

УЧРЕЖДЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ РАМН

**Н.В. Каражас, Т.Н. Рыбалкина, М.Н. Корниенко,
М.В. Юдицкий**

**ПНЕВМОЦИСТОЗ – АКТУАЛЬНАЯ
ИММУНОДЕФИЦИТ-АССОЦИИРОВАННАЯ
ИНФЕКЦИЯ**

(эпидемиология, клиника, диагностика и лечение)

Методическое пособие

**Москва
2010**

Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Корниенко М.Н., Юдицкий М.В.

Пневмоцистоз – актуальная иммунодефицит-ассоциированная инфекция: Методические рекомендации. – М., 2009. – 75 с.

В книге освещены вопросы эпидемиологии, клинической картины, лабораторной диагностики, основные принципы комплексной терапии и профилактики пневмоцистоза. Дана информация о новых средствах, применяемых при пневмоцистной инфекции.

Для эпидемиологов, инфекционистов, педиатров, пульмонологов, гематологов, онкологов терапевтов, врачей общей практики, клинических ординаторов и студентов медицинских ВУЗов.

Рецензенты: д.м.н., профессор Е.П. Ковалева

д.б.н., профессор И.С. Тартаковский

Введение

Болезненные состояния, вызванные пневмоцистами согласно международной классификации (Medic ode Hospital ICD.9.CM,1999), классифицируются как пневмоцистоз. Пневмоцистоз относится к часто встречающимся оппортунистическим инфекциям, которые, активизируясь, в свою очередь, являются маркерами иммунодефицитных состояний. Понятие «оппортунистические инфекции», появившееся в медицинской литературе несколько десятилетий назад, приобрело особую значимость в эру пандемии ВИЧ-инфекции и СПИДа. За последние годы отмечен значительный рост числа лиц с иммунодефицитными состояниями различной природы, что позволяет говорить о формировании «популяционных иммунодефицитов».

Вторичный (приобретенный) иммунодефицит - это клинко-иммунологический синдром, развивающийся на фоне ранее нормального функционирования иммунной системы, характеризующийся устойчиво выраженным снижением количественных и функциональных показателей специфических и/или неспецифических факторов иммунорезистентности. В современных условиях причины возникновения иммунодефицитов могут быть различными: соматические или инфекционные (в том числе и ВИЧ-инфекция) заболевания, нарушения экологической обстановки, социально-экономическая нестабильность, стрессы, наркомания и др. На этом фоне могут происходить существенные изменения эпидемиологических закономерностей многих инфекционных заболеваний, в том числе и оппортунистических.

Первые описания пневмоцистной пневмонии были сделаны в Европе. С 1938 года по 1963 произошли вспышки пневмоцистоза в 45 городах 17 стран. До 1964 года были описаны 22 случая пневмоцистоза у взрослых, в возрасте от 21 года до 78 лет, диагностированные посмертно. В 1966 году Кисега в Чехословакии обследовав 1631 ребенка в 4-х детских домах, обнаружил у 216 детей пневмоцистоз, 50 детей умерли. За 5 лет в Чехословакии от пневмоцистной пневмонии погибли > 500 детей.

В 1989 году на Международной конференции в Женеве по Десятому пересмотру МКБ пневмоцистоз был отнесен к X классу болезней органов дыхания (B59), и соответственно эта болезнь подлежит регистрации и кодируется на основании данных истории болезни (амбулаторных карт).

В 1991 г. в мире было зарегистрировано более 100 000 случаев пневмоцистоза. Тем не менее в России и странах СНГ эта инфекция до настоящего времени фактически официальной статистикой не учитывается из-за трудности постановки этиологического диагноза на основании клинических проявлений.

