

Valentina Črne<sup>1</sup>, Miha Skvarč<sup>2</sup>

## Diagnostični pristop pri bolniku s sumom na okužbo s *Pneumocystis jirovecii*

### *Diagnostic Approach in Patients with Suspected Pneumocystis jirovecii Infection*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Pneumocystis jirovecii*, laktatna dehidrogenaza, beta-D-glukan, direktna imunofluorescenca, verižna reakcija s polimerazo v realnem času

*Pneumocystis jirovecii* pljučnica se pogosto pojavlja pri imunsko oslabeledih bolnikih. Povzroča veliko smrtnost, zato je pomembno, da nanjo pri teh bolnikih pomislimo ter uporabimo ustrezne diagnostične metode. Ob sumu nanjo opravimo slikovno diagnostiko (rentgenogram in včasih tudi računalniško tomografijo pljuč), odvzamemo kri za biokemične preiskave (laktatno dehidrogenazo in beta-D-glukan) ter izločke dihalnih poti za direktni mikroskopski prikaz (klasično barvanje in direktna imunofluorescenca) ali za verižno reakcijo s polimerazo. Najboljša kužnina je bronhoalveolarni izpirek, najboljčutljivejša in najbolj specifična metoda pa reakcija verižne polimeraze, s katero lahko zaznamo tudi kolonizacijo s *P. jirovecii*. Najboljši način, da ločimo kolonizacijo od simptomatske okužbe, je, da upoštevamo vse rezultate, ki jih dobimo z naštetimi metodami.

#### ABSTRACT

KEY WORDS: *Pneumocystis jirovecii*, lactate dehydrogenase, beta-D-glucan, direct immunofluorescence, real-time polymerase chain reaction

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia is common in immunocompromised patients. It has significant mortality, which is why it is important to consider an infection with *P. jirovecii* in these patients and use appropriate diagnostic methods. When the clinical features indicate *P. jirovecii* pneumonia, we perform imaging studies (chest radiograph and chest computer tomography), take blood for biochemical analysis (lactate dehydrogenase and beta-D-glucan) and respiratory specimens for direct microscopic examination (conventional staining and direct immunofluorescence) or polymerase chain reaction. The best specimen is the bronchoalveolar lavage and the most sensitive and specific method is polymerase chain reaction, with which we can even detect colonization with *P. jirovecii*. The best way to differentiate colonization from a symptomatic infection is by taking into consideration several methods described above.

<sup>1</sup> Valentina Črne, dr. med., Splošna bolnišnica Novo mesto, Šmihelska cesta 1, 8000 Novo mesto; tinacrne@gmail.com

<sup>2</sup> Asist. dr. Miha Skvarč, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

