorazowo jest alarmującym objawem u chorych z zakażeniem grzybiczym płuc [101;163]. Wyjaśnienie mechanizmu krwiopłucia w aspergilozie płucnej przedstawił już w 1989 roku Weiss [225]. Znane jest zjawisko angiotropizmu *Aspergillus*, które może tłumaczyć częstość występowania krwiopłucia w infekcjach o tej etiologii. W okresie neutropenii po chemioterapii, strzępki grzyba kolonizują oskrzela i naczynia powodując lokalne ogniska martwicy. Podczas odnowy hematologicznej i w trakcie wzrostu liczby granulocytów obojętnochłonnych, pochodzące z nich enzymy proteolityczne powodują uszkodzenie tkanki płucnej. W przypadku lokalizacji zmian w pobliżu tętnicy płucnej może dochodzić do masywnego krwotoku w wyniku uszkodzenia naczynia [225]. Okres rekonstrukcji hematologicznej jest w związku z tym krytyczny dla nagłych krwotoków [45;163]. W badaniu z 1986 roku Albelda i wsp. opisują, że odsetek masywnego krwiopłucia wystąpił u 27% chorych z odnową szpikową i u żadnego chorego bez rekonstrukcji szpikowej [3]. Niewielkie krwiopłucie opisywane jest u 58% pacjentów z inwazyjną aspergilozą. Śmiertelne krwotoki występują rzadko, zazwyczaj w trakcie odnowy hematologicznej. Gorelik i wsp. opisali 2 przypadki oraz dokonali przeglądu literatury (17 przypadków) śmiertelnych krwotoków płucnych [72]. Wykazano, że w okresie wzrostu liczby granulocytów, kiedy u części chorych dochodzi do wyzdrowienia po synergistycznym działaniu z antybiotykami, u części – w tej fazie zakażenia dochodzi do śmiertelnego krwotoku [72;156].

Wśród analizowanych w niniejszym opracowaniu dzieci z IZG, krwiopłucie wystąpiło u dwóch pacjentek. W obydwu przypadkach objaw ten obserwowano w okresie ustępowania neutropenii, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa. U pacjentki, u której doszło do zgonu, do śmiertelnego krwotoku doszło, gdy liczba granulocytów gwałtownie wzrosła po zastosowaniu granulocytarnego czynnika wzrostu. Pierwszy incydent krwiopłucia obserwowano 4 dni wcześniej, wówczas podjęto decyzję o kwalifikacji dziecka do zabiegu lobektomii. Zdając sobie sprawę z ryzyka krwotoku podczas rekonstrukcji hematologicznej, przed decyzją o włączeniu G-CSF poszukiwano dawcy granulocytów jako alternatywnego sposobu postępowania wspomagającego. Niestety brak rodzinnego dawcy granulocytów uniemożliwił wdrożenie tej procedury. U drugiej dziewczynki, u której wystąpiło krwiopłucie, przeprowadzony zabieg lobektomii pozwolił na całkowitą eradykację zakażenia.

Podjmując decyzję o przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego należy wziąć pod uwagę ryzyko powikłań procedur inwazyjnych stosowanych w diagnostyce i leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych. W pracy Endo i wsp. retrospektywnej analizie poddano 31 chorych z aspergilozą płucną, u których przeprowadzono radykalną resekcję zmian płucnych [3;62]. W tej grupie u 20 chorych przeprowadzono segmentektomię lub lobektomię, u 11 – usunięcie dwóch płatów lub pulmonektomię. Powikłania pooperacyjne w tej grupie chorych wystąpiły u 19% operowanych i obejmowały: krwawienie do jamy opłucnej, przetokę oskrzelowo-opłucnową oraz ropniaka opłucnej. W pracy Cesaro i wsp. opisano 20 elektywnych procedur chirurgicznych przeprowadzonych u 19 dzieci [33]. W tej grupie dzieci powikłania chirurgiczne obserwowano u 3 dzieci; nie stwierdzono zgonów związanych z procedurami chirurgicznymi.

W analizowanej w niniejszym opracowaniu grupie pacjentów, powikłania po zastosowanych procedurach inwazyjnych wystąpiły u dwojga dzieci. U jednego dziecka obserwowano masywne krwawienie po zabiegu resekcji klinowej płuca, chłopiec wymagał ponownej operacji. U drugiego dziecka wystąpiło masywne krwawienie będące wynikiem biopsji zatoki szczękowej. U pozostałych pacjentów nie obserwowano powikłań po zastosowanych procedurach. Należy podkreślić znaczenie odpowiedniego przygotowania pacjenta do zabiegu; szczególnie istotne jest uzyskanie odpowiedniej liczby płytek krwi. Liczba płytek powyżej 50 G/l powinna zapewnić bezpieczeństwo podczas zabiegu [156;233]. W grupie ocenianych dzieci, u sześciorga istniała konieczność transfuzji koncentratu krwinek płytkowych przed zabiegiem. Przetoczenia koncentratu krwinek czerwonych w okresie pooperacyjnym wymagało sześcioro dzieci.

Wskazania do zabiegu torakochirurgicznego muszą być każdorazowo ustalane indywidualnie z uwzględnieniem statusu hematologicznego, stanu ogólnego dziecka, wyników badań biochemicznych, mikrobiologicznych i obrazowych z wyważeniem bilansu ryzyka zabiegu i jego korzyści. Decyzję o zabiegu operacyjnym muszą podejmować wspólnie lekarze hematolodzy, torakochirurdzy i anestezjolodzy. Kwalifikacja do zabiegu zazwyczaj jest bardzo trudna. Z jednej strony podkreśla się rolę resekcji zmienionej tkanki dla pełnej eradykacji zakażenia oraz zapobieganie potencjalnie śmiertelnemu krwiopłuciu, z drugiej jednak strony należy wziąć pod uwagę ryzyko samego zabiegu związane ze stanem ogólnym i statusem hematologicznym. Należy również uwzględnić fakt, iż w ostatnim okresie dysponujemy coraz bardziej skutecznymi lekami przeciwgrzybiczymi, dzięki którym możliwe jest uzyskanie pełnej regresji zmiany grzybiczej. W związku z tym niekiedy należy rozważyć postawę wyczekującą. Opisany przypadek pacjenta, u którego odstąpiono od lobektomii, jest dowodem na skuteczność postępowania zachowawczego u chorego z dużą zmianą naciekową płuca. Kilkakrotne konsultacje z chirurgami klatki piersiowej pozwoliły ustalić optymalną opcję terapeutyczną dla tego pacjenta. Wydaje się jednak, że nie jest możliwe ustalenie jednolitego algorytmu postępowania terapeutycznego u pacjentów ze zlokalizowanym naciekiem płucnym, czego dowodem może być opisywany przypadek dziewczynki, która zginęła z powodu masywnego krwotoku płucnego w drodze na blok operacyjny. U pierwszego pacjenta decyzja o zabiegu operacyjnym została, po konsultacji z zespołem torakochirurgów odroczone z uwagi na niekorzystną lokalizację zmiany stwarzającą ryzyko krwotoku w trakcie zabiegu. U tego chorego leczenie zachowawcze przyniosło pozytywny efekt terapeutyczny. U drugiej pacjentki, pomimo wdrożenia leczenia przeciwgrzybiczego, doszło do progresji zakażenia. Wydaje się, że w tym przypadku decyzja o dokonaniu lobektomii zapadła zbyt późno. Czas, jaki upłynął od pojawienia się niewielkiego krwiopłucia do zabiegu operacyjnego wyniósł 4 dni. W tym okresie gwałtownie wzrosła liczba granulocytów, co najprawdopodobniej było przyczyną śmiertelnego krwotoku płucnego.

W każdym przypadku interwencji chirurgicznej w analizowanym materiale klinicznym uzyskano wymierne korzyści diagnostyczne i/lub terapeutyczne. We wszystkich przypadkach potwierdzono wstępną sugestię zakażenia grzybiczego wysuniętą na podstawie badań obrazowych. Dodatkowo wyniki uzyskane u części pacjentów pozwoliły na modyfikację leczenia przeciwgrzybiczego, natomiast u części spowodowały usunięcie zmian resztkowych i umożliwiły bezpieczną kontynuację leczenia immunosupresyjnego. Interesujące były zwłaszcza przypadki podejrzenia zakażenia grzybiczego skóry i tarzycy wysunięte na podstawie oceny ultrasonograficznej. Ocena histopatologiczna materiału uzyskanego drogą biopsji potwierdziła obecność grzybów chorobotwórczych

(*Aspergillus spp.* i *Mucor spp.*) i umożliwiła podjęcie właściwych decyzji terapeutycznych.

Ostatecznie należy uznać, że wprowadzenie procedur inwazyjnych do diagnostyki i leczenia IZG stanowić może cenne uzupełnienie postępowania zachowawczego. Kwalifikacja dziecka do opisywanych procedur interwencyjnych każdorazowo powinna być dokonywana indywidualnie, z uwzględnieniem wielospecjalistycznych konsultacji oraz po analizie potencjalnego ryzyka procedury i wynikających z niej korzyści.

Podsumowanie

Podsumowując, wydaje się, że uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki badań mogą mieć korzystny wpływ na efekty leczenia przeciwgrzybiczego u dzieci leczonych z powodu chorób nowotworowych. Wykorzystanie badania ultrasonograficznego w diagnostyce i monitorowaniu zmian grzybiczych w płucach nie tylko umożliwia wdrożenie leczenia przeciwgrzybiczego we wczesnej fazie zakażenia, ale także pozwala monitorować skuteczność stosowanej terapii. Dodatkowo, obrazowanie przy pomocy ultradźwięków pozwala ograniczyć częstość stosowania tomografii komputerowej, co ma istotne znaczenie dla ochrony radiologicznej populacji dziecięcej. Jak wykazano w niniejszym opracowaniu, hiperglikemia posterydowa stanowi istotny, ale niedoceniany czynnik ryzyka rozwoju zakażeń grzybiczych, szczególnie u dzieci. Poprawa wykrywalności hiperglikemii posterydowej u dzieci leczonych z powodu chorób krwi umożliwia wyodrębnienie grupy pacjentów, u których należy rozważyć wdrożenie profilaktyki przeciwgrzybiczej zawierającej w swoim spektrum grzyby pleśniowe. Dzieci, u których stwierdzano hiperglikemię podczas terapii glikokortykosterydami, powinny także zostać objęte opieką poradni diabetologicznej po zakończeniu terapii przeciwnowotworowej. Możliwość wykorzystania transfuzji koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców stanowi cenne uzupełnienie stosowanej farmakoterapii zakażeń grzybiczych. Należy podkreślić jednak, że warunkiem niezbędnym do przeprowadzenia tej procedury jest doskonała współpraca klinicysty z Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolęcznictwa oparta o wspólnie wypracowany model działania, który musi prawidłowo funkcjonować w przypadku konieczności pilnego przygotowania dawcy do separacji koncentratu granulocytów. Algorytm postępowania stosowany od 10 lat w ośrodku gdańskim jest godny polecenia i możliwy do wprowadzenia także w innych ośrodkach klinicznych, nie tylko pediatrycznych. Inwazyjne procedury diagnostyczne i terapeutyczne są coraz częściej stosowane u pacjentów z podejrzeniem lub rozpoznaniem inwazyjnych zakażeń grzybiczych, co niewątpliwie ma związek z poprawą jakości opieki okołoperacyjnej, jak i technik wykonywanych zabiegów. Pomimo istniejących trudności wynikających przede wszystkim z ciężkości stanu ogólnego pacjenta i towarzyszących zaburzeń krzepnięcia, należy dążyć do uzyskania wiarygodnego materiału diagnostycznego, co wielokrotnie umożliwia modyfikację stosowanego uprzednio leczenia przeciwgrzybiczego. Dodatkowo usunięcie zmian grzybiczych niepoddających się leczeniu zachowawczemu pozwala na bezpieczną kontynuację leczenia immunosupresyjnego.

Wszystkie przedstawione aspekty zarówno w obszarze diagnostyki, jak i terapii przeciwgrzybiczej są możliwe do wykorzystania nie tylko u dzieci leczonych z powodu schorzeń onkohematologicznych. Mogą mieć zastosowanie zarówno u dzieci, jak i u pacjentów dorosłych z upośledzeniem homeostazy immunologicznej ustroju, w wyniku którego doszło do rozwoju inwazyjnego zakażenia grzybiczego. W związku z powyż-

szym wydaje się, że niniejsza praca może mieć wymierny walor praktyczny możliwy do wykorzystania w codziennej praktyce klinicznej w wielu dziedzinach medycyny oraz ostatecznie przyczynić się do ograniczenia niekorzystnych skutków inwazyjnych zakażeń grzybiczych.

