

**Urszula Demkow**

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. U. Demkow

## Diagnostyka immunologiczna i molekularna zakażeń dróg oddechowych

The immunological and molecular diagnostics of respiratory tract infections

### Abstract

Diagnostic strategies in upper and lower respiratory tract infections include conventional procedures and the new molecular tools. Serology plays a role in certain viral and atypical infections of lower respiratory track but is not reliable in small children and in immunocompromised subjects. Antigen detection can be also carried out. If a potential pathogen is non detectable by simply assay or in severe or complicated lower respiratory tract infections, the use of molecular tools is highly indicated.

**Key words:** respiratory tract infections, laboratory diagnostics, molecular methods, serology

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 6: 446–453**

### Streszczenie

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń górnych i dolnych dróg oddechowych opiera się na metodach konwencjonalnych oraz nowoczesnych metodach biologii molekularnej. Serologia odgrywa ważną rolę w rozpoznawaniu niektórych zakażeń o etiologii wirusowej i w diagnostyce zakażeń drobnoustrojami atypowymi. Metody serologiczne nie są jednak przydatne w diagnostyce zakażeń u małych dzieci oraz u osób w immunosupresji. W przypadku patogenów niewykrywalnych metodami konwencjonalnymi oraz zakażeń o ciężkim przebiegu, zagrażających życiu, metody molekularne mają duże znaczenie.

**Słowa kluczowe:** zakażenia dróg oddechowych, diagnostyka laboratoryjna, metody molekularne, serologia

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 6: 446–453**

### Wprowadzenie

Zakażenia dróg oddechowych stanowią istotny problem w codziennej praktyce klinicznej. Na zakażenia górnych dróg oddechowych zapada każdego roku około 50% populacji, a około 5% cierpi na zakażenia dolnych dróg oddechowych [1]. Czynnikiem etiologicznymi zakażeń dróg oddechowych są wirusy, bakterie, pierwotniaki i grzyby. Zakażenia dróg oddechowych mogą przebiegać pod postacią łagodnych zespołów objawów obejmujących jedynie górne drogi oddechowe i ciężkich zakażeń obejmujących dolne drogi oddechowe oraz pęcherzyki płucne, prowadząc do ciężkich zaburzeń ogólnoustrojowych (posocznica, zespół ostrej niewydolności oddechowej). Ciężkie zakażenia dolnych dróg oddechowych w powiązaniu z powikłaniami ogólnoustrojowymi występują częściej przy obecności czynników ryzyka, takich jak przewlekłe choroby serca i płuc, cukrzyca, niewydolność nerek, nowotwory, choroby układu krwiotwórczego, niedożywienie i inne choroby przewle-

mujących jedynie górne drogi oddechowe i ciężkich zakażeń obejmujących dolne drogi oddechowe oraz pęcherzyki płucne, prowadząc do ciężkich zaburzeń ogólnoustrojowych (posocznica, zespół ostrej niewydolności oddechowej). Ciężkie zakażenia dolnych dróg oddechowych w powiązaniu z powikłaniami ogólnoustrojowymi występują częściej przy obecności czynników ryzyka, takich jak przewlekłe choroby serca i płuc, cukrzyca, niewydolność nerek, nowotwory, choroby układu krwiotwórczego, niedożywienie i inne choroby przewle-

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Urszula Demkow, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny, ul. Marszałkowska 24, 00–576 Warszawa, e-mail: demkow@litewska.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.10.2011 r.  
Copyright © 2011 Via Medica  
ISSN 0867–7077

kłe [2]. W przypadku łagodnych zakażeń górnych dróg oddechowych diagnostyka laboratoryjna na ogół jest zbędna, a chorzy mogą być leczeni objawowo lub empirycznie przeciwko drobnoustrojom. U chorych z ciężkimi zakażeniami, szczególnie z towarzyszącymi zaburzeniami odporności lub obecnością chorób współistniejących, diagnostyka laboratoryjna, pozwalająca na identyfikację czynnika etiologicznego, jest niezwykle pomocna [3].

Diagnostyka zakażeń dróg oddechowych opiera się na wywiadzie obejmującym aktualne dolegliwości chorego oraz współistniejące i przebyte choroby, wywiadzie epidemiologicznym, badaniu przedmiotowym, badaniach radiologicznych oraz mikrobiologicznych. W niektórych przypadkach powyższe metody diagnostyczne należy uzupełnić o dodatkowe badania laboratoryjne: metody serologiczne, diagnostykę molekularną oraz specjalistyczne badania płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, *broncho-alveolar lavage fluid*) i indukowanej płwociny (np. przy zakażeniu *P. jiroveci* — patrz dalej).

