

Mikroorganizmy z rodzaju *Pneumocystis* – komensale i patogeny na granicy królestw

Sebastian Gnat, Dominik Łagowski

z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Microorganisms of the genus *Pneumocystis* – commensals and pathogens on the border of the kingdoms

Gnat S., Łagowski D., Sub-Department of Microbiology, Institute of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Pneumocystis fungi are closely related unicellular, low-virulence microorganisms occurring commonly in the lungs of humans and many other mammalian species. The transient primary colonization by these opportunistic fungi mainly affects the upper respiratory tract and most often occurs in adolescence. Re-colonization, manifested by *Pneumocystis* pneumonia (PCP), may occur in the immunocompromised individuals or may result from other accompanying infectious disease. The major risk factor for PCP development is the reduced count of CD4⁺ T cells. Investigations of the biology of *Pneumocystis* fungi have long been limited due to the lack of a reliable and reproducible method for their *in vitro* cultivation. Nevertheless, the clinical characteristics have been described based on observations of both human and animal cases. These fungal infections can be symptomatic as well as subclinical or latent, which is common in rats, mice, guinea pigs, rabbits, cats, sheep, and various species of wild animals. An important role as a reservoir of these fungi is played by dogs. Such breeds as smooth and wire-haired Miniature Dachshunds, Miniature Spitz dogs, and English Toy Spaniels are especially predisposed to colonization by these fungi. This article presents the characteristics of fungi from the genus *Pneumocystis*, with particular emphasis on the life cycle of these pathogens. The other aspects discussed, are the current diagnostic and therapeutic challenges associated with this infectious disease.

Keywords: fungi, commensals, protozoa, *Pneumocystis*, pneumonia.

Grzyby z rodzaju *Pneumocystis* to blisko spokrewnione, jednokomórkowe mikroorganizmy o niskiej zjadliwości, które występują pospolicie w płucach ludzi i wielu innych gatunków ssaków (1). Pierwotna, przejściowa kolonizacja tym grzybem oportunistycznym obejmuje przede wszystkim górne drogi oddechowe, a dochodzi do niej najczęściej w okresie młodocianym (2). Wówczas u zakażonego osobnika można wykryć we krwi swoiste przeciwciała (3). Do powtórnej kolonizacji, objawiającej się pneumocystozowym zapaleniem płuc (PCP), może dochodzić w stanach immunosupresji bądź w przebiegu innych towarzyszących chorób zakaźnych (4). Najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju PCP jest obniżenie liczby limfocytów T CD4⁺ (5).

Badania biologii grzybów z rodzaju *Pneumocystis* od dawna ograniczone są brakiem wiarygodnej i powtarzalnej metody hodowli *in vitro*, niemniej jednak charakterystyka kliniczna została opisana na podstawie obserwacji przypadków zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Ponadto grzyby *Pneumocystis* spp.

uzyskane z symptomatycznych zakażeń u różnych żywicieli, w tym u psów, świń, koni i kóz, są morfologicznie nie do odróżnienia, ale są specyficzne dla gatunku żywiciela (3). Zakażenia mogą mieć także formę subkliniczną lub utajoną, co jest powszechne u szczurów, myszy, świń morskich, królików, kotów, owiec i różnych gatunków dzikich zwierząt (6). W tym artykule przedstawiona jest charakterystyka grzybów z rodzaju *Pneumocystis* ze szczególnym uwzględnieniem cyklu życiowego patogenu. Drugim omawianym aspektem są aktualne wyzwania diagnostyczne związane z tą chorobą zakaźną.

Rys historyczny

Cysty grzybów z rodzaju *Pneumocystis* zostały po raz pierwszy zaobserwowane w 1909 r. w płucach świnki morskiej zakażonej eksperymentalnie *Trypanosoma cruzi* przez brazylijskiego lekarza Carlosa Chagasa. Wówczas patogen został zdiagnozowany jako nowa, nieopisana dotychczas forma świdorowca. Dwa lata później ten sam badacz znalazł podobne cysty w płucach człowieka, który zmarł z powodu ostrej trypanosomozy (7). Antonio Carini również zaobserwował cysty u szczurów oraz u świń morskich zakażonych *Trypanosoma lewisi*, jednak uznał, że nie jest to odmiana świdorowca. W 1912 r. Pierre i Marie Delanoë dokonali pierwszej klasyfikacji mikroorganizmów w rodzaju *Pneumocystis*, twierdząc, że są to pierwotniaki. Nadana nazwa rodzajowa miała odzwierciedlać szczególnie wysokie powinowactwo patogenu do płuc, stąd określenie *pneumo* oraz charakterystyczną formę morfologiczną cysty, jaką przybierały drobnoustroje, stąd przyrostek – *cystis*. Pierwszym opisanym gatunkiem był *P. carinii* (obecna nazwa nomenklaturyczna to *P. jirovecii*), nazwa gatunkowa została wybrana na cześć włoskiego badacza Antonio Cariniego, który dostarczył materiału do badań (8). Pierwsze przypadki kliniczne zdiagnozowano podczas II wojny światowej. Badacze Vanek i Jirovec opisali śródmiąższowe zapalenie płuc spowodowane przez *P. carinii* u trzech niedożywionych niemowląt. Epidemiologiczny wybuch chorób o tej etiologii rozpoczął się w 1981 r., kiedy opisano 15 przypadków u pacjentów będących nosicielami ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV). Późniejsza pandemia zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS) doprowadziła do większego zainteresowania tymi mikroorganizmami (9). Aż do lat 50. XX wieku *P. carinii* nie został wyizolowany *in vitro*, stąd liczne kontrowersje i dyskusje dotyczące albo pierwotniaczego, albo

grzybiczego charakteru patogenu. Dopiero za pomocą biologii molekularnej udowodniono, że drobnoustroj ma większe podobieństwo z grzybami niż z pierwotniakami. Współczesne analizy filogenetyczne oparte na analizie sekwencji małych podjednostek rRNA oraz innych konserwatywnych genów wykazały, że ewolucyjnie najbliższymi krewnymi *P. carinii* były drożdże *Schizosaccharomyces pombe* i patogen roślinny *Taphrina deformans* (10). Ponadto udowodniono, że wszystkie izolaty kliniczne *Pneumocystis* są podobne morfologicznie, ale różnią się genetycznie i są swoiste dla gospodarza (6).

Współczesna taksonomia

Z perspektywy współczesnej taksonomii opisano i zaakceptowano tylko pięć gatunków grzybów z rodzaju *Pneumocystis*. *Pneumocystis carinii* i *P. wakefieldiae* wyizolowane po raz pierwszy od szczurów wędrownych (*Rattus norvegicus*; 11, 12), *P. jirovecii* od ludzi, nazwa nadana na cześć czeskiego parazytologa Otto Jiroveca (13, 14), *P. murina* od pospolitych myszy domowych (*Mus musculus*; 15) i *P. oryctolagi* od królików europejskich (*Oryctolagus cuniculus*; 16). Specyficzny podtyp tego ostatniego gatunku związany z zakażeniami u koni został zidentyfikowany na podstawie analizy genu rRNA (17). Dodatkowo trwa dyskusja nad kolejnym gatunkiem *P. canis*, odpowiedzialnym za zakażenia u psów. Na obecną chwilę gatunek ten jest określany formalnie terminem *Pneumocystis carinii formae speciales canis* (18, 19).

Badania taksonomiczne tej grupy mikroorganizmów są jednak trudne, a obecny system klasyfikacyjny pozostaje raczej niepewny. Pierwotnie organizmy z rodzaju *Pneumocystis* klasyfikowane były jako jednokomórkowe pierwotniaki w typie *Sarcocystis* (20). Rewizji klasyfikacyjnej dokonano na podstawie sposobu namnażania tych mikroorganizmów, podobnego do tworzenia askospor przez drożdże, struktury organelli i wyników barwienia do obserwacji w mikroskopie świetlnym. Zastosowanie kryterium filogenetycznego opartego na sekwencjach rRNA wskazało, że drobnoustroje z rodzaju *Pneumocystis* są najbliższymi spokrewnione z grzybami z klasy Ascomycetes (8). Niemniej jednak właściwości biologiczne tych drobnoustrojów są zbliżone do tych, jakie występują u pierwotniaków, przede wszystkim wymieniane cechy dotyczą wrażliwości na leki stosowane w leczeniu zakażeń pierwotniaczych i oporność na większość leków przeciwgrzybiczych (9).

Ekologia i rezerwuary

Grzyby z rodzaju *Pneumocystis* są uważane za wszechobecne, a jeden z ich istotniejszych rezerwuarów stanowią płuca ssaków lądowych z prawie wszystkich regionów geograficznych, z możliwym wyjątkiem Arktyki i Antarktydy, gdzie ich obecność nie została jeszcze zbadana (21). W literaturze nie ma również doniesień o występowaniu grzybów *Pneumocystis* spp. u ssaków morskich (6). Dane epidemiologiczne i eksperymentalne wskazują na powietrzną i prawdopodobnie horyzontalną drogę transmisji

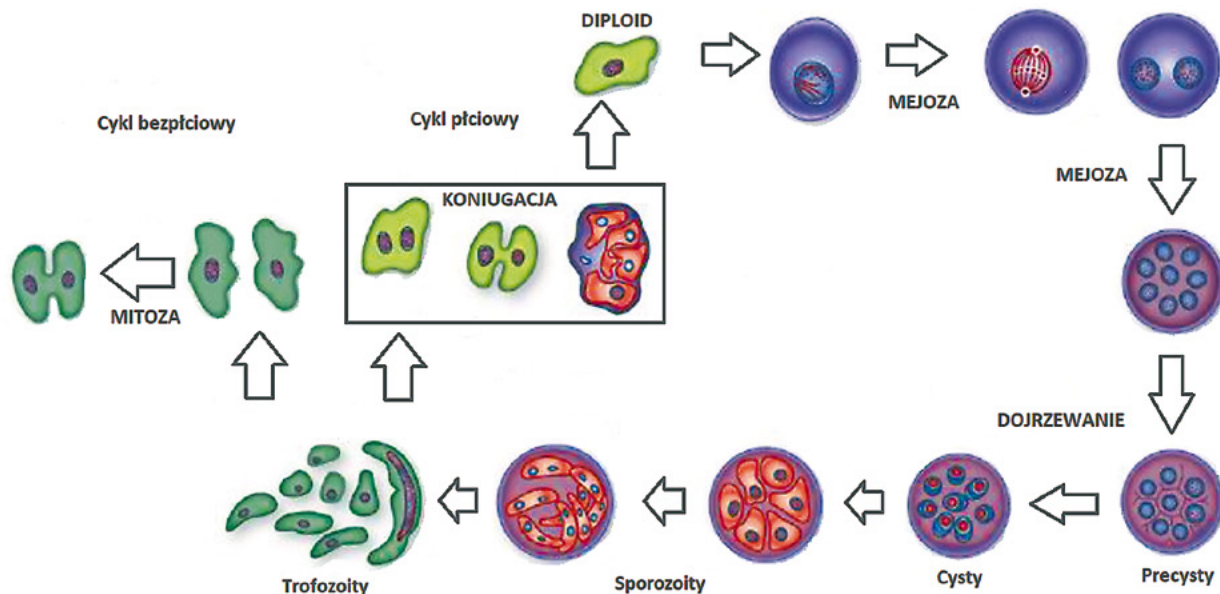
u ludzi i zwierząt (5). Toczy się debata na temat tego, czy grzyby *Pneumocystis* spp. mogą być przenoszone wertykalnie u ludzi i zwierząt. Na podstawie analiz genetycznych izolatów uzyskanych od ludzi sugeruje się, że raczej niedawne nabycie zakażenia od innej osoby, a nie reaktywacja pierwotnego zakażenia, może być odpowiedzialne za chorobę kliniczną (22, 23). Ponadto nie zidentyfikowano żadnych środowiskowych form *Pneumocystis*, które dostarczyłyby dodatkowych dowodów na to, że wzrost grzybów i ich transmisje są zależne od stadium pośredniego znajdującego się poza organizmem żywiciela (11).

U ludzi przeciwciała przeciwko *P. jirovecii* odnotowano najwcześniej u czteroletniego dziecka, ale prawdopodobnie narażenie na kontakt z patogenem nastąpiło u pacjenta w znacznie młodszym wieku (8, 21, 24). Prawdopodobnie pierwsza ekspozycja następuje w okresie noworodkowym, powodując łagodne objawy kliniczne lub ich brak, co może być mylone z innym czynnikiem zakaźnym (25). Eksperymenty na nowonarodzonych szczurach wykazały, że DNA *P. carinii* było obecne w ich jamie ustnej już 1–2 godz. po urodzeniu, nawet przed pierwszym karmieniem (26). Ten pierwszy kontakt może zatem odbywać się drogą powietrzną lub wertykalną (6). U psów pneumocystozowe zapalenie płuc jest chorobą zagrażającą życiu (9, 21, 24, 27, 28), co wynika z utrzymywania się wysokiego miana grzybów w przestrzeniach zębodołowych, w połączeniu z silną odpowiedzią zapalną w śródmiązszu płucnym (29, 30, 31, 32, 33). Podejrzewanym sposobem przenoszenia patogenu u psów jest droga kropelkowa od psów zakażonych subklinicznie (bezobjawowych), zazwyczaj od suki do szczenięcia, wkrótce po urodzeniu (34). Bezobjawowa kolonizacja organizmu żywiciela przez *P. canis* jest prawdopodobnie typowym obrazem zakażenia u psów, chociaż w literaturze nie są dostępne dane dotyczące detekcji patogenu od zdrowych psów. Wskazywane są natomiast rasy szczególnie predysponowane, tj. jamniki miniaturowe gładkie i szorstkowłose (31, 32), szpice miniaturowe (35) oraz angielskie spaniele miniaturowe (2).

Cykl życiowy patogenu

Cykl życiowy grzybów z rodzaju *Pneumocystis* nie został w pełni zdefiniowany, a większość doniesień literaturowych wskazuje na przebieg procesu płciowego w organizmie żywiciela, co jest zasadniczą różnicą w stosunku do większości innych grzybów chorobotwórczych (ryc. 1; 6). Ponadto żywiele prawdopodobnie są w stanie przenosić zakażenie na kolejne osobniki w odróżnieniu od innych grzybów (np. z rodzaju *Aspergillus*), dla których organizm wyższy jest ogniwem przypadkowym i ostatecznym w cyklu życiowym (36, 37).

Przyjmuje się, że po inhalacji elementów infekcyjnych *Pneumocystis* spp. ulegają one przyłączeniu do pneumocytów typu I w pęcherzykach płucnych gospodarza. Jak na razie nie ma jednoznacznego stanowiska co do tego, które z form grzyba są zakaźne. Niedawne badania dostarczają dowodów na to, że również cysta może być czynnikiem transmisyjnym.



Ryc. 1. Schematyczny przebieg cyklu życiowego grzybów z rodzaju *Pneumocystis*

Wykazano, że leczenie myszy i szczurów zakażonych grzybami z rodzaju *Pneumocystis* za pomocą echinokandyn (leków hamujących syntezę β -1, 3-D-glukanu) eliminuje cysty, które zawierają glukan w swoich ścianach (38). Zwierzęta po zakończeniu terapii były pozbawione cyst, a zatem form zawierających dużą liczbę żywych form grzyba, i nie przenosiły zakażenia drogą powietrzną na niezakażone zwierzęta. Natomiast nielezione zwierzęta, posiadające cysty w płucach, były w stanie zakażać inne osobniki. Stąd postawiono wniosek, że cysta jest cząsteczką transmisyjną. W płucach cysty ulegają zakotwiczeniu w komórkach typu I, a formy troficzne wyrastają w kierunku światła pęcherzyka płucnego. Zakażenie najczęściej rozprzestrzenia się na całe płuca, ale sposób, w jaki organizmy przemieszczają się między pęcherzykami płucnymi, nie jest znany. Niektóre z doniesień naukowych wskazują również na zdolność *P. carinii* i *P. murina* do tworzenia biofilmów, co może sugerować, że jest to mechanizm rozprzestrzeniania się zakażenia w płucach (39).

Prawdopodobne jest, że mikroorganizmy namnażają się u gospodarzy immunokompetentnych, unikając działania układu odpornościowego za pomocą licznych antygenów powierzchniowych (40). Teoretycznie stadium komensalne może trwać przez całe życie gospodarza, jeśli równowaga między przyrastającymi populacjami grzybów *Pneumocystis* i hamującym ich ekspansję działaniem układu odpornościowego gospodarza nie zostanie zakłócona (41). Osłabienie układu odpornościowego może być wywołane różnymi czynnikami, w tym innymi chorobami zakaźnymi, przejściowymi stanami powodującymi immunosupresję, wadami wrodzonymi i/lub niedożywieniem (42). Wówczas dochodzi do wzmożonej proliferacji grzybów w obrębie pęcherzyków płucnych i rozwoju zapalenia płuc. Pneumocystozowe zapalenie płuc u pacjentów z immunosupresją jest chorobą potencjalnie śmiertelną, jeśli w porę nie zostanie zastosowane odpowiednie leczenie (43). Grzyby z rodzaju *Pneumocystis* powinny być zatem uznawane

za mikroorganizmy oportunistyczne, bowiem mogą występować w stanie komensalnym oraz patogenym, przy czym choroba może przybierać postać od subklinicznej do ciężkiej i zagrażającej życiu (42, 43).

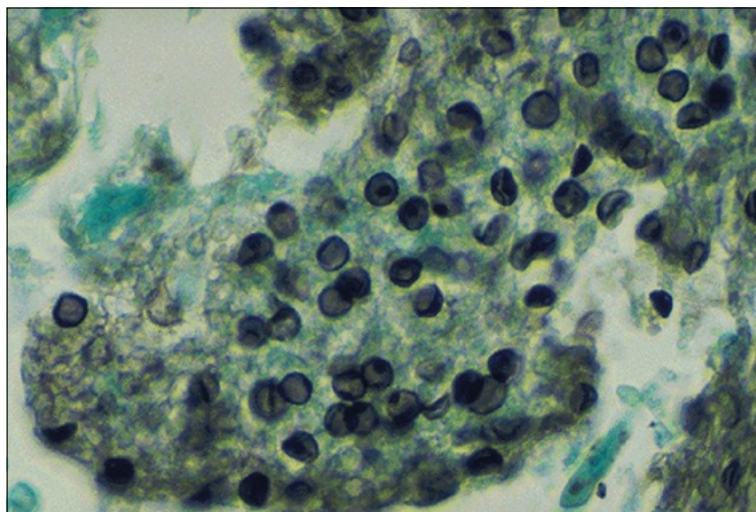
Wszystkie dostępne w literaturze informacje na temat cyklu życiowego *Pneumocystis* spp. pochodzą z badań przeprowadzonych u ssaków z osłabionym układem odpornościowym. Natomiast brakuje danych o cyklu życiowym u żywicieli immunokompetentnych, chociaż potwierdzono ich powszechną obecność w płucach u zdrowych zwierząt oraz ludzi (26, 40). Obecne dowody naukowe sugerują, że grzyby z rodzaju *Pneumocystis* mogą stanowić składnik mykrobioty płuc, pozostając neutralnym zdrowotnie mikroorganizmem komensalnym, chociaż jak dotąd nie określono czasu zasiedlania płuc przez te grzyby (6). Icenhour i wsp. (44) przeprowadzili badania na 137 laboratoryjnych szczurach pochodzących od trzech różnych hodowców i wykazali 98% częstość występowania grzybów z rodzaju *Pneumocystis* w płucach osobników immunokompetentnych bez żadnych objawów klinicznych. Natomiast u ludzi Nevez i wsp. (45) wykazali, że detekcja *P. jirovecii* zawsze związana była z osłabieniem układu odpornościowego, ale rzadka u osób zdrowych. Należy zaznaczyć, że kolonizacja u ludzi definiowana była jako obecność *P. jirovecii* wykrytego za pomocą technik PCR lub barwienia histologicznego tkanki płucnej, popłuczyn jamy ustnej, gardła lub płynu oskrzelowo-pęcherzykowego, bez uzyskania kultury grzyba. Dodatkowo, osłabiony układ immunologiczny określony przez Nevez i wsp. (45) obejmował także ciężę, występowanie przewlekłych chorób płuc oraz niedojrzałość układu odpornościowego, np. u niemowląt (40). Nie były to zatem stany głębokiej immunosupresji. U osób cierpiących na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) DNA *P. jirovecii* wykryto w wyciętej tkance płuc u 36, 7% pacjentów w porównaniu z 9, 1% u osób zdrowych (46). Nie udowodniono żadnego zgonu spowodowanego przez grzyby *Pneumocystis*, ale osoby skolonizowane miały cięższą niedrożność