6. WNIOSKI

Całokształt prezentowanych aspektów diagnostyki i leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej przyczynił się do osiągnięcia bardzo wysokiego odsetka wyleczeń zakażeń grzybiczych w tej grupie pacjentów. Dowodem skuteczności stosowanych procedur diagnostyczno-terapeutycznych może być brak obserwowanych w ośrodku gdańskim różnic w przeżyciu pomiędzy grupą dzieci, u których w trakcie leczenia choroby podstawowej obserwowano IZG, a dziećmi, u których IZG nie wystąpiło.

Na podstawie przeprowadzonej w niniejszej rozprawie analizy sformułowano następujące wnioski:

1. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej wynosi 24,1% i jest wyższa, aniżeli podawana w literaturze. Wynika to z faktu uwzględnienia w analizie pacjentów nie tylko z udokumentowanym i prawdopodobnym rozpoznaniem IZG wg kryteriów EORTC 2008, ale także pacjentów z rozpoznaniem możliwym. Uznano, że typowe zmiany w badaniach obrazowych stanowią wystarczającą podstawę do rozpoznania IZG u dzieci i wdrożenia leczenia. W gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej uzyskano wysoką skuteczność leczenia IZG – pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano u 96,7% dzieci. Modyfikacja kryteriów EORTC 2008 może zmniejszyć niedoszacowanie rozpoznawania IZG u dzieci i tym samym poprawić efekty leczenia przeciwegrzybiczego
2. Przezskatkowe ultrasonograficzne badanie płuc stanowi cenną metodę wczesnej diagnostyki zakażeń grzybiczych płuc u dzieci, umożliwiając ograniczenie terapii empirycznej na korzyść wyprzedzającej. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono skuteczność diagnostyczną opisywanego badania w rozpoznawaniu IZG płuc u dzieci – metodę zwalidowano w oparciu o porównanie jej z tomografią komputerową klatki piersiowej
3. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że hiperglikemia posterydowa stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju IZG, w związku z czym należy ją uwzględnić w kwalifikacji pacjentów do wdrożenia profilaktyki przeciwegrzybiczej. Leki stosowane w profilaktyce przeciwegrzybiczej powinny uwzględniać w swoim spektrum grzyby pleśniowe. Opracowany program wczesnego rozpoznawania zaburzeń gospodarki węglowodanowej poprawia wykrywalność hiperglikemii posterydowej i umożliwia wyodrębnienie dodatkowej grupy pacjentów wymagających profilaktyki przeciwegrzybiczej. Program ten może być przydatny nie tylko u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej, ale również może znaleźć zastosowanie u dzieci i dorosłych otrzymujących glikokortykosterydy w terapii innych jednostek chorobowych
4. Transfuzje koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców stanowiąc mogą cenną opcję leczenia wspomagającego u dzieci z IZG. Warunkiem niezbędnym do stosowania procedury jest sprawnie funkcjonujący system współpracy z Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. W celu ostatecznej oceny przydatności tej metody leczenia ko-

nieczne byłoby przeprowadzenie randomizowanych badań klinicznych na dużych grupach pacjentów, jednakże jest to z przyczyn etycznych bardzo trudne

5. Na podstawie analizy przebiegu klinicznego IZG u pacjentów G poddanych procedurom chirurgicznym wykazano, iż stanowią one cenne uzupełnienie diagnostyki i terapii tych zakażeń. Kwalifikacja do interwencji chirurgicznej każdorazowo musi być dokonywana indywidualnie, z uwzględnieniem ryzyka zabiegu i potencjalnych korzyści z niego wynikających. Szersze wykorzystanie inwazyjnych procedur diagnostycznych w wybranych przypadkach klinicznych umożliwia ustalenie czynnika etiologicznego IZG i wdrożenie właściwej terapii przeciwgrzybiczej. Chirurgiczne usunięcie przetrwałych ognisk zakażenia może warunkować kontynuację leczenia choroby podstawowej. U pacjentów z krwiopluciem w przebiegu inwazyjnej aspergilozy płuc, zwłaszcza w okresie rekonstrukcji hematologicznej, zabieg operacyjny musi być wykonywany w trybie pilnym.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abbasi S., Shenep J.L., Hughes W.T., Flynn P.M.: Aspergillosis in children with cancer: A 34-year experience. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29, 1210-1219.
2. Adamski Z, Batura-Gabryel H: *Mikrobiologia lekarska dla lekarzy i studentów*. Poznań, 2007. ISBN 978-83-60187-76-0.
3. Albelda SM, Talbot GH, Gerson SL, Miller WT, Cassileth PA: Pulmonary cavitation and massive hemoptysis in invasive pulmonary aspergillosis. Influence of bone marrow recovery in patients with acute leukemia. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:115-120.
4. Ali R, Ozkalemkas F, Ozcelik T, Ozkocaman V, Ozkan A, Bayram S, Ener B, Ursavas A, Ozal G, Tunalı A: Invasive pulmonary aspergillosis: role of early diagnosis and surgical treatment in patients with acute leukemia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;5:17.
5. Aliff TB, Maslak PG, Jurcic JG, Heaney ML, Cathcart KN, Sepkowitz KA, Weiss MA: Refractory *Aspergillus* pneumonia in patients with acute leukemia: successful therapy with combination caspofungin and liposomal amphotericin. *Cancer* 2003;97:1025-1032.
6. Allinson K, Kolve H, Gumbinger HG, Vormoor HJ, Ehlert K, Groll AH: Secondary antifungal prophylaxis in paediatric allogeneic haematopoietic stem cell recipients. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:734-742.
7. Antachopoulos C, Walsh TJ, Roilides E: Fungal infections in primary immunodeficiencies. *Eur J Pediatr* 2007;166:1099-1117.
8. Ascioglu S, Rex JH, de PB, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ: Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7-14.
9. Azzola A, Passweg JR, Habicht JM, Bubendorf L, Tamm M, Gratwohl A, Eich G: Use of lung resection and voriconazole for successful treatment of invasive pulmonary *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol* 2004;42:4805-4808.
10. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ: Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1974;23:9-15.
11. Baillargeon J, Langevin AM, Mullins J, Ferry RJ, Jr., DeAngulo G, Thomas PJ, Estrada J, Pitney A, Pollock BH: Transient hyperglycemia in Hispanic children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45:960-963.
12. Balcerska A, Irga N, Kosiak W, Mysliwiec M, Szalewska M: Fungal infections in children. *Zakazenia* 2006;3:72-80.
13. Baron O, Guillaume B, Moreau P, Germaud P, Despins P, De Lajartre AY, Michaud JL: Aggressive surgical management in localized pulmonary mycotic and nonmycotic infections for neutropenic patients with acute leukemia: report of eighteen cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:63-68.
14. Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L, Romani L: TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* 2004;173:7406-7415.

15. Bennett CL, Evens AM, Andritsos LA, Balasubramanian L, Mai M, Fisher MJ, Kuzel TM, Angelotta C, McKoy JM, Vose JM, Bierman PJ, Kuter DJ, Trifilio SM, Devine SM, Tallman MS: Haematological malignancies developing in previously healthy individuals who received haematopoietic growth factors: report from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *Br J Haematol* 2006;135:642-650.
16. Bernard A, Caillot D, Couaillier JF, Casasnovas O, Guy H, Favre JP: Surgical management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1441-1447.
17. Bhagavath P, Rastogi P, Menezes RG, Valiathan M, Mohan Kumar TS, Raghavendra Babu YP, Kanchan T, Monteiro FN, Nayak VC: Sudden death due to pulmonary aspergillosis. *J Forensic Leg Med* 2009;16:27-30.
18. Bhatia S, McCullough J, Perry EH, Clay M, Ramsay NK, Neglia JP: Granulocyte transfusions: efficacy in treating fungal infections in neutropenic patients following bone marrow transplantation. *Transfusion* 1994;34:226-232.
19. Bhatti Z, Shaukat A, Almyroudis NG, Segal BH: Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia* 2006;162:1-15.
20. Black CT, Hennessey PJ, Andrassy RJ: Short-term hyperglycemia depresses immunity through nonenzymatic glycosylation of circulating immunoglobulin. *J Trauma* 1990;30:830-832.
21. Blijlevens NM, Donnelly JP, De Pauw BE: Impaired gut function as risk factor for invasive candidiasis in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2002;117:259-264.
22. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, Rodrigues SD, Li S, Hansen JA, Zhao LP, Aderem A, Boeckh M: Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008;359:1766-1777.
23. Boutati EI, Anaissie EJ: Fusarium, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 1997;90:999-1008.
24. Brealey D, Singer M: Hyperglycemia in critical illness: a review. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:1250-1260.
25. Brenner DJ: Estimating cancer risks from pediatric CT: going from the qualitative to the quantitative. *Pediatr Radiol* 2002;32:228-3.
26. Budak A: Inwazyjne zakażenia grzybicze - profilaktyka i leczenie. *Zakazenia* 2004;3:48-52.
27. Bueter M, Thalheimer A, Schuster F, Bock M, von EC, Meyer D, Fein M: Transfusion-related acute lung injury (TRALI)--an important, severe transfusion-related complication. *Langenbecks Arch Surg* 2006;391:489-494.
28. Burgos A, Zaoutis TE, Dvorak CC, Hoffman JA, Knapp KM, Nania JJ, Prasad P, Steinbach WJ: Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics* 2008;121:e1286-e1294.
29. Butrym A, Zywar K, Dzietczenia J, Mazur G: Invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Mikologia Lekarska* 2011;18:47-53.
30. Bux J, Cassens U, Dielschneider T, Duchscherer M, Edel E, Eichler H, Haas C, Moog R, Peschke H, Peters C, Ryzenkov I, Schlenke P, Ullrich H, Wiesneth M: Tolerance of granulocyte donors towards granulocyte colony-stimulating factor

- stimulation and of patients towards granulocyte transfusions: results of a multicentre study. *Vox Sang* 2003;85:322-325.
31. Caillot D, Latrabe V, Thiebaut A, Herbrecht R, De BS, Pigneux A, Monchecourt F, Mahi L, Alfandari S, Couaillier JF: Computer tomography in pulmonary invasive aspergillosis in hematological patients with neutropenia: an useful tool for diagnosis and assessment of outcome in clinical trials. *Eur J Radiol* 2010;74:e172-e175.
 32. Castagnola E, Cesaro S, Giacchino M, Livadiotti S, Tucci F, Zanazzo G, Caselli D, Caviglia I, Parodi S, Rondelli R, Cornelli PE, Mura R, Santoro N, Russo G, De SR, Buffardi S, Viscoli C, Haupt R, Rossi MR: Fungal infections in children with cancer: a prospective, multicenter surveillance study. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:634-639.
 33. Cesaro S, Cecchetto G, De CF, Dodero P, Giacchino M, Caviglia I, Fagioli F, Livadiotti S, Salin F, Caselli D, Castagnola E: Results of a multicenter retrospective study of a combined medical and surgical approach to pulmonary aspergillosis in pediatric neutropenic patients. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:909-913.
 34. Cesaro S, Chinello P, De SG, Marson P, Picco G, Varotto S, Pittalis S, Zanesco L: Granulocyte transfusions from G-CSF-stimulated donors for the treatment of severe infections in neutropenic pediatric patients with onco-hematological diseases. *Support Care Cancer* 2003;11:101-106.
 35. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, Safdar A, Raad II, Kontoyiannis DP: 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;91:986-989.
 36. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N: *Essentials of Clinical Immunology*. New York, Wiley, 2006.
 37. Chiou CC, Walsh TJ, Groll AH: Clinical pharmacology of antifungal agents in pediatric patients. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:2465-2489.
 38. Chong AL, Grant RM, Ahmed BA, Thomas KE, Connolly BL, Greenberg M: Imaging in pediatric patients: time to think again about surveillance. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:407-413.
 39. Confer DL, Miller JP: Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration. *Br J Haematol* 2007;137:77-78.
 40. Cordonnier C, Ribaud P, Herbrecht R, Milpied N, Valteau-Couanet D, Morgan C, Wade A: Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin Infect Dis* 2006;42:955-963.
 41. Cornely OA, Aversa F, Cook P, Jones B, Michallet M, Shea T, Vallejo C: Evaluating the role of prophylaxis in the management of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancy. *Eur J Haematol* 2011;87:289-301.
 42. Cornely OA, Bohme A, Buchheidt D, Einsele H, Heinz WJ, Karthaus M, Krause SW, Kruger W, Maschmeyer G, Penack O, Ritter J, Ruhnke M, Sandherr M, Sieniawski M, Vehreschild JJ, Wolf HH, Ullmann AJ: Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of

- the German Society for Haematology and Oncology. *Haematologica* 2009;94:113-122.
43. Cornely OA, Bohme A, Buchheidt D, Glasmacher A, Kahl C, Karthaus M, Kern W, Kruger W, Maschmeyer G, Ritter J, Salwender HJ, Sandherr M, Schiel X, Schuttrumpf S, Sieniawski M, Silling G, Ullmann AJ, Wolf HH: Prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies and solid tumors--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2003;82 Suppl 2:S186-S200.
 44. Cornely OA, Marty FM, Stucker F, Pappas PG, Ullmann AJ: Efficacy and safety of micafungin for treatment of serious *Candida* infections in patients with or without malignant disease. *Mycoses* 2011;54:e838-e847.
 45. Crassard N, Hadden H, Piens MA, Pondarre C, Hadden R, Galambrun C, Pracros JP, Souillet G, Basset T, Berthier JC, Philippe N, Bertrand Y: Invasive aspergillosis in a paediatric haematology department: a 15-year review. *Mycoses* 2008;51:109-116.
 46. Crassard N, Hadden H, Pondarre C, Hadden R, Galambrun C, Piens MA, Pracros JP, Souillet G, Basset T, Berthier JC, Philippe N, Bertrand Y: Invasive aspergillosis and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a 15-year experience. *Transpl Infect Dis* 2008;10:177-183.
 47. Dabritz J, Attarbaschi A, Tintelnot K, Kollmar N, Kremens B, von Loewenich FD, Schrod L, Schuster F, Wintergerst U, Weig M, Lehnbecher T, Groll AH: Mucormycosis in paediatric patients: demographics, risk factors and outcome of 12 contemporary cases. *Mycoses* 2011;54:e785-e788.
 48. Dale DC, Liles WC: Return of granulocyte transfusions. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:18-22.
 49. Danner BC, Didilis V, Dorge H, Mikroulis D, Bougioukas G, Schondube FA: Surgical treatment of pulmonary aspergillosis/mycosis in immunocompromised patients. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2008;7:771-776.
 50. de MM, de Jongste JC, van WM, Merkus PJ, de Vries AH, Hop WC, Warris A, Janssens HM: Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in children with bronchoalveolar lavage galactomannan. *Pediatr Pulmonol* 2012.
 51. de PB, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Munoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE: 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.
 52. Delisle MS, Williamson DR, Perreault MM, Albert M, Jiang X, Heyland DK: The clinical significance of *Candida* colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients. *J Crit Care* 2008;23:11-17.
 53. Denning DW, Marinus A, Cohen J, Spence D, Herbrecht R, Pagano L, Kibbler C, Kermery V, Offner F, Cordonnier C, Jehn U, Ellis M, Collette L, Sylvester R: An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in

- haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. *J Infect* 1998;37:173-180.
54. Denning DW, Marr KA, Lau WM, Facklam DP, Ratanatharathorn V, Becker C, Ullmann AJ, Seibel NL, Flynn PM, van Burik JA, Buell DN, Patterson TF: Micafungin (FK463), alone or in combination with other systemic antifungal agents, for the treatment of acute invasive aspergillosis. *J Infect* 2006;53:337-349.
 55. Diamond RD, Clark RA: Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils in vitro. *Infect Immun* 1982;38:487-495.
 56. Dignani MC, Anaissie EJ, Hester JP, O'Brien S, Vartivarian SE, Rex JH, Kantarjian H, Jendiroba DB, Lichtiger B, Andersson BS, Freireich EJ: Treatment of neutropenia-related fungal infections with granulocyte colony-stimulating factor-elicited white blood cell transfusions: a pilot study. *Leukemia* 1997;11:1621-1630.
 57. Drewniak A, Kuijpers TW: Granulocyte transfusion therapy: randomization after all? *Haematologica* 2009;94:1644-1648.
 58. Dvorak CC, Fisher BT, Sung L, Steinbach WJ, Nieder M, Alexander S, Zaoutis TE: Antifungal prophylaxis in pediatric hematology/oncology: new choices & new data. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:21-26.
 59. Dzierzanowska D: Zakażenia grzybicze - wybrane zagadnienia. Bielsko-Biała, alfamedica press, 2006. ISBN 83-88778-99-4.
 60. Dzierzanowska D: Prophylaxis, preemptive and empiric therapy invasive fungal infections. *Zakazenia* 2008;2:1-7.
 61. el-Mahallawy HA, Attia I, Ali-el-Din NH, Salem AE, Abo-el-Naga S: A prospective study on fungal infection in children with cancer. *J Med Microbiol* 2002;51:601-605.
 62. Endo S, Otani S, Tezuka Y, Tetsuka K, Tsubochi H, Hasegawa T, Sato Y, Sohara Y: Predictors of postoperative complications after radical resection for pulmonary aspergillosis. *Surg Today* 2006;36:499-503.
 63. Freireich EJ, Levin RH, Whang J, Carbone PP, Bronson W, Morse EE: The function and fate of transfused leukocytes from donors with chronic myelocytic leukemia in leukopenic recipients. *Ann NY Acad Sci* 1964;26:1081-1089.
 64. Frush DP, Donnelly LF, Rosen NS: Computed tomography and radiation risks: what pediatric health care providers should know. *Pediatrics* 2003;112:951-957.
 65. Fuji S, Kim SW, Mori S, Fukuda T, Kamiya S, Yamasaki S, Morita-Hoshi Y, Ohara-Waki F, Honda O, Kuwahara S, Tanosaki R, Heike Y, Tobinai K, Takaue Y: Hyperglycemia during the neutropenic period is associated with a poor outcome in patients undergoing myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2007;84:814-820.
 66. Fuji S, Kim SW, Mori S, Kamiya S, Yoshimura K, Yokoyama H, Kurosawa S, Saito B, Takahashi T, Kuwahara S, Heike Y, Tanosaki R, Takaue Y, Fukuda T: Intensive glucose control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective matched-cohort study. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:105-111.
 67. Geerlings SE, Hoepelman AI: Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26:259-265.

68. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA: Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984;100:345-351.
69. Giacchino M, Milano GM, Carraro F, Bezzio S, Pegoraro A, Aversa F, Cesaro S: Current evidence of antifungal prophylaxis and therapy in pediatric patients. *Pediatr Rep* 2011;3:e6.
70. Girmenia C, Micozzi A, Gentile G, Santilli S, Arleo E, Cardarelli L, Capria S, Minotti C, Cartoni C, Brocchieri S, Guerrisi V, Meloni G, Foa R, Martino P: Clinically driven diagnostic antifungal approach in neutropenic patients: a prospective feasibility study. *J Clin Oncol* 2010;28:667-674.
71. Gompelmann D, Heussel CP, Schuhmann M, Herth FJ: The role of diagnostic imaging in the management of invasive fungal diseases--report from an interactive workshop. *Mycoses* 2011;54 Suppl 1:27-31.
72. Gorelik O, Cohen N, Shpirer I, Almozni-Sarafian D, Alon I, Koopfer M, Yona R, Modai D: Fatal haemoptysis induced by invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukaemia during bone marrow and clinical remission: report of two cases and review of the literature. *J Infect* 2000;41:277-282.
73. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, Wingard JR, Herbrecht R, Ribaud P, Patterson TF, Troke PF, Denning DW, Bennett JE, De Pauw BE, Rubin RH: Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis* 2007;44:373-379.
74. Grigull L, Beier R, Schrauder A, Kirschner P, Loening L, Jack T, Welte K, Sykora KW, Schrappe M: Invasive fungal infections are responsible for one-fifth of the infectious deaths in children with ALL. *Mycoses* 2003;46:441-446.
75. Grigull L, Beilken A, Schmid H, Kirschner P, Sykora KW, Linderkamp C, Donnerstag F, Goudeva L, Heuft HG, Welte K: Secondary prophylaxis of invasive fungal infections with combination antifungal therapy and G-CSF-mobilized granulocyte transfusions in three children with hematological malignancies. *Support Care Cancer* 2006;14:783-786.
76. Gurion R, Belnik-Plitman Y, Gaftor-Gvili A, Paul M, Vidal L, Ben-Bassat I, Shpilberg O, Raanani P: Colony-stimulating factors for prevention and treatment of infectious complications in patients with acute myelogenous leukemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;6:CD008238.
77. Hachem R, Sumoza D, Hanna H, Girgawy E, Munsell M, Raad I: Clinical and radiologic predictors of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients: should the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) criteria be revised? *Cancer* 2006;106:1581-1586.
78. Hale KA, Shaw PJ, Dalla-Pozza L, MacIntyre CR, Isaacs D, Sorrell TC: Epidemiology of paediatric invasive fungal infections and a case-control study of risk factors in acute leukaemia or post stem cell transplant. *Br J Haematol* 2010;149:263-272.
79. Hatziaorou E, Walsh TJ, Tsanakas JN, Roilides E: Aspergillus and the paediatric lung. *Paediatr Respir Rev* 2009;10:178-185.

80. Hauggaard A, Ellis M, Ekelund L: Early chest radiography and CT in the diagnosis, management and outcome of invasive pulmonary aspergillosis. *Acta Radiol* 2002;43:292-298.
81. Halaburda K: Diagnosis and treatment of invasive fungal infections. Analysis based on experts panel standpoint published in *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011. *Zakazenia* 2011;3:3-14.
82. Herbrecht R, Auvrignon A, Andres E, Guillemain R, Suc A, Eyer D, Paillet C, Letscher-Bru V, Leverger G, Schaison G: Efficacy of amphotericin B lipid complex in the treatment of invasive fungal infections in immunosuppressed paediatric patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:77-82.
83. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, Villard O, Liu KL, Natarajan-Ame S, Lutz P, Dufour P, Bergerat JP, Candolfi E: Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002;20:1898-1906.
84. Herbrecht R, Maertens J, Baila L, Aoun M, Heinz W, Martino R, Schwartz S, Ullmann AJ, Meert L, Paesmans M, Marchetti O, Akan H, Ameye L, Shivaprakash M, Viscoli C: Caspofungin first-line therapy for invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients: an European Organisation for Research and Treatment of Cancer study. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:1227-1233.
85. Heussel CP, Kauczor HU, Heussel GE, Fischer B, Begrich M, Mildenerberger P, Thelen M: Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem-cell transplant recipients: use of high-resolution computed tomography. *J Clin Oncol* 1999;17:796-805.
86. Hicheri Y, Toma A, Maury S, Pautas C, Mallek-Kaci H, Cordonnier C: Updated guidelines for managing fungal diseases in hematology patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:1049-1060.
87. Hoffer FA, Gow K, Flynn PM, Davidoff A: Accuracy of percutaneous lung biopsy for invasive pulmonary aspergillosis. *Pediatr Radiol* 2001;31:144-152.
88. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA, Rolston KV, Shenep JL, Young LS: 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002;34:730-751.
89. Illerhaus G, Wirth K, Dwenger A, Waller CF, Garbe A, Brass V, Lang H, Lange W: Treatment and prophylaxis of severe infections in neutropenic patients by granulocyte transfusions. *Ann Hematol* 2002;81:273-281.
90. Imhof A, Balajee SA, Fredricks DN, Englund JA, Marr KA: Breakthrough fungal infections in stem cell transplant recipients receiving voriconazole. *Clin Infect Dis* 2004;39:743-746.
91. Irga N, Grabiec-Wisniewska A, Kosiak W, Balanda A, Balcerska A: Mucor sp. invasive infection in children treated for acute leukemia. Diagnostic and therapeutic problem. *Onkologia Info* 2008;5:188-193.
92. Irga N, Kosiak W, Jaworski R, Komarnicka J, Birkholz D: Hyperthyroidism secondary to disseminated mucormycosis in a child with acute lymphoblastic leukemia: case report and a review of published reports. *Mycopathologia* 2013;175:123-127.

-
93. Irga N, Mysliwiec M, Osak M, Szmigiero-Kawko M, Adamkiewicz-Drozynska E, Jaworski R: Transient hyperglycaemia - an underestimated problem of paediatric oncohaematology. *Arch Med Sci* 2012;8:672-677.
 94. Irga N, Rzyman W, Niedzwiecki M, Kosiak W, Tomaszewski M, Adamkiewicz-Drozynska E: Lethal pulmonary hemorrhage in aspergillosis in 14 years old patient with acute myeloblastic leukaemia. *Mikologia Lekarska* 2009;16:115-117.
 95. Irga N, Szalewska M, Wisniewski J, Balcerska A: Combination treatment of invasive fungal infections in patients with hemato-oncologic diseases. *Zakazenia* 2010;6:2-5.
 96. Jain KK, Mittal SK, Kumar S, Gupta RK: Imaging features of central nervous system fungal infections. *Neurol India* 2007;55:241-250.
 97. Jakubowski W: Standardy badań ultrasonograficznych. Warszawa-Zamość, 2011.
 98. Janes SM, Barker KF, Mak V, Bell D: Invasive pulmonary aspergillosis in an insulin-dependent diabetic. *Respir Med* 1998;92:972-975.
 99. Jankowska-Konsur A, Pres K, Baran E: Fungal rhinosinusitis. *Mikologia Lekarska* 2005;12:133-136.
 100. Jarque I, Tormo M, Bello JL, Rovira M, Batlle M, Julia A, Tabares S, Rivas C, Fernandez-Sevilla A, Garcia-Boyero R, Deben G, Gonzalez-Campos J, Capote FJ, Sanz MA: Caspofungin for the treatment of invasive fungal disease in hematological patients (ProCAS Study). *Med Mycol* 2013;51:150-154.
 101. Jassem E, Jassem J: Pulmonary beedings. *Polska Medycyna Paliatywna* 2003;2:23-30.
 102. Jha AK, Bansal D, Chakrabarti A, Shivaprakash MR, Trehan A, Marwaha RK: Serum galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis in children with haematological malignancies. *Mycoses* 2013.
 103. Jorgensen KJ, Gotzsche PC, Johansen HK: Voriconazole versus amphotericin B in cancer patients with neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;CD004707.
 104. Kalwak K: What's new in the diagnostics and treatment of invasiv fungal infections in hematooncologic patients? *Zakazenia* 2010;2:55-59.
 105. Kami M, Machida U, Okuzumi K, Matsumura T, Mori SS, Hori A, Kashima T, Kanda Y, Takaue Y, Sakamaki H, Hirai H, Yoneyama A, Mutou Y: Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy. *Br J Haematol* 2002;117:40-46.
 106. Kaya Z, Gursel T, Kocak U, Aral YZ, Kalkanci A, Albayrak M: Invasive fungal infections in pediatric leukemia patients receiving fluconazole prophylaxis. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52:470-475.
 107. Kerr JP, Liakopolou E, Brown J, Cornish JM, Fleming D, Massey E, Oakhill A, Pamphilon DH, Robinson SP, Totem A, Valencia AM, Marks DI: The use of stimulated granulocyte transfusions to prevent recurrence of past severe infections after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2003;123:114-118.
 108. Klastersky J: Antifungal therapy in patients with fever and neutropenia--more rational and less empirical? *N Engl J Med* 2004;351:1445-1447.

109. Klaudel-Dreszler M, Heropolitanska-Pliszka E, Pietrucha B, Bernatowska E: Fungal infection - disease suggesting primary immunodeficiency. *Mikologia Lekarska* 2009;16:85-89.
110. Kobayashi R, Kaneda M, Sato T, Ichikawa M, Suzuki D, Ariga T: The clinical feature of invasive fungal infection in pediatric patients with hematologic and malignant diseases: a 10-year analysis at a single institution at Japan. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:886-890.
111. Kontoyiannis DP, Luna MA, Samuels BI, Bodey GP: Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:721-739.
112. Korsak J: [Clinical application of granulocyte concentrates in neutropenia caused by immunosuppressive treatment]. *Pol Merkur Lekarski* 2008;24:346-350.
113. Kosiak W: Progress in lung ultrasound in the end of 2009. *Ultrasonografia* 2009;39:57-61.
114. Kotani T, Takeuchi T, Makino S, Hata K, Yoshida S, Nagai K, Wakura D, Isoda K, Hanafusa T: Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for deep mycosis in patients with connective tissue disease. *J Infect Chemother* 2013.
115. Kowalczyk RK: *Onkohematologia dziecięca - co nowego?* Wrocław, Cornetis Sp.z o.o., 2009. ISBN 978-83-61-415-03-9.
116. Krinsley JS: Association between hyperglycemia and increased hospital mortality in a heterogeneous population of critically ill patients. *Mayo Clin Proc* 2003;78:1471-1478.
117. Krishna G, Sansone-Parsons A, Martinho M, Kantesaria B, Pedicone L: Posaconazole plasma concentrations in juvenile patients with invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:812-818.
118. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA: Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 2003;38:143-158.
119. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, Bitar D, Dromer F, Lortholary O: A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis* 2012;54 Suppl 1:S35-S43.
120. Lass-Flörl C, Resch G, Nachbaur D, Mayr A, Gastl G, Auberger J, Bialek R, Freund MC: The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2007;45:e101-e104.
121. Lawkowicz W, Krzemińska-Ławkowiczowa I: *Hematologia wieku dziecięcego*. Warszawa, PZWL, 1969.
122. Lee FY, Mossad SB, Adal KA: Pulmonary mucormycosis: the last 30 years. *Arch Intern Med* 1999;159:1301-1309.
123. Lehnbecher T, Bochennek K, Schrey D, Groll AH: Antifungal Therapy in Pediatric Patients. *Curr Fungal Infect Rep* 2011;5:103-110.
124. Letowska M: *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*. Warszawa, 2011. ISBN 978-83-7760-043-6.
125. Lichtenstein DA: Ultrasound examination of the lungs in the intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2009;10:693-698.

-
126. Lin PC, Chang TT, Jang RC, Chiou SS: Hepatosplenic microabscesses in pediatric leukemia: a report of five cases. *Kaohsiung J Med Sci* 2003;19:368-374.
 127. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM: Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001;32:358-366.
 128. Lowas S, Malempati S, Marks D: Body mass index predicts insulin resistance in survivors of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:58-63.
 129. Lowas SR, Marks D, Malempati S: Prevalence of transient hyperglycemia during induction chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52:814-818.
 130. Lund B, Asberg A, Heyman M, Kanerva J, Harila-Saari A, Hasle H, Soderhall S, Jonsson OG, Lydersen S, Schmiegelow K: Risk factors for treatment related mortality in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:551-559.
 131. Maertens J, Glasmacher A, Herbrecht R, Thiebaut A, Cordonnier C, Segal BH, Killar J, Taylor A, Kartsonis N, Patterson TF, Aoun M, Caillot D, Sable C: Multicenter, noncomparative study of caspofungin in combination with other antifungals as salvage therapy in adults with invasive aspergillosis. *Cancer* 2006;107:2888-2897.
 132. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Fluckiger U, Frere P, Gachot B, Heinz WJ, Lass-Flörl C, Ribaud P, Thiebaut A, Cordonnier C: European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:709-718.
 133. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, Wilmer A, Verhaegen J, Boogaerts M, Van EJ: Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005;41:1242-1250.
 134. Maertens JA: History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 2004;10 Suppl 1:1-10.
 135. Maertens JA, Madero L, Reilly AF, Lehrnbecher T, Groll AH, Jafri HS, Green M, Nania JJ, Bourque MR, Wise BA, Strohmaier KM, Taylor AF, Kartsonis NA, Chow JW, Arndt CA, DePauw BE, Walsh TJ: A randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus liposomal amphotericin B for empiric antifungal therapy in pediatric patients with persistent fever and neutropenia. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:415-420.
 136. Maertens JA, Frere P, Lass-Flörl C, Heinz W, Cornely OA: Primary antifungal prophylaxis in leukaemia patients. *EJC Supplements* 2007;5:43-48.
 137. Malani AN, Kauffman CA: Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* 2007;67:1803-1812.
 138. Maloney E, Ociepa T, Sagan L, Urasinski T: Disseminated CNS aspergillosis in a 13-year-old girl with aplastic anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Mikologia Lekarska* 2009;16:99-103.
 139. Mandhaniya S, Swaroop C, Thulkar S, Vishnubhatla S, Kabra SK, Xess I, Bakhshi S: Oral voriconazole versus intravenous low dose amphotericin B for primary antifungal prophylaxis in pediatric acute leukemia induction: a

- prospective, randomized, clinical study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33:e333-e341.
140. Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L: Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2004;39:797-802.
 141. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L: Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:909-917.
 142. Marr KA, Seidel K, Slavin MA, Bowden RA, Schoch HG, Flowers ME, Corey L, Boeckh M: Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood* 2000;96:2055-2061.
 143. Maschmeyer G, Haas A: Voriconazole: a broad spectrum triazole for the treatment of serious and invasive fungal infections. *Future Microbiol* 2006;1:365-385.
 144. Mathur M, Johnson CE, Sze G: Fungal infections of the central nervous system. *Neuroimaging Clin N Am* 2012;22:609-632.
 145. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP: Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009;9:89-96.
 146. Mezger M, Einsele H, Loeffler J: Genetic susceptibility to infections with *Aspergillus fumigatus*. *Crit Rev Microbiol* 2010;36:168-177.
 147. Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ: Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* 2009;69:361-392.
 148. Molina JR, Serrano J, Sanchez-Garcia J, Rodriguez-Villa A, Gomez P, Tallon D, Martin V, Rodriguez G, Rojas R, Martin C, Martinez F, Alvarez MA, Torres A: Voriconazole as primary antifungal prophylaxis in children undergoing allo-SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:562-567.
 149. Mor M, Gilad G, Kornreich L, Fisher S, Yaniv I, Levy I: Invasive fungal infections in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:1092-1097.
 150. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyannis DP, Walsh TJ, Fridkin SK, Pappas PG, Warnock DW: Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol* 2005;43 Suppl 1:S49-S58.
 151. Mousset S, Hermann S, Klein SA, Bialleck H, Duchscherer M, Bomke B, Wassmann B, Bohme A, Hoelzer D, Martin H: Prophylactic and interventional granulocyte transfusions in patients with haematological malignancies and life-threatening infections during neutropenia. *Ann Hematol* 2005;84:734-741.
 152. Mowat A, Baum J: Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971;284:621-627.
 153. Muller FM, Trusen A, Weig M: Clinical manifestations and diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised children. *Eur J Pediatr* 2002;161:563-574.
 154. Naghibi M, Smith RP, Baltch AL, Gates SA, Wu DH, Hammer MC, Michelsen PB: The effect of diabetes mellitus on chemotactic and bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes Res Clin Pract* 1987;4:27-35.

155. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Pfaller M, Chang C, Webster K, Marr K: 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;48:265-273.
156. Nosari A, Ravini M, Cairoli R, Cozzi P, Marbello L, Marengo P, Grillo G, Morra E: Surgical resection of persistent pulmonary fungus nodules and secondary prophylaxis are effective in preventing fungal relapse in patients receiving chemotherapy or bone marrow transplantation for leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:631-635.
157. Nucci M, Nouer SA, Graziutti M, Kumar NS, Barlogie B, Anaissie E: Probable invasive aspergillosis without prespecified radiologic findings: proposal for inclusion of a new category of aspergillosis and implications for studying novel therapies. *Clin Infect Dis* 2010;51:1273-1280.
158. Ofra Y, Avivi I, Oliven A, Oren I, Zuckerman T, Bonstein L, Rowe JM, Dann EJ: Granulocyte transfusions for neutropenic patients with life-threatening infections: a single centre experience in 47 patients, who received 348 granulocyte transfusions. *Vox Sang* 2007;93:363-369.
159. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra ME, Melillo L, Aversa F, Van Lint MT, Falcucci P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A: The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006;91:1068-1075.
160. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Martino B, Specchia G, Pastore D, Stanzani M, Cattaneo C, Fanci R, Caramatti C, Rossini F, Luppi M, Potenza L, Ferrara F, Mitra ME, Fadda RM, Invernizzi R, Aloisi T, Picardi M, Bonini A, Vacca A, Chierichini A, Melillo L, de WC, Fianchi L, Riva M, Leone G, Aversa F, Nosari A: Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. *Haematologica* 2010;95:644-650.
161. Pagano L, Caira M, Valentini CG, Posteraro B, Fianchi L: Current therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients. *Blood Rev* 2010;24:51-61.
162. Pagano L, Offidani M, Fianchi L, Nosari A, Candoni A, Piccardi M, Corvatta L, D'Antonio D, Girmenia C, Martino P, Del FA: Mucormycosis in hematologic patients. *Haematologica* 2004;89:207-214.
163. Pagano L, Ricci P, Nosari A, Tonso A, Buelli M, Montillo M, Cudillo L, Cenacchi A, Savignana C, Melillo L: Fatal haemoptysis in pulmonary filamentous mycosis: an underevaluated cause of death in patients with acute leukaemia in haematological complete remission. A retrospective study and review of the literature. *Gimema Infection Program (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto)*. *Br J Haematol* 1995;89:500-505.
164. Pakyz AL, Gurgle HE, Oinonen MJ: Antifungal use in hospitalized adults in U.S. academic health centers. *Am J Health Syst Pharm* 2011;68:415-418.
165. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr., Calandra TF, Edwards JE, Jr., Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD: Clinical practice guidelines for the management of

- candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:503-535.
166. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N: Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006;42:1417-1427.
 167. Pidhorecky I, Urschel J, Anderson T: Resection of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann Surg Oncol* 2000;7:312-317.
 168. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, Grillot R: Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:2184-2186.
 169. Pizzo PA, Robichaud KJ, Gill F.A., Witebsky FG: Empiric antibiotic and antifungal therapy for cancer patients with prolonged fever and granulocytopenia. *Am J Med* 1982;72:101-111.
 170. Potenza L, Barozzi P, Vallerini D, Bosco R, Quadrelli C, Mediani L, Morselli M, Forghieri F, Volzone F, Codeluppi M, Rossi G, Tazzioli G, Venturelli C, Torelli G, Luppi M: Diagnosis of invasive aspergillosis by tracking *Aspergillus*-specific T cells in hematologic patients with pulmonary infiltrates. *Leukemia* 2007;21:578-581.
 171. Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG: Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2000;110:273-284.
 172. Price TH, Bowden RA, Boeckh M, Bux J, Nelson K, Liles WC, Dale DC: Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2000;95:3302-3309.
 173. Pui CH, Burghen GA, Bowman WP, Aur RJ: Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. *J Pediatr* 1981;99:46-50.
 174. Quillen K, Wong E, Scheinberg P, Young NS, Walsh TJ, Wu CO, Leitman SF: Granulocyte transfusions in severe aplastic anemia: an eleven-year experience. *Haematologica* 2009;94:1661-1668.
 175. Raj R, Kamath SR, Ranjit S, Shankar N, Lakshmanan V: Granulocyte transfusion in children. *Indian Pediatr* 2009;46:516-518.
 176. Rammaert B, Desjardins A, Lortholary O: New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses* 2012;55:e74-e84.
 177. Rankin NE: Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with agranulocytosis and antibiotic therapy. *Br Med J* 1953;25:918-919.
 178. Rassias AJ, Marrin CA, Arruda J, Whalen PK, Beach M, Yeager MP: Insulin infusion improves neutrophil function in diabetic cardiac surgery patients. *Anesth Analg* 1999;88:1011-1016.
 179. Reissig A, Kroegel C: Sonographic diagnosis and follow-up of pneumonia: a prospective study. *Respiration* 2007;74:537-547.
 180. Roberson JR, Spraker HL, Shelso J, Zhou Y, Inaba H, Metzger ML, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Sandlund JT, Jeha S, Pui CH, Howard SC: Clinical consequences of hyperglycemia during remission induction therapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009;23:245-250.

181. Robinson SP, Marks DI: Granulocyte transfusions in the G-CSF era. Where do we stand? *Bone Marrow Transplant* 2004;34:839-846.
182. Romani L: Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004;4:1-23.
183. Rosen GP, Nielsen K, Glenn S, Abelson J, Deville J, Moore TB: Invasive fungal infections in pediatric oncology patients: 11-year experience at a single institution. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;27:135-140.
184. Rubio PM, Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Lassaletta A, Cuenca-Estrella M, Diaz MA, Riesco S, Madero L: Increasing incidence of invasive aspergillosis in pediatric hematology oncology patients over the last decade: a retrospective single centre study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31:642-646.
185. Rubnitz JE, Lensing S, Zhou Y, Sandlund JT, Razzouk BI, Ribeiro RC, Pui CH: Death during induction therapy and first remission of acute leukemia in childhood: the St. Jude experience. *Cancer* 2004;101:1677-1684.
186. Rutella S, Pierelli L, Sica S, Serafini R, Chiusolo P, Paladini U, Leone F, Zini G, D'Onofrio G, Leone G, Piccirillo N: Efficacy of granulocyte transfusions for neutropenia-related infections: retrospective analysis of predictive factors. *Cytotherapy* 2003;5:19-30.
187. Safdar A, Rodriguez GH, De Lima MJ, Petropoulos D, Chemaly RF, Worth LL, Shpall EJ, Rolston KV, Raad II, Chan KW, Champlin RE: Infections in 100 cord blood transplantations: spectrum of early and late posttransplant infections in adult and pediatric patients 1996-2005. *Medicine (Baltimore)* 2007;86:324-333.
188. Sakr Y, Sponholz C, Tuche F, Brunkhorst F, Reinhart K: The role of procalcitonin in febrile neutropenic patients: review of the literature. *Infection* 2008;36:396-407.
189. Segal BH: Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation. *Oncologist* 2007;12 Suppl 2:7-13.
190. Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, Ostrosky-Zeichner L, Sobel J, Viscoli C, Walsh TJ, Maertens J, Patterson TF, Perfect JR, Dupont B, Wingard JR, Calandra T, Kauffman CA, Graybill JR, Baden LR, Pappas PG, Bennett JE, Kontoyannis DP, Cordonnier C, Viviani MA, Bille J, Almyroudis NG, Wheat LJ, Graninger W, Bow EJ, Holland SM, Kullberg BJ, Dismukes WE, De Pauw BE: Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 2008;47:674-683.
191. Seidel MG, Minkov M, Witt V, Matthes-Martin S, Potschger U, Worel N, Leitner G, Sary J, Gadner H, Peters C: Granulocyte transfusions in children and young adults: does the dose matter? *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31:166-172.
192. Seidel MG, Peters C, Wacker A, Northoff H, Moog R, Boehme A, Silling G, Grimminger W, Einsele H: Randomized phase III study of granulocyte transfusions in neutropenic patients. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:679-684.
193. Shindo M, Sato K, Jimbo J, Hosoki T, Ikuta K, Sano A, Nishimura K, Torimoto Y, Kohgo Y: [Breakthrough pulmonary mucormycosis during voriconazole treatment after reduced-intensity cord blood transplantation for a patient with acute myeloid leukemia]. *Rinsho Ketsueki* 2007;48:412-417.

194. Shoham S, Levitz SM: The immune response to fungal infections. *Br J Haematol* 2005;129:569-582.
195. Sieniawski M, Bohlius J, Cornely OA: Importance of primary antifungal prophylaxis for hematological patients. *Nowotwory* 2004;3:281-289.
196. Singh N, Paterson DL: Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:44-69.
197. Skiada A, Lanternier F, Groll AH, Pagano L, Zimmerli S, Herbrecht R, Lortholary O, Petrikos GL: Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica* 2013;98:492-504.
198. Slats AM, Egeler RM, van der Does-van den Berg, Korbijn C, Hahlen K, Kamps WA, Veerman AJ, Zwaan CM: Causes of death--other than progressive leukemia--in childhood acute lymphoblastic (ALL) and myeloid leukemia (AML): the Dutch Childhood Oncology Group experience. *Leukemia* 2005;19:537-544.
199. Sonabend RY, McKay SV, Okcu MF, Yan J, Haymond MW, Margolin JF: Hyperglycemia during induction therapy is associated with increased infectious complications in childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51:387-392.
200. Sonabend RY, McKay SV, Okcu MF, Yan J, Haymond MW, Margolin JF: Hyperglycemia during induction therapy is associated with poorer survival in children with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr* 2009;155:73-78.
201. Stam WB, O'Sullivan AK, Rijnders B, Lugtenburg E, Span LF, Janssen JJ, Jansen JP: Economic evaluation of posaconazole vs. standard azole prophylaxis in high risk neutropenic patients in the Netherlands. *Eur J Haematol* 2008;81:467-474.
202. Stefaniak J: Invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancy: etiology, risk factors, diagnosis and treatment. *Zakazenia* 2008;3.
203. Stefaniak MJ: Invasive pulmonary fungal infections, other than aspergillosis, in patients with hematologic malignancy: increasing clinical problem. *Zakazenia* 2009;2:46-51.
204. Stegenga ME, van der Crabben SN, Dessing MC, Pater JM, van den Pangaart PS, de Vos AF, Tanck MW, Roos D, Sauerwein HP, van der Poll T: Effect of acute hyperglycaemia and/or hyperinsulinaemia on proinflammatory gene expression, cytokine production and neutrophil function in humans. *Diabet Med* 2008;25:157-164.
205. Stergiopoulou T, Meletiadiis J, Roilides E, Kleiner DE, Schaufele R, Roden M, Harrington S, Dad L, Segal B, Walsh TJ: Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 2007;127:349-355.
206. Styczynski J: Diagnostics and treatment of fungal diseases in children: ECIL4 pediatric group recommendations. *Zakazenia* 2012;2:3-11.
207. Styczynski J, Gil L: Invasive aspergillosis in children after haematopoietic stem cell transplantation. *Wsp Onkol* 2010;14:44-53.
208. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP: A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995;33:497-500.

-
209. Subira M, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Serrano D, De La Camara R: Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol* 2003;82:80-82.
 210. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F: Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 2001;91:311-318.
 211. Tedder M, Spratt JA, Anstadt MP, Hegde SS, Tedder SD, Lowe JE: Pulmonary mucormycosis: results of medical and surgical therapy. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1044-1050.
 212. Thomas KE, Owens CM, Veys PA, Novelli V, Costoli V: The radiological spectrum of invasive aspergillosis in children: a 10-year review. *Pediatr Radiol* 2003;33:453-460.
 213. Turina M, Fry DE, Polk HC, Jr.: Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects. *Crit Care Med* 2005;33:1624-1633.
 214. Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van WE, Bobbaers H, Bouillon R: Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 2006;354:449-461.
 215. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R: Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med* 2001;345:1359-1367.
 216. Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, Weekers F, Verwaest C, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P: Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003;31:359-366.
 217. Verdeguer A, Fernandez JM, Esquembre C, Ferris J, Ruiz JG, Castel V: Hepatosplenic candidiasis in children with acute leukemia. *Cancer* 1990;65:874-877.
 218. Vrielink H, Meijer B, van't Ende E, Ball LM, Brand A, Zwaginga JJ: Granulocyte transfusions for pediatric patients and the establishment of national treatment guidelines and donor registry. *Transfus Apher Sci* 2009;41:73-76.
 219. Wajs J: Granulocyte concentrates transfusions - renaissance of underestimated method of therapy? *Acta Haematologica Polonica* 2001;32:385-392.
 220. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF: Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46:327-360.
 221. Walsh TJ, Lutsar I, Driscoll T, Dupont B, Roden M, Ghahramani P, Hodges M, Groll AH, Perfect JR: Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:240-248.
 222. Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, Chandrasekar P, Donowitz GR, Graybill R, Greene RE, Hachem R, Hadley S, Herbrecht R, Langston A, Louie A, Ribaud P, Segal BH, Stevens DA, van Burik JA, White CS, Corcoran G, Gogate J, Krishna G, Pedicone L, Hardalo C, Perfect JR: Treatment of invasive

- aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis* 2007;44:2-12.
223. Wang JL, Chang CH, Young-Xu Y, Chan KA: Systematic review and meta-analysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and definitive therapy for invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2409-2419.
224. Weiser MA, Cabanillas ME, Konopleva M, Thomas DA, Pierce SA, Escalante CP, Kantarjian HM, O'Brien SM: Relation between the duration of remission and hyperglycemia during induction chemotherapy for acute lymphocytic leukemia with a hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone/methotrexate-cytarabine regimen. *Cancer* 2004;100:1179-1185.
225. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
226. Wheat LJ, Walsh TJ: Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:245-251.
227. White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, Gomez BL, Carr MJ, Kimmitt PT, Seaton S, Rajakumar K, Holyoake T, Kibbler CC, Johnson E, Hobson RP, Jones B, Barnes RA: A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn* 2006;8:376-384.
228. Wierzbicka M: Systemic mycoses - present threats. *Nowa Medycyna - Pulmonologia* 2000;4:10-13.
229. Wierzbowska A, Pluta A: Prophylaxis and treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients according to ECIL-3 recommendations. *Hematologia* 2011;2:140-148.
230. Wilke M: Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin and its impact on use and costs: review of the literature. *Eur J Med Res* 2011;16:180-186.
231. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R: Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991;325:1274-1277.
232. Wolska-Kuśnierz B, Kurenko-Deptuch M, Bernatowska E: Trudności w rozpoznawaniu i leczeniu powikłań infekcyjnych u chorych z pierwotnymi niedoborami odporności. *Przegl Epidemiol* 2008;62:123-131.
233. Wright JA, Bradfield SM, Park JR, Hawkins DS: Prolonged survival after invasive aspergillosis: a single-institution review of 11 cases. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:286-291.
234. Zupanska B: Transfusion-related acute lung injury (TRALI) - dangerous and underdiagnosed post-transfusion syndrome. *Acta Haematologica Polonica* 2001;32:359-365.

8. STRESZCZENIE

W ostatnich kilkudziesięciu latach dokonał się przełom w leczeniu dzieci ze schorzeniami onkohematologicznymi. Pomimo znacznego postępu w leczeniu zakażeń wiążących terapię przeciwnowotworową, schorzenia infekcyjne nadal dominują wśród przyczyn zgonów w grupie dzieci z ostrymi białaczkami. Wśród powikłań infekcyjnych, inwazyjne zakażenia grzybicze stanowią najczęstszą przyczynę zgonów u pacjentów leczonych z powodu schorzeń nowotworowych układu krwiotwórczego oraz poddawanych przeszczepom komórek krwiotwórczych. Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w ostatnich latach znacząco wzrosła, a śmiertelność, pomimo stosowania coraz doskonalszych metod diagnostyki i terapii, nadal pozostaje wysoka. Inwazyjne zakażenia grzybicze (IZG), określane także jako inwazyjna choroba grzybicza stanowią narastający problem także w onkohematologii dziecięcej.

Podstawowym celem rozprawy była optymalizacja wybranych procedur w zakresie wczesnej diagnostyki i leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej, a w konsekwencji poprawa wyników leczenia dzieci z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi.

Cel pracy realizowano w pierwszej części opracowania poprzez szczegółową analizę inwazyjnych zakażeń grzybiczych, które wystąpiły podczas leczenia dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego i ciężką anemią aplastyczną w gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej z uwzględnieniem kryteriów rozpoznania i uzyskanych efektów terapeutycznych. W drugiej części analizy przedstawiono wybrane cztery aspekty diagnostyki i terapii inwazyjnych zakażeń grzybiczych mogące przyczynić się do poprawy uzyskiwanych efektów leczenia przeciugrzybiczego.

Poszukując skutecznych i bezpiecznych metod diagnostyki zakażeń grzybiczych oceniono przydatność przekłatkowego badania ultrasonograficznego płuc we wczesnej diagnostyce inwazyjnych zakażeń płuc u dzieci oraz podjęto próbę walidacji metody. Oceniono także wpływ hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG u dzieci oraz dodatkowo podjęto próbę poprawy wykrywalności hiperglikemii posterydowej w analizowanej grupie dzieci przy pomocy opracowanego programu wczesnego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej. W poszukiwaniu bardziej efektywnych metod leczenia wspomagającego, podjęto próbę oceny przydatności transfuzji koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców oraz oceniono rolę procedur chirurgicznych w diagnostyce i leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci.

Materiał kliniczny w niniejszym opracowaniu stanowiła grupa 245 dzieci obojga płci w wieku od 39 dni do 18 lat leczonych w Katedrze i Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Anna Balcerska) w okresie od 1 stycznia 2003 roku do 31 grudnia 2011 roku z powodu schorzeń rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej. Rozpoznanie inwazyjnego zakażenia grzybiczego stawiano w oparciu o zmodyfikowane kryteria European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) z roku 2008 (pierwotna wersja – 2002 rok). Wyróżniono trzy typy rozpoznania: udokumentowane (*proven*), prawdopodobne (*probably*) i możliwe (*possible*).

W analizowanej grupie dzieci inwazyjne zakażenie grzybicze stwierdzono u 59 chorych (24,1%). U dwojga dzieci IZG wystąpiło dwukrotnie, w związku z czym sumaryczna liczba incydentów IZG, którą poddano analizie wynosiła 61. Rozpoznanie możliwego

zakażenia grzybiczego postawiono u 26 dzieci (42,6%), prawdopodobne zakażenie grzybicze rozpoznano u 17 dzieci (27,9%) i udokumentowane zakażenia grzybicze u 18 dzieci (29,5%). Zakażenia grzybicze w analizowanej grupie dzieci występowały w następującej lokalizacji narządowej: płuca – 44 incydenty (72,1%), fungemia – 4 incydenty (6,6%), zakażenie układu moczowego – 4 incydenty (6,6%), wątroba i śledziona – 3 incydenty (4,9%) oraz zatoki przynosowe – 1 incydent (1,6%). W pięciu przypadkach stwierdzono zakażenie rozsiane, co stanowi 8,2% incydentów IZG, które obejmowało następujące lokalizacje narządowe: wątroba i śledziona oraz zakażenie układu moczowego – 2 incydenty, jeden incydent współistniejącego zakażenia obu płuc i tarczycy, jeden incydent zajęcia płuc z fungemią oraz jeden incydent jednoczasowego zajęcia płuc, wątroby, śledziony, skóry i gałki ocznej.

Wśród 61 analizowanych incydentów IZG w 23 przypadkach (37,7%) stwierdzono prawdopodobne lub udokumentowane zakażenie *Aspergillus spp.*, w 13 przypadkach (21,3%) – zakażenie *Candida spp.*, natomiast w 23 incydentach (37,7%) nie ustalono etiologii zakażenia grzybiczego. W jednym przypadku (1,6%) stwierdzono współistniejące zakażenie *Candida spp.* i *Aspergillus spp.*, a w jednym przypadku (1,6%) stwierdzono współistnienie zakażenia o etiologii *Mucor spp.* i *Aspergillus spp.*

W leczeniu IZG monoterapię zastosowano w 49 przypadkach (80,3%). Leczenie skojarzone zastosowano w 12 incydentach zakażenia (19,7%). Wśród 61 incydentów IZG terapię empiryczną wdrożono w 5 przypadkach (8,2%), terapię wyprzedzającą w 43 przypadkach (70,5%), natomiast leczenie celowane włączono w 13 incydentach (21,3%).

Po 3 tygodniach od włączenia terapii przeciwrzybiczej całkowitą odpowiedź na zastosowane leczenie uzyskano w 18 przypadkach (29,5%), w 37 odpowiedź oceniono jako częściową (60,7%), w 4 przypadkach stwierdzono stabilizację choroby (6,6%), natomiast w 2 przypadkach efekt leczenia oceniono jako niepowodzenie (3,3%). Pozytywny efekt terapeutyczny po 3 tygodniach od włączenia leczenia zgodnie z przyjętymi kryteriami uzyskano w 55 incydentach IZG (90,2%).

Po 3 miesiącach od włączenia terapii przeciwrzybiczej całkowitą odpowiedź na zastosowane leczenie uzyskano w 53 przypadkach (86,9%), w sześciu odpowiedź oceniono jako całkowitą z obecnością masy resztkowej (9,8%), natomiast w 2 przypadkach efekt leczenia oceniono jako niepowodzenie (3,3%). W związku z tym pozytywny efekt terapeutyczny po 3 miesiącach od włączenia leczenia uzyskano w 59 incydentach IZG (96,7%).

Do momentu zakończenia obserwacji (31 stycznia 2013 r.) żyło 43 z 59 dzieci, u których wystąpiło inwazyjne zakażenie grzybicze, co stanowi 73% grupy. Szesnaścioro dzieci (27%) z tej grupy zmarło. Zakażenie grzybicze było w tej grupie pacjentów przyczyną zgonu u dwojga dzieci (3,4%). Pięcioletnie przeżycie w całej analizowanej grupie dzieci (n=245) wynosiło 77,4% natomiast 10-letnie 73,7%. Średnie obserwowane przeżycie dzieci z przebytych IZG w analizowanym okresie wynosiło 90 miesięcy, natomiast u dzieci, u których IZG nie wystąpiło – 96,5 miesiąca. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w długości przeżycia pomiędzy obiema grupami.

W analizie przydatności przekłatkowego ultrasonograficznego badania płuc (PUBP) uwzględniono 36 dzieci z gorączką neutropeniczną, u których w procesie diagnostycznym zakażenia grzybiczego wykonano zarówno PUBP, jak również TK klatki piersiowej. Podejrzenie zakażenia grzybiczego płuc na podstawie PUBP wysunięto u 25 z 36 dzieci. Wśród charakterystycznych cech dla zakażenia grzybiczego w PUBP opisano: nieprawidłową linię opłucnej u 24 dzieci, obecność obszarów konsolidacji z nieregularnym zarysem brzeżnym zmiany stwierdzono u 18 dzieci, niejednorodną echostrukturę

u 25 dzieci, w tym u 2 pacjentów stwierdzono obecność ropnia w mięszu płuca, obecność bronchogramu u 17 pacjentów, natomiast nieprawidłowy wzorzec unaczynienia zmian u 24 dzieci. Na podstawie uzyskanych danych obliczono, iż czułość PUBP w rozpoznawaniu IZG płuc weryfikowana TK klatki piersiowej wynosi 100%, natomiast swoistość metody wynosi 73,3%. Dodatnia wartość predykcyjna (PPV) opisywanego badania wynosi 65,6%, natomiast ujemna wartość predykcyjna wynosi 100%.

W części dotyczącej analizy wpływu hiperglikemii posterydowej na częstość występowania IZG uwzględniono 83 dzieci, u których stosowano opracowany w ośrodku gdańskim program wczesnego rozpoznawania zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Wykazano, że w grupie 22 dzieci, u których stwierdzono hiperglikemię posterydową – inwazyjne zakażenie grzybicze rozpoznano u 13 pacjentów (59,1%). W grupie 61 dzieci, u których nie stwierdzono hiperglikemii posterydowej, IZG stwierdzono u 5 pacjentów (8,2%). Wykazano statystycznie istotną różnicę w występowaniu IZG pomiędzy obiema grupami ($p < 0,001$). Stwierdzono także przydatność programu wczesnego rozpoznawania zaburzeń gospodarki węglowodanowej w diagnostyce hiperglikemii posterydowej u dzieci otrzymujących w ramach programu terapeutycznego glikokortykosterydy.

W analizowanej grupie dzieci, u których obserwowano 61 incydentów inwazyjnych zakażeń grzybiczych, procedurę przetoczenia koncentratu granulocytów (KG) przeprowadzono u 16 pacjentów. Łącznie przeprowadzono u nich 54 transfuzje KG. Spośród 12 dzieci, u których zastosowano co najmniej dwa przetoczenia, ostateczny pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano u wszystkich dzieci. W ocenie efektu terapeutycznego po 3 tygodniach od ostatniego przetoczenia KG wykazano, że całkowitą regresję zmian obserwowano u 2 pacjentów, natomiast u pozostałych 10 obserwowano częściową regresję. Ostatecznej oceny efektywności procedury dokonano po 3 miesiącach. U 10 dzieci stwierdzono całkowitą regresję zmian, a u jednego dziecka stwierdzono obecność zmiany resztkowej. Wykazano bardzo dobrą tolerancję procedury zarówno u biorców, jak i u dawców koncentratu granulocytów.

Wśród 59 dzieci z zakażeniem grzybiczym, do inwazyjnych procedur diagnostycznych i/lub terapeutycznych zakwalifikowano ośmiorgo dzieci, co stanowi 13,6% całej grupy. W grupie tej przeprowadzono dziewięć procedur inwazyjnych. U sześciorga dzieci wykonano po jednej procedurze: u czworga z nich chirurgicznie usunięto zmienioną zapalnie tkankę płucną (dwa zabiegi lobektomii, jeden zabieg segmentektomii i jedna resekcja klinowa); u jednego dziecka wykonano biopsję zatoki przynosowej; u jednego dziecka wykonano biopsję skóry. U jednego dziecka przeprowadzono trzy procedury inwazyjne (punkcja jamy opłucnowej, pulmonektomia i biopsja tarczycy). Jedno dziecko spośród ośmiorga zakwalifikowanych do procedur inwazyjnych, zmarło w trakcie transportu na blok operacyjny przed wykonaniem planowanej lobektomii. W każdym przypadku interwencji chirurgicznej w analizowanym materiale klinicznym uzyskano wymierne korzyści diagnostyczne i/lub terapeutyczne. We wszystkich przypadkach potwierdzono wstępną sugestię zakażenia grzybiczego wysuniętą na podstawie badań obrazowych. Dodatkowo, wyniki uzyskane u części pacjentów pozwoliły na modyfikację leczenia przeciugrzybiczego, natomiast u części spowodowały usunięcie zmian resztkowych i umożliwiły bezpieczną kontynuację leczenia immunosupresyjnego.

Uzyskane wyniki leczenia IZG w gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej są bardzo satysfakcjonujące, zwłaszcza w zestawieniu z wynikami uzyskiwanymi w innych ośrodkach na całym świecie. W związku z powyższym można wnioskować, iż systematyczne monitorowanie pacjentów z grup ryzyka wystąpienia IZG przy pomocy badania ultrasonograficznego klatki piersiowej oraz wczesne włączenie terapii przeciugrzybi-

czej, w tym leczenia wspomagającego umożliwia redukcję śmiertelności związanej z IZG.

Całokształt prezentowanych aspektów diagnostyki i leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej przyczynił się do osiągnięcia bardzo wysokiego odsetka wyleczeń zakażeń grzybiczych w tej grupie pacjentów. Dowodem skuteczności stosowanych procedur diagnostyczno-terapeutycznych może być brak obserwowanych w ośrodku gdańskim różnic w przeżyciu pomiędzy grupą dzieci, u których w trakcie leczenia choroby podstawowej obserwowano IZG, a dziećmi, u których IZG nie wystąpiło.

Na podstawie przeprowadzonej w niniejszej rozprawie analizy sformułowano następujące wnioski: częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych w gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej wynosi 24,1% i jest wyższa, aniżeli podawana w literaturze. Wynika to z faktu uwzględnienia w analizie pacjentów nie tylko z udokumentowanym i prawdopodobnym rozpoznaniem IZG wg kryteriów EORTC 2008, ale także pacjentów z rozpoznaniem możliwym. Uznano, że typowe zmiany w badaniach obrazowych stanowią wystarczającą podstawę do rozpoznania IZG u dzieci i wdrożenia leczenia. W gdańskim ośrodku hematologii dziecięcej uzyskano wysoką skuteczność leczenia IZG – pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano u 96,7% dzieci. Modyfikacja kryteriów EORTC 2008 może zmniejszyć niedoszacowanie rozpoznawania IZG u dzieci i tym samym poprawić efekty leczenia przeciwgrzybiczego. Przezłatkowe ultrasonograficzne badanie płuc stanowi cenną metodę wczesnej diagnostyki zakażeń grzybiczych płuc u dzieci, umożliwiając ograniczenie terapii empirycznej na korzyść wyprzedzającej. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono skuteczność diagnostyczną opisywanego badania w rozpoznawaniu IZG płuc u dzieci – metodę zwalidowano w oparciu o porównanie jej z tomografią komputerową klatki piersiowej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że hiperglikemia posterydowa stanowić może dodatkowy, istotny czynnik ryzyka rozwoju IZG, w związku z czym należy ją uwzględnić w kwalifikacji pacjentów do wdrożenia profilaktyki przeciwgrzybiczej. Leki stosowane w profilaktyce przeciwgrzybiczej powinny uwzględniać w swoim spektrum grzyby pleśniowe. Opracowany program wczesnego rozpoznawania zaburzeń gospodarki węglowodanowej poprawia wykrywalność hiperglikemii posterydowej i umożliwia wyodrębnienie dodatkowej grupy pacjentów wymagających profilaktyki przeciwgrzybiczej. Program ten może być przydatny nie tylko u dzieci leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i ciężkiej anemii aplastycznej, ale również może znaleźć zastosowanie u dzieci i dorosłych otrzymujących glikokortykosterydy w terapii innych jednostek chorobowych. Transfuzje koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców stanowią cenną opcję leczenia wspomagającego u dzieci z IZG. Warunkiem niezbędnym do stosowania procedury jest sprawnie funkcjonujący system współpracy z Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecництва. W celu ostatecznej oceny przydatności tej metody leczenia konieczne byłoby przeprowadzenie randomizowanych badań klinicznych na dużych grupach pacjentów, jednakże jest to z przyczyn etycznych bardzo trudne. Na podstawie analizy pacjentów z IZG poddanych procedurom chirurgicznym wykazano, iż stanowią one cenne uzupełnienie diagnostyki i terapii tych zakażeń. Kwalifikacja do interwencji chirurgicznej każdorazowo musi być dokonywana indywidualnie, z uwzględnieniem ryzyka zabiegu i potencjalnych korzyści z niego wynikających. Szerze wykorzystanie inwazyjnych procedur diagnostycznych w wybranych przypadkach klinicznych umożliwia ustalenie czynnika etiologicznego IZG i wdrożenie właściwej terapii przeciwgrzybiczej. Chirurgiczne usunięcie przetrwałych ognisk zakażenia może

warunkować kontynuację leczenia choroby podstawowej. U pacjentów z krwiopluciem w przebiegu inwazyjnej aspergilozy płuc, zwłaszcza w okresie rekonstrukcji hematologicznej, zabieg operacyjny musi być wykonywany w trybie pilnym

Podsumowując, wydaje się, że uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki badań mogą mieć korzystny wpływ na efekty leczenia przeciwgrzybiczego u dzieci leczonych z powodu chorób nowotworowych. Wykorzystanie badania ultrasonograficznego w diagnostyce i monitorowaniu zmian grzybiczych w płucach nie tylko umożliwia wdrożenie leczenia przeciwgrzybiczego we wczesnej fazie zakażenia, ale także pozwala monitorować skuteczność stosowanej terapii. Dodatkowo, obrazowanie przy pomocy ultradźwięków pozwala ograniczyć częstość stosowania tomografii komputerowej, co ma istotne znaczenie dla ochrony radiologicznej populacji dziecięcej. Jak wykazano w niniejszym opracowaniu, hiperglikemia posterydowa stanowić może istotny, ale niedoceniany, szczególnie u dzieci czynnik ryzyka rozwoju zakażeń grzybiczych. Poprawa wykrywalności hiperglikemii posterydowej u dzieci leczonych z powodu chorób krwi umożliwia wyodrębnienie grupy pacjentów, u których należy rozważyć wdrożenie profilaktyki przeciwgrzybiczej zawierającej w swoim spektrum grzyby pleśniowe. Dzieci, u których stwierdzano hiperglikemię podczas terapii glikokortykosterydami, powinny także zostać objęte opieką Poradni Diabetologicznej po zakończeniu terapii przeciwnowotworowej. Możliwość wykorzystania transfuzji koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców stanowi cenne uzupełnienie stosowanej farmakoterapii zakażeń grzybiczych. Należy podkreślić jednak, że warunkiem niezbędnym do przeprowadzenia tej procedury jest doskonała współpraca klinicysty z Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecnicstwa oparta o wspólnie wypracowany model działania, który musi prawidłowo funkcjonować w przypadku konieczności pilnego przygotowania dawcy do separacji koncentratu granulocytów. Algorytm postępowania stosowany od 10 lat w ośrodku gdańskim jest godny polecenia i możliwy do wprowadzenia także w innych ośrodkach klinicznych, nie tylko pediatrycznych. Inwazyjne procedury diagnostyczne i terapeutyczne są coraz częściej stosowane u pacjentów z podejrzeniem lub rozpoznaniem inwazyjnych zakażeń grzybiczych, co niewątpliwie ma związek z poprawą jakości opieki okołoperacyjnej, jak i technik wykonywanych zabiegów. Pomimo istniejących trudności wynikających przede wszystkim z ciężkości stanu ogólnego pacjenta i towarzyszących zaburzeń krzepnięcia, należy dążyć do uzyskania wiarygodnego materiału diagnostycznego, co wielokrotnie umożliwia modyfikację stosowanego uprzednio leczenia przeciwgrzybiczego. Dodatkowo usunięcie zmian grzybiczych niepoddających się leczeniu zachowawczemu, pozwala na bezpieczną kontynuację leczenia immunosupresyjnego.

Wszystkie przedstawione aspekty zarówno w obszarze diagnostyki, jak i terapii przeciwgrzybiczej są możliwe do wykorzystania nie tylko u dzieci leczonych z powodu schorzeń onkohematologicznych. Mogą mieć one zastosowanie zarówno u dzieci, jak i u pacjentów dorosłych z upośledzeniem homeostazy immunologicznej ustroju, w wyniku którego doszło do rozwoju inwazyjnego zakażenia grzybiczego. W związku z powyższym wydaje się, że niniejsza praca może mieć wymierny walor praktyczny możliwy do wykorzystania w codziennej praktyce klinicznej w wielu dziedzinach medycyny oraz ostatecznie przyczynić się do ograniczenia niekorzystnych skutków inwazyjnych zakażeń grzybiczych.

9. SUMMARY

Over the last few decades we have witnessed a real breakthrough in the treatment of hemato-oncological disorders in children. Despite significant progress in the treatment of infections complicating oncological therapy, infectious diseases still are the predominate cause of death in children with acute leukemias. Among infectious complications, invasive fungal infections (IFI) are the most common cause of mortality in patients treated for hematological malignancies or undergoing transplantation of the hematopoietic cells. The incidence of the IFIs has significantly increased over the recent years, with still alarmingly high mortality, despite the more and more sophisticated methods of diagnosis and treatment. IFIs, also referred to as an invasive fungal disease, are a growing problem in pediatric hemato-oncology.

The primary objective of this work was to optimize the selected procedures for the early diagnosis and treatment of IFI in children treated for hematological malignancies and severe aplastic anemia aiming to improve the treatment outcomes for children with IFI.

Aim of this work was carried out, in the first part of the study, through a detailed analysis of invasive IFIs occurring during the treatment of hematological proliferative disorders and severe aplastic anemia in patients of the Gdansk pediatric hematology center. The analysis included diagnostic criteria and therapeutic effects obtained. The second part of the analysis presents four selected aspects of IFI diagnosis and treatment which may contribute to the improvement of the effects of the antifungal therapy.

In search of the effective and safe methods of diagnosing fungal infections the usefulness of the transthoracic lung ultrasound (TLU) in the early diagnosis of invasive pulmonary fungal infections in children was evaluated, an attempt to validate this imaging method was also undertaken. The study also evaluated the impact of steroid-related hyperglycemia on the incidence of IFI in children. Additionally a special program was developed for the early detection of carbohydrate metabolism disorders in an attempt to improve the recognition of steroid-related hyperglycemia in the pediatric group analyzed. As more effective methods of supportive care are also required in IFI treatment, an attempt to assess the utility of the granulocyte concentrate transfusions from G-CSF mobilized donors was undertaken. The role of surgical procedures in the diagnosis and treatment of IFIs in children was also evaluated.

The studied group consisted of 245 children, boys and girls aged from 39 days to 18 years, undergoing treatment in Department of Pediatrics, Hematology, Oncology, and Endocrinology of the Medical University of Gdansk (Head of the Departement: Professor Anna Balcerska, MD, PhD) between 1st January 2003 and 31st December 2011 due to proliferative disorders of the hematopoietic system or due to aplastic anemia. Diagnosis of IFI was made based on the modified European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) criteria from 2008 (initial version – 2002). Three types of diagnoses were distinguished: proven, probable and possible.

The IFIs were diagnosed in 59 patients (24.1% of the group). Two children had invasive fungal infections twice, thus the number of IFI incidents analyzed in this study totals 61. Possible fungal infection was diagnosed in 26 children (42.6%), probable infection in 17 children (27.9%) and documented fungal infection was noted in 18 children (29.5%). Fungal infections in the study group were localized as follows: lungs – 44 incidents (72.1%), fungemia – 4 incidents (6.6%), urinary tract infection – 4 incidents

(6.6%), liver and spleen 3 incidents (4.9%) and paranasal sinuses 1 incident (1.6%). In five cases the infection was disseminated, which comprised 8.2% of all IFI incidents. Disseminated infections involved the following organs: liver, spleen and urinary tract two incidents, one incident involved both lungs and the thyroid gland, in one case the fungemia was accompanied by the lung involvement and in one case the lungs, the liver, the spleen, the skin and the eyeball were affected at the same time.

Out of the 61 IFI events analyzed 23 (37.7%) were probable or proven *Aspergillus spp.* infections, 13 cases (21.3%) were *Candida spp.* infection, and for 23 incidents (37.7%) the exact fungal etiology has not been established. In one case (1.6%) there was a coincidence of *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* infections and in another case (1.6%) *Mucor spp.* infection coincided with *Aspergillus spp.* infection.

Monotherapy was used for IFI treatment in 49 cases (80.3%) and combination therapy in 12 (19.7%). Among the 61 incidents IFI empirical therapy was implemented in 5 cases (8.2%), pre-emptive therapy was used for 43 incidents (70.5%), and targeted therapy in 13 incidents (21.3%).

After 3 weeks of the antifungal therapy a complete response was achieved in 18 cases (29.5%), in further 37 cases a partial response was reached (60.7%). In 4 cases the treatment resulted in disease stabilization (6.6%), while two cases were considered treatment failures (3.3%). In accordance with the established criteria the positive therapeutic effect at 3 weeks was achieved in 55 IFI incidents (90.2%).

After 3 months from the initiation of the antifungal treatment a complete response was achieved in 53 cases (86.9%), in six cases the response was considered complete with the residual mass (9.8%), while two cases were considered treatment failures (3.3%). Therefore, the positive therapeutic effect at 3 months was achieved in 59 IFI incidents (96.7%).

By the end of the follow-up period (31st January 2013) 43 out of 59 children who developed IFI were alive, which represents 73% of the group. Sixteen children died (27% of the group). In the analyzed group the fungal infection was the cause of death in two children (3.4%). The 5-year survival rate for the whole group (n=245) was 77.4% while 10-year survival rate was 73.7%. For the children with the history of IFI the average survival time was 90 months vs. 96.5 months for children without IFI history. No statistically significant differences in survival were noted between the groups.

The TLU value in IFI diagnosis was evaluated based on 36 children with febrile neutropenia who had the ultrasonographic imaging performed along with chest CT. The fungal infection, based on TLU, was suspected in 25 out of 36 children. The characteristic features of the fungal infection in TLU included: abnormal pleural line, which was seen in 24 children, areas of consolidation with an irregular outline – observed in 18 children, heterogeneous echostructure – 25 children, including 2 patients with an abscess found in the lung parenchyma, the presence of bronchogram – 17 patients, and abnormal vascularity pattern – in 24 children. TLU method sensitivity for diagnosis pulmonary IFI, as verified by chest CT, is 100%, with the specificity of 73.3%. Positive predictive value (PPV) of this method is 65.6% and the negative predictive value equals 100%.

The impact of steroid-related hyperglycemia on the incidence of IFI was analyzed based on the data from 83 children for whom the program for early detection of carbohydrate metabolism disorders was implemented. In 22 children with steroid-related hyperglycemia – IFI was diagnosed in 13 cases (59.1%). Among 61 children without steroid related hyperglycemia IFI were noted in 5 patients (8.2%). The difference in IFI frequency rate between the two groups was statistically significant ($p < 0.001$). The pro-

gram for the early detection of carbohydrate metabolism disorders was proven to be useful in diagnosing steroid-related hyperglycemia in children treated with corticosteroids.

In the study group, with its 61 IFI incidents, granulocyte concentrates were transfused in 16 patients. The number of granulocyte concentrate transfusions totaled 54. In 12 children, who had received at least two transfusions, a positive final effect was achieved in all cases. When the therapeutic effect was assessed 3 weeks after the last granulocyte concentrate transfusion a complete regression was seen in 2 patients while 10 showed partial regression of the lesions. The final assessment was performed 3 months after the transfusions. Ten children reached complete regression of the fungal lesions and a residual lesion was found in one child. The tolerance of the granulocyte concentrate transfusion procedure was good both in recipients and in donors.

Eight of 59 children with a fungal infection were qualified for invasive diagnostic and/or therapeutic procedures, which represents 13.6% of the group. Nine invasive procedures were performed in this group. Single procedure was performed in six children: four required surgical removal of the inflamed lung tissue (two lobectomies, one segmentectomy and one wedge resection were performed); a biopsy of the paranasal sinuses was performed in one child and skin biopsy in another. One child required three invasive procedures: pleural puncture, pulmonectomy and thyroid biopsy. One child, out of eight qualified for invasive procedures, died during the transport to the operating theatre, before the scheduled lobectomy was commenced. In all cases, surgical intervention gave tangible diagnostic and/or therapeutic benefits. In all cases the initial diagnosis of a fungal infection, put forward based on the imaging studies, was confirmed. In addition, the results obtained in some patients led to the modification of the antifungal therapy, and resulted in the removal of residual lesions which allowed to safely continue with the immunosuppressive therapy.

The IFI treatment results in Gdansk pediatric hematology centre are very satisfactory, especially when compared with the results of the hematological centers worldwide. Therefore it can be concluded, that systematic monitoring of patients at risk of IFI by ultrasound examination of the chest, and early intervention with antifungal therapy, including adjuvant treatment, can reduce the IFI associated mortality.

All aspects of IFIs in children treated for hematological malignancies and severe aplastic anemia presented in this study contributed to the very high rate of fungal infection cures in these patients. In Gdansk pediatric hematology center the survival of children with IFI did not differ from the survival of children without IFI, which seems to be the proof of the efficacy of the diagnostic and therapeutic procedures implemented.

Based on the analysis performed in this study the following conclusions can be drawn: the incidence of invasive fungal infections in Gdansk pediatric hematology center of is 24.1%, which is higher than reported in the literature. It results from the fact that not only patients with documented and probable IFIs as per EORTC 2008 criteria, but also patients with the diagnosis of possible IFI were included. It was assumed that characteristic changes in the imaging studies give sufficient ground for putting forward the diagnosis of IFI and initiating the treatment. A high IFI treatment efficacy was achieved in Gdansk pediatric hematology centre with positive treatment results seen in 96.7% children. Modification of EORTC 2008 criteria can reduce the underestimation of IFI diagnosis in children and thus improve the effects of the antifungal treatment. TLU is a valuable method for early diagnosis of pulmonary fungal infections in children and allows to reduce empiric therapy in favor of the pre-emptive therapy. The results con-

firmed the diagnostic efficacy of TLU in diagnosing pulmonary IFI in children – the method was validated by comparison with computed tomography of the chest. Based on the results obtained in this study it can also be stated that steroid-related hyperglycemia is an additional and significant, risk factor for IFI development and as such should be considered when patients are qualified for antifungal prophylaxis. Drugs used in antifungal prophylaxis should encompass mold fungi in their spectrum of activity. The program for the early recognition of carbohydrate metabolism disorders developed in the course of this study improves the detection of steroid-related hyperglycemia and allows for the identification of the additional group of patients who require antifungal prophylaxis. The program can be beneficial not only for children treated due to proliferative hematopoietic disorders and aplastic anemia but can also be useful for children and adults receiving glucocorticoids in the treatment for other diseases. Granulocyte concentrate transfusions from G-CSF stimulated donors are a valuable treatment option for children with IFI. A well-functioning system of cooperation with the Regional Blood Center is a necessary condition for the successful application of the procedure. Randomized clinical trials with large patients groups would be necessary for the full evaluation of this treatment method, although it seems impossible to undertake them for the ethical reasons. The analysis of the patients with IFI who underwent surgical procedures showed that surgery is a valuable augmentation to the diagnosis and treatment of IFIs. The qualification for the surgical procedures must be individual and should consider the predicted risks and expected benefits. Wider utilization of the invasive diagnostic procedures in selected clinical cases allows for identification of the IFI causative factor and helps to initiate the targeted antifungal therapy. The surgical removal of the remaining infection focus may be essential for the continuation of the treatment of the underlying disease. For patients with hemoptysis, in course of the lung aspergillosis, especially during the hematological reconstitution period, the surgery must be performed urgently.

In conclusion, it seems that the results obtained in this study may positively affect the results of antifungal therapy in children undergoing cancer therapy. The use of ultrasound in the diagnosis and monitoring of fungal lesions in the lungs, not only allows for the implementation of antifungal therapy in the early phase of the infection, but also enables monitoring of the therapeutic effects. Moreover, ultrasound imaging allows to reduce the frequency of CT scans, which is important for radiation protection in the pediatric population. As demonstrated in this study, steroid-related hyperglycemia may be an important risk factor for the development of fungal infections, still neglected, especially in children. Improving the detection of steroid-related hyperglycemia in children with blood disorders can identify a group of patients who should be considered for antifungal prophylaxis comprising moulds in its spectrum. Children with hyperglycemia during corticosteroid therapy should also be followed in the Diabetes Clinic after their oncological treatment is over. The transfusions of granulocyte concentrates from G-CSF stimulated donors are a valuable addition to the pharmacotherapy of the fungal infections. It should be stressed, however, that a prerequisite for this procedure is an excellent collaboration between the clinician and the Regional Blood Center. A jointly developed model is needed to secure smooth operation in case an emergency preparation of the donor for granulocyte concentrate transfusion is required. The algorithm that has been used in Gdansk centre for 10 years is worth recommending and can be implemented in other clinical centers, not only in the pediatric ones.

The invasive diagnostic and therapeutic procedures are more and more often used in patients with suspected or confirmed IFI, which is undoubtedly related to the improve-

ment of the preoperative care quality and advances of the surgical techniques. Despite the difficulties, arising mainly from the severity of the patients' general condition and associated coagulation disorders, a reliable diagnostic material should be obtained whenever possible, as it often allows to adjust the antifungal therapy. The removal of the fungal lesions resistant to the conservative treatment is necessary for the safe resumption of the immunosuppressive treatment.

All the issues presented in this study, both regarding the diagnosis and the treatment of antifungal infections, can be useful not only in children treated for oncohematological disorders. They can be implemented for children as well as for adults with impaired immunological homeostasis resulting in fungal invasion. Therefore, it seems that this work can have a measurable practical value for use in daily clinical practice in many areas of medicine, and ultimately can help to reduce the negative impacts of invasive fungal infections.

10. ZAŁĄCZNIKI

10.1. Zgoda Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym

Uzyskano zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym na badania dotyczące oceny wpływu hiper-glikemii posterydowej na częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych (NKEBN/236/2010) oraz oceny przydatności transfuzji koncentratu granulocytów od stymulowanych G-CSF dawców rodzinnych w leczeniu ciężkich infekcji u dzieci w neutropenii (NKEBN/16/2004 oraz NKEBN/16-147/2007).

**NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
PRZY GDAŃSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
telefax 058/349-10-11 - sekretariat, tel. 058/349-12-60 – przewodniczący**

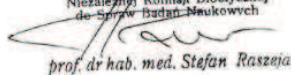
NKEBN/236/2010

Gdańsk, 2010-07-12

Pani
Prof. dr hab. med. Anna Balcerska
Kierownik Katedry i Kliniki Pediatrii,
Hematologii, Onkologii i Endokrynologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

W odpowiedzi na zgłoszenie badań z dnia 22.06.2010 r. na temat:
„Wczesna diagnostyka i terapia zaburzeń gospodarki węglowodanowej u dzieci
leczonych glikokortykosteroidami” (*projekt badawczy planowany do przeprowadzenia
pod kierunkiem dr n. med. Nineli Irgi*) - Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań
Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym na posiedzeniu w dniu
1 lipca 2010 roku zapoznała się z wyżej wymienionym projektem pracy i wyraża zgodę
na jej prowadzenie w zakresie przedstawionym we wniosku, gdyż są to badania
poznawcze, dokonywane w interesie badanych pacjentów.

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3A
telefax 058 349 10 11

PRZEWODNICZĄCY
Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych

prof. dr hab. med. Stefan Rasznica

NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
przy Akademii Medycznej w Gdańsku
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3 a
tel. 349-10-11, 349-12-80

Gdańsk, 2004-02-12

NKEBN/16/2004

Pani
Prof. dr hab. med. Anna Balcerska
Kierownik Kliniki Pediatrii, Hematologii,
Onkologii i Endokrynologii
Instytut Pediatrii
Akademia Medyczna w Gdańsku

W odpowiedzi na zgłoszenie badań z dnia 15.01.2004 r. na temat: „Ocena przydatności transfuzji koncentratów granulocytarnych od stymulowanych G-CSF dawców rodzinnych w leczeniu ciężkich infekcji u dzieci w neuropenii” (praca statutowa ST-8 planowana do przeprowadzenia pod kierunkiem lek. med. Małgorzaty Zaborowskiej-Sołtys) – Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku rozpatrzyła ww. zgłoszenie na posiedzeniu w dniu 29 stycznia 2004 r. i wyraża zgodę na prowadzenie badań w zakresie przedstawionym we wniosku stwierdzając, że są to badania poznawcze dokonywane w interesie pacjentów.

PRZEWODNICZĄCY
Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych
przy Akademii Medycznej w Gdańsku
prof. dr hab. med. Stefan Raszeja

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU
NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
przy Akademii Medycznej w Gdańsku
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3 A
telefon 349-10-11

Gdańsk, 2007-04-03

NKEBN/16-147/2007

Pani
Prof. dr hab. med. Anna Balcerska
Kierownik Kliniki Pediatrii, Hematologii,
Onkologii i Endokrynologii
Akademia Medyczna w Gdańsku

W odpowiedzi na pismo z dnia 26.03.2007 r. dotyczące przedłużenia wydanej zgody komisji bioetycznej Nr NKEBN/16/2004 z dnia 12.02.2004 r. na prowadzenie badania klinicznego pt. **„Ocena przydatności transfuzji koncentratów granulocytarnych od stymulowanych G-CSF dawców rodzinnych w leczeniu ciężkich infekcji u dzieci w neutropenii”** (praca statutowa ST-8 realizowana pod kierunkiem lek. med. Małgorzaty Zaborowskiej-Sołtys) – Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku zapoznała się z ww. prośbą Pani Profesor i wyraża zgodę na kontynuowanie ww. programu badawczego oraz przedłuża ważność wydanej decyzji do czasu zakończenia badań.

PRZEWODNICZĄCY
Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych
przy Akademii Medycznej w Gdańsku
prof. dr hab. med. Stefan Raszeja