Dostępność różnorodnych metod diagnostycznych oraz ich wysokie koszty implikują konieczność opracowania wytycznych dotyczących zastosowania i wyboru metod diagnostycznych. Według wytycznych pediatrycznych [3] konieczność wdrożenia intensywnej diagnostyki mikrobiologicznej oraz zastosowania innych metod diagnostyki laboratoryjnej dotyczy następujących sytuacji:

- ciężkie zakażenia prowadzące do hospitalizacji,
- przedłużające się zakażenia,
- brak efektu zastosowanej antybiotykoterapii,
- podejrzenie ciężkiej infekcji wirusowej, szczególnie przy dostępności swoistego leczenia przeciwwirusowego,
- chorzy w immunosupresji,
- badania epidemiologiczne wybranych populacji.

Praktycznie zalecenia te można również odnieść do osób dorosłych.

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń dróg oddechowych obejmuje: klasyczną diagnostykę mikrobiologiczną, metody serologiczne (wykrywanie przeciwciał przeciwko antygenom drobnoustrojów lub samych antygenów w płynach ustrojowych) i metody biologii molekularnej (wykrywanie kwasów nukleinowych drobnoustrojów). Pomocne w postawieniu właściwego rozpoznania są niekiedy podstawowe badania laboratoryjne (hematologiczne, biochemiczne, koagulologiczne itp.). Metody serologiczne i molekularne mają szczególne znaczenie w przypadku, gdy hodowla drobnoustroju jest niemożliwa lub trudna technicznie i długotrwała [4–6]. Dotyczy to szczególnie zakażeń wi-

rusowych, drobnoustrojów atypowych, niektórych pierwotniaków, grzybów i wolno rosnących gatunków bakterii. Wybór metody diagnostycznej zależy od:

- czynnika etiologicznego,
- informacji, jaką chcemy uzyskać (wykrywanie wczesnej fazy zakażenia, fazy przewlekłej, przebytej infekcji),
- stanu klinicznego chorego, jego wieku, obecności innych chorób modyfikujących wyniki badań.

Na przykład badania serologiczne zwykle nie są pomocne we wczesnej fazie ostrej choroby, gdyż synteza przeciwciał w odpowiednim mianie wymaga zwykle około 2 tygodni. Natomiast wykrywanie kopii wirusa metodą łańcuchowej reakcji polimerazy *real-time* PCR (*polymerase chain reaction*) jest możliwe tylko w aktywnej fazie choroby. Stwierdzenie przebytego zachorowania jest możliwe jedynie metodami serologicznymi.

Metody wykrywania zakażeń wirusami oddechowymi to: hodowla tkankowa (komórkowa), badania serologiczne i badania techniką PCR. Hodowle tkankowe przez wiele lat były „złotym standardem” diagnostyki wirusologicznej. Obecnie jednak laboratoria diagnostyki wirusowej bazujące na technikach hodowlanych są powszechnie zastępowane przez pracownie posługujące się czulszymi technikami molekularnymi. W wielu przypadkach techniki hodowlane mogą dawać wyniki fałszywie ujemne, spowodowane zbyt małą liczbą kopii wirusa, zakażeniem wirusami nieznanymi, obecnością inhibitorów wirusowych w próbce, złym przechowywaniem i transportem próbki. Klasyczne wirusy oddechowe wykrywano tradycyjnie metodami inokulacji materiału zakażonego na różnych podłożach komórkowych. Największym problemem była jednak labilność wirusów w transportowanej próbce. Badania charakteryzowała niska czułość oraz czasochłonność — zwykle 2–3 dni niezbędne dla potwierdzenia obecności wirusa w próbce.

### Podstawowe badania laboratoryjne

Podstawowe, rutynowe badania laboratoryjne często mogą dawać pierwsze wskazówki dotyczące etiologii zakażenia, jego ciężkości i obecności powikłań. Jednym z podstawowych badań jest morfologia krwi obwodowej z ilościową i jakościową oceną leukocytów. W rozmazie krwi można stwierdzić obecność leukocytozy z przewagą granulocytów obojętnochłonnych (zakażenia bakteryjne) lub limfocytozę (niektóre infekcje wirusowe). Jakościowa ocena krwinek białych, zmiany morfologii limfocytów: limfocytów atypowych, mononuklearów,

ziarnistości toksycznych w granulocytach, również mogą być wskazówką diagnostyczną. Badania biochemiczne (enzymy wątrobowe, bilirubina) i badanie ogólne moczu mogą pomóc w ocenie występowania powikłań. Niejednokrotnie dla potwierdzenia infekcyjnego podłoża stanu zapalnego pomocne są białka ostrej fazy (białko C-reaktywne, prokalcytonina).

### Diagnostyka serologiczna

Polega na oznaczaniu stężenia przeciwciał IgM, IgA, IgG oraz ich awidności (siły wiązania antygeny z przeciwciałem) [5]. We wczesnej fazie zakażenia awidność przeciwciał jest niska, dłuższy czas po zakażeniu awidność rośnie, gdyż syntetyzowane przeciwciała są lepiej „dopasowane” do antygenów drobnoustroju. Na poziom oznaczanych przeciwciał wpływa wiek, faza choroby, to czy był to pierwszy, czy powtórny kontakt z drobnoustrojem oraz obecność chorób współistniejących. Diagnostyka serologiczna często zawodzi u małych dzieci i u chorych w immunosupresji. Na ogół nie jest również pomocna we wczesnej fazie ostrej choroby. Obecność przeciwciał w surowicach dzieci do 6. miesiąca życia może wynikać z obecności przeciwciał pochodzących od matki i nabytych w życiu płodowym [5].

### Metody serologiczne

Należą do nich: immunofluorescencja pośrednia (IF) i metody immunoenzymatyczne (EIA). Immunofluorescencja pośrednia pozostaje „złotym standardem”, gdyż tą metodą mogą być różnicowane reakcje swoiste i nieswoiste. Jest techniką mniej czułą, lecz bardziej swoistą niż EIA. Jest również bardziej czasochłonna i wymaga doświadczonego personelu. Natomiast EIA mają tę przewagę, że można je zautomatyzować, co ułatwia rutynową diagnostykę.

W niektórych przypadkach przydatną metodą jest również immunofluorescencja bezpośrednia (bezpośrednie wykrywanie antygenów drobnoustrojów w materiale z dróg oddechowych, np. w BALF lub w płwocinie).

### Diagnostyka molekularna

Polega na wykrywaniu kwasów nukleinowych drobnoustrojów [3, 4, 6]. W przypadku patogenów oddechowych szczególne zastosowania technik biologii molekularnej to wykrywanie materiału genetycznego:

- bakterii szczególnie trudnych do hodowli, wolno rosnących (*Bordetella pertussis*),
- drobnoustrojów atypowych (*Legionella spp.*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*),

- wirusów,
- grzybów,
- pierwotniaków.

### Metody molekularne

Zalicza się do nich *Southern blot*, hybrydyzację *in situ*, które pozwalają wykryć nawet niepełne fragmenty genomu wirusa w krążących limfocytach lub w materiale biopsyjnym, a także różne odmiany techniki PCR, w tym *real-time* PCR, *multiplex* PCR (równoczesna identyfikacja panelu wirusów oddechowych).

### Real-time PCR

To technika, która zrewolucjonizowała mikrobiologię kliniczną [3, 6]. *Real-time* PCR (PCR w czasie rzeczywistym) łączy klasyczną PCR z fluorescencyjną metodą wykrywania produktu amplifikacji w tym samym układzie. Czas wykonania badania wynosi około godziny. Jest to technika droższa niż metody hodowlane. Jej czułość i swoistość jest bardzo wysoka. Metoda ta jest szczególnie użyteczna, gdyż umożliwia ocenę liczby kopii patogenu. Możliwość wielokrotnego powtarzania pozwala na monitorowanie leczenia. Badanie składa się z 3 etapów: 1) ekstrakcji DNA (manualnej lub automatycznej), 2) amplifikacji, 3) wykrywania produktu metodą fluorescencji.

*Real-time* PCR ma przewagę nad konwencjonalnym PCR — posiada wyższą swoistość, wynik otrzymuje się szybko oraz jest możliwe ilościowe oznaczanie liczby kopii drobnoustroju [4, 7]. Pozwala na wykrycie drobnoustrojów posiadających geny oporności na antybiotyki (gronkowce metycylinooporne [MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*] lub enterokoki oporne na wankomycynę [VRE, *vancomycin-resistant Enterococcus*]). W wielu badaniach potwierdzono, że wykrycie i izolacja nosicieli MRSA lub VRE może znacząco obniżyć częstość występowania zakażeń wewnątrzszpitalnych oraz zredukować koszty ich leczenia. Szeroki nadzór nad MRSA i/lub VRE metodami hodowlanymi jest trudny dla większości laboratoriów mikrobiologii klinicznej. *Real-time* PCR umożliwia uproszczenie i przyspieszenie wykrywania MRSA i VRE — wynik może być otrzymany w ciągu jednego dnia.

Metoda ta ma zastosowanie w wykrywaniu:

- 1) bakterii:
  - bakterii wolno rosnących i trudno poddających się hodowli,
  - patogenów wywołujących atypowe zapalenia płuc,
  - *Streptococcus pneumoniae* w wydzielinie z dróg oddechowych (z zastrzeżeniem, że tech-

- nikami molekularnymi nie można odróżnić kolonizacji od aktywnego zakażenia),
- prątków,
  - szczepów bakterii opornych na antybiotyki (MRSA, VRE),
  - w szybkiej diagnostyce krztuśca;
- 2) wirusów — jest metodą z wyboru w wykrywaniu i ilościowej ocenie wirerii. Służy do oceny progresji choroby oraz efektów leczenia. Badanie jest szczególnie przydatne u chorych po transplantacjach i przy prowadzonej terapii antywirusowej. Najczęściej wykrywane wirusy to:
- *Herpes simplex virus*,
  - cytomegalowirus (CMV),
  - wirus Ebsteina-Barr (EBV, *Ebstein-Barr virus*),
  - wirus HIV,
  - klasyczne wirusy oddechowe,
  - wirus grypy i paragrypy,
  - RSV (*respiratory syncytial virus*)
  - adenowirus,
  - metapneumowirus,
  - *SARS coronavirus*;
- 3) grzybów — *real-time* PCR najczęściej stosuje się do diagnostyki zakażeń grzybami rodzaju *Aspergillus*. Metoda diagnostyczna jest bardzo cenna ze względu na wysoką śmiertelność inwazyjnej aspergilozy i toksyczność leczenia. Istniejące testy służą głównie do wykrywania *Aspergillus fumigatus*, rzadziej *Aspergillus flavus*. Materiałem do badań może być krew obwodowa, BALF, bioptaty tkanek. Opisano odmianę techniki PCR do wykrywania genu oporności na itraconazol. Istnieją testy do wykrywania *Candida albicans*, w tym także opornych na flukonazol. Metodą *real-time* PCR można również wykryć *Pneumocystis jiroveci*, obecnie zaliczany do grzybów.

### Metody molekularne w przyszłości

Należą do nich: elektroforeza kapilarna z *multiplex* PCR lub bez, mikroczipy, w pełni automatyczne systemy PCR bez konieczności wstępnej izolacji DNA lub RNA oraz PCR z detekcją mikrocząstek.

W ostatni czasie wprowadzono metody molekularne umożliwiające równoczesną identyfikację materiału genetycznego szeregu drobnoustrojów w badanym materiale (np. drobnoustroje atypowe *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*) [7].

### Diagnostyka płwociny i BALF

Ocena charakteru wykrztuszonej płwociny (charakter ropny, obecność krwi) jest jednym z najprostszych badań, które można przeprowadzić nawet przy łóżku chorego. W popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych można bezpośrednio

poszukiwać patogenów (trofozoity, cysty, komórki zakażone wirusami, fragmenty grzybni) [8].

### Metody badania BALF

Metody te obejmują immunofluorescencję bezpośrednią i ocenę rozmazu komórek BALF po odpowiednim barwieniu. Cechuje je jednak niska czułość, wymagają także dużego doświadczenia. Jedy- nym zakażeniem, w którym bezpośrednio poszukiwanie patogenów w BALF jest powszechnie rekomendowane jest zakażenie *Pneumocystis jiroveci*.

### Szczegółowy opis metod diagnostycznych dla wybranych patogenów oddechowych

#### *M. pneumoniae*

*M. pneumoniae* to drobnoustrój pozbawiony ściany komórkowej [9]. Metody wykrywania zakażenia to:

- izolacja i hodowla na specjalnych podłożach,
- metody serologiczne (immunofluorescencja pośrednia i metody immunoenzymatyczne),
- hybrydyzacja DNA,
- PCR.

Najstarszym testem w diagnostyce zakażeń mykoplazmowych, wprowadzonym w latach 40. ubiegłego wieku, jest test wykrywający zimne aglutyniny. Zimne aglutyniny są to heterofilne przeciwciała, które wywołują aglutynację własnych krwinek chorego w niskiej temperaturze. Test ten charakteryzuje się małą czułością (30–50%) i małą swoistością. Dziś ma znaczenie historyczne [10].

Przeciwciała przeciwko antygenom mykoplazmy wykrywa się powszechnie metodą immunofluorescencji pośredniej lub metodami immunoenzymatycznymi [10]. W przypadku zakażenia pierwotnego dochodzi do wzrostu IgM około 7. dnia choroby. O zakażeniu świadczy 4-krotny wzrost IgG w odstępie 2–4 tygodni. Stężenie immunoglobulin jest zazwyczaj niskie u dzieci poniżej 3. rż. U osób młodych w przebiegu infekcji pierwotnie wzrasta IgM, a następnie IgG. U starszych osób najczęściej występuje reinfekcja i dlatego w przypadku ponownego zachorowania obserwuje się znaczący wzrost IgG i IgA, przy niewielkim wzroście lub bez zmiany miana IgM. Wysokie miano IgG długo utrzymuje się u ozdowieńców i z tego powodu nie może być wyznacznikiem ostrej fazy choroby. Często zakażenia mykoplazmą mogą przebiegać bezobjawowo i jedynym dowodem przebytego zakażenia jest podwyższone miano IgG. W celu potwierdzenia zakażenia najlepiej powtórzyć badanie serologiczne 10–14 dni po pierwszym badaniu [9, 10].

Oprócz swoistych przeciwciał dla antygenów *M. pneumoniae* wykrywa się wiele przeciwciał

heterofilnych: zimne aglutyniny, aglutyniny dla paciorkowców, autoprzeciwciała dla glikolipidowych antygenów narządowych. Obecność przeciwciał heterofilnych wynika z podobieństwa glikolipidów *M. pneumoniae* i glikolipidów narządowych.

