

## Prace oryginalne

**Występowanie DNA *Pneumocystis carinii* i *Pneumocystis wakefieldiae* w tkankach pozapłucnych szczurów laboratoryjnych poddawanych immunosupresji****Presence of *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis wakefieldiae* DNA in the extrapulmonary tissues of immunocompromised laboratory rats**

Elżbieta Gołąb

Zakład Parazytologii Lekarskiej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24. 00-791 Warszawa; E-mail: egolab@pzh.gov.pl

**ABSTRACT.** Fungi of the genus *Pneumocystis* are opportunistic pathogens which cause lethal pneumonia in immunocompromised hosts. Those fungi may also invade other visceral organs where they induce lesions, although, the pathways or mechanisms of the in vivo infection are still unknown. The corticosteroid-treated rat model was used to evaluate the course of extrapulmonary pneumocystosis. Liver, kidney, spleen, and mesenteric lymph nodes of 16 rats were examined for the presence of mtLSU gene fragments of *P. carinii* and *P. wakefieldiae* using the nested PCR method. *Pneumocystis* DNA was detected in 26 organ samples of which 17 contained both species (*P. carinii* and *P. wakefieldiae*) and 9 contained only *P. carinii*. Positive samples were received from 10 rats examined after 6–9 weeks of immunosuppression. The highest percentage of positive samples (62.5%) was obtained among examined visceral lymph nodes. *Pneumocystis* DNA was detected in the blood serum of two rats with no traces of the DNA in their internal organs. Conversely, *Pneumocystis* DNA was found in the internal organs of two other rats, although their serum samples were negative. The average number of *Pneumocystis* cysts in the lungs of animals in which extrapulmonary infection was detected was 3.4 per one microscopic view field. In the case of animals where the infection was limited to the lung tissue this number was almost two times lower (1.8 cysts per one microscopic view field). An analysis of the results of the presently reported experiment showed that massive *Pneumocystis* infection in the lungs makes it more likely that *Pneumocystis* will spread to other internal organs. This spread probably takes place via the lymphatic vessels. The extrapulmonary foci may contain either *P. carinii* alone, or both pathogens: *P. carinii* and *P. wakefieldiae*.

**Key words:** *Pneumocystis wakefieldiae*, *Pneumocystis carinii*, extrapulmonary infection, nPCR, rat

**Wstęp**

Grzyby należące do rodzaju *Pneumocystis* są patogenami oportunistycznymi i w stanach osłabienia czynności układu odpornościowego żywiciela mogą wywoływać zapalenie płuc. Przy stałym wzroście liczby osób, które poddawane są leczeniu z wykorzystaniem środków immunosupresyjnych *Pneumocystis* stanowi więc istotne zagrożenie epidemiologiczne. Dlatego prowadzone są badania mające na celu

wyjaśnienie nierozpoznanych dotychczas aspektów biologii oraz zagadnień dotyczących źródeł zakażenia, wektorów czy też rezerwuarów i dróg przenoszenia *Pneumocystis*. Stwierdzono, że grzyb przenoszony drogą powietrzną trafia do pęcherzyków płucnych, w których dochodzi do jego replikacji. Jednak obserwacje prowadzone u osób zakażonych *Pneumocystis*, początkowo *post mortem*, a następnie przyżyciowo wykazały, że grzyb może umiejscawiać się także w tkankach innych niż płucne. Stwierdzono, że

u osób z immunosupresją, której przyczyną nie był wirus HIV zakażenie *Pneumocystis* występujące poza płucami nie daje charakterystycznych objawów klinicznych, co uniemożliwia jego przyżyciowe rozpoznanie. Infekcja rozwija się najczęściej tuż przed śmiercią i nie stanowi jej przyczyny [1–3]. Występowanie objawów klinicznych towarzyszących rozsianym schorzeniom *Pneumocystis* stwierdzono natomiast u pacjentów zakażonych HIV [4, 5]. Ng i wsp. [6] wykazali, że objawy pneumocystozy pozapłucnej są odpowiednie dla zajętego narządu lub tkanki. Przeprowadzona przez autorów analiza przypadków chorobowych pozwoliła ponadto na stwierdzenie, że prognozy dotyczące przebiegu zakażenia rozsianego są uzależnione od jego lokalizacji.

