

RODICA SELEVESTRU^{1,2}, MARIANA COTOROBAI¹, LUDMILA BALANEȚCHI¹,
CRISTINA TOMACINSCHI^{1,2}, DIANA ROTARU-COJOCARI¹, SVETLANA ȘCIUCA^{1,2}

INFECȚIA CU *ASPERGILUS FUMIGATUS* LA PACIENȚII CU MALADII CRONICE PULMONARE

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Departamentul Pediatrie, Clinică Pneumologie

²IMSP Institutul Mamei și Copilului

SUMMARY

ASPERGILUS FUMIGATUS INFECTION IN PATIENTS WITH CHRONIC LUNG DISEASE

Key words: *Aspergillus fumigatus*, cystic fibrosis, children

Aim. Evaluation of *Aspergillus fumigatus* infection in lung damage in patients with chronic lung disease.

Material and methods. The study included children with chronic bronchopulmonary diseases: 22 patients with CF (73,3%: 95%CI, 54,1-87,7 cases), with asthma 3 children (10%: 95%CI, 2,1-26,5), with unilateral lobe emphysema and pulmonary tuberculosis 2 children each (6,7%: 95%CI, 0,8-22,1) and obliterating bronchiolitis one child (3,3%: 95%CI, 0,1-17,2). The study was based on the analysis of the results of immunological investigations in serum. Quantitative assessment of anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies (IgM, IgA, IgG) by indirect haemagglutination methods. The results are expressed as a titer (norm <1/80). Assessment of serum IgE concentration was performed by immunoenzymatic analysis. The materials were statistically analyzed with Microsoft Excel, Epi Info -3,5 programs.

Results. The basic group consisted of 22 children with CF (9 boys 40,9%: 95%CI, 20,7-63,6 and 13 girls 59,1%: 95%CI, 36,4-79,3) and 8 children with chronic bronchopulmonary diseases (50%: 95%CI, 15,7-84,3 boys and girls). The total titer of Ac anti-*Aspergillus fumigatus* equal to 1:440±49,6 children in the baseline was assessed, and in children with chronic bronchopulmonary diseases the total titer of Ac anti-*Aspergillus fumigatus* was higher - 1:640±130,6, statistic T=1,8, p>0,05. Total serum IgE concentration in children with HR equal to 181,5±58,9 ME/ml, and children with chronic bronchopulmonary diseases 96,8±29,1 ME/ml, statistic T=0,74, p>0,05.

Conclusion. *Aspergillus fumigatus* infection is confirmed by the increased titer of hiter-IgE-associated anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies labeled in patients with cystic fibrosis.

РЕЗЮМЕ

ИНФЕКЦИЯ *ASPERGILUS FUMIGATUS* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

Ключевые слова: *Aspergillus fumigatus*, муковисцидоз, дети

Цель статьи. Оценка роли инфекции с *Aspergillus fumigatus* в повреждении легких у пациентов с хроническими заболеваниями легких.

Материал и методы. В исследование были включены дети с хроническими бронхолегочными заболеваниями: 22 пациента с муковисцидозом (73,3%: 95%ДИ, 54,1-87,7 случаев), 3 ребенка с астмой, (10%: 95%ДИ, 2,1-26,5), с односторонней долевой эмфиземой. и туберкулезом легких по 2 ребенка (6,7%: 95%ДИ, 0,8-22,1) и облитерирующий бронхиолит у одного ребенка (3,3%: 95% ДИ, 0,1-17,2). Исследование основано на анализе результатов иммунологических исследований сыворотки крови. Количественная оценка антител против *Aspergillus fumigatus* (IgM, IgA, IgG) методами непрямой гемагглютинации. Результаты выражаются в титре (норма<1/80). Определение сывороточной концентрации IgE проводили с помощью иммуноферментного анализа. Статистический анализ материалов проводился с помощью программ MicrosoftExcel, EpiInfo -3,5.

Результаты. Основную группу составили 22 ребенка с МВ (9 мальчиков 40,9%: 95%ДИ, 20,7-63,6 и 13 девочек 59,1%: 95%ДИ, 36,4-79,3) и 8 детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями (по 50%: 95%ДИ, 15,7-

84,3 мальчиков и девочек). Общий титр Ас anti-*Aspergillus fumigatus*, равный 1:440±49,6, оценивался у детей на исходном уровне и у детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями общий титр anti-*Aspergillus fumigatus* был выше – 1:640±130,6 (T=1,8, p>0,05). Общая концентрация Ig E в сыворотке крови у детей с ЧСС 181,5±58,9 МЕ/мл и у детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями 96,8±29,1 МЕ/мл (T=0,74, p>0,05).

Вывод. Инфекция *Aspergillus fumigatus* подтверждается повышенным титром ассоциированных с hiter-IgE антител против *Aspergillus fumigatus*, меченных у пациентов с муковисцидозом.

Introducere. *Aspergillus* reprezintă un fung care poate duce la o varietate de boli infecțioase, alergice, în funcție de statutul imun al gazdei sau de integritatea sistemului respirator [8].

Speciile de *Aspergillus* continuă să fie o cauză importantă de pericol pentru viață la pacienții imunocompromisi. Populația din grupul de risc este constituită din pacienți cu neutropenie prelungită, transplant de celule stem, transplant de organe solide, imunodeficiențe primare sau dobândite, administrare de corticosteroizi, pacienții cu fibroză chistică (FC) și altele [4].

Entitățile nozologice cauzate de *Aspergillus* sunt variate, de la o boală de tip alergic la infecții generalizate care pune în pericol viața.

Alături de criteriile tradiționale radiologice utile în diagnosticul infecției cu *Aspergillus* la pacienți, apar noi teste imunologice in/vitro.

Corticosteroizi, itraconazol și voriconazolul continuă să fie de bază a terapiei ABPA, dar alte preparate, cum ar fi posaconazolul, vitamina D, INF-omb recombinant și Regulator de conductanță transmembranară (CFTR) modulatori, au dat rezultate pozitive. Cu toate acestea, s-au efectuat puține studii să constituie instrumente certe pentru monitorizare și clasificare a acestei maladii [6].

La nivel pulmonar *Aspergillus* determină 4 forme: Aspergiloza invazivă (IA), Aspergiloza bronhopulmonară alergică (ABPA), care se găsește predominant la pacienții cu astm bronșic, fibroză chistică și bronșiectazii, Aspergiloza pulmonară cronică – o infecție pulmonară cu *Aspergillus* la pacienți cu sisteme imunitare sănătoase, astfel, fungul nu poate invada rapid pacientul, dar reușește să se instaleze în căile respiratorii sau sinusurile, țesutul pulmonar deteriorat de tuberculoză sau o infecție similară și Aspergilomul [5, 8].

Cu toate acestea, aspergiloza bronho-pulmonară alergică la pacienții cu FC poate fi adesea subdiagnosticat din cauza lipsei unor criterii de diagnostic standardizate.

Se cunosc cinci etape ale aspergilozei bronhopulmonare alergice (ABPA) [3, 6]. La prima etapa numită acută pacientul este diagnosticat cu toate caracteristicile tipice (IgE specific *Aspergillus*, anomalii radiologice, periferice, eozinofilie din sânge, precipitine serice specifice *Aspergillus*). La etapa a doua numită de remisie este caracteristică pacienților asimptomatic, fără infiltrate radiologice noi, fără creșterea IgE totală timp de cel puțin 6 luni. Exacerbarea este caracteristică următoarei etape, când apar noi infiltrate pulmonare pe radiografia toracică cu eozinofilie din sângele periferic și dublează nivelul

de IgE de remisie. În stadiul patru pacienții dezvoltă un răspuns al astmului bronșic dependent de corticosteroizi cu incapacitatea de a renunța la tratamentul cu corticosteroizi. Pe final se realizează boală pulmonară fibrotică cu fibroză ireversibilă și cavitație cronică la radiografie și tomografie.

Criterii majore de diagnostic pentru aspergiloza bronhopulmonară alergică (ABPA) [5, 8] sunt: astm bronșic, prezența infiltratelor pulmonare tranzitorii, reactivitate cutanată imediată la *Aspergillus fumigatus*, IgE serică totală crescută, precipitarea anticorpilor împotriva *Aspergillus fumigatus*, eozinofilie în sângele periferic, IgE și IgG serice crescute la *Aspergillus fumigatus*, bronșiectazii centrale/proximale cu conicitate normală a bronhiilor distale și criteriile minore: expectorarea sputei de o culoare aurie-maronie, cultura sputei pozitivă pentru speciile *Aspergillus* și reactivitate târzie a pielii (de tip Arthus) la *Aspergillus fumigatus*.

Stevens David A și colaboratorii 2003 propun criteriile de diagnostic pentru aspergiloza bronhopulmonară alergică (ABPA) [7]: FC cu deteriorare clinică acută sau subacută, concentrația totală IgE serică >1000 UI/ml, cu excepția cazului în care pacientul primește corticosteroizi sistemici, IgE pozitivă specifică serului (>0,35 kUA/L) sau test cutanat imediat, anticorpi precipitați la *Aspergillus fumigatus* sau anticorpi IgG serici la *Aspergillus fumigatus* printr-un test *in vitro*, infiltrate noi sau recente pe radiografia toracică sau CT care nu răspund la antibiotice și fizioterapie standard.

Scopul lucrării. Evaluarea infecției cu *Aspergillus fumigatus* în afectarea pulmonară la pacienții cu maladii cronice bronhopulmonare.

Material și metode. Lucrarea științifică a preconizat o cercetare retrospectivă, prin studiul de cohortă analitic. Au fost evaluate 120 fișe medicale a copiilor cu aspergiloza pulmonară diagnosticată prin analize de laborator, imagistic sau prezumtiv conform simptomelor și examenului clinic, internați în secția de pneumologie a IMSP IMC pe parcursul anului 2015-2020.

În studiu au fost incluși copiii cu maladii cronice bronhopulmonare: 22 pacienții cu FC (73,3%: 95%CI, 54,1-87,7 cazuri), cu astm bronșic 3 copii (10%: 95%CI, 2,1-26,5), cu emfizem lobar unilateral și tuberculoză pulmonară câte 2 copii (6,7%: 95%CI, 0,8-22,1) și bronșiolită obliterantă un copil (3,3%: 95%CI, 0,1-17,2). Studiul a avut la bază analiza rezultatelor investigațiilor imunologice în ser. Aprecierea cantitativă a anticorpilor

anti-*Aspergillus fumigatus* (IgM, IgA, IgG) prin metode de hemaglutinare indirecta. Rezultatele sunt exprimate sub forma de titru (norma <1/80). Aprecierea concentrației IgE în ser s-a efectuat prin analiza imunoenzimatică. Materialele au fost analizate statistic cu programe *Microsoft Excel*, *Epi Info* -3,5.

Rezultate și discuții. Aspergiloza bronhopulmonară alergică la copiii cu fibroză chistică: o actualizare a celor mai noi instrumente de diagnostic și abordări terapeutice. Fibroza chistică, cea mai frecventă boală genetică autozomală recesivă din populația caucasiană, se caracterizează prin infecții respiratorii frecvente și boli pulmonare progresive. Micozele se găsesc frecvent la pacienții cu FC și, printre aceștia, *Aspergillus fumigatus* este cel mai frecvent izolat. În timp ce bacteriile, în special *Pseudomonas aeruginosa*, au un bine stabilit efect negativ asupra bolii pulmonare, în FC, impactul infecțiilor fungice rămâne neclar. La pacienți cu FC, inhalarea *Aspergillus conidia* poate provoca ABPA, o boală pulmonară mediată de Th2 care poate contribui la progresia bolii. Caracteristici clinice, diagnostic, criteriile și tratamentul ABPA sunt încă o chestiune de dezbatere. Având în vedere consecințele unui ABPA depistat târziu diagnosticul sau riscul de supradiagnosticare ABPA, este imperativ ca criteriile de diagnostic să fie îndrumate, revizuite și standardizate [3, 6].

Lotul de bazăconstituit din 22 de copii cu FC (9 băieți 40,9%: 95%CI, 20,7-63,6 și 13 fete 59,1%: 95%CI, 36,4-79,3) și 3 copii cu afecțiuni bronhopulmonare cronice (câte 50%: 95%CI, 15,7-84,3 băieți și fete).

Speciile de *Aspergillus* sunt ciuperci saprofite omniprezente găsite în apă, soluri, degradare organică și în medii anterioare. Cea mai comună specie asociată bolilor respiratorii la om este *Aspergillus fumigatus*. Sporii *Aspergillus* sunt inhalați zilnic, de obicei fără consecințe, dar la persoanele susceptibile cu boli pulmonare, cum ar fi FC, inhalarea *Aspergillus* poate coloniza plămânul și provoacă aspergiloza bronhopulmonară alergică. ABPA este mediată Th2-boală pulmonară cauzată de hipersensibilitate la hifele *Aspergillus* care prezintă morbiditate semnificativă pentru pacienții cu FC și pot evolua spre bronșiectazii și fibroză pulmonară. În timp ce infecțiile bacteriene, în special cei cu *Ps.aeruginosa*, au un efect negativ bine stabilit asupra bolii pulmonare FC, impactul infecțiilor fungice rămâne neclar, dar un diagnostic precoce al ABPA pare clinic relevant pentru a evita deteriorarea funcției pulmonare [7].

A fost evaluat titrul total de Ac anti-*Aspergillus fumigatus* egal cu 1:440±49,6 la copiii cu FC (titru maximal 1:640, minim - 1:160, mediana - 1:360, Mo - 1:640), care prin valori majorate confirmă etiologia fungică a procesului pulmonar cronic. La copiii cu maladii cronice bronhopulmonare titrul total de Ac anti-*Aspergillus fumigatus* a fost mai crescut și a atins valori de 1:640±130,6 (titru maxim 1:1280, minim - 1:320, mediana - 1:640, Mo - 1:640, T statistic = 1,8, p>0,05), care au permis

confirmarea aspergilozei pulmonare la acești copii.

Concentrația IgE totală serică, care este considerată unul dintre markerii etiologiei fungice cu *Aspergillus*, la copiii cu FC era majorată semnificativ și egală cu 181,5±58,9 ME/ml (variații de la 8,7 până la 911,6 ME/ml, mediana - 77,9 ME/ml, Mo - 8,7 ME/ml). Acest parametru imunologic la copiii cu maladii cronice bronhopulmonare nu a prezentat valori foarte exagerate și a constituit 96,8±29,1 ME/ml (valoarea maximă de 182,9 ME/ml, minimă - 35,5 ME/ml, mediana - 104,7 ME/ml și mode (Mo) - 35,5 ME/ml, T statistic = 0,74, p>0,05).

Aspergillus fumigatus confirmă frecvent la pacienții cu FC. *Aspergillusfumigatus* este cel mai frecvent izolat, cu probe de sputa găsite pozitive la 16% dintre copii și adolescenți și până la 58% când se include și pacienți mai în vârstă. Utilizarea protocoalelor specifice de diagnosticare fungică constând din mediu selectiv pentru ciuperci și metode moleculare a crescut semnificativ detectarea *Aspergillus* în ultimii ani. Colonizarea căilor respiratorii poate fi suspectată atunci când *Aspergillus* este cultivat în două sau mai multe probe peste un an la pacienții fără simptome respiratorii noi și fără IgG fungice specific în ser. La copiii mai mici, datele sunt neclare și prevalența colonizării poate fi subestimată, deoarece aceasta grupa de vârstă produce rareori spută, iar rezultatele microbiologice se bazează pe tampoane de tuse, prevalența ABPA este estimată a fi între 10% și 25%, în funcție de studii [6].

Astfel, printre criteriile de diagnostice pentru aspergiloza bronhopulmonară alergică [1] sunt obligatorii testul cutanat de tip *Aspergillus*, care testează IgE pozitivă sau crescută împotriva *Aspergillus fumigatus*, niveluri totale crescute de IgE (>1000 UI/ml), și sunt necesare două din trei criterio prezentate mai jos: prezența anticorpilor IgG împotriva *Aspergillus fumigatus* sau a anticorpilor care precipită, prezența opacităților pulmonare trecătoare sau fixe pe Rx toracică, numărul de eozinofile >500 celule/μL la pacienții care nu au primit glucocorticoizi.

Dar Denning DW și colab. face diferență între noțiunile de definiții pentru colonizarea fungică, sensibilizarea fungică și aspergiloza bronhopulmonară alergică [2]. Astfel definiția propusă pentru colonizarea fungicăcuprinde una sau mai multe probe respiratorii pozitive pentru *Aspergillus* de culturi sau PCR, nu există simptome respiratorii majore noi, nu există dovezi ale ABPA sau ale altor forme de aspergiloza, fără imunocompromisuri evidente, ser negativ *Aspergillus* IgG. Criteriile pentru definiția de sensibilizare fungică prevede pozitivareatestului cutanat pentru *Aspergillus*, care testează IgE pozitiv sau crescut împotriva *Aspergillus fumigatus* fără inflamație sau leziuni pulmonare. Nu în ultim moment sunt prezentate criteriile pentru definiția de aspergiloza bronhopulmonară alergicăcaracteristică pacienților cu FC, pacienților cu testul cutanat prin IgE *Aspergillusfumigatus*pozitivi și celor cu concentrații crescute de IgE totale(>1000 UI/ml).

Concluzie. Infecția cu *Aspergillus fumigatus* la copiii este confirmată prin titrul majorat de anticorpi anti-*Aspergillus fumigatus* asociată de hiter-IgE marcată la pacienții cu fibroză chistică. Recunoașterea timpurie și tratamentul precoce al infecțiilor fungice pot fi fundamentale pentru a preveni progresia afectării pulmonare în fibroză chistică și alte boli pulmonare cronice la copii.

BIBLIOGRAFIE

1. Agarwal R., Chakrabarti A., Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013, Aug, 43(8):850-73. doi: 10.1111/cea.12141
2. David W. Denning, Cadranel Jacques et al., Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016 Jan;47(1):45-68 doi: 10.1183/13993003.00583-2015
3. King Jill, Brunel Shan F, Warris Adilia. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. *J. Infect.* 2016, Jul. 5; 72 Suppl: S50-5
4. Kousha M., et al. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* 2011; 20: 121, 156–174 DOI: 10.1183/09059180.00001011
5. Protocol Clinic Național „Aspergiloza pulmonară la copii”. Chișinău, 2021, 30 p.
6. Steinbach WJ. Pediatric aspergillosis: disease and treatment differences in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2005, Apr, 1;24(4):358-64
7. Stevens David A, Moss Richard B., et al.. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis - state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin. Infect. Dis.* 2003, Oct 1; 37 Suppl. 3, S225-64. doi: 10.1086/376525
8. Thomas F. Patterson, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 63, Issue 4, 2016, p.e1–e60