I. Современные представления о пневмоцистной инфекции

1. История вопроса

Микроорганизм, впервые описанный в 1909 г. К. Шагосом и выделенный в 1912 г. Ф. Деланое в отдельный вид *Pneumocystis carinii*, долгое время считали безвредным микроорганизмом. В 1942 году была доказана его этиологическая роль в возникновении интерстициальной плазмноклеточной пневмонии, вспышки которой регистрировались у недоношенных новорожденных и у детей с иммунодефицитными состояниями. Долгое время большинство исследователей на основании ряда морфологических признаков (отсутствия в клеточной стенке эргостерола, неэффективности противогрибковых препаратов и, напротив, эффективности противопротозойных лекарственных средств) *Pneumocystis carinii* относили к простейшим. Однако в 80 годы прошлого столетия на основании убедительных достижений молекулярной биологии была установлена гомология последовательностей генов 5S р РНК пневмоцист и зигомицет, которая свидетельствует о промежуточном положении пневмоцист в классификации грибов между фикомицетами и высшими грибами. Другими доказательствами принадлежности пневмоцист к царству грибов являются их биохимические и морфологические особенности (поверхностные гликопротеиды, строение клеточной стенки и др.).

2. Этиология и патогенез

Возбудитель пневмоцистоза широко распространен среди млекопитающих, как среди людей, так и среди различных животных: плохо вскармливаемых жеребят, свиней, коз, кошек, собак. Данные изучения генотипичных и фенотипичных параметров указывают на факт видоспецифичности *Pneumocystis carinii*.

В 1994 году было принято давать триноминальное латинское название микроорганизмам *Pneumocystis carinii*, выделенным от разных млекопитающих, включающее видовое название хозяина. Возбудитель пневмоцистоза человека назван *Pneumocystis carinii formae specialis Spanish hominis*, другое название этого паразита – *Pneumocystis jiroveci* по фамилии чешского ученого-паразитолога Отто Йировица, впервые описавшего этот микроорганизм как причину легочного заболевания у человека.

Пневмоцистоз, как правило, протекает в виде острых респираторных заболеваний, обострений хронических бронхолегочных заболеваний, обструктивного бронхита, ларингита, а также по типу пневмоний с нарушениями газообмена (интерстициальных пневмоний). Пневмоцистная пневмония даже в фатальных случаях редко выходит за пределы легких, что связано с крайне **низкой вирулентностью *Pneumocystis carinii/ jiroveci***. Однако на фоне нарушенного клеточного иммунитета, пневмоцистоз может проявляться и в виде внелегочных поражений (надпочечников, щитовидной железы, печени, селезенки, желудочно-кишечного тракта, сердца, кожи), а также могут развиваться отиты, мастоидиты и гаймориты пневмоцистной этиологии, что, впрочем, случается крайне редко. Патогенез внелегочной диссеминации неясен, предполагается лимфагенное и гематогенное распространение возбудителя.

Pneumocystis carinii/ jiroveci – классический оппортунист, т.к. инфекция вызванная этим возбудителем при дефиците гуморального и клеточного иммунитета проявляет себя манифестно. Возможна реактивация латентной инфекции у больных со вторичными иммунодефицитами.

Приобретенный иммунитет не стойкий. Рецидивы пневмоцистной пневмонии отмечаются у 10% детей и взрослых с иммунодефицитами, при СПИДе - у 25%. Обследование одних и тех же больных при повторном заболевании методом ПЦР показало наличие нескольких разных генотипов возбудителя пневмоцистоза, что и подтвердило новое заражение этих больных.

Таким образом, доказано, что часто происходит свежее заражение отдельных лиц и наблюдаются вспышки пневмоцистных пневмоний в детских коллективах и внутрибольничные - среди взрослых.

Pneumocystis carinii/ jiroveci – внеклеточный паразит, весь жизненный цикл которого происходит в альвеоле и включает четыре стадии:

- трофозоит;
- прециста;
- циста;
- спорозоит.

Размножение паразита сопровождается появлением большого числа трофозоитов – вегетативной формы *Pneumocystis carinii/ jiroveci* диаметром 1-5 мкм, одноядерных с 2-х слойной клеточной тонкой мембраной. С помощью филоподий они прикрепляются к эпителию легкого, выстланного альвеолоцитами 1-го порядка, чему способствуют фосфолипиды, мукополисахариды, апопротеины, сурфактант, содержащиеся в поверхностном эпителии альвеол, и пролиферируют. Затем трофозоит округляется, формирует утолщенную клеточную стенку и превращается в овальной формы прецисту, диаметром 5 мкм, в которой иногда можно определить внутрицистные тельца. Далее прециста развивается в зрелую толстостенную 3-х слойную цисту, наружный слой, которой выявляется только при электронной микроскопии, при обычных методах окраски для световой микроскопии его выявить не удастся. Изучение морфологии *Pneumocystis carinii/ jiroveci* с помощью метода замораживания-скалывания показало, что ранняя прециста характеризуется наличием одного крупного яд-

ра, скоплением вокруг него митохондрий и тонкой пелликулой, сходной с пелликулой трофозоитов. На следующей стадии прециста имеет 2-6 ядер, пелликула утолщается, а в поздней прецисте в цитоплазме вокруг ядер появляются мембраны. Диаметр цисты 7-8 мкм, внутри нее находится четное число внутрицистных телец – спорозоитов (чаще 8). Наличие пневмоцист с максимальным числом спорозоитов (диаметром 1-3 мкм) свидетельствует об активации возбудителя. Формирование спорозоитов напоминает формирование аскоспор аскомицетов. Толстая стенка пневмоцисты содержит ряд гликопротеинов, из которых gp 120 связывается с фибронектином, формируя фибронектиновый мостик, соединяющий *Pneumocystis carinii*/ *jiroveci* с альвеолярным эпителием хозяина и макрофагами. Довольно часто приходится наблюдать внутриклеточно (в макрофагах) расположенные цисты.

Полный цикл развития *Pneumocystis carinii*/ *jiroveci* протекает двумя фазами: сексуальной и асексуальной.

В сексуальной фазе в момент заражения зрелые цисты, попавшие в чувствительный организм, разрываются, высвобождая спорозоиты, часть из которых являются гаплоидами (т.е. содержит одинарный набор хромосом -1/2 от диплоидных). Они сливаются попарно, образуя трофозоиты, способные развиваться в прецисты и далее в цисты.

В асексуальной фазе трофозоиты, перетягиваясь, делятся на две клетки, и каждая из них развивается в пневмоцисту.

Пневмоцисты обладают выраженным тропизмом к легочной ткани, (поражая при этом пневмоциты 1-го и 2-го порядков) который, возможно, обусловлен наличием какого-то особого фактора в альвеолах, необходимого возбудителю, например, потребность в кислороде.

Заболевание развивается только на фоне иммунодефицитных состояний. Ведущую роль играют нарушения клеточного иммунитета.

Снижение Т-хелперов (CD4+ клеток) и увеличение содержания цитотоксических лимфоцитов, Т-супрессоров (CD8+) приводит к развитию пневмоцистной пневмонии, что было показано в экспериментах на мышах.

В практической медицине у ВИЧ-инфицированных больных снижение CD4+ ниже 300 в 1 мл является основанием для проведения медикаментозной профилактики пневмоцистоза.

У больных пневмоцистозом отмечается местная или системная продукция антител, не обладающих протективным действием. Несмотря на то, что первые исследования свидетельствовали о незначительной роли антител в патогенезе пневмоцистной пневмонии, авторы более поздних работ показали, что гуморальный иммунитет является достаточно важным звеном в защите от возбудителя этой инфекции. Кортикостероиды, применяемые в определенных случаях при лечении больных, опосредовано снижают фагоцитарную и цитолитическую активность альвеолярных макрофагов, повреждая Fc-рецептор на их мембране. Макрофаги переваривают, разрушают и убивают пневмоцисты, реализуя цитокиновый механизм и включая реактивные оксиданты. У недоношенных детей с белковой недостаточностью нарушается специфический синтез иммуноглобулинов и, как следствие, может развиваться пневмоцистная пневмония. Инфекционный процесс, связанный с дефектом антителообразования, развивается, как правило, во втором полугодии 1-го года жизни ребенка после исчезновения из кровотока материнских иммуноглобулинов. Приведенные данные свидетельствуют о роли гуморального иммунитета в патогенезе пневмоцистоза. В сыворотке периферической крови определяют специфические антитела классов IgG, IgM и IgA, при этом выявляют дефицит некоторых изотипов антипневмоцистных антител.

В эксперименте также показана роль гуморального иммунитета: при инфузии Т-лимфоцитов и пересадке селезенки от иммунокомпетентных мышей к мышам с выраженным комбинированным иммунодефицитным состоянием для угнетения пневмоцистной пневмонии было необходимо дополнительное введение В-лимфоцитов. Обращает на себя внимание тот факт, что в экспериментальных исследованиях введение моноклональных антител или гипериммунной сыворотки против антигенных детерминант *Pneumocystis carinii* обеспечивало

видимый эффект при профилактике и лечении пневмоцистной пневмонии.

По гистологическим признакам течение пневмоцистной пневмонии можно разделить на три стадии:

- I стадия – начальная, характеризуется наличием цист и трофозоитов, прикрепленных к фибронектину альвеолярной стенки. Для этой стадии характерно отсутствие воспаления стенок альвеол и клеточной инфильтрации, а также каких-либо клинических проявлений;
- II стадия – характеризуется десквамацией альвеолярного эпителия и увеличением количества цист внутри альвеолярных макрофагов. На этой стадии могут появиться первые клинические симптомы болезни;
- III стадия – финальная, представляет собой реактивный альвеолит с интенсивной десквамацией альвеолярного эпителия, вакуолизацией цитоплазмы альвеолярных макрофагов, моно- или плазмочитарной интерстициальной инфильтрацией, большим количеством пневмоцист как в макрофагах, так и в просвете альвеол.

По мере прогрессирования процесса трофозоиты и детрит накапливаются в просвете альвеол. При этом резко снижается диффузия газов, развивается дыхательная недостаточность.

У ослабленных детей можно обнаружить интенсивный инфильтрат из плазматических клеток, что и легло в основу прежнего названия пневмоцистоза – интерстициальная плазмочеточная пневмония.

3. Эпидемиология

Pneumocystis carinii/*jiroveci* широко распространен и выявляется повсеместно, однако, наиболее часто пневмоцистную инфекцию диагностировали в США, Канаде, странах Западной Европы.

Не смотря на то, что он обнаружен у многих лабораторных, домашних и диких животных, и в эксперименте на животных была доказана возможность его передачи, большинство данных свидетельст-

вует о том, что пневмоцистная пневмония не является зоонозом и передается только от человека к человеку, т.е. **антропоноз**.

В 1976 году J. Frenkel доказал, что возбудитель пневмоцистоза у людей *Pneumocystis jiroveci*, морфологически сходен с *Pneumocystis carinii* у животных, но отличается по антигенной структуре. Непрерывность течения эпидемического процесса поддерживается взаимодействием трех факторов: источника инфекции, механизма передачи инфекции и восприимчивости населения.

Источником инвазии является больной или носитель этого микроорганизма, о чем свидетельствуют следующие данные:

- имеются сообщения о семейных вспышках пневмоцистной пневмонии, эпидемических вспышках в пределах одного отделения;
- в воздухе помещений, где находятся больные пневмоцистной пневмонией, определяется ДНК *P. jiroveci*;
- титры антипневмоцистных антител значительно выше у медицинских работников, контактирующих с больными пневмоцистной пневмонией.

Среди здорового населения до 10% являются носителями пневмоцист.

Механизм передачи пневмоцистоза – аспирационный, а основными путями передачи являются воздушно-капельный, воздушно-пылевой, аэрогенный и ингаляционный.

Немецкими учеными экспериментально показано на мышах, что иммунокомпетентные мыши BALB после тесного контакта с инфицированными мышами SCID были способны передавать *Pneumocystis carinii* восприимчивым мышам, что подтверждает аспирационный механизм передачи возбудителя.

Входными воротами возбудителя служат дыхательные пути.

Фактор передачи инфекции – мокрота, слизь верхних дыхательных путей.

Возбудитель может неопределенное время находиться на эпителии зева, дыхательных путей больных и здоровых носителей.

В семейных очагах, где источником инфекции являлись родители, их ослабленные дети подвергались инфицированию и заболевали пневмоцистными пневмониями. Описаны внутрибольничные заражения детей в отделениях недоношенных, новорожденных в детских больницах или в домах ребенка от медицинского персонала, являющегося носителями пневмоцист. