

*Alicja Sobolewska, Tadeusz Hubert Dzbeński*

## EPIDEMIOLOGIA I DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA INWAZJI POWODOWANYCH PRZEZ *PNEUMOCYSTIS CARINII*

Zakład Parazytologii Lekarskiej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie  
Kierownik: Prof. dr hab. *T.H. Dzbeński*

*Omówiono współczesne poglądy na temat epidemiologii i diagnostyki zarażeń *Pneumocystis carinii* oraz przedstawiono szereg propozycji dotyczących racjonalnego postępowania diagnostycznego u osób podejrzanych o pneumocystozę.*

W ostatnim dziesięcioleciu wzrosła na świecie liczba zakażeń patogenami oportunistycznymi, m.in. z powodu coraz powszechniejszego stosowania środków immunosupresyjnych w leczeniu oraz wzrostu liczby infekcji wirusem wywołującym zespół nabytego upośledzenia odporności (AIDS). Zwiększeniu liczby zakażeń towarzyszyło jednocześnie bardzo istotne poszerzenie spectrum czynników etiologicznych. Okazało się, że szereg organizmów, które uważano dotychczas za nieszkodliwe lub wręcz za niezakaźne dla człowieka, w stanach upośledzonej odporności może powodować chorobę, niejednokrotnie o dramatycznym przebiegu. Do grupy klasycznych patogenów oportunistycznych, o ustalonej od lat chorobotwórczości należy *Pneumocystis carinii*.

*Pneumocystis* jest jednokomórkowym organizmem eukariotycznym, bez sprecyzowanej jak dotąd przynależności systematycznej, szeroko rozpowszechnionym wśród ludności zamieszkującej różnorodne regiony geograficzne, zwłaszcza w Europie i Ameryce Północnej. Badania serologiczne, jakie przeprowadzono w Holandii i na terenie USA, wykazały obecność przeciwciał swoistych dla *P. carinii* u 75% dzieci, które nie ukończyły jeszcze 4-ego roku życia, natomiast wśród ludności Afryki Zachodniej *Pneumocystis* występuje znacznie rzadziej. Mimo szerokiego rozprzestrzenienia, przypadki zachorowań na pneumocystozę występują stosunkowo rzadko, ponieważ rozwijają się w okolicznościach ograniczających a priori ich liczebność.

### CHARAKTERYSTYKA EPIDEMIOLOGICZNA

Pneumocystoza występuje w dwóch odmianach, jako epidemiczna i sporadyczna. Postać epidemiczna może występować na oddziałach dziecięcych, wśród wcześniaków i niemowląt, zwłaszcza w okresie fizjologicznego obniżenia odporności, pod postacią śródmiąższowego, plazmatycznokomórkowego zapalenia płuc (PCP). Choroba

rozwija się powoli, w ciągu 1–4 tygodni, wśród objawów narastającej niewydolności oddechowej i biegunki, zazwyczaj z nieznacznym podwyższeniem ciepłoty ciała lub bezgorączkowo. W przypadkach nie leczonych kończy się zgonem u 20 do 50% chorujących.

Postać sporadyczną obserwuje się w przypadkach pierwotnych oraz wtórnych niedoborów odpornościowych, szczególnie niedoborów limfocytów T. Niedobory sprzyjające rozwojowi pneumocystozy występują: a) w przebiegu chorób nowotworowych, zwłaszcza białaczek i chłoniaków b) w następstwie podawania środków obniżających odporność po zabiegach transplantacyjnych lub w czasie leczenia zapalenia naczyń na podłożu autoalergicznym c) w wyniku zakażenia wirusem HIV d) podczas hipogammaglobulinemii; w rzadkich przypadkach pneumocystozę rozpoznaje się u osób nie wykazujących obniżenia odporności.

Przypadki sporadyczne rozwijają się zazwyczaj gwałtownie, przebiegają u większości chorych ze znacznym podwyższeniem ciepłoty ciała, „suchym” kaszlem, dusznością i sinicą. Nie leczona pneumocystoza sporadyczna kończy się zgonem w ciągu kilku dni a przypadki leczonego PCP u pacjentów z AIDS często nawracają. W skupiskach osób zakażonych wirusem HIV pneumocystoza może się szerzyć epidemicznie i występować poza płucami, w miejscach tak nietypowych jak siatkówka, szpik kostny, czy ucho środkowe.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, opartym m.in. na wynikach badań przeprowadzonych z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych i metody wykrywania DNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy, przyjmuje się, że pneumocystoza człowieka nie jest zoonozą; źródłem zarażenia przenoszącego się głównie drogą kropelkową, jest przede wszystkim chory człowiek, znacznie rzadziej osoba nie wykazująca objawów klinicznych inwazji. Zjawisko bezobjawowego nosicielstwa, aczkolwiek występuje, nie jest tak powszechne jak niegdyś sądzono, a rozwój inwazji u osób z upośledzoną czynnością układu odpornościowego jest raczej następstwem reinwazji niż reaktywacji utajonego zarażenia (10).

## DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

Ze względu na mało charakterystyczny obraz kliniczny i podstępny przebieg wolno rozwijającej się choroby, rozpoznanie pneumocystozy, zwłaszcza przypadków sporadycznych, jest trudne i wymaga przeprowadzenia szeregu badań dodatkowych. Zakres oferowanych badań dodatkowych, szczególnie badań laboratoryjnych uległ ostatnio istotnemu poszerzeniu o metody bardziej czułe i swoiste od dotychczas stosowanych, np. wykorzystujące przeciwciała monoklonalne, czy wykrywające DNA *Pneumocystis*, z których każda oprócz niewątpliwych zalet, ma jednak pewne ograniczenia. Lekarz prowadzący chorego z podejrzeniem o inwazję *Pneumocystis* powinien znać zasób możliwych do wykonania badań dodatkowych, czułość i swoistość każdej metody, a ponadto znać odpowiedź na pytanie, czy fakt wykrycia pasożyta, jego antygeny lub DNA jest równoznaczny ze znalezieniem przyczyny obserwowanych objawów klinicznych oraz czy uzasadnia podjęcie leczenia swoistego i ewentualnych działań przeciwepidemicznych, np. izolację pacjenta. Ważne znaczenie ma również znajomość ryzyka dla zdrowia pacjenta, jakie stwarzają niektóre z oferowanych

metod diagnostycznych oraz świadomość czasochłonności i kosztu proponowanych badań. Przedstawione poniżej uwagi na temat metod stosowanych w diagnostyce pneumocystozy powinny pomóc w znalezieniu właściwych odpowiedzi.

Na doborze metod stosowanych w diagnostyce pneumocystozy człowieka zaciążył brak możliwości namnażania pasożyta *in vitro* (4) lub na drodze pasażowania na zwierzętach laboratoryjnych, dlatego większość stosowanych metod polega na wykazywaniu obecności *Pneumocystis* w tym materiale, jaki uzyskano bezpośrednio od pacjenta. Liczba wykrytych pasożytów nie odgrywa większej roli przy ustalaniu rozpoznania za pomocą barwienia preparatów lub immunofluorescencji, ponieważ zgodnie z obecnymi poglądami *Pneumocystis* nie należy do organizmów, które chętnie osiedlają się w zarażonym ustroju nie wywołując przy tym objawów chorobowych, stąd też każda liczba pasożytów stwierdzonych ww. metodami w materiale pobranym z dróg oddechowych, jest równoznaczna z rozpoznaniem pneumocystozy (8).

Materiał do badań uzyskuje się w czasie bronchoskopii (bronchofiberoskopii) stosując metodę biopsji przezoskrzelowej albo aspirowania popłuczyn oskrzelowych lub oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) (2). Równie często stosowanym sposobem pozyskiwania materiału jest indukowanie płwociny wziewaniem aerosolu hipertonicznego roztworu chlorku sodowego, znacznie rzadziej wykonuje się obecnie biopsję na otwartym płucu. W niektórych regionach Polski wykorzystuje się do badania materiał spod nagłośni; do badań serologicznych pobiera się krew.

Biopsja na otwartym płucu stwarza najlepsze warunki do pobrania najodpowiedniejszego materiału, jednak ze względu na znaczną inwazyjność tej metody jest obecnie stosowana tylko wyjątkowo.

Zabiegiem mniej inwazyjnym jest biopsja przezoskrzelowa, daje jednak powikłania pod postacią krwotoku lub odmy, które obserwuje się u około 20% badanych (10). Ze względu na wysokie ryzyko powikłań pozabiegowych, unika się obecnie tego zabiegu, aczkolwiek stwarza on cenną możliwość pobrania wielu próbek, które można oceniać histopatologicznie, także w kierunku zakażeń innych niż *P. carinii*.

Najbardziej polecane jest obecnie zbieranie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych za pomocą fiberoskopu, którego końcówkę wprowadza się zazwyczaj do oskrzela płata środkowego płuca prawego i przepłukuje kilkakrotnie fizjologicznym roztworem chlorku sodowego do całkowitej objętości 150–200 ml. Badania BAL umożliwiają wykrycie powyżej 90% zarażeń. U pacjentów pobierających inhalacje aerosolu pentamidyny w celach chemoprotektyki pneumocystozy obserwuje się wzrost inwazji usytuowanych wyłącznie w górnym płacie (7). Ponieważ rutynowe badania bronchoskopowe wypadają w tej sytuacji zazwyczaj ujemnie, zaleca się pobieranie popłuczyn z co najmniej dwóch płatów, tj. środkowego i górnego (18).

W wielu ośrodkach diagnostycznych metodę bronchoskopii zastępuje się zbieraniem płwociny indukowanej inhalacjami hipertonicznego roztworu NaCl. Jest to metoda całkowicie nieinwazyjna, jednak o niższej wydajności diagnostycznej, wahającej się między 50 a 90%. Wadą tej metody jest również ograniczenie możliwości wykrywania innych potencjalnych patogenów. Ujemny wynik badania płwociny indukowanej u pacjenta z objawami śródmiąższowego zapalenia płuc może stanowić wskazanie do przeprowadzenia bronchoskopii.

Pobieranie materiału spod nagłośni ma wątpliwą wartość diagnostyczną, ponieważ typowym miejscem osiedlania się pasożyta są pęcherzyki płucne, w których

odbywa się cykl rozwojowy *Pneumocystis* i gdzie pasożyt występuje w największej liczbie pod postacią trofozoitów i cyst. W górnych drogach oddechowych mogą występować nieliczne cysty, ich brak nie wyklucza jednak inwazji, zwłaszcza w przypadkach sporadycznych. Według danych analizowanych przez CDC w Atlancie odsetek przypadków PCP potwierdzonych dodatnim wynikiem badania wydzieliny górnych dróg oddechowych nie przekraczał 6 (1).

Materiał uzyskany w czasie biopsji służy do wykonywania preparatów odciskowych na szkiełkach podstawowych, natomiast po utrwaleniu i zatopieniu w parafinie – do sporządzania skrawków mikrotomowych, które wykorzystuje się do barwienia hematoxyliną i eozyną lub srebrzenia. Przygotowanie skrawków histologicznych stwarza nieocenioną możliwość wykrywania *Pneumocystis* oraz jednoczesnej oceny liczby pasożytów i charakteru wywołanych zmian tkankowych, jest jednak czasochłonne.

Preparaty odciskowe, podobnie jak i materiał pobrany z dróg oddechowych i utrwalone na szkiełkach mikroskopowych można zabarwić, najdalej w ciągu kilkunastu minut, za pomocą odczynnika Giemsy, błękitu toluidyny O, Fungi-Fluoru, Diff-Quiku lub soli srebra (2, 15). Podstawą pewnego rozpoznania mikroskopowego jest stwierdzenie obecności cyst zawierających ciała śródcystowe przy barwieniu metodą Giemsy lub wykrycie ciał nawiasowych w cystach poddanych srebrzeniu. Ustalanie obecności trofozoitów w preparatach jest niepewne, nawet przy dużym doświadczeniu osoby mikroskopującej.

Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe, po ewentualnym upłynnieniu i odwirowaniu, wykorzystuje się do badania metodą immunofluorescencyjną (5) stosując dostępne w handlu przeciwciała monoklonalne przeciw antygenom cyst i trofozoitów *P. carinii* (Dako lub Sanofi Diagnostics Pasteur). Dzięki zastosowaniu wspomnianych przeciwciał monoklonalnych dokonano bardzo istotnego postępu w diagnostyce laboratoryjnej pneumocystozy podnosząc czułość i swoistość reakcji immunofluorescencyjnych, metoda ta ma jednak pewne ograniczenia.

Ponieważ przeciwciała monoklonalne charakteryzują się reaktywnością w stosunku do pojedynczego determinantu antygenowego, może się zdarzyć, że nie rozpoznają obecności pasożyta w sytuacji zamaskowania determinantu przez inne, sąsiadujące z nim na powierzchni komórki pasożyta. Zmiany w układzie przestrzennym antygenów powierzchniowych powoduje niekiedy proces utrwalania materiału, co nie wpływa na reaktywność przeciwciał poliklonalnych, ogranicza jednak przydatność przeciwciał monoklonalnych.

Badania serologiczne w kierunku pneumocystozy polegają na poszukiwaniu swoistych przeciwciał lub krążącego antygeny rozpuszczalnego pasożyta. Do wykrywania przeciwciał używa się najczęściej odczynu immunofluorescencyjnego opracowanego przez *Nowoslawskiego* i *Brzosko* (11), rzadziej odczynu immunoenzymatycznego ELISA lub hemaglutynacji biernej. Stwierdzenie swoistych przeciwciał klas G i M świadczy o aktywnej inwazji, niestety, przeciwciała klasy M wykrywa się stosunkowo rzadko. (Spośród 8810 próbek surowic badanych w Zakładzie Parazytologii Lekarskiej PZH w latach 1989–1993, tylko 4,6% wykazało obecność swoistych IgM). Obecność samych przeciwciał klasy G przemawia za odległym kontaktem z antygenem pasożyta, ponieważ przeciwciała tej klasy utrzymują się w krążeniu zaraznej osoby przez wiele miesięcy. U noworodka przeciwciała klasy G mogą być przeniesione biernie poprzez łożysko, ich obecność nie musi zatem dowodzić inwazji.

Prócz powyższego należy również wziąć pod uwagę fakt, że przeciwciała przeniesione w sposób bierny mogą powodować supresję produkcji swoistych IgM w organizmie zarażonego noworodka utrudniając rozpoznanie inwazji, natomiast u pacjentów z upośledzoną czynnością układu odpornościowego i pneumocystozowym zapaleniem płuc (PCP), poziom swoistych przeciwciał bywa na ogół niski lub nieoznaczalny, zwłaszcza w przypadkach rozwiniętego zespołu AIDS.

Przytoczone wyżej ograniczenia w użyteczności testów oznaczających przeciwciała skłoniły do opracowania alternatywnej metody serologicznej polegającej na wykrywaniu krążącego antygenu rozpuszczalnego pasożyta. Do oryginalnego testu, opisanego przez Pifer i wsp. w r. 1978 (12) wykorzystano metodę immunoelektroprecypitacji w żelu agarozowym. Odczyn ten wykonywano z powodzeniem wyłącznie w referencyjnym laboratorium serologicznym uniwersytetu stanu Tennessee w Memphis. Obecnie ośrodek ten zaleca raczej metodę aglutynacji lateksu opłaszczzonego swoistym przeciwciałem przeciw *P. carinii* wg Jarovenko i wsp. (6, 13). U pacjentów z AIDS i klinicznie rozpoznany PCP, test wykrywający antygen wypada dodatnio w 30% przypadków. Zgodność wyników omawianego testu z badaniem parazytologicznym materiału pobranego metodami inwazyjnymi wynosi 80%.

Największe nadzieje na rozwiązanie wielu problemów laboratoryjnej diagnostyki pneumocystozy wiąże się obecnie z zastosowaniem technik z zakresu biologii molekularnej, takich jak amplifikacja wybranych fragmentów DNA pasożyta za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz hybrydyzacja DNA lub RNA *P. carinii* z odpowiednimi sondami genetycznymi. Sekwencje oligonukleotydów w najczęściej stosowanych primerach reakcji amplifikacyjnej (pAZ 102-E i pAZ 102-H) odpowiadają fragmentom rybosomalnego RNA mitochondriów pasożyta (14, 16). Główną zaletą reakcji PCR w porównaniu z metodami barwienia histochemicznego lub immunofluorescencji, jest wysoka czułość, co odbija się jednak niekorzystnie na swoistości metody amplifikacyjnej, ponieważ dodatni wynik reakcji z próbką badanego materiału bywa następstwem obecności zaledwie kilku pasożytów, niezdolnych przecież do wywołania jakichkolwiek objawów chorobowych.

Wykazano daleko idącą korelację między dodatnim wynikiem PCR a klinicznym rozpoznaniem PCP u pacjentów z AIDS oraz brak korelacji dodatniego wyniku z klinicznym rozpoznaniem choroby w grupie pacjentów z obniżoną czynnością układu odpornościowego bez AIDS (82% wyników fałszywie dodatnich, cyt. wg 17).

Porównanie wydajności diagnostycznej metod immunofluorescencji i PCR zastosowanych do badania próbek BAL i płwociny wykazało, że czułość i swoistość obu technik sięga 100% przy badaniu popłuczyn, natomiast przy badaniu płwociny wzrasta z 78% po zastosowaniu immunofluorescencji do 100% po użyciu PCR (3). Przydatność PCR do badania próbek krwi pozostaje przedmiotem kontrowersji (9).

Z przedstawionych wyżej uwag wynika, iż mimo znacznego postępu, jaki dokonano ostatnio w laboratoryjnym rozpoznawaniu pneumocystozy wprowadzając nowe sposoby pozyskiwania materiału do badań i nowe techniki diagnostyczne, wciąż brakuje metody dostarczającej jednoznacznej informacji a jednocześnie taniej i bezpieczniejszej dla chorego. Przy wyborze metody zapewniającej najpełniejszą informację diagnostyczną, jaką jest niewątpliwie badanie skrawków histologicznych, trzeba przeprowadzić ryzykowny zabieg chirurgiczny dla pozyskania materiału, zdecydowanie się na bezpieczne badania serologiczne stwarza, niestety, niewielkie szanse na uzyskanie ostatecznego rozpoznania,

natomiast wiarygodne badanie płwociny wymaga zastosowania drogiej techniki amplifikacji kwasów nukleinowych pasożyta.

Przy wyborze metody diagnostycznej trzeba wziąć również pod uwagę wiek oraz inne schorzenia, jakie współistnieją ze zmianami chorobowymi układu oddechowego badanej osoby, np. u pacjenta z AIDS i zmianami zapalnymi płuc decyzję przeprowadzenia badań serologicznych należy uznać za mało przemyślaną, natomiast rozpoczęcie badań diagnostycznych u niemowlęcia od bronchoskopii, za zbyt pochopne.

Brak nie budzących zastrzeżeń metod badania laboratoryjnego skłonił część klinicystów do kwestionowania potrzeby przeprowadzania takich badań, a zwłaszcza do celowości stosowania inwazyjnych metod pobierania materiału (10). Wstępne rozpoznanie pneumocystozy powinno się opierać na wynikach badania klinicznego, łącznie z badaniem gazometrycznym krwi i ewentualnym badaniem przy użyciu radioizotopów, takich jak gal –67 lub związku technetu. (We wstępnym okresie pneumocystozy badania gazometryczne krwi wykazują prawidłowe ciśnienie parcjalne tlenu i niekiedy hipokapnię, natomiast w okresie zaawansowanej choroby, zazwyczaj hipoksemię i hiperkapnię oraz wzmożony wychwyty galu-67 na obszarze płuc). Według przytaczanej opinii, po wstępnym rozpoznaniu pneumocystozy należy niezwłocznie przystąpić do leczenia swoistego, którego skuteczność uzasadni diagnozę *ex juvantibus*, natomiast przeprowadzanie badań bronchoskopowych trzeba ograniczać do przypadków nie reagujących pozytywnie na zastosowane leczenie, lub takich, które wykazują objawy mało typowe dla pneumocystozowego zapalenia płuc. Powyższa opinia jest odrzucana przez większość klinicystów uważających bronchoskopię za badanie obowiązkowe, szczególnie u pacjentów zakażonych wirusem HIV.

## WNIOSKI

Krytyczna analiza przedstawionych wyżej faktów i komentarzy umożliwia wypracowanie kilku wniosków dotyczących racjonalnego postępowania diagnostycznego u osób podejrzanych o pneumocystozę, które można uszeregować w zależności od ich znaczenia i stopnia pewności w następujący sposób:

1. U osób zakażonych wirusem HIV pojawienie się zmian zapalnych w płucach stanowi wskazanie do bronchoskopii i pobrania popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, które należy badać metodą immunofluorescencji przy użyciu przeciwciał monoklonalnych lub techniką PCR.

2. U osób z upośledzoną funkcją układu odpornościowego i zmianami zapalnymi płuc, które nie są zakażone wirusem HIV, należy pobrać płwocinę w sposób wymuszony i badać techniką PCR.

3. U noworodków i niemowląt starszych diagnostykę zmian płucnych należy rozpoczynać od wykonania badań serologicznych (także u matek badanych dzieci).

4. U zakażonych wirusem HIV, u których rozpoznano obustronne zapalenie płuc, lecz nie ustalono czynnika etiologicznego, pomimo przeprowadzenia co najmniej dwóch badań bronchoskopowych, istnieją wskazania do wykonania biopsji na otwartym płucu; wskazaniem do wykonania biopsji jest również sytuacja pogarszającego się stanu zdrowia u osób leczonych zgodnie z wynikami przeprowadzonej już bronchoskopii diagnostycznej (10).

A. Sobolewska, T.H. Dzbeński

THE EPIDEMIOLOGY AND LABORATORY DIAGNOSIS  
OF INFECTIONS WITH *PNEUMOCYSTIS CARINII*

SUMMARY

There were presented an up-to-date views on the epidemiology and diagnosis of infections with *Pneumocystis carinii* together with a number of suggestions concerning most rational diagnostic procedures in patients suspected of pneumocystosis.

PIŚMIENICTWO

1. Arvin M.A., Ruskin J., Yeager A.S.: W: Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 3rd edition, eds. J.S. Remington, J.O. Klein, W.B. Saunders Co., London 1990, 528. – 2. Armbruster Ch., Pokieser L., Hassel A.: Acta Cytologica, 1995, 39, 1089. – 3. Cartwright C.P., Nelson N.A., Gill V.J.: J. Clin. Microbiol., 1994, 32, 1634. – 4. Cushion M.T., J. Protozool., 1989, 36, 45. – 5. Elvin K.M., Bjorkman A., Linder E., Heurlin N., Hjerpe A.: Brit. Med. J, 1988, 297, 381. – 6. Jarowenko M., Pifer L., Kerman R., Kahan B.D.: Transplantation, 1986, 41, 436. – 7. Jules-Elysee K.M., Stover D.E., Zaman M.B., Bernard E.M., White D.A.: Ann. Intern. Med., 1990, 112, 750. – 8. Kovacs J.A. W: Shelhammer J.H., moderator. The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections, Ann. Intern. Med. 1996, 124, 585. – 9. Lipschik G.Y., Gill V.J., Lundgren J.D., Andrawis V.A., Nielsen J.O., Ognibene F.P., Kovacs J.A.: Lancet, 1992, 340, 203. – 10. Miller R.W.: Manson's tropical diseases, 20th edition, W.B. Saunders Co., London 1996, 1075.–

11. Nowosławski A., Brzosko W.: Bull. Acad. Sci. Pol., 1964, 12, 143. – 12. Pifer L.L., Hughes W.T., Stagno S., Woods D.: Pediatrics, 1978, 61, 35. – 13. Pifer L.L., Pifer D.D., Woods D.R., Joyner R.E., Edwards C.C.: Vaccine, 1986, 4, 257. – 14. Smits H.L., Hartskeerl R.A.: J. Microbiol. Meth, 1995, 23, 41. – 15. Thomson R.B., Smith T.R., Wilson W.R.: J. Clin. Microbiol, 1982, 16, 303. – 16. Wakefield A.E., Pixley F.J., Banerji S., Sinclair K., Miller R.F., Moxon E.R.: Lancet, 1990, 336, 451. – 17. Weig M., Klinker H., Wilhelm M., Lemmer K., Gross U.: Lancet, 1996, 347, 1266. – 18. Yung R.C., Weinacker A.B., Steiger D.J., Miller T.R., Stern E.J., Salmon C.J.: Am. Rev. Respir. Dis., 1993, 148, 1563.

Adres: Zakład Parazytologii Lekarskiej Państwowego Zakładu Higieny,  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24