dróg oddechowych niż osoby z POChP, u których nie wykryto grzybów z tego rodzaju. Vargas i wsp. (47) wskazywali, że grzyby *Pneumocystis* mogą stanowić potencjalną przyczynę zespołu nagłej śmierci niemowląt (SIDS). Niemniej jednak późniejsze badania tkanki płucnej niemowląt, które zmarły z powodu SIDS, w porównaniu z tymi, które zmarły z innych przyczyn, nie potwierdziły tych wcześniejszych ustaleń. Natomiast u obydwu badanych grup *P. jirovecii* wykryto u ok. 30% niemowląt. Podobnych badań brakuje dla zwierząt.

Diagnostyka

Rozpoznanie pneumocystozowego zapalenia płuc jest trudne ze względu na brak jakichkolwiek specyficznych odchyłań w badaniach hematologicznych i biochemicznych, a także zmian patognomicznych w radiogramach klatki piersiowej. Pneumocystozowe zapalenie płuc mogą częściowo sugerować zmiany śródmiąższowe o charakterze rozlanym w płucach, często występujące razem z krwawieniem pęcherzykowym. Niejednokrotnie zaobserwować można także objawy nadciśnienia płucnego (31). Zmiany śródmiąższowe są lepiej widoczne w tomografii komputerowej, ale obrazowanie zwykle wymaga znieczulenia ogólnego lub silnej sedacji, co nie zawsze może być wykonane u pacjenta. Charakterystyczną cechą grzybów z rodzaju *Pneumocystis* jest wysoka specyficzność wobec gatunku żywiciela, przy czym u każdego żywiciela może występować jako komensal i/lub potencjalny patogen tylko jeden unikalny gatunek *Pneumocystis* (6). Kolejną istotną z diagnostycznego punktu widzenia cechą rodzaju jest to, że grzyby te nie rosną na stosowanych rutynowo pożywkach mykologicznych. Ich hodowla możliwa jest jedynie na specjalnie dobranych liniach komórek nabłonka oddechowego (48). Ostateczne rozpoznanie zapalenia płuc wywołanego przez *Pneumocystis* spp. tradycyjnie opiera się na bezpośredniej wizualizacji drobnoustrojów w rozmazach cytologicznych sporządzonych z głębokich popłuczyn oskrzelowych lub po przekłatkowej aspiracji cienkoigłowej (49). Zastosowanie różnych technik barwienia pozwala ze zmienną czułością i swoistością, zależnie od materiału, wykryć cysty *Pneumocystis* w preparatach mikroskopowych. Niemniej jednak wszystkie te techniki są zdecydowanie mniej czułe niż metody oparte na qPCR (50, 51).

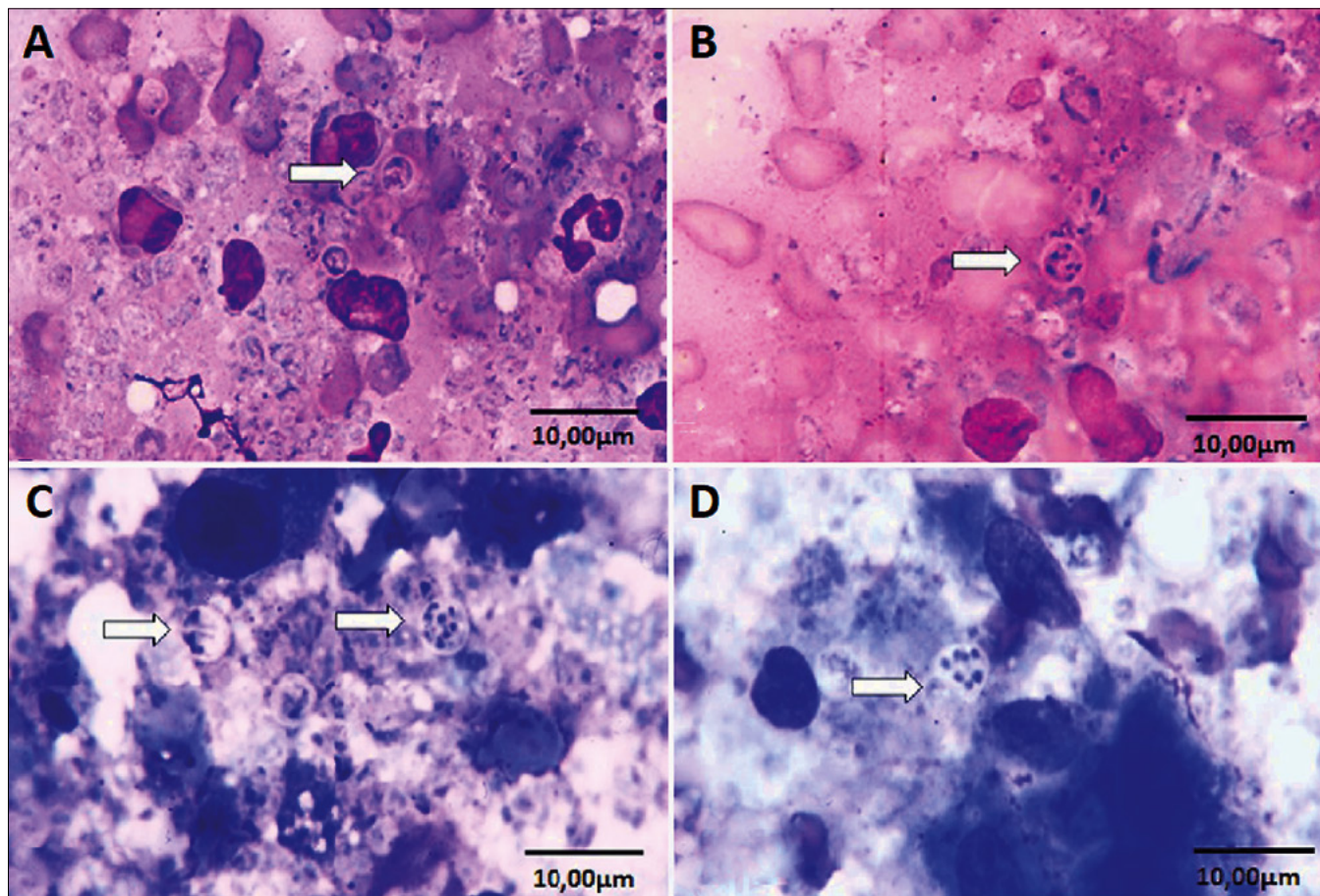
Metodą referencyjną w diagnostyce PCP pozostaje bronchoskopia z pobraniem płynu w czasie płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL, – bronchoalveolar lavage). Płyn pobrany w czasie BAL (BALF, bronchoalveolar lavage fluid) można następnie wybarwić metodą srebrową Grocotta, w której uwidocznione zostają cysty grzybów (ryc. 2). Inną wykorzystywaną w diagnostyce metodą jest barwienie Diff-Quick (modyfikacja barwienia Wrighta–Giemsa), w którym zaobserwować można zarówno cysty, jak i formy troficzne *Pneumocystis* spp. (ryc. 3; 52). Metoda ta wymaga jednak większego doświadczenia od laboranta. Istnieje jednak szereg problemów technicznych, które utrudniają detekcję *Pneumocystis* spp. w preparatach cytologicznych. Gdy choroba ma łagodny przebieg