Zakażeniom *M. pneumoniae* może towarzyszyć niedokrwistość hemolityczna. Zwykle występuje w 2.–3. tygodniu choroby, przy ustępowaniu zmian oddechowych. Przebieg kliniczny może być różnorodny, od postaci łagodnych aż do ciężkich, ze znacznie podwyższonym stężeniem bilirubiny wolnej, powiększeniem wątroby i nasiloną niedokrwistością [9].

### Wirus Ebsteina-Barr

Zakażenie EBV jest bardzo powszechne, ocenia się, że występuje u około 90% dorosłych. Podczas pierwotnego zakażenia wirusy replikują w limfocytach B. Wirus pozostaje w organizmie do końca życia. Obraz kliniczny pierwotnego zakażenia może być bardzo różny w zależności od wieku i stanu układu odpornościowego — od bezobjawowego zakażenia do ciężkiej, powikłanej mononukleozy. W rzadkich przypadkach aktywna mononukleozą może przejść w aktywną przewlekłą postać choroby [11, 12]. Inne postacie kliniczne zakażenia to:

- zespół limfoproliferacyjny związany z chromosomem X,
- zespół przewlekłego zmęczenia,
- zespoły limfoproliferacyjne, w tym potransplantacyjne,
- rak nosogardzieli,
- chłoniak Burkitta,
- zespół hematofagocytarny związany z EBV,
- przewlekłe aktywne zakażenie EBV — stan przednowotworowy.

Śródmiąższowe zapalenie płuc może towarzyszyć różnym klinicznym postaciom zakażenia EBV.

Bardzo ważnym badaniem w diagnostyce mononukleozy jest morfologia krwi obwodowej z rozmazem. W rozmazie stwierdza się wzrost liczby limfocytów oraz obecność atypowych dużych limfocytów o zmienionym jądrze (mononuklearów). Mononukleozie mogą towarzyszyć również inne zmiany hematologiczne: niedokrwistość hemolityczna, małopłytkowość, a nawet agranulocytoza. Stwierdza się występowanie poliklonalnej hipergammaglobulinemii związanej z pobudzeniem limfocytów B.

W ciągu pierwszych 3 tygodni po zakażeniu u około 90% chorych na mononukleozę wykrywa się przeciwciała heterofilne (nieswoiste) reagujące z krwinkami barana. Obecność przeciwciał he-

terofilnych potwierdza się w odczynie Paula-Bunnella-Davidsohna (PBD) lub testem lateksowym. Mononukleozę rozpoznaje się, jeśli miano przekracza 1:56 u dorosłych i 1:28 u dzieci w odczynie PBD i 1:5 w odczynie lateksowym. Dodatni wynik uzyskuje się u 95% dorosłych chorych na mononukleozę i nieco rzadziej u dzieci [11, 12].

Diagnostyka serologiczna zakażenia EBV polega na wykrywaniu przeciwciał przeciwko antygenom wirusa. „Złotym standardem” jest immunofluorescencja pośrednia. Można stosować również metodę immunoenzymatyczną. Wirus Ebsteina-Barr ma złożony cykl życiowy, mogą pojawiać się ukryte lub aktywne formy zakażenia, odpowiedź humoralna jest bardzo złożona i może być trudna do interpretacji. W ostatnich latach opisano poszczególne etapy zakażenia i ich przełożenie na odpowiedź na określone antygeny, co ułatwia diagnostykę. Bardzo ważnym elementem rozpoznawania zakażeń EBV jest odróżnienie świeżego zakażenia od seronegatywności lub przebytej infekcji [11]. Antygeny wirusa pomocne w diagnostyce serologicznej to:

- antygen kapsydowy (VCA, *viral capsid antigen*),
- antygen jądrowy (EBNA, *Ebstein-Barr nuclear antigen*),
- antygen wczesny (EA, *early antigen*),
- antygen osłonki (MA, *membrane antigen*).

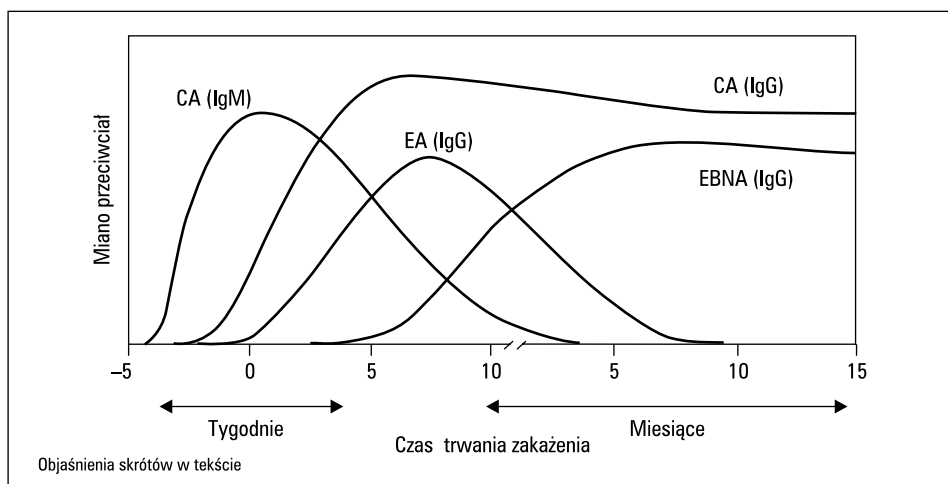
Dla pierwotnych infekcji typowe jest występowanie przeciwciał przeciwko antygenowi wczesnemu oraz białkom kapsydu wirusa. W najwcześniejszej fazie po zakażeniu wytwarzane są przeciwciała IgM przeciw EA. Najwyższe stężenie tych przeciwciał występuje razem z pierwszymi objawami mononukleozy. Około 2 tygodnie po zakażeniu rozpoczyna się wytwarzanie przeciwciał IgG przeciw EA, IgM przeciw VCA i IgG przeciw VCA. Najwyższe stężenie przeciwciał IgM przeciw VCA notuje się około 3 tygodni po wystąpieniu objawów. Przeciwciała IgM i IgG przeciw EA oraz IgM przeciw VCA zanikają w miarę progresji choroby. Najpierw spada miano przeciwciał IgM przeciw VCA, a następnie IgG przeciw EA, przy czym przeciwciała IgG anty EA mogą być wykrywane przez dłuższy czas po zakażeniu. Najwyższe miano przeciwciał IgG przeciw VCA stwierdza się około 6 tygodni po wystąpieniu objawów i utrzymuje się ono przez całe życie, dlatego IgG przeciw VCA są istotnym markerem seropozytywności. Ponowny wzrost IgG przeciw VCA towarzyszy reaktywacji zakażenia, natomiast IgM przeciw VCA rzadko pojawia się w przypadku reaktywacji. Najczulszym markerem reaktywacji są IgG przeciw EA. Kilka tygodni po wystąpieniu objawów można wykryć przeciwcia-

ła przeciw EBNA, które szczytowe miano osiągają po około 7 miesiącach i zwykle utrzymuje się ono na wysokim poziomie przez całe życie. Ich obecność świadczy o przebytej infekcji, podobnie jak kombinacja IgG przeciw VCA oraz IgG przeciw EBNA (ryc. 1 i tab. 1) [11].

Reaktywacja zakażenia EBV u osoby immunokompetentnej nie ma istotnego znaczenia klinicznego. Problemem jest reaktywacja u osób z obniżoną odpornością prowadząca do rozwoju zespołów limfoproliferacyjnych po transplantacji, chłoniaków u chorych zakażonych HIV itp. Diagnostyka serologiczna zarówno pierwotnego zakażenia, jak i reaktywacji często zawodzi u chorych w immunosupresji (np. po transplantacjach), dlatego dla tej grupy chorych najbardziej wiarygodnymi metodami wykrywania zakażenia są metody molekularne [12].

Powszechnie stosowane są 3 metody biologii molekularnej do wykrywania kwasów nukleinowych EBV: *real-time* PCR, *Southern blotting* do oceny komórek zakażonych przez EBV oraz hybrydyzacja *in situ*. Metoda *real-time* PCR jest szczególnie użyteczna w monitorowaniu poziomu wirerii i oceny skuteczności leczenia. Określony poziom odcięcia pozwala na rozróżnienie ukrytego zakażenia od aktywnej choroby. Techniki hybrydyzacji *Southern blot* i hybrydyzacji *in situ* z użyciem klonowanych fragmentów DNA lub RNA wirusa umożliwiają wykrycie nawet niepełnych fragmentów genomu wirusa występujących w krążących limfocytach lub w materiale biopsyjnym [12].

Nowym testem stosowanym w diagnostyce zakażenia EBV jest test ELISPOT, polegający na ocenie liczby komórek produkujących interferon gamma pod wpływem antygenów wirusa.



**Rycina 1.** Kinetyka odpowiedzi serologicznej w pierwotnym zakażeniu wirusem Ebsteina-Barr. Czas 0 oznacza moment wystąpienia objawów klinicznych

**Figure 1.** The kinetics of antibody response during primary infection with Epstein-Barr virus. Time 0 indicates the onset of the disease

**Tabela 1.** Interpretacja wyników badań serologicznych u chorych zakażonych wirusem Ebsteina-Barr

**Table 1.** The interpretation of serological tests' results in patients infected with Epstein-Barr virus

Przeciwciała	EA Ig	VCA IgM	VCA IgG	EBNA
Seronegatywny	-	-	-	-
Wczesna faza zakażenia	+	+	-	-
	+	+	+	-
	+	-	+	-
	-	+	+	-
Przebyte zakażenie	-	-	+	+
	-	-	-	+
Reaktywacja	++	-	++	+
	++	+	++	+

Objaśnienia skrótów w tekście

## Cytomegalowirus

Bardzo duży odsetek całej populacji jest zakażony CMV. Zakażenia nabyte drogą naturalną (głównie kropelkową) są zwykle bezobjawowe. Sporadycznie choroba ma przebieg klinicznie jawny, z objawami zespołu mononukleozowego [13]. Ciężki przebieg kliniczny mogą mieć zakażenia drogą parenteralną (przetoczenie krwi, przeszczepienie narządów — szczególnie u chorych w immunosupresji). W rzadkich przypadkach ostrej infekcji mogą wystąpić:

- śródmiąższowe zapalenie płuc,
- zapalenie wątroby,
- zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych,
- zapalenie mięśnia sercowego.

W badaniach laboratoryjnych we krwi obwodowej stwierdza się:

- limfocytozę z obecnością limfocytów atypowych,
- poliklonalną hipergammaglobulinemię,
- rzadko trombocytopenię i anemię hemolityczną.

Tradycyjną metodą diagnostyczną jest hodowla wirusa w fibroblastach, z materiałów takich jak mocz, krew, wymazy z gardła, wydzielina szyjki macicy, płyn owodniowy czy łożysko, z mikroskopową oceną zmian w komórkach wywołanych przez wirusa. W obrazie histopatologicznym cechą charakterystyczną cytomegalii jest powiększenie zainfekowanych komórek i wtręty wewnątrzjądrowe. Izolacja wirusa nie pozwala na odróżnienie infekcji pierwotnej od reaktywacji [13, 14].

Szybką metodą diagnostyczną są kombinacje hodowli tkankowych oraz wykrywanie wczesnych antygenów CMV (pp65) z użyciem przeciwciał monoklonalnych [13, 14]. Metoda ta pozwala już w kilka do kilkudziesięciu godzin od zakażenia wykryć białka produkowane przez wirusa — białka alfa, zwane wczesnymi antygenami (EA, *early antigens*), i białka gamma, zwane późnymi antygenami (LA, *late antigens*). Antygeny białkowe pojawiają się o 7–14 dni wcześniej niż swoiste przeciwciała dla wirusa cytomegalii i jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych.

W testach serologicznych wysokie miano przeciwciał IgM wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na pierwotną infekcję. Słaby dodatni wynik oznaczenia IgM może świadczyć o wystąpieniu ostrej infekcji wtórnej. W pierwotnym zakażeniu IgM szybko narastają i po ustąpieniu zakażenia znikają. U części chorych IgM mogą być wykrywane jeszcze w ciągu roku po zakażeniu. Wykrycie IgM nie świadczy o tym, czy jest to pierwotne zakażenie, czy reaktywacja endogennego zakażenia utajonego. Chorzy w immunosupresji mogą nie wytwarzać anty-CMV

IgM. Przeciwciała IgG narastają wolniej niż IgM, a po osiągnięciu maksimum obniżają swoje miano, utrzymując się przez całe życie [13, 14].

Do metod molekularnych należą ilościowa ocena DNA cytomegalowirusa oraz ocena jego aktywnej replikacji. Badania te są najbardziej przydatne u chorych w immunosupresji [12, 14].

## Pneumocystis jiroveci

*Pneumocystis jiroveci* (dawna nazwa *P. carinii*) może wywoływać oportunistyczne zapalenia płuc u osób w immunosupresji. Najczęściej dotyczy to osób zakażonych HIV oraz chorych na nowotwory i choroby autoimmunologiczne leczonych immunosupresyjnie [15].

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń *Pneumocystis jiroveci* jest trudna, gdyż brak rutynowych metod hodowli oraz wiarygodnych testów serologicznych. Metodami powszechnie stosowanymi są: specyficzne barwienia preparatów cytologicznych z BALF, immunofluorescencja bezpośrednia preparatów cytologicznych z BALF oraz PCR [16, 17].

Klasyczną metodą laboratoryjną do wykrywania drobnoustroju, który nie może być hodowany jest metoda bezpośredniej wizualizacji patogenu w materiale od chorego. Diagnostyka zakażenia *P. jiroveci* tradycyjnie opierała się na poszukiwaniu drobnoustroju w BALF. Trofozoity można uwidoczniać metodą May-Grunwalda-Giemsy, choć zdecydowanie lepsza jest immunofluorescencja bezpośrednia lub barwienie związkami srebra metodą Grocott-Gomori (*silver stain*). Wszystkie metody poszukiwania patogenu w specjalnie barwionych preparatach są stosunkowo mało czułe, a ich wynik zależy od doświadczenia osoby wykonującej badanie. Czułość immunofluorescencji bezpośredniej BALF wynosi 70–92%, natomiast w przypadku bronchoaspiratów i indukowanej płwociny jest znacznie niższa. Wyniki fałszywie ujemne częściej zdarzają się u osób bez zaburzeń odporności. U chorych w immunosupresji, ze względu na łatwiejsze namnażanie się drobnoustroju, jest on częściej wykrywany, choć oczywiście wyniki fałszywie ujemne też mogą się zdarzyć [15, 16].

Metodą diagnostyczną z wyboru jest *real-time* PCR, umożliwiająca ocenę liczby kopii drobnoustroju [16, 17]. Ilościowa *real-time* PCR jest szczególnie wartościowa, ponieważ *P. jiroveci* może kolonizować układ oddechowy (szczególnie u noworodków, kobiet w ciąży, osób z przewlekłymi chorobami układu oddechowego). Testy PCR są bardzo często dodatnie u bezobjawowych nosicieli. *Real-time* PCR może ilościowo rozróżnić kolonizację od choroby aktywnej klinicznie. Jednak mimo że poziom odcięcia oddziela nosicieli od

chorych, istnieje szara strefa wyników niejednoznacznych. Konieczne są zatem dalsze usprawnienia molekularnych technik badawczych [16, 17].

### Podsumowanie

Metody laboratoryjne mogą być cennym uzupełnieniem diagnostyki kliniczno-radiologicznej oraz mikrobiologicznej u chorych z zakażeniami dróg oddechowych. Zlecając wykonanie badania laboratoryjnego, musimy wiedzieć, czy i jak wykorzystamy otrzymany wynik. Wybór lub rezygnacja z danej metody powinny opierać się na przeprowadzeniu analizy poniesionych nakładów pracy, kosztów, czasu oczekiwania na wynik oraz korzyści odniesionych z otrzymanego wyniku i ich przełożeniu na postępowanie z chorym. Pierwsze wskazówki diagnostyczne mogą wpływać z najprostszych badań laboratoryjnych, jak morfologia krwi z rozmazem, badania biochemiczne, ocena makroskopowa płwociny.

Bardzo ważne znaczenie ma znajomość dostępnych technik laboratoryjnych oraz ich wad i ograniczeń. W każdej sytuacji niezwykle istotna jest współpraca lekarza z pracownikami laboratorium przy wyborze odpowiednich badań oraz interpretacji otrzymanych wyników.

### Piśmiennictwo

1. Monte S.V., Paolini N.M., Slazak E.M., Schentag J.J., Paladino J.A. Costs of treating lower respiratory tract infections. *Am. J. Manag. Care* 2008; 14: 190–196.
2. Goulding J., Snelgrove R., Saldana J. i wsp. Respiratory infections: do we ever recover? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007; 4: 618–625.
3. Henrickson K.J. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004; 23: 6–10.
4. Espy. M.J., Uhl J.R., Buckwalter S.P. i wsp. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 165–256.
5. Kuypers J., Wright N., Ferrenberg J. i wsp. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2382–2388.
6. Gouriet F., Drancourt M., Raoult D. Multiplexed serology in atypical bacterial pneumonia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1078: 530–540.
7. Maltezou H.C., La-Scola B., Astra H. i wsp. Mycoplasma pneumoniae and Legionella pneumophila in community-acquired lower respiratory tract infections among hospitalized children: diagnosis by real time PCR. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004; 36: 639–642.
8. Joos L., Chhajed P.N., Wallner J. i wsp. Pulmonary infections diagnosed by BALF: a 12-year experience in 1066 immunocompromised patients. *Respir. Med.* 2007; 101: 93–97.
9. Othman N., Isaacs D., Daley A.J., Kesson A.M. Mycoplasma pneumoniae infection in a clinical setting. *Pediatr. Int.* 2008; 50: 662–666.
10. Thurman K.A., Walter N.D., Schwartz S.B. i wsp. Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of Mycoplasma pneumoniae in community outbreaks. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 1244–1249.
11. Bruu A.L., Hjetland R., Holter E. i wsp. Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virus-specific and heterophile antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7: 451–456.
12. Niesters H.G. Clinical virology in real time. *J. Clin. Virol.* 2002; 25 (supl. 3): S3–S12.
13. Weber B., Berger A., Rabenau H. Human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of recombinant antigens for cytomegalovirus antibody detection. *J. Virol. Methods* 2001; 96: 157–170.
14. Drew W.L. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007; 20: 408–411.
15. Shimizu Y., Sunaga N., Dobashi K. i wsp. Serum markers in interstitial pneumonia with and without Pneumocystis jiroveci colonization: a prospective study. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 47.
16. Kaouech E., Kallel K., Anane S. i wsp. Pneumocystis jiroveci pneumonia: comparison between conventional PCR and staining techniques. *Pathol. Biol. (Paris)* 2009; 57: 373–377.
17. Fillaux J., Malvy S., Alvarez M. i wsp. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of Pneumocystis jiroveci pneumonia. *J. Microbiol. Methods* 2008; 75: 258–261.