## UVOD

*Pneumocystis jirovecii* je obligatorni zunajcelični mikroorganizem, ki spada med oportunistične glive kvasovke. Najprej so ga imenovali *Pneumocystis carinii*, pozneje pa so ga pri ljudeh preimenovali v *P. jirovecii*, saj so ugotovili, da *P. carinii* povzroča okužbo pri podganah, *P. jirovecii* pa pri ljudeh (1). Pri osebah z oslabiljenim imunskim sistemom lahko povzroči *P. jirovecii* pljučnico (angl. *pneumocystis pneumonia*, PCP), ki ima veliko smrtnost (2). Večino bolnikov s PCP v svetu še vedno predstavljajo bolniki, okuženi s HIV, vendar razširjenost PCP pri tovrstnih bolnikih od uvedbe kemoprofilakse in protiretrovirusnega zdravljenja upada (3). Povečuje pa se razširjenost pri osebah z imunskimi pomanjkljivostmi, ki niso okuženi s HIV, kot so bolniki po presaditvi čvrstih organov in krvotvornih matičnih celic, bolniki z rakavimi ali revmatološkimi boleznimi, bolniki na terapiji z glukokortikoidi, purinskimi analogi, kalcinevrinskimi zaviralci, monoklonskimi protitelesi proti CD52 in CD20 ter antagonisti dejavnika tumorske nekroze  $\alpha$  (4). Prenos okužbe še ni popolnoma jasen, sprva so mislili, da gre za reaktivacijo latentne okužbe, pridobljene v otroštvu, vendar je vse več dokazov, da gre za *de novo* okužbo, ki se prenaša z bolnika na bolnika ter s koloniziranih oseb (osebe po preboleli PCP, zdravstveni delavci, otroci) (1, 2, 5). Kolonizacijo opredelimo kot odkritje *P. jirovecii* brez simptomov in znakov PCP (1). Rezultati raziskav so pokazali, da ima 83 % otrok v starosti štiri let protitelesa proti *P. jirovecii* in da je 20 % zdravih odraslih oseb koloniziranih s *P. jirovecii*. PCP se kaže z neznačilnimi simptomi in znaki, kot so dispneja ob naporu in suh kašelj, ki se z razvojem bolezni stopnjujeta, ter subfebrilna temperatura. Pri pregledu je bolnik tahipnoičen, tahikarden, hipoksemičen, pri avskultaciji pljuč ni patoloških fenomenov. Zanesljiva diagnostika, zdravljenje in kemoprofilaksa s trimetoprim/sulfametoksazolom (TMP/SMX) so

pomembni, saj je smrtnost PCP pri bolnikih, okuženih s HIV, 10 do 20 %, pri ostalih imunsko oslabilih pa 30 do 60 % (2). V članku bomo obravnavali diagnostične postopke pri osebah, za katere sumimo, da imajo PCP.

## DIAGNOSTIČNE METODE

Diagnostične metode, ki so v podporo klinični sliki, so naslednje:

- slikovna diagnostika,
- nespecifične biokemične preiskave (laktatna dehidrogenaza (LDH)),
- glivno specifične biokemične preiskave (beta-D-glukan) ter
- mikrobiološke mikroskopske in molekularne preiskave.

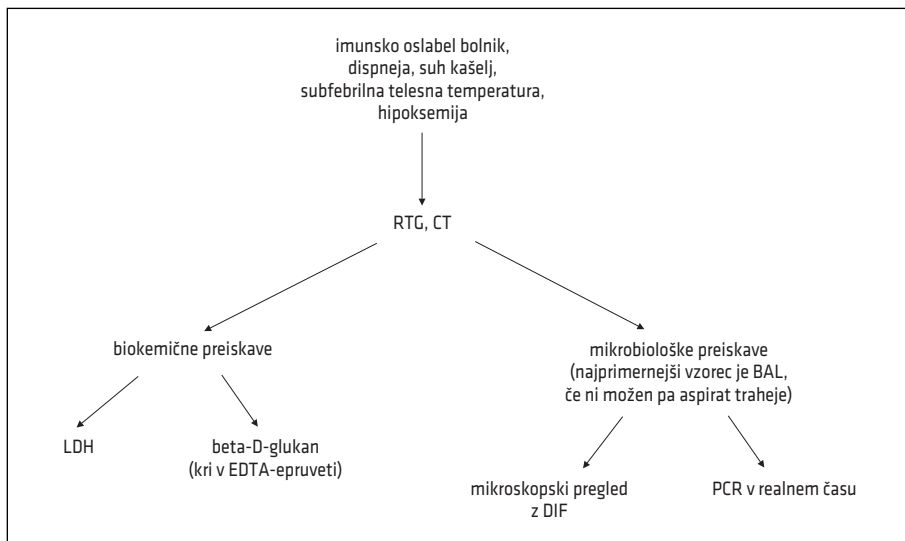
Zaradi nespecifične klinične slike nam je pri sumu na PCP v pomoč diagnostični protokol (slika 1).