Ryc. 2. Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego pobrany w przebiegu pneumocystozowego zapalenia płuc wybarwiony metodą srebrową Grocotta (GMS)

bądź w początkowym etapie jej przebiegu, drobnoustroje są mniej liczne i nawet z głębokich popłuczyn oskrzelowych lub BAL można nie uzyskać wystarczającej liczby cyst lub form troficznych, aby umożliwić ich wykrycie przez cytologa (53). Ponadto, ze względu na fakt, że grzyby z rodzaju *Pneumocystis* bytują głównie w przestrzeniach pęcherzykowych, a nie w drogach oddechowych, wymagana jest specjalistyczna wiedza techniczna, aby prawidłowo pobrać próbkę BALF lub wykonać głębokie płukanie oskrzeli z wystarczającą energią (54). Z tego powodu niektórzy klinicyści preferują przezskórne igłowe aspiracje płucne zamiast BAL do pobierania materiału w diagnostyce pneumocystozowego zapalenia płuc (52). Ogólnie uwidocznienie charakterystycznych torbieli lub form troficznych w próbkach BAL lub biopsjach cienkoigłowych jest uważane za diagnostyczne. Należy jednak wziąć pod uwagę, że wszystkie grzyby *Pneumocystis* spp. mają dwa stadia rozwojowe: formę troficzną (dawniej określaną jako trofozoit) i formę cysty. Brak równowagi między różnymi formami cyklu życiowego, jaki został zaobserwowany chociażby u *P. canis*, może wyjaśniać niską wydajność diagnostyczną cytologii w niektórych przypadkach, ponieważ cysty są znacznie łatwiejsze do rozróżnienia niż formy troficzne przy użyciu barwienia cytologicznego (55). Dlatego wyniki należy interpretować ostrożnie. Interesujące jest to, że w doświadczeniach z wykorzystaniem gryzoni stosunek trofozoitu do torbieli wzrastał podczas wychodzenia z zapalenia płuc wywołanego przez *Pneumocystis carinii*. Zmiany tej nie udało się jednak zaobserwować w badaniu monitoringowym próbek płynu oskrzelowo-pęcherzykowego pobranego od psów z pneumocystozowym zapaleniem płuc (2).

Literatura naukowa wskazuje, że diagnostyka mikrobiologiczna grzybów z rodzaju *Pneumocystis* wymaga podejścia koncepcyjnego w porównaniu z większością innych patogenów grzybowych, polegającego w głównej mierze na stosowaniu technik molekularnych (56). Kamieniem milowym w diagnostyce PCP są metody genetyczne, głównie oparte na PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy) i LAMP (technika amplifikacji izotermicznej). Badania te można wykonać



Ryc. 3. Preparaty cytologiczne po barwieniu Diff-Quick od psów z zapaleniem płuc wywołanym przez *Pneumocystis canis*. A, B: charakterystyczne struktury przypominające cysty (zaznaczone strzałkami), jak i formy troficzne widoczne pomiędzy uszkodzonymi komórkami i zdegenerowanymi neutrofilami. C, D: rozmazy wyciskowe z płuca uzyskane podczas sekcji zwłok, na których widoczne są cysty (zaznaczone strzałkami) i formy troficzne

z BALF, indukowanej płwociny lub popłuczyn z jamy ustnej. Odróżnienie kolonizacji od aktywnego zakażenia nie jest w tym przypadku możliwe (57). Obiecujące wyniki diagnostyczne uzyskiwane są przy zastosowaniu tzw. zagnieżdżonego PCR, wykrywającego specyficznego regiony mitochondrialnego genu dużej podjednostki rRNA (mtLSU rRNA nPCR; 58). Kombinację metod tradycyjnego barwienia Grocotta i Giemsy oraz metody mtLSU rRNA nPCR wykorzystano również do wykrycia i odróżnienia zakażenia od nosicielstwa (11, 58). U osobników chorych z PCP, *Pneumocystis* spp. wykrywany jest zarówno w barwieniu, jak i metodami genetycznymi, natomiast u nosicieli grzyba dodatni jest tylko wynik techniki PCR (2, 12, 58). Na rynku dostępny jest komercyjny szybki zestaw diagnostyczny oparty na wyżej opisanej metodzie (Fast Track Diagnostics — FTD *Pneumocystis* PCR Kit dla mtLSU rRNA), którego efektywność diagnostyczna została określona na 97,5% (59). Podkreślenia wymaga fakt, że gen mtLSU RNA jest najczęściej wykorzystywanym markerem w diagnostyce zakażeń na tle *Pneumocystis* spp. (60). Jako zaleta wskazywane jest, że pacjenci z aktywną chorobą mają większą liczbę kopii DNA niż osobniki jedynie skolonizowane. Niemniej jednak metoda nie jest jak dotąd rutynowo stosowana i wymaga dalszej standaryzacji.

W detekcji grzybów *Pneumocystis* można również wykorzystywać oznaczanie β -D-glukanu, składnika ściany komórkowej grzybów (61). Technika ta jest

rutynowo stosowana w mykologii do diagnostyki innych patogenów grzybowych. Nie jest to jednak badanie specyficzne dla wykrycia zakażenia, ale wynik ujemny pozwala na jego wykluczenie. Ponadto miano nie koreluje z ciężkością choroby, nie nadaje się więc do monitorowania jej przebiegu (61, 62).

Leczenie

Popularne leki przeciwgrzybicze, takie jak amfoterycyna B i azole, nie wykazują skuteczności przeciwko grzybom z rodzaju *Pneumocystis* (63). Jedyną grupą skutecznych wobec tych patogenów substancji przeciwgrzybiczych są echinokandyny (46). Mechanizm działania przeciwgrzybiczego echinokandyn polega na niekompetycyjnym hamowaniu syntazy 1, 3- β -D glukanu. Związek ten znajduje się w ścianach cyst *Pneumocystis* spp., nie jest obecny w formach troficznych. Stąd działanie tych leków ograniczone jest do selektywnej eliminacji torbieli, a po leczeniu pozostają duże populacje form troficznych. Chociaż kliniczne zastosowanie tych związków przyniosło mieszane rezultaty, możliwe jest, że połączenie echinokandyn z niższymi dawkami bardziej toksycznych środków w celu wyeliminowania form troficznych może zapewnić skuteczne leczenie (64).

Obecnie stosowanym leczeniem pierwszego rzutu jest połączenie inhibitorów kwasu foliowego trimetoprimu-sulfametoksazolu (TMP-SMX) wraz

z kortykosteroidami w celu zmniejszenia destrukcyjnego stanu zapalnego (23, 24, 32). Z tym schematem wiążą się jednak liczne skutki uboczne, m.in. ciężka wysypka, gorączka i neutropenia, które często powodują konieczność zmiany na alternatywne leczenie. Terapie drugiego rzutu obejmują stosowanie klindamycyny-primachiny, atowakwonu lub pentamidyny (64). Brak możliwości hodowli *Pneumocystis* spp. uniemożliwia określenie minimalnego stężenia hamującego leków (MIC, minimum inhibitory concentration), więc powszechnie stosowane są wysokie dawki leku (24, 33, 65, 66).

Opublikowano również badania dotyczące zastosowania chitosanu w terapii PCP u szczurów poddanych immunosupresji. Wstępne wnioski z tej pracy są zachęcające, choć mechanizm działania chitosanu nie został jednoznacznie poznany (67).

Podsumowanie

Mikroorganizmy z rodzaju *Pneumocystis* swoimi właściwościami biologicznymi stoją na pograniczu królestwa grzybów i pierwotniaków. Ich zjadliwość jest niska i większość cyklu życiowego odbywają w stadium komensalnym, niemniej jednak w pewnych stacjach immunosupresji mogą wywoływać pneumocystozowe zapalenie płuc. Choroba może mieć przebieg symptomatyczny, subkliniczny lub przybierać postać utajoną, co jest powszechne u niektórych gatunków zwierząt, zwłaszcza u psów. Dane epidemiologiczne i eksperymentalne wskazują na powietrzną i prawdopodobnie horyzontalną drogę transmisji zakażenia. Terapia tych zakażeń jest trudna ze względu na unikalne właściwości tych drobnoustrojów, a popularne leki przeciwgrzybicze, takie jak amfoterycyna B i azole, nie wykazują skuteczności przeciwko grzybom z rodzaju *Pneumocystis*. Jedyną grupą skutecznych wobec tych patogenów substancji przeciwgrzybiczych są echinokandyny. Przyszłe badania powinny być skupione na określeniu, czy grzyby *Pneumocystis* spp. mogą być przenoszone wertykalnie u ludzi i zwierząt oraz wskazaniu metod prewencji pierwotnej kolonizacji.

Piśmiennictwo

- Walzer P.D., Schnelle V., Armstrong D., Peter Rosen P.: Nude mouse: A new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. *Science* (80-). 1977, 197, 177–179.
- Danesi P., Ravagnan S., Johnson L.R., Furlanello T., Milani A., Martin P., Boyd S., Best M., Galgut B., Irwin P., Canfield P.J., Krockenberger M.B., Halliday C., Meyer W., Malik R.: Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in dogs. *Med Mycol*. 2017, 55, 828–842.
- Miller R., Huang L., D. Walzer P.: The Relationship between *Pneumocystis* Infection in Animal and Human Hosts, and Climatological and Environmental Air Pollution Factors: A Systematic Review. *OBM Genet*. 2018, 2, 1–1.
- Yiannakis E.P., Boswell T.C.: Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: Evidence that *P. jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. *J Hosp Infect*. 2016, 93, 1–8.
- Schildgen V., Mai S., Khalifaoui S., Lüsebrink J., Pieper M., Tillmann R.L., Brockmann M., Schildgen O.: *Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. *MBio*. 2014, 5, e01186–14.
- Cushion M.T.: Are members of the fungal genus pneumocystis (a) commensals; (b) opportunists; (c) pathogens; or (d) all of the above? *PLoS Pathog*. 2010, 6, e1001009.
- Redhead S.A., Cushion M.T., Frenkel J.K., Stringer J.R.: *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol*. 2006, 53, 2–11.
- Topley Wilson, Graham S., Collier, L. H., Mahy, B. W. J., Ter Meulen, Volker., Topley, W. W. C., American Society for Microbiology, W.W.C., Topley W.W.C., Wilson G.S., Collier L.H., Mahy B.W.J., Ter Meulen V., Topley W.W.C., Microbiology. A.S. for.: *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th ed. Hodder Arnold ; ASM Press; 2005. <http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470688618/home/>
- Sokulska M., Kicia M., Wesołowska M., Hendrich A.B.: *Pneumocystis jirovecii*—from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitol Res*. 2015, 114, 3577–3585.
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lücking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P.B., McLaughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y.C., Gams W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Kõljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K.H., Lichwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J.M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P., Schüssler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y.J., Zhang N.: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007, 111, 509–547.
- Akbar H., Pinçon C., Aliouat-Denis C.M., Derouiche S., Taylor M.L., Pottier M., Carreto-Binaghi L.H., González-González A.E., Courpon A., Barriel V., Guillot J., Chabé M., Suarez-Alvarez R.O., Aliouat E.M., Dei-Cas E., Demanche C.: Characterizing *Pneumocystis* in the lungs of bats: Understanding *Pneumocystis* evolution and the spread of pneumocystis organisms in mammal populations. *Appl Environ Microbiol*. 2012, 78, 8122–8136.
- Cushion M.T., Keely S.P., Stringer J.R.: Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. *Mycologia*. 2004, 96, 429–438.
- Frenkel J.K.: *Pneumocystis jirovecii* n. sp. from man: Morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1976, No.43, 13–30.
- Frenkel J.K.: *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): A critical historical overview. *J Eukaryot Microbiol*. 1999, 46, 89S–92S.
- Keely S.P., Fischer J.M., Cushion M.T., Stringer J.R.: Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology*. 2004, 150, 1153–1165.
- Dei-Cas E., Chabé M., Moukhli R., Durand-Joly I., Aliouat E.M., Stringer J.R., Cushion M., Noël C., Sybren De Hoog G., Guillot J., Viscogliosi E.: *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: Review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. *FEMS Microbiol Rev*. 2006, 30, 853–871.
- Sellon D.C., Long M.T., Kohn C.: Miscellaneous Fungal Diseases. In: Sellon DC, Long MTBT-EID (Second E, eds. *Equine Infectious Diseases: Second Edition*. W.B. Saunders; 2013:433–448.e5.
- Ralph E., Reppas G., Halliday C., Krockenberger M., Malik R.: *Pneumocystis canis* pneumonia in dogs. *Microbiol Aust*. 2015, 36, 79.
- English K., Peters S.E., Maskell D.J., Collins M.E.: DNA analysis of *Pneumocystis* infecting a Cavalier King Charles Spaniel. *J Eukaryot Microbiol*. 2001, 48, 106S.
- Chabé M., Herbreteau V., Hugot J.P., Noemi B., Deruyter L., Serge M., Dei-Cas E.: *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis wakefieldiae* in wild *Rattus norvegicus* trapped in Thailand. *J Eukaryot Microbiol*. 2010, 57, 213–217.
- MacNeill A.L., Alleman A.R., Franklin R.P., Long M., Giguère S., Uhl E., López-Martinez A., Wilkerson M.: Pneumonia in a Paso-Fino mare. *Vet Clin Pathol*. 2003, 32, 73–76.
- Beard C.B., Carter J.L., Keely S.P., Huang L., Pieniazek N.J., Moura I.N.S., Roberts J.M., Hightower A.W., Bens M.S., Freeman A.R., Lee S., Stringer J.R., Duchin J.S., Del Rio C., Rimland D., Baughman R.P., Levy D.A., Dietz V.J., Simon P., Navin T.R.: Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: Implications for transmission. *Emerg Infect Dis*. 2000, 6, 265–272.
- Kovacs J.A., Gill V.J., Meshnick S., Masur H.: New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Am Med Assoc*. 2001, 286, 2450–2460.
- Kureljušić B., Weissenbacher-Lang C., Nedorost N., Stixenberger D., Weissenböck H.: Association between *Pneumocystis* spp. and co-infections with *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* in Austrian pigs with pneumonia. *Vet J*. 2016, 207, 177–179.
- Vargas S.L., Hughes W.T., Santolaya M.E., Ulloa A.V., Ponce C.A., Cabrera C.E., Cumsille F., Gigliotti F.: Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis*. 2001, 32, 855–861.