Wiele przypadków zakażeń pozapłucnych opisano w czasie gdy w profilaktyce pneumocystozowego zapalenia płuc stosowano pentamidynę w postaci wziewnej. Dlatego wiązano ich występowanie ze złym wchłanianiem podawanego tą drogą środka co mogło powodować niewystarczający poziom leku we krwi obwodowej i w konsekwencji prowadzić do rozwoju choroby poza płucami. Jednak przypadki pneumocystozy pozapłucnej u osób przyjmujących *per os* leki w celach profilaktycznych nie potwierdzały powyższej teorii [7, 8].

W celu poznania dróg szerzenia się zakażenia *Pneumocystis in vivo* przeprowadzono badania tkanek płucnych, węzłów chłonnych krezkowych, wątroby oraz nerek uzyskanych od szczurów poddawanych immunosupresji z wykorzystaniem octanu hydrokortyzonu. Za pomocą metody nested PCR (nPCR) poszukiwano fragmentów genu kodującego mtLSU DNA *Pneumocystis carinii* i *Pneumocystis wakefieldiae* [9].

## Material i metody

W pracy wykorzystano materiał uzyskany

od zwierząt badanych uprzednio na obecność DNA *P. carinii* w surowicy krwi. W trakcie tych badań samcom szczurów Wistar przez 9 kolejnych tygodni farmakologicznie obniżano odporność aby spowodować rozwój infekcji subklinicznej, nabytej przez zwierzęta w sposób naturalny, do stadium pneumocystozy. Szczurom podawano podskórnie octan hydrokortyzonu, dwa razy w tygodniu, w dawce 0,037g. Materiał do badań, który stanowiły: krew, płuca, węzły chłonne krezkowe, wątroba, śledziona oraz nerki, pobierano po zastosowaniu narkozy ketaminowo-ksylazynowej. Ocenę intensywności zakażenia w płucach przeprowadzono badając mikroskopowo preparaty odciskowe z tkanek płucnych zabarwione odczynnikiem Giemzy. Do badań wybrano tkanki pobrane od 16 osobników, będących po 5–9 tygodniach iniekcji octanu hydrokortyzonu, u których liczba cyst w preparacie z płuc wynosiła od 0,2 do 4,6 w 1 polu widzenia. U 10 z tych zwierząt stosując metodę semi-nested wykryto uprzednio DNA *Pneumocystis* w surowicy krwi [10] (Tabela 1).

**Izolacja DNA.** Po trzykrotnym płukaniu solą fizjologiczną tkanki homogenizowano. DNA izolowano posługując się zestawem QIA Tissue KIT firmy Qiagen, zgodnie z instrukcją producenta. Do rozpoczęcia badań DNA przechowywano w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Amplifikacja DNA.** Zastosowano metodę nested PCR, z parą starterów zewnętrznych pAZ102-E, pAZ102-H oraz dwoma parami starterów wewnętrznych kodujących sekwencje *P. carinii* (startery: RC1, RC2) i *P. wakefieldiae* (startery: RR1, RR2) [11, 12]. Po etapie aktywacji polimerazy w temp.  $95^{\circ}\text{C}$ , który trwał 15 min przeprowadzano 40 cykli amplifikacji w warunkach:  $94^{\circ}\text{C}/1$  min,  $54^{\circ}\text{C}$  (startery RC1, RC2, i RR, RR2) lub  $55^{\circ}\text{C}$  (startery pAZ102-H, pAZ102-E) przez 1,5 min,  $72^{\circ}\text{C}/2$  min. Wyniki amplifikacji odczytywano

Tabela 1. Charakterystyka zwierząt zbadanych  
Table 1. Characteristic of examined animals

Wyniki badań Results	Tydzień immunosupresji. Numer zwierzęcia/Week of immunosuppression. Rat number															
	5.1	5.2	5.3	6.1	6.2	6.3	7.1	7.2	7.3	7.4	8.1	8.2	8.3	9.1	9.2	9.3
Płuca/Lungs Ilość cyst w polu widzenia <sup>1</sup>	0,2	0,3	0,9	1,9	4,4	3,9	3,0	4,6	2,9	4,6	2,4	2,5	2,9	2,1	3,0	2,3
DNA w surowicy krwi/DNA in serum	0	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+

Explanations: <sup>1</sup>—mean number of cysts per one microscopic field

Tabela 2. Dodatnie wyniki badania narządów wewnętrznych szczurów na obecność DNA *Pneumocystis carinii* i *Pneumocystis wakefieldiae*Table 2. Positive results of internal organs examination for DNA of *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis wakefieldiae* presence

Narząd/Organ	Numer szczura/Number of rat									
	6.2	6.3	7.1	7.2	7.3	8.1	8.2	9.1	9.2	9.3
Wątroba/Liver	++	++	++	++	0	++	0	0	0	++
Śledziona/Spleen	0	+	++	++	++	+	+	0	0	0
Nerki/Kidneys	++	+	+	+	0	0	0	0	0	0
Węzły chłonne/Lymph nodes	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+

Explanations: +: DNA *P. carinii*; ++: DNA-*P. carinii* and *P. wakefieldiae*

po przeprowadzeniu elektroforezy w 2% żelu agarozowym zabarwionym bromkiem etydydy. Produkty amplifikacji miały wielkość 137 p. z. i 251 p. z. gdy reakcja przebiegała odpowiednio ze starterami RC1, RC2 i RR1, RR2.

## Wyniki

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia DNA *Pneumocystis* wykryto w 26 zbadanych próbkach. Obydwa gatunki: *P. carinii* i *P. wakefieldiae* występowały razem w 17 próbkach, a w pozostałych 9 wykrywano wyłącznie gatunek *P. carinii* (Tabela 2). Próbkę dodatkowo pochodziły od 10 szczurów zbadanych po 6–9 tygodniach stosowania immunosupresji. Najwyższy odsetek wyników dodatnich (62,5%) uzyskano badając węzły chłonne. U dwóch szczurów DNA *Pneumocystis* było obecne w surowicy krwi, ale nie zostało wykryte w tkankach narządów wewnętrznych, natomiast u dwóch innych osobników wykryto DNA w narządach wewnętrznych, chociaż wynik badania surowicy był ujemny. Średnia liczba cyst w płucach zwierząt, u których wykryto ogniska zakażenia pozapłucnego wynosiła 3,4 w 1 polu widzenia, podczas gdy u zwierząt z infekcją ograniczoną do tkanek płucnych była blisko dwukrotnie niższa – 1,8 w 1 polu widzenia.

## Dyskusja

Wstępnie założono, że nagromadzenie dużej liczby *Pneumocystis* i rozwój procesów zapalnych prowadzi do uszkodzenia mięszu płuc szczurów poddawanych długotrwałej immunosupresji, efek-

tem czego może być przeniesienie zakażenia do tkanek innych narządów. Wyniki przeprowadzonych badań wydają się potwierdzać przyjęte założenie. Poza tkankami płucnymi, *Pneumocystis* wykryto u zwierząt poddawanych immunosupresji przez okres 6 do 9 tygodni. Intensywność infekcji płuc u osobników z pneumocystozą rozsianą przekraczała około dwukrotnie średnią intensywność obliczoną dla przypadków pneumocystozy ograniczonej do płuc. Wyniki zgodne z uzyskanymi w przeprowadzonej pracy opublikowali Chary-Reddy i Graves [13], którzy również badali szerzenie się zakażenia *Pneumocystis* w organizmach szczurów doświadczalnych. Posługując się metodą PCR autorzy wykryli fragmenty genu MSG *Pneumocystis* poza płucami u szczurów po 6 do 8 tygodniach stosowania immunosupresji z wykorzystaniem octanu metyloprednizolonu. DNA grzyba występowało w wątrobie, nerkach, śledzionie i węzłach chłonnych zwierząt, u których infekcja w tkankach płucnych była intensywna. Również Denis i wsp. [14] wykrywali *Pneumocystis* poza płucami u szczurów poddawanych wielotygodniowej immunosupresji. Za pomocą metody immunofluorescencji autorzy stwierdzili obecność grzyba w tkankach wątroby, śledziony, serca i nerek u 5 z 9 (55%) zbadanych zwierząt po 9–12 tygodniach immunosupresji. Natomiast Rabodonirina i wsp. [15] wykryli DNA *Pneumocystis* nie tylko u 11 szczurów z immunosupresją ale też u dwóch immunokompetentnych zwierząt kontrolnych. DNA obecne było w co najmniej jednym ze zbadanych organów innych niż płuca, wśród których znalazły się: wątroba, śledziona i nerki. Autorzy wysnuli więc przypuszczenie, że szerzenie się zakażenia poza płuca może być natu-

ralnym elementem ewolucji pneumocystozy a nie zjawiskiem w jej przebiegu wyjątkowym.

W doświadczeniu Chary-Reddy i Graves węzły chłonne stanowiły poza płucami najczęstszą lokalizację zakażenia *Pneumocystis* u szczurów laboratoryjnych [13]. W przeprowadzonych badaniach również stwierdzono, że *Pneumocystis* występuje najczęściej w tkankach węzłów chłonnych. Wydaje się więc prawdopodobne, że choroba szerzy się z płuc drogą naczyń limfatycznych. Nie wykazano natomiast powiązania pomiędzy występowaniem ognisk pneumocystozy pozapłucnej a wynikami badania surowicy krwi na obecność DNA grzyba. Wynik badania narządów wewnętrznych dwóch zwierząt, u których wykryto uprzednio materiał genetyczny *Pneumocystis* w surowicy krwi był ujemny, a w przypadku dwóch innych osobników wystąpiła sytuacja odwrotna: przy ujemnym wyniku badania surowicy krwi stwierdzono pozapłucne ogniska zakażenia. Podobne rezultaty uzyskali też Chary-Reddy i Graves: u sześciu szczurów wykryli DNA grzyba w tkankach pozapłucnych chociaż nie było ono obecne w próbkach krwi [13].

W pracy wykorzystano metodę nested PCR ponieważ zwiększa ona czułość wykonywanych badań, a także pozwala na rozróżnienie gatunków *Pneumocystis*: *P. carinii* i *P. wakefieldii*, które występują u szczurów laboratoryjnych. W tkankach płucnych wszystkich wytypowanych do doświadczenia zwierząt stwierdzono obecność *P. carinii* i *P. wakefieldiae*. Jednak u 40% zbadanych osobników w ogniskach pozapłucnych wykryto jedynie *P. carinii*, natomiast gatunek *P. wakefieldiae* nie występował jako jedyny w żadnej z 26 dodatnich próbek tkanek pozapłucnych. Według wiedzy autorki są to pierwsze wyniki dotyczące występowania dwóch różnych gatunków szczurzego *Pneumocystis* poza płucami. W płucach szczurów laboratoryjnych *P. wakefieldiae* jest również bardzo rzadko spotykany jako jedyny gatunek, obydwa gatunki szczurzego *Pneumocystis* występują tam najczęściej razem, co wykazały badania przeprowadzone przez Cushion i Orr [16]. Natomiast Icenhour i wsp. zaobserwowali, że koegzystencja *P. carinii* i *P. wakefieldiae* w płucach oparta jest na zasadach konkurencji, a częściowy wpływ na wynik tej konkurencji mają czynniki zewnętrzne takie jak wilgotność i temperatura otoczenia [17].

Analizując wyniki przeprowadzonego doświadczenia stwierdzono, że masywne zakażenia *Pneumocystis* w obrębie płuc sprzyjają szerzeniu się pneumocystozy do innych organów wewnętrznych,

prawdopodobnie drogą naczyń limfatycznych. U szczurów laboratoryjnych zakażenie w tkankach innych niż płucne mogą powodować wspólnie gatunki *P. carinii* i *P. wakefieldiae* oraz jako jedyny gatunek *P. carinii*. Ponieważ węzły chłonne stanowiły najczęstszą lokalizację *Pneumocystis* wydaje się, że ich badanie przy zastosowaniu metody nPCR mogłoby usprawnić laboratoryjne rozpoznawanie pneumocystozy jednak wymaga to przeprowadzenia dalszych badań.

## Literatura

- [1] Barnett R.N., Hull J.G., Vortel V., Kralove H., Schwarz J. 1969. *Pneumocystis carinii* in lymph nodes and spleen. *Archives of Pathology* 88: 175–180.
- [2] LeGolvan D.P., Heidelberger K.P. 1973. Disseminated, granulomatous *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Archives of Pathology* 95: 344–348.
- [3] Jarnum S., Rasmussen E.F., Ohlsen A.S., Sorensen A.W.S. 1968. Generalized *Pneumocystis carinii* infection with severe idiopathic hypoproteinemia. *Annals of Internal Medicine* 68: 138–145.
- [4] Cohen O.J., Stoeckle M.Y. 1991. Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Internal Medicine* 151: 1205–1214.
- [5] Cote R.J., Rosenblum M., Telzak E.E., May M., Unger P.D., Cartun R.W. 1990. Disseminated *Pneumocystis carinii* infection causing extrapulmonary organ failure: clinical, pathologic, and immunohistochemical analysis. *Modern Pathology* 3: 25–30.
- [6] Ng V.L., Yajko D.M., Hadley W.K. 1997. Extrapulmonary pneumocystosis. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 401–418.
- [7] Carlin E.M., Coker R.J., Goldin R.D., Harris J.R. W. 1993. Systemic *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis with dapsone and pyrimethamine fails to protect against extrapulmonary pneumocystosis. *Genitourinary Medicine* 69: 130–132.
- [8] Podzamczar D., Martos A., Ferrer I., Santin M., Gudiol F. 1993. Hepatic and pulmonary pneumocystosis during primary prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia with dapsone/pyrimethamine. *Clinical Infectious Diseases* 16: 171.
- [9] Cushion M. 2004. Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. *Mycologia* 96: 429–438.
- [10] Gołąb E., Sobolewska A., Bitkowska E., Bednarska A., Berak H., Dzbenski 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: 235–238.
- [11] Wakefield A.E., Pixley F.J., Banerji S., Sinclair K., Miller R.F., Moxon, E.R., Hopkin J.M. 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification.

- Lancet* 336: 451–453.
- [12] Palmer R.J., Cushion M.T., Wakefield A. 1999. Discrimination of rat-derived *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *ratti* using the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 13: 147–155.
- [13] Chary-Reddy S., Graves D.C. 1996. Identification of extrapulmonary *Pneumocystis carinii* in immunocompromised rats by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1660–1665.
- [14] Denis C.M., Cailliez J.C., Aliouat E.M., Delcourt P., LePage G., Hermant N., Lamouret M., Dei-Cas E. 1994. Does *Pneumocystis carinii* remain infectious in the bloodstream? *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41: 86S.
- [15] Rabodonirina M., Wilmotte R., Dannaoui E., Persat F., Bayle G., Mojon M. 1997. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by PCR amplification in various rat organs in experimental pneumocystosis. *Journal of Medical Microbiology* 46: 665–668.
- [16] Cushion M.T., Orr S. 1996. Kinetics of 2 genetically distinct *Pneumocystis carinii* populations in rat colonies. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 46S.
- [17] Icenhour C.R., Arnold J., Medvedovic M., Cushion M.T. 2006. Competitive coexistence of two *Pneumocystis* species. *Infection, Genetics and Evolution* 6: 177–186.

Wpłynęło 6 marca 2009

Zaakceptowano 20 kwietnia 2009