### Slikovna diagnostika

Na RTG-sliki pljuč so najpogosteje prisotni obojestranski perihilarni infiltrati, ki dajejo sliko metulja. Infiltrati so z napredovanjem bolezni vedno bolj homogeni in difuzni. Redkeje vidimo posamezne ali številne nodule, infiltrate v zgornjih režnjih, pnevmotoraks ali plevralni izliv. Občutljivejša metoda je CT pljuč z značilno obojestransko sliko mlečnega stekla (2).

### Laktatna dehidrogenaza

Neinvazivni serološki označevalci so lahko v veliko pomoč pri diagnozi in spremljanju bolezni, še posebno, če invazivna diagnostika ni možna. LDH je citoplazemski encim, ki je prisoten v večini organskih sistemov in se sprošča iz celic ob poškodbi citoplazemske membrane (6). Pri bolnikih s PCP najdemo zvišane serumske koncentracije LDH, ki so posledica poškodbe pljuč, ki jo povzroči patogen. Zvišane koncentracije LDH imajo kot označevalec za PCP 78 do 100 % občutljivost in 45 do 78 % specifičnost. Biti pa moramo previdni, saj



**Slika 1.** Diagnostični protokol pri sumu na *Pneumocystis jirovecii* pljučnico. LDH – laktatna dehidrogenaza, EDTA – etilendiamintetraoetna kislina (angl. *ethylenediaminetetraoetic acid*), DIF – direktna imunofluorescenca, PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*).

se zvišane koncentracije LDH pojavljajo tudi pri boleznih, ki zajemajo ostale organske sisteme, negativne vrednosti pa še ne izključijo okužbe (7).

### Beta-D-glukan

Je glivni označevalec, ki izvira iz celične stene različnih gliv in je najboljši serološki označevalec za diagnozo PCP (4). Serumске koncentracije so, poleg bolnikov s PCP, zvišane tudi pri bolnikih s kandidemijo, z aspergilozo, s fusariozo, trihosporiozo in histoplazmozo. Vendar so vrednosti pri tovrstnih bolnikih nižje kot pri PCP, kjer so vrednosti zelo visoke (8). Diagnostični test Fungitell® proizvajalca Associates of Cape Cod ima mejo pozitivnosti postavljeno pri 80 pg/mL (9). Občutljivost pri tej vrednosti testa je 92 %, specifičnost pa 65 % (10). Obetaven pristop, ko invazivna diagnostika ni možna, je kombinacija klinične slike, vrednosti LDH in beta-D-glukana (7).

### Mikroskopske diagnostične metode

*P. jirovecii* ni možno kultivirati na gojiščih, zato je potreben direktni mikroskopski dokaz

organizma v izločkih dihalnih poti, kot so izmeček, inducirani izmeček, aspirat traheje, bronhoalveolarni izpirek (angl. *bronchoalveolar lavage*, BAL) ali vzorec biopsije pljuč (11). Občutljivost mikroskopskega prikaza je odvisna od kvalitete in vrste vzorca (12). Občutljivost barvanja pri BAL-vzorcih je 70 do 92 %, pri vzorcih izmečka pa le 38 do 53 % (13, 14). Zato je najbolj priporočljiv vzorec za diagnostiko BAL, saj pri osebi, ki je okužena, vsebuje najvišjo koncentracijo gliv. Aspirat traheje vsebuje nižjo koncentracijo gliv, najnižjo pa izmeček. Koncentracija gliv oz. glivno breme je lahko manjše pri imunsko oslabelih bolnikih brez okužbe s HIV, pri bolnikih, ki so na protiretrovirusnem zdravljenju, in pri bolnikih, ki prejema kemoprofilakso s TMP/SMX (2, 12). Trofične oblike dokažemo z modificiranim barvanjem po metodi Papanicolaou ali Wright-Giemsa. Ciste obarvamo s srebrenjem z Gomori metamin srebrom. Zaradi možne prisotnosti gliv kvasovk si s temi barvanji teže razlagamo rezultate v izmečkih dihal. Priporočljivejša je metoda direktne imunofluorescence (DIF), kjer obarvamo

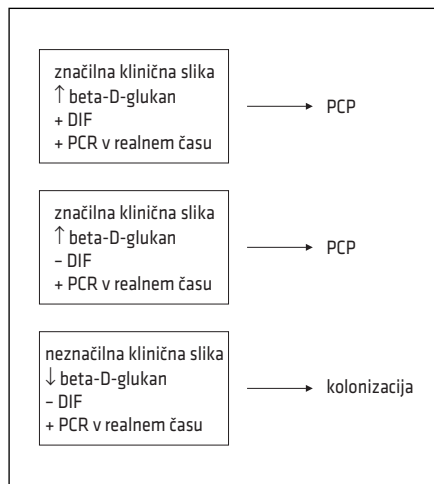
tako trofične kot cistične oblike, metoda pa ima večjo specifičnost in občutljivost kot navadno barvanje (2). Pri DIF uporabljamo s fluoresceinom označena monoklonska protitelesa, ki se vežejo na antigen na površini *P. jirovecii*. Za pozitiven rezultat štejemo prisotnost vsaj dveh fluorescentno zelenih cističnih formacij v vzorcu. Občutljivost DIF je 96 %, specifičnost pa 95 % (15). Večjemu številu bolnikov, ki imajo klinično sliko, značilno za PCP, mikroskopsko ne dokažemo okužbe s *P. jirovecii* (16). Zato so bile razvite molekularne metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR).

### Molekularne diagnostične metode

Metodo PCR uporabljamo za odkrivanje *P. jirovecii*, tarčni geni pa so dihidropteroat sintetaza (DHPS), dihidrofolat reduktaza (DHFR), notranji prepisujoči se distančnik (ITS), rRNK mitohondrijske velike podenote (mtLSU rRNK), 5S rRNK,  $\beta$ -tubulin, glavni površinski glikoprotein (angl. *major surface glycoprotein*, MSG) ter genski lokusi *kex-1* in *cdc2*. Občutljivost je večja pri PCR-protokolih, ki ciljajo na gene, prisotne v več kopijah v organizmu, kot sta MSG in mtLSU rRNK. Sprva smo za diagnostiko uporabljali standardni PCR, ki temelji na pomnoževanju specifičnega odseka DNK *P. jirovecii* in zaznavanju PCR-produkta s pomočjo elektroforeze. S to metodo zaznamo že zelo majhne količine DNK-pnevmociste, vendar ima lahko metoda majhno specifičnost, veliko lažno pozitivnih rezultatov in majhno pozitivno napovedno vrednost. Pri standardnem PCR je večja verjetnost kontaminacije vzorca zaradi odprtega sistema in številnejših korakov, ki so potrebni, da obdelamo vzorec. Zato smo začeli uporabljati verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction*, qPCR). qPCR je hitrejša (manj kot 3 ure) in občutljivejša metoda. Raziskave so pokazale, da je občutljivost tovrstne

PCR od 82 do 100 %, specifičnost pa od 83 do 100 % (4).

Neujemanja med pozitivnim PCR-rezultatom in negativnim rezultatom barvanja so diagnostični problem pri bolnikih s sumom na PCP (12). Če v vzorcu z DIF odkrijemo značilne cistične formacije, hkrati pa je pozitiven tudi rezultat PCR, ima bolnik ob ustrezni klinični sliki skoraj zanesljivo PCP. Več težav imamo z določanjem, kdaj je prisotna kolonizacija. S standardnim PCR težko ločimo med simptomatsko okužbo in kolonizacijo, z raziskavami pa so pokazali, da bi s qPCR lahko ločili med kolonizacijo in PCP. Vendar je tudi s qPCR razlaga rezultatov v primeru kolonizacije lahko težavna. Metoda ni standardizirana, zato nimamo določenih primernih mejnih vrednosti in tarčnih genov, težava pa je tudi, da ne moremo nadzirati količine DNA v vzorcu dihalnih poti (4). Zato je za razlikovanje PCP in kolonizacije najprimerneje upoštevati kombinacijo klinične slike, vrednosti beta-D-glukana, barvanja z DIF in rezultatov qPCR, kar je prikazano na sliki 2 (4, 11, 12).



**Slika 2.** Razlikovanje *Pneumocystis jirovecii* pljučnice ter kolonizacije. PCP – *Pneumocystis jirovecii* pljučnica, DIF – direktna imunofluorescenca, PCR – verižna reakcija s polimerazo,  $\uparrow$  – visoka vrednost, + – pozitiven izvid, – – negativen izvid,  $\downarrow$  – nizka vrednost.

Metoda PCR je zelo pomembna tudi za genotipizacijo pnevmocist, ker na ta način lahko sledimo prenosom okužbe s človeka na človeka in načrtujemo ustrezno preventivo. Z metodo PCR so pri pnevmocisti odkrili tudi mutacijo na genu DHPS, ki povzroča odpornost na TMP/SMX (11).

## ZAKLJUČEK

Vse več je bolnikov z imunskimi pomanjkljivostmi, bodisi okuženimi s HIV ali pa je

imunska oslabelost posledica imunosupresivnih zdravil oziroma določenih bolezni. Pri tovrstnih bolnikih moramo ob pojavu dispneje, kašlja in subfebrilne telesne temperature (značilni trias za PCP) pomisliti na morebitno PCP in uporabiti ustrezen diagnostični protokol, saj zgodnja diagnoza in zdravljenje pomembno zmanjšata smrtnost bolezni.

---

## LITERATURA

1. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25 (2): 297–317.
2. Thomas CF Jr, Limper AH. *Pneumocystis pneumoniae*. *N Engl J Med.* 2004; 350 (24): 2487–98.
3. Morris A, Lundgren JD, Masur H, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10 (10): 1713–20.
4. Reid AB, Chen SC, Worth LJ. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients: new risks and diagnostic tools. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24 (6): 534–44.
5. Le Gal S, Damiani C, Rouille A, et al. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (7): 62–71.
6. Glick JH Jr. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme and total lactate dehydrogenase values in health and disease, and clinical evaluation of these tests by means of discriminant analysis. *Am J Clin Pathol.* 1969; 52 (3): 320–8.
7. Esteves F, Lee CH, de Sousa B, et al. (1-3)-Beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* V tisku 2014.
8. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3- $\beta$ -D-glucan for *pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (1): 7–15.
9. Fungitell Assay [internet]. East Falmouth: Associates of Cape Cod; c1974-2014 [citirano 19. 3. 2014]. Dosegljivo na: <http://www.acciusa.com/clinical/fungitell/index.html>
10. Morris AM, Masur H. A serologic test to diagnose *pneumocystis pneumonia*: are we there yet? *Clin Infect Dis.* 2011; 53 (2): 203–4.
11. Durand-Joly I, Chabe M, Soula F, et al. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 45 (3): 405–10.
12. Fan LC, Lu HW, Cheng KB, et al. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e73099.
13. Wakerfield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet.* 1990; 336 (8713): 451–53.
14. Lipschik GY, Gill VJ, Lundgren JD, et al. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. *Lancet.* 1992; 340 (8813): 203–6.
15. MERIFLUOR *Pneumocystis* [internet]. Cincinnati: Meridian Bioscience; c1977-2014 [citirano 19. 3. 2014]. Dosegljivo na: <http://www.meridianbioscience.com/diagnostic-products/respiratory/merifluor/merifluor-pneumocystis.aspx>
16. Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, et al. Polymerase chain reaction for diagnosing *pneumocystis pneumonia* in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest.* 2009; 135 (3): 655–61.