26. Icenhour C.R., Rebolz S.L., Collins M.S., Cushion M.T.: Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryot Cell*. 2002, **1**, 414–419.
27. Weisbroth S.H.: Pneumocystis: Newer knowledge about the biology of this group of organisms in laboratory rats and mice. *Lab Anim (NY)*. 2006, **35**, 55–61.
28. Sakakibara M., Shimizu C., Kadota K., Hatama S.: *Pneumocystis carinii* infection in a domestic goat (*Capra hircus domesticus*) with multibacillary paratuberculosis. *J Vet Med Sci*. 2013, **75**, 671–674.
29. Farrow B.R.H., Watson A.D.J., Hartley W.J., Huxtable C.R.R.: *Pneumocystis pneumonia* in the dog. *J Comp Pathol*. 1972, **82**, 447–453.
30. Copland J.W.: Canine pneumonia caused by *Pneumocystis carinii*. *Aust Vet J*. 1974, **50**, 515–518.
31. Canfield P.J., Church D.B., Malik R.: *Pneumocystis pneumonia* in a dog. *Aust Vet Pract*. 1993, **23**, 150–154.
32. Lobetti R.: Common variable immunodeficiency in miniature dachshunds affected with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Vet Diagn Invest*. 2000, **12**, 39–45.
33. Watson P.J., Wotton P., Eastwood J., Swift S.T., Jones B., Day M.J.: Immunoglobulin deficiency in Cavalier King Charles Spaniels with *Pneumocystis pneumonia*. *J Vet Intern Med*. 2006, **20**, 523–527.
34. Lobetti R.: *Pneumocystosis*. *Canine Feline Infect Dis*. Published online January 1, 2013, 686–692.
35. Kanemoto H., Morikawa R., Chambers J.K., Kasahara K., Hanafusa Y., Uchida K., Ohno K., Nakayama H.: Common variable immune deficiency in a pomeranian with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Vet Med Sci*. 2015, **77**, 715–719.
36. Vohra P.K., Park J.G., Sanyal B., Thomas C.F.: Expression analysis of PCST3, a putative pheromone receptor from the lung pathogenic fungus *Pneumocystis carinii*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, **319**, 193–199.
37. Ramsey I.K., Foster A., McKay J., Herrtage M.E.: *Pneumocystis carinii* pneumonia in two Cavalier King Charles spaniels. *Vet Rec*. 1997, **140**, 372–373.
38. Cushion M.T., Linke M.J., Ashbaugh A., Sesterhenn T., Collins M.S., Lynch K., Brubaker R., Walzer P.D.: Echinocandin treatment of *Pneumocystis pneumonia* in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection. *PLoS One*. 2010, **5**, 1–12.
39. Cushion M.T., Collins M.S., Linke M.J.: Biofilm formation by *Pneumocystis* spp. *Eukaryot Cell*. 2009, **8**, 197–206.
40. Cushion M.T., Stringer J.R.: Stealth and Opportunism: Alternative lifestyles of species in the fungal genus *Pneumocystis*. *Annu Rev Microbiol*. 2010, **64**, 431–452.
41. Kim T.O., Lee J.K., Kwon Y.S., Kim Y. Il., Lim S.C., Kim M.S., Kho B.G., Park C.K., Oh I.J., Kim Y.C., Park H.Y., Shin H.J.: Clinical characteristics and prognosis of patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia without a compromised illness. Taylor WR, ed. *PLoS One*. 2021, **16**, e0246296.
42. Moon S.M., Kim T., Sung H., Kim M.N., Kim S.H., Choi S.H., Jeong J.Y., Woo J.H., Kim Y.S., Lee S.O.: Outcomes of moderate-to-severe *Pneumocystis pneumonia* treated with adjunctive steroid in non-HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, **55**, 4613–4618.
43. Mendoza M.A., Iyer S., Camargo J.F., Benedetto P.W.: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia as a complication of etoposide therapy. *BMJ Case Rep*. 2021, **14**, e242485.
44. Icenhour C.R., Rebolz S.L., Collins M.S., Cushion M.T.: Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* in commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *J Clin Microbiol*. 2001, **39**, 3437–3441.
45. Nevez G., Magois E., Duwat H., Gouilleux V., Jounieaux V., Totet A.: Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin Infect Dis*. 2006, **42**, e99–e101.
46. Morris A., Sciruba F.C., Lebedeva I.P., Githaiga A., Elliott W.M., Hogg J.C., Huang L., Norris K.A.: Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004, **170**, 408–413.
47. Vargas S.L., Ponce C.A., Gálvez P., Ibarra C., Haas E.A., Chadwick A.E., Krous H.F.: *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2007, **26**, 81–83.
48. Atzori C., Aliouat E.M., Bartlett M.S., Dujardin L., Cargnel A., Dei-Cas E.: XXI. Current in vitro culture systems for *Pneumocystis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998, **22**, 169–172.
49. Chandra P., Delaney M.D., Tuazon C.U.: Role of special stains in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection from bronchial washing specimens in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Acta Cytol*. 1988, **32**, 105–108.
50. Procop G.W., Haddad S., Quinn J., Wilson M.L., Henshaw N.G., Reller L.B., Artymyshyn R.L., Katanik M.T., Weinstein M.P.: Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol*. 2004, **42**, 3333–3335.
51. Baughman R.P., Strohofer S.S., Clinton B.A., Nickol A.D., Frame P.T.: The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Arch Pathol Lab Med*. 1989, **113**, 1062–1065.
52. Reppas G., Fyfe J., Foster S., Smits B., Martin P., Jardine J., Lam A., O'Brien C., Malik R.: Detection and identification of mycobacteria in fixed stained smears and formalin-fixed paraffin-embedded tissues using PCR. *J Small Anim Pract*. 2013, **54**, 638–646.
53. Savic S.: *Pneumocystis jirovecii*, Cytological Findings. In: 2017:414–417.
54. Tregnago R., Xavier R.G., Pereira R.P., Prolla J.C.: The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytologic evaluation of papanicolaou and leishman-stained bronchoalveolar specimens in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Cytopathology*. 1993, **4**, 77–84.
55. Sukura A.: Trophozoite-to-cyst ratio increases during recovery from *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats. *Apmis*. 1995, **103**, 300–306.
56. Krockenberger M.B., Canfield P.J., Malik R.: *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): A review of 43 cases of cryptococcosis. *Med Mycol*. 2003, **41**, 225–234.
57. Ricciardi A., Gentilotti E., Coppola L., Maffongelli G., Cerva C., Malagnino V., Mari A., Di Veroli A., Berrilli F., Apice F., Toschi N., Di Cave D., Giuseppe Parisi S., Andreoni M., Sarmati L.: Infectious disease ward admission positively influences *P. jirovecii* pneumonia (PjP) outcome: A retrospective analysis of 116 HIV-positive and HIV-negative immunocompromised patients. *PLoS One*. 2017, **12**, e0176881.
58. Danesi P., da Rold G., Rizzoli A., Hauffe H.C., Marangon S., Samerpitak K., Demanche C., Guillot J., Capelli G., de Hoog S.G.: Barcoding markers for *Pneumocystis* species in wildlife. *Fungal Biol*. 2016, **120**, 191–206.
59. Hoarau G., Mukherjee P.K., Gower-Rousseau C., Hager C., Chandra J., Retuerto M.A., Neut C., Vermeire S., Clemente J., Colombel J.F., Fujitaka H., Poulain D., Sendid B., Ghannoum M.A.: Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. Bonomo RA, ed. *MBio*. 2016, **7**, e01250–16.
60. Le Gal S., Damiani C., Rouillé A., Grall A., Tréguer L., Virmaux M., Moalic E., Quinio D., Moal M.C., Berthou C., Saliou P., Le Meur Y., Totet A., Nevez G.: 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**, e62–e71.
61. Karageorgopoulos D.E., Qu J.M., Korbila I.P., Zhu Y.G., Vasileiou V.A., Falagas M.E.: Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2013, **19**, 39–49.
62. Son H.J., Sung H., Park S.Y., Kim T., Lee H.J., Kim S.M., Chong Y.P., Lee S.O., Choi S.H., Kim Y.S., Woo J.H., Kim S.H.: Diagnostic performance of the (1–3)- β -D-glucan assay in patients with *Pneumocystis jirovecii* compared with those with candidiasis, aspergillosis, mucormycosis, and tuberculosis, and healthy volunteers. Kumar S, ed. *PLoS One*. 2017, **12**, e0188860.
63. D'Avignon L.C., Schofield C.M., Hospenthal D.R.: *Pneumocystis pneumonia*. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008, **29**, 132–140.
64. Li H., Huang H., He H.: Successful treatment of severe *Pneumocystis pneumonia* in an immunosuppressed patient using caspofungin combined with clindamycin: A case report and literature review. *BMC Pulm Med*. 2016, **16**, 144.
65. Burke B.A., Good R.A.: *Pneumocystis carinii* infection. *Medicine (Baltimore)*. 1992, **71**, 166–177.
66. Meffert F.J.: *Pneumocystis pneumonia* in two cavalier king Charles spaniel littermates. *Aust Vet Pract*. 2009, **39**, 2–9.
67. Liu A.B., Pu Y., Zheng Y.Q., Cai H., Ye B.: Therapeutic efficacies of chitosan against *Pneumocystis pneumonia* of immunosuppressed rat. *Parasite Immunol*. 2014, **36**, 292–302.

Dr hab. Sebastian Gnat prof. uczelni,
e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl