

WYSTĘPOWANIE DNA *PNEUMOCYSTIS CARINII* I PRZECIWCIAŁ PNEUMOCYSTOZOWYCH W SUROWICACH NIEMOWLĄT W OKRESIE FIZJOLOGICZNEGO SPADKU ODPORNOŚCI

ELŻBIETA GOŁĄB¹, ALICJA SOBOLEWSKA¹ I EWA MATYSIAK²

¹Zakład Parazytologii Lekarskiej, PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa;

²Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii, IMiD, ul. Kasprzaka 17a, 00-211 Warszawa

ABSTRACT. Occurrence of *Pneumocystis carinii* DNA and anti-*Pneumocystis* antibodies in sera of infants at the age of humoral response natural degradation. The polymerase chain reaction (PCR) and indirect immunofluorescent test (IF) were used for examination of serum samples obtained from infants with respiratory tract infections. Sixty (11,9%) out of the 503 examined infant samples were positive for anti-*P. carinii* IgM and 354 (70,4%) contained anti-*Pneumocystis* IgG. *P. carinii* DNA was found in 6 (6,7%) sera from 90 of infected infants. Five out these 6 samples were for anti-*Pneumocystis* antibodies positive; 4 contained both IgG and IgM classes and one had only IgG. The sixth sample had neither IgG nor IgM, despite of *P. carinii* DNA presence. The results of the studies indicated that for diagnosis *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in infants on serum specimens detection of antibodies by IF test is of greater value than *Pneumocystis* DNA amplification by PCR method.

Key words: antibodies, diagnosis, DNA, infants, *Pneumocystis carinii*, serum.

WSTĘP

Pneumocystis carinii jest pasożytniczym grzybem, szeroko rozpowszechnionym w populacji ludzkiej i zwierzęcej, który w stanach niewydolności układu odpornościowego może powodować śródmiąższowe, plazmatycznokomórkowe zapalenie płuc. Do grupy narażonych na pneumocystozę należą wcześniaki i niemowlęta w okresie fizjologicznego spadku odporności a także osoby w różnym wieku z zaburzeniami odporności o podłożu genetycznym oraz nabytym w wyniku chorób lub zabiegów leczniczych. Wcześniactwo czy też fizjologiczny spadek odporności występujący u niemowląt pomiędzy 10 a 24 tygodniem życia sprzyja powstawaniu zakażeń układu oddechowego o różnej etiologii, w tym wywoływanych przez *Pneumocystis*. Pneumocystoza u dzieci rozwija się początkowo wśród objawów niespecyficznych, takich jak: niepokój lub ospałość, brak apetytu, biegunka, przyśpieszony oddech, zasinięcia wokół oczu. W późniejszym okresie infekcji może pojawić się kaszel z odkrztuszaniem lepkiej wydzieliny. W ciągu 1 do 4 tygodni następuje rozwój objawów niewydolności oddechowej, którym czasami towarzyszy nieznaczne

podwyższenie ciepłoty ciała. Infekcje nieleczone trwają od 4 do 6 tygodni kończąc się zgonem u 20–50% dzieci (Arvin i wsp. 1990). Pneumocystoza może szerzyć się w postaci epidemicznej wśród hospitalizowanych wcześniaków i niemowląt, a także występować sporadycznie u noworodków lub u dzieci starszych z pierwotnymi i wtórnymi niedoborami odporności (Burke i Good 1972, Walzer i wsp. 1974).

Ze względu na mało charakterystyczny obraz kliniczny choroby rozpoznanie pneumocystozy wymaga przeprowadzenia badań laboratoryjnych, które w Polsce najczęściej opierają się na wykrywaniu swoistych przeciwciał w surowicy krwi dziecka. Jednak stan fizjologicznego obniżenia odporności utrudnia prawidłową interpretację otrzymywanych wyników, dlatego prowadzone są prace nad możliwością wykorzystania innych metod, w tym reakcji łańcuchowej polimerazy. Oparta na zasadzie wielokrotnej amplifikacji materiału genetycznego *in vitro* PCR, pozwala na wykrywanie pojedynczych form życiowych *Pneumocystis*, a jej wynik nie jest zależny od stanu odporności pacjenta. Reakcja PCR znalazła już zastosowanie w diagnostyce pneumocystozy do badania materiału pobranego z dróg oddechowych pacjenta (Wakefield i wsp. 1991, Richards i wsp. 1994, Rabodonirina i wsp. 1997, Gołąb i wsp. 2001). Przy poszukiwaniu nieinwazyjnych metod rozpoznawania infekcji *Pneumocystis* podejmowano też próby zastosowania PCR do wykrywania DNA grzyba w próbkach surowicy krwi u osób dorosłych (Atzori i wsp. 1995, Gołąb i wsp. 2002). Dotychczas nie sprawdzono użyteczności tej metody w badaniach surowic chorych dzieci.

Celem pracy było badanie surowicy krwi niemowląt w wieku fizjologicznego spadku odporności na obecność DNA *Pneumocystis carinii* oraz pneumocystozowych przeciwciał IgM i IgG.

MATERIAŁ I METODY

W kierunku pneumocystozowych IgM i IgG zbadano 503 surowice krwi pobrane od niemowląt, w wieku od 10 do 24 tygodni, z objawami zmian w układzie oddechowym.

DNA *Pneumocystis carinii* poszukiwano w 90 z 503 surowic, które uprzednio zbadano na obecność przeciwciał przeciwko *P. carinii*.

Grupę kontrolną stanowiło 25 próbek surowic pobranych od niemowląt w wieku od 2 do 12 miesiąca życia. Dzieci te nie miały objawów infekcji układu oddechowego i były zakwalifikowane do zabiegów chirurgicznych.

Metodę immunofluorescencji pośredniej z wykorzystaniem antygeny ludzkiego szczepu *P. carinii* (Nowosławski i Brzosko 1964) zastosowano do poszukiwania pneumocystozowych IgM i IgG.

DNA do reakcji PCR izolowano za pomocą zestawu QIAamp Blood Kit (Qiagen). Procedura izolacyjna przebiegała według instrukcji załączonej przez producenta. W skrócie: 200 µl surowicy krwi trawiono proteazą i za pomocą

alkoholu etylowego wytrącano DNA, które następnie oczyszczano poprzez kolejne wirowania z buforami płuczącymi. Oczyszczone i wysuszone w wirówce próżniowej próbki DNA zawieszano w 20 μ l jałowej H_2O i wykorzystywano w metodzie PCR.

W reakcji PCR amplifikowano fragmenty DNA genu kodującego mitochondrialne RNA dużej podjednostki rybosomów, wykorzystując startery pAZ102E i pAZ102H określające fragment wielkości 346 par zasad (Wakefield i wsp. 1990). Amplifikacja składała się z 40 cykli przebiegających według schematu: 1,30 min/94°C, 1,30 min/50°C, 2 min/72°C oraz z końcowego etapu wydłużania łańcucha przebiegającego w temp. 72°C w czasie 5 min. Wyniki reakcji odczytywano po elektroforetycznym rozdziale produktów amplifikacji w 2% żelu agarowym z dodatkiem bromku etydyny.

WYNIKI

Swoiste IgM wykryto u 60, a IgG u 354 spośród 503 zbadanych niemowląt z zakażeniami układu oddechowego (Tabela 1). W grupie kontrolnej złożonej z 25 niemowląt zdrowych nie wykryto przeciwciał klasy M, a swoiste IgG stwierdzono u 11 zbadanych dzieci.

Tabela 1. Wyniki badań serologicznych surowic pobranych od niemowląt z zakażeniami układu oddechowego

Wynik badania serologicznego	Liczba uzyskanych wyników
IgG -, IgM +	4
IgG +, IgM +	56
IgG +, IgM -	298
IgG -, IgM -	145
Razem	503

DNA *P. carinii* wykryto w 6 z 90 zbadanych próbek pochodzących od niemowląt z klinicznie rozpoznany zakażeniem dróg oddechowych. W surowicy krwi 5 z tych dzieci znaleziono przeciwciała pneumocystozowe, u 4 swoiste IgG i IgM a u jednego wyłącznie IgG. W jednej próbce surowicy zawierającej DNA *Pneumocystis* nie stwierdzono obecności przeciwciał pneumocystozowych (Tabela 2).

Tabela 2. Wyniki PCR dla surowic pobranych od dzieci z objawami zakażenia dróg oddechowych

Grupa surowic	Liczba próbek zbadanych	Liczba wyników dodatnich w PCR
IgG - IgM +	2	0
IgG + IgM +	31	4
IgG + IgM -	28	1
IgG - IgM -	29	1
Razem	90	6

Wszystkie z 25 próbek pobranych od zdrowych niemowląt z grupy kontrolnej były ujemne w badaniu PCR.

DYSKUSJA

Najwyższą wartość diagnostyczną w rozpoznawaniu pneumocystozowego zapalenia płuc mają próbki popłuczyn z pęcherzyków płucnych i oskrzeli (BAL), jednak ich uzyskanie wymaga przeprowadzenia inwazyjnego zabiegu bronchoskopii. Dlatego BAL badany jest w nielicznych przypadkach, najczęściej u osób dorosłych z AIDS. Przy diagnozowaniu pneumocystozy noworodków materiałem do badań są próbki surowicy krwi, w których poszukuje się swoistych przeciwciał lub antygenów *P. carinii*. Obecność swoistych IgM w surowicy chorego świadczy o aktywnej infekcji *Pneumocystis*. W przeprowadzonych przez nas badaniach swoiste IgM wykryto u 11,9% niemowląt z objawami mogącymi wskazywać na PCP (pneumocystozowe zapalenie płuc – ang. *Pneumocystosis carinii* pneumonia). Warto przypomnieć, że Sobolewska i Dzbeński (1997) wykryli pneumocystozowe IgM w 4,6% badając 8810 próbek surowic pacjentów w różnym wieku z zakażeniami układu oddechowego. W badaniach własnych przeprowadzonych w grupie 503 niemowląt z infekcjami układu oddechowego odsetek dzieci posiadających pneumocystozowe IgG wynosił 70,4%. Przeciwciała tej grupy wykrywano też u 44% zdrowych dzieci w wieku od 2 do 12 miesięcy. Pifer i wsp. (1978) stwierdzali obecność IgG u jednej trzeciej spośród 19 zbadanych zdrowych dzieci w przedziale wiekowym 4–6 miesięcy. Autorzy Ci odnotowali, że średnio 75 dzieci przebywa infekcję *Pneumocystis carinii* przed ukończeniem 4 roku życia.

W trakcie przeprowadzonych badań DNA *P. carinii* wykryto czworo dzieci z aktywną infekcją *P. carinii*, potwierdzoną obecnością swoistych przeciwciał klasy M. Można przypuszczać, że próbka surowicy, w której nie stwierdzono IgM, tylko swoiste IgG również pochodziła od niemowlęcia z aktywną pneumocystozą, ponieważ niekiedy wytwarzanie dziecięcych IgM jest blokowane przez przeniesione biernie poprzez łożysko matczyne IgG. Natomiast obecność DNA w surowicy krwi niemowlęcia, u którego nie wykryto swoistych dla *Pneumocystis* przeciwciał, nie może być podstawą do rozpoznania pneumocystozowego zapalenia płuc. Pifer i wsp. (1978) wykrywali krążące antygeny *P. carinii* w surowicach 15% nowotworowych pacjentów, bez zapalenia płuc. Natomiast Meyers i wsp. (1979), badając biorców szpiku kostnego, wykryli antygeny krążące *Pneumocystis* w 35 surowicach z grupy 52 pobranych od pacjentów z zapaleniem płuc na tle wirusowym bądź idiopatycznym.

Dane odnoszące się do obecności DNA *P. carinii* w surowicy krwi bywają sprzeczne i dotyczą osób dorosłych, głównie zarażonych wirusem HIV. Pojawianie się kwasów nukleinowych *Pneumocystis* w surowicach osób z HIV chorych na PCP stwierdzali Gołąb i wsp. (2002), Atzori i wsp. (1995), Schluger

i wsp. (1992), podczas gdy Tamburrini i wsp. (1996) oraz Lipschik i wsp. (1992) znajdowali DNA grzyba jedynie w komórkach krwi tej grupy pacjentów. DNA występowało zwykle w stanach zaawansowanej immunosupresji, a jego obecność nie oznaczała aktywnej infekcji (Gołąb i wsp. 2002). Aczkolwiek w przeprowadzonych badaniach własnych czułość metody PCR mogła być zaniżona z powodu diagnozowania próbek pobieranych niekiedy kilka dni po wprowadzeniu leczenia przeciwko *Pneumocystis*, uzyskane wyniki wydają się potwierdzać brak istotnych zależności pomiędzy obecnością DNA *P. carinii* w surowicy krwi a zapaleniem płuc również w grupie niemowląt.

Rezultaty przeprowadzonych badań pozwalają na stwierdzenie, że przy ocenie próbek surowicy krwi w procesie rozpoznawania przypadków PCP u niemowląt bardziej użyteczne, aniżeli poszukiwanie DNA *P. carinii* za pomocą PCR, jest wykrywanie przeciwciał przeciwko *Pneumocystis* w odczynie immunofluorescencji pośredniej.

LITERATURA

- Arvin A.M., Yeager A.S. 1990. Protozoan and helminth infections (including *Pneumocystis carinii*). In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant* (Eds. J.S. Remington and J. O. Klein) W.B. Saunders Co., Philadelphia, 528–573.
- Atzori C., Jang-Jih L., Jiang B., Bartlett M.S., Orlando G., Queener S.F., Smith J.W., Cargnel A., Lee Ch. 1995. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reactions on serum specimens. *Journal of Infectious Disease* 172: 1623–1626.
- Burke B.A., Good R.A. 1972. *Pneumocystis carinii* infection. *Medicine* 52: 23.
- Gołąb E., Sobolewska A., Bitkowska E., Bednarska A., Berak H., Dzbeński T.H., Horban A. 2001. „Nested” PCR w diagnostyce przypadków pneumocystozowego zapalenia płuc (PCP) u pacjentów z AIDS. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 521–525.
- Gołąb E., Sobolewska A., Bitkowska E., Bednarska A., Berak H., Dzbeński T.H. 2002. Detection of serum *Pneumocystis carinii* DNA in the course of *P. carinii* pneumonia in experimental animals and HIV-infected patients. *Acta Parasitologica* 47: (w druku).
- Lipschik G.Y., Gill V.J., Lundgren J.D., Andrawis V.A., Nelson N.A., Nielsen J.O., Ognibene F.P., Kovacs J.A. 1992. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. *Lancet* 340: 203–206.
- Meyers J.D., Pifer L.L., Sale G.E., Thomas E.D. 1979. The value of *Pneumocystis carinii* antibody and antigen detection for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia after marrow transplantation. *American Review of Respiratory Disease* 120: 1283–1287.
- Nowosławski A., Brzosko W. 1964. Indirect immunofluorescent test for serodiagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. *Bulletin de L'Academie Polonaise des Science* 12: 143–147.
- Pifer L.L., Hughes W.T., Stagno S., Woods D. 1978. 41 *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* 61: 35–41.
- Rabodonirina M., Raffinot D., Cotte L., Boibieux A., Mayencon, M., Bayle G., Persat F., Rabatel F., Trepo C., Peyramond D., Piens M-A. 1997. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from Human Immunodeficiency Virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2748–2751.
- Richards C.G.M., Wakefield A.E., Mitchell C.D. 1994. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in nasopharyngeal aspirates of leukaemic infants with pneumonia. *Archives of Disease in Childhood* 71: 254–255.

- Schluger N., Godwin T., Sepkowitz K., Armstrong D., Bernard E., Rifkin M., Cerami A., Bucala R. 1992. Application of DNA amplification to pneumocystosis: presence of serum *Pneumocystis carinii* DNA during human and experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of Experimental Medicine* 176: 1327-1333.
- Sobolewska A., Dzbeński T.H. 1997. Epidemiologia i diagnostyka laboratoryjna inwazji powodowanych przez *Pneumocystis carinii*. *Przegląd Epidemiologiczny* 51: 1-2.
- Tamburrini E., Mencarini P., Visconti E., Zolfo M., De Luca A., Siracusano A., Ortona E., Wakefield A.E. 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1586-1588.
- Wakefield A.E., Pixley F.J., Banerji S., Sinclair K., Miller R.F., Moxon E.R., Hopkin J.M. 1990. Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences for *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 43: 69-76.
- Wakefield A.E., Guiver L., Miller R.F., Hopkin J.M. 1991. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 337: 1378-79.
- Walzer P.D., Perl D.P., Krogstad D.J., Rawson P.G., Schultz M.G. 1974. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Annals of Internal Medicine* 80: 83-93.