

Występowanie grzybów *Candida* w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych u chorych z guzem nowotworowym płuca

Occurrence of *Candida* fungi in bronchoalveolar lavage in patients with lung neoplastic tumour



Maria Szymankiewicz¹, Maciej Dancewicz^{2,3}, Mariusz Bella^{2,3}, Janusz Kowalewski^{2,3}

¹Zakład Mikrobiologii, Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

²Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

³Oddział Kliniczny Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2009; 6 (1): 43–45

Streszczenie

Wstęp: W przebiegu raka płuca często występują zakażenia układu oddechowego. Rozpoznanie, szczególnie kandydozy płuc, jest trudne ze względu na brak charakterystycznych cech klinicznych.

Cel pracy: Celem pracy była ocena występowania grzybów *Candida* w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych (BAL). Próbowano również ocenić znaczenie izolacji *Candida* spp. w posiewach ilościowych BAL-u.

Materiał i metody: Badaniem objęto 44 chorych, u których stwierdzono guz nowotworowy płuca. Materiał do badań mikrobiologicznych pobrany podczas bronchoskopii przesyłano do Zakładu Mikrobiologii w celu izolacji i identyfikacji grzybów. Wykonywano posiewy ilościowe BAL-u na podłoże Sabouraud agar (bioMérieux), stosując ezy kalibrowane (1:100 i 1:1000). Materiały posiewano również na podłoże Sabouraud agar z gentamycyną i chloramfenikolem (bioMérieux). Płytki inkubowano przez 5 dni w temp. 30°C. Grzyby drożdżopodobne identyfikowano zgodnie ze standardowymi metodami laboratoryjnymi. Wyniki były podawane w jednostkach tworzących kolonie na ml (cfu/ml).

Wyniki: U 15 spośród 44 badanych pacjentów (34,09%) stwierdzono obecność grzybów *Candida*, w tym u 14 pacjentów występował jeden izolat, a u 1 pacjenta dwa izolaty. Najczęściej identyfikowanym gatunkiem był *C. albicans*. Izolację *Candida* spp. w ilości $\geq 10^4$ cfu/ml wykazano tylko u 3 pacjentów (6,82%). Niezależnie od wyniku posiewów ilościowych nie odnotowano u żadnego pacjenta klinicznych objawów zakażenia.

Wnioski: Wśród chorych na raka płuca grzyby *Candida* spp., szczególnie *C. albicans*, izolowano często, ale sporadycznie otrzymywano wzrost w ilości $\geq 10^4$ cfu/ml. U wszystkich bada-

Abstract

Background: Respiratory infections are very frequent in lung cancer patients. Their diagnosis, especially diagnosis of pulmonary candidiasis, is difficult because of the lack of specific clinical manifestations.

Aim: The objective of this study was to assess the occurrence of *Candida* fungi in bronchoalveolar lavage (BAL) in patients with neoplastic tumour of the lung. We also tried to estimate the significance of the isolation of *Candida* spp. in quantitative cultures of BAL.

Material and Methods: 44 patients with lung neoplastic tumour were included in this study. Materials for microbiological examinations were taken during bronchoscopy and sent to the Microbiology Department for fungal isolation and identification. Quantitative cultures of BAL fluid were performed by using Sabouraud agar (bioMérieux) and calibrated loops (1: 100 and 1: 1000). Materials were also cultured onto Sabouraud gentamicin and chloramphenicol agar (bioMérieux). The plates were incubated for 5 days at 30°C. Yeast-like fungi were identified by standard laboratory methods. Results are expressed as colony forming units per millilitre (cfu/ml).

Results: Growth of *Candida* spp. in any count was seen in 15 of 44 examined patients (34.09%): one isolate in 14 patients and two isolates in 1 patient. The most frequently identified species was *C. albicans*. The isolation of *Candida* spp. in quantity $\geq 10^4$ cfu/ml was observed only in 3 patients (6.82%). Regardless of result of quantitative cultures none of the patients demonstrated any clinical manifestations of respiratory infection.

Conclusions: The isolation of *Candida* spp., especially *C. albicans*, from BAL was frequent in patients with lung cancer but the presence of *Candida* spp. in quantity $\geq 10^4$ cfu/ml was rare. In

Adres do korespondencji: dr n. med. Maria Szymankiewicz, Zakład Mikrobiologii, Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka, ul. Romanowskiej 2, 85-796 Bydgoszcz, tel. +48 52 374 33 15, faks +48 52374 33 01, e-mail: szymankiewicz@mco.bydgoszcz.pl

nych pacjentów izolacja grzybów wskazywała na kolonizację drzewa oskrzelowego.

Słowa kluczowe: popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe, *Candida*, guz nowotworowy płuca.

Wstęp

Chorzy na raka płuca są narażeni na ryzyko wystąpienia zakażeń dolnych dróg oddechowych. Etiologia tych zakażeń obejmuje głównie bakterie [1–3]. Zakażenia grzybicze, w tym grzybicze zapalenia płuc, opisywane są bardzo rzadko, ale rzeczywista zapadalność nie jest znana. Rozpoznanie infekcji grzybiczej jest trudne ze względu na brak charakterystycznych cech klinicznych. Zakażeniu towarzyszy zwykle gorączka, duszność, osłabienie oraz przyspieszony oddech i spadek saturacji krwi. Obraz radiologiczny kandydozy płuc nabytej drogą apiracyjną jest również niespecyficzny. Ze względu na trudności diagnostyczne grzybicze zapalenia płuc rzadko rozpoznawane są przyżyciowo. Potwierdzenie infekcji grzybiczej często otrzymuje się dopiero w badaniach sekcyjnych. Haron i wsp. [4], a także Masur i wsp. [5] wykazali, że pierwotne zapalenie płuc wywołane przez *Candida* występowało u 0,20 i 0,40% zmarłych pacjentów, a u większości z nich (84%) było bezpośrednią przyczyną śmierci [4]. Pomimo rozwoju metod diagnostycznych badanie histopatologiczne pozostaje najbardziej wiarygodną metodą potwierdzania zakażenia grzybiczego. Rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu obecności blastospor, strzępek lub pseudostrzępek grzyba w tkance pobranej drogą biopsji aspiracyjnej lub biopsji otwartej. Izolacja grzybów z popłuczyn oskrzelikowo-pęcherzykowych (ang. *bronchoalveolar lavage* – BAL) nie zawsze ma wartość diagnostyczną. Nie można bowiem wykluczyć kolonizacji. W pewnych grupach pacjentów pomocne mogą być ilościowe posiewy BAL-u, ale niektórzy autorzy kwestionują przydatność tej metody diagnostycznej [6–9].

Cel pracy

Celem pracy była ocena występowania grzybów z rodzaju *Candida* w drzewie oskrzelowym chorych z nowotworowym guzem płuca. Podjęto również próbę oceny zależności między liczbą wyizolowanych grzybów a występowaniem klinicznych objawów zakażenia.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w okresie od 1.01.2006 r. do 30.08.2007 r. W tym czasie wykonano w Pracowni Bronchoskopii 432 badania bronchofiberoskopowe. Badania do niniejszej pracy wykonywano jeden raz w tygodniu. Ogółem wykonano 52 badania. Ponieważ z grupy wyłączone chorych bez nowotworu płuca, w badanej grupie pozostało 44 chorych w wieku od 38 do 77 lat (śr. 57,95): 34 mężczyzn (wiek 38–77 lat; śr. 58,53) i 10 kobiet (wiek 46–77 lat; śr. 56). U wszystkich tych chorych wykonano badanie bronchofiberoskopem wysterylizowanym w tlenku etylenu. Podczas badania fiksovano aparat w oskrzeli segmentarnym ze zmianą nowotworową i podawano przez kanał roboczy jałową sól fizjolo-

all examined patients the isolation of *Candida* fungi indicated colonization of the bronchial tree.

Key words: bronchoalveolar lavage, *Candida*, lung neoplastic tumour.

giczną w ilości 150 ml w dawkach frakcjonowanych, a następnie odsysano popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe do jałowego ssaka. Uzyskany płyn przekazywano do badania mikrobiologicznego. We wszystkich 44 przypadkach rozpoznano nowotwór złośliwy płuca: w 36 (81,82%) przypadkach rak niedrobnokomórkowy (w tym u 17 chorych rak płaskonabłonkowy), w 6 (13,64%) przypadkach rak anaplastyczny drobnokomórkowy i w 2 (4,54%) przypadkach rakowiak. Spośród badanych chorych 13 (29,55%) poddano zabiegowi operacyjnemu anatomicznej radykalnej resekcji mięszu płuca wraz z guzem.

W Zakładzie Mikrobiologii płyn mieszano przez około 1 min na wortexie, a następnie wykonywano posiew na podłoże Sabouraud agar (bioMérieux) przy pomocy ez kalibrowanych (1:100 i 1:1000) oraz na podłoże Sabouraud agar z gentamycyną i chloramfenikolem (bioMérieux). Po odwirowaniu materiału (3750 obr/min w czasie 15 min) z osadu wykonywano preparat bezpośredni barwiony metodą Grama. Posiewy inkubowano w temperaturze 30°C przez 5 dni. Płytki odczytywano codziennie. Identyfikację przeprowadzono, oceniając morfologię kolonii, obecność filamentów (ang. *germ tube test*) i wytwarzanie chlamydospor na podłożu P.C.B. (bio-Rad). Ponadto wykonywano test manualny API *Candida* albo test automatyczny Vitek Yeast Biochemical Card (bioMérieux). Wyniki podawano w jednostkach tworzących kolonie (ang. *colony forming units* – cfu/ml). Do interpretacji posiewów ilościowych przyjęto próg diagnostyczny na poziomie $\geq 10^4$ cfu/ml.

Na przeprowadzenie powyższych badań uzyskano zgodę regionalnej komisji bioetycznej.

Wyniki

U 15 spośród 44 badanych pacjentów (34,09%) stwierdzono obecność grzybów *Candida*. Dominującym gatunkiem był *Candida albicans*. Wzrost szczepów tego gatunku uzyskano u 14 chorych (31,82%), u 1 chorego (2,27%) otrzymano wzrost *C. glabrata*. Grzyby występowały głównie w monokulturze. Tylko w jednym przypadku (2,27%) otrzymano hodowlę mieszaną *C. albicans* i *C. tropicalis*. U 1 pacjenta stwierdzono wzrost grzybów w ilości $>10^4$ cfu/ml. Wzrost grzybów na poziomie 10^4 cfu/ml uzyskano w materiale pobranym od 2 (4,55%) chorych. U 12 chorych (27,27%) zanotowano wzrost grzybów na poziomie $<10^4$ cfu/ml. Nie uzyskano klinicznego potwierdzenia infekcji grzybiczej wśród badanych pacjentów, u których wynik posiewu w kierunku grzybów drożdżopodobnych był dodatni. Pacjent, u którego w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych stwierdzono występowanie *C. albicans* w ilości $>10^4$ cfu/ml, zmarł w 2. dobie po badaniu. Przyczyną zgonu był rozsiew choroby nowotworowej stwierdzony w badaniach obrazowych przed wykonaniem bronchoskopii.

Dyskusja

W piśmiennictwie brak szerszych opracowań dotyczących występowania grzybiczych zakażeń układu oddechowego u pacjentów chorych na raka płuca. W dostępnych publikacjach autorzy oceniali kolonizację lub występowanie grzybiczych infekcji płucnych na niejednorodnych grupach pacjentów z różnymi typami immunosupresji, głównie u pacjentów w neutropenii [7, 8, 10, 11]. El-Ebiary i wsp. [9] badali *post mortem* występowanie infekcji grzybiczych wśród krytycznie chorych mechanicznie wentylowanych pacjentów oddziału intensywnej terapii. W badaniach histologicznych potwierdzili występowanie grzybów w biopsjach płucnych u 40% pacjentów, ale grzybicze zapalenie płuc rozpoznali tylko u 8% z nich. Autorzy nie stwierdzili korelacji między liczbą *Candida* a zakażeniem, a tym samym nie potwierdzili, że wyniki posiewów ilościowych są dobrym markerem wskazującym na grzybicze zapalenie płuc w badanej grupie pacjentów. Podobnie Rello i wsp. [12] nie wykazali klinicznej przydatności ilościowych oznaczeń *Candida*. Autorzy wysunęli również przypuszczenie, że izolacja *Candida* z drzewa oskrzelowego u pacjentów bez neutropenii, nawet w ilości przekraczającej przyjęty próg diagnostyczny, wskazuje raczej na kolonizację. Właśne badania korespondują z wynikami przedstawionymi przez ww. autorów. U żadnego z badanych w obecnej pracy chorych nie rozpoznano klinicznie grzybiczego zapalenia płuc. Nie było też wskazań do wdrożenia leczenia przeciwgrzybiczego, co dowodzi, że w posiewach rozpoznano kolonizację drzewa oskrzelowego grzybami *Candida*. Należy jednak podkreślić, że wśród badanych pacjentów tylko u 3 odnotowano wzrost grzybów w ilości przekraczającej przyjęty próg diagnostyczny. W grupie pacjentów z intensywnym wzrostem *Candida* stwierdzono 1 zgon. Przyczyną zgonu było uogólnienie choroby nowotworowej. W badaniach prowadzonych wśród pacjentów z obniżoną odpornością obecność grzybów *Candida* w badanym materiale korelowała w niektórych przypadkach z występującym zakażeniem. Saito i wsp. [7], a także von Eiff i wsp. [8] stwierdzili odpowiednio, że wyniki BAL-u prawidłowo prognozowały grzybicze zapalenie płuc u 3 spośród 4 pacjentów chorych na białaczkę i u 7 spośród 10 pacjentów z neutropenią, aczkolwiek ostatni wymienieni autorzy opisali jednocześnie 6 chorych z dodatnimi wynikami, ale bez potwierdzonej infekcji. Dodatkowo hodowle w kierunku grzybów uzyskane z BAL-u są trudne do interpretacji, szczególnie u pacjentów z zaburzeniami immunologicznymi wynikającymi z choroby podstawowej, a niebędących w głębokiej immunosupresji. Kontoyiannis i wsp. [13] oszacowali czułość i swoistość tej metody diagnostycznej w wykrywaniu kandydozy płuc na odpowiednio 71 i 57%. BAL jako względnie bezpieczna procedura diagnostyczna jest stosowana w ocenie etiologii bakteryjnego zapalenia płuc [14]. Niska swoistość w przypadku izolacji grzybów stanowi największe ograniczenie tej metody. W przywołanym w obecnej pracy piśmiennictwie nie wykazano bezpośredniej zależności między ilością grzybów izolowanych w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych a infekcją grzybiczą płuc.

Należy jednak podkreślić, że liczba doniesień w tym zakresie jest niewielka i ogranicza się do wybranych grup pacjentów. Również w naszym materiale nie stwierdzono przydatności przyjętego progu diagnostycznego do odróżniania kolonizacji od zakażenia. Wydaje się jednak, że wobec bardzo poważnych następstw kandydozy wśród chorych na raka płuca, posiewy ilościowe BAL-u w kierunku grzybów mogą wspomagać rozpoznanie, jeśli są stosowane wraz z innymi, dostępnymi obecnie metodami diagnostycznymi, co powinno być przedmiotem badań obejmujących większą grupę pacjentów.

Wnioski

1. Wśród chorych z guzem nowotworowym płuca grzyby *Candida* izolowano często.
2. Wzrost grzybów powyżej przyjętego progu diagnostycznego stwierdzano sporadycznie.
3. U żadnego z chorych nie rozpoznano klinicznych cech grzybiczego zapalenia płuc.

Praca została wygłoszona podczas IV Kongresu Polskiego Towarzystwa Kardio-Torakochirurgów w Warszawie, 12–14 czerwca 2008 roku.

Piśmiennictwo

1. Merad-Taoufik M, Antoun S, Ruffié P. [Fever and infectious complications in patient with lung cancer]. *Rev Pneumol Clin* 2008; 64: 99-103.
2. Berghmans T, Sculier JP, Klasterky J. A prospective study of infections in lung cancer patients admitted to the hospital. *Chest* 2003; 124: 114-120.
3. Brambilla C, Romand P, Vanderkerckhove C, Moro D. [Respiratory infection and bronchial cancer] *Rev Mal Respir* 1992; 9 Suppl 1: R49-R52.
4. Haron E, Vartivarian S, Anaissie E, Dekmezian R, Bodey GP. Primary *Candida* pneumonia. Experience at a large cancer center and review of the literature. *Medicine* 1993; 72: 137-142.
5. Masur H, Rosen PP, Armstrong D. Pulmonary disease caused by *Candida* species. *Am J Med* 1977; 63: 914-925.
6. Wood GC, Mueller EW, Croce MA, Boucher BA, Fabian TC. *Candida* sp. isolated from bronchoalveolar lavage: clinical significance in critically ill trauma patients. *Intensive Care Med* 2006; 32: 599-603.
7. Saito H, Anaissie EJ, Morice RC, Dekmezian R, Bodey GP. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary infiltrates in patients with acute leukemia. *Chest* 1988; 94: 745-749.
8. von Eiff M, Roos N, Fegeler W, von Eiff C, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. Hospital-acquired *Candida* and *Aspergillus* pneumonia-diagnostic approaches and clinical findings. *J Hosp Infect* 1996; 32: 17-28.
9. el-Ebiary M, Torres A, Fàbregas N, de la Bellacasa JP, González J, Ramirez J, del Baño D, Hernández C, Jiménez de Anta MT. Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients. An immediate postmortem histologic study. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 583-590.
10. Balducci L, Halbrook JC, Chapman SW, Vance RB, Thigpen JT, Morrison FS. Acute leukemia and infections: perspectives from a general hospital. *Am J Hematol* 1983; 15: 57-63.
11. Hummel M, Rudert S, Hof H, Heilmann R, Buchheidt D. Diagnostic yield of bronchoscopy with bronchoalveolar lavage in febrile patients with hematologic malignancies and pulmonary infiltrates. *Ann Hematol* 2008; 87: 291-297.
12. Rello J, Esandi ME, Díaz E, Mariscal D, Gallego M, Vallès J. The role of *Candida* sp isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest* 1998; 114: 146-149.
13. Kontoyiannis DP, Reddy BT, Torres HA, Luna M, Lewis RE, Tarrand J, Bodey GP, Raad II. Pulmonary candidiasis in patients with cancer: an autopsy study. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 400-403.
14. Hohenadel IA, Kiworr M, Genitsariotis R, Zeidler D, Lorenz J. Role of bronchoalveolar lavage in immunocompromised patients with pneumonia treated with a broad spectrum antibiotic and antifungal regimen. *Thorax* 2001; 56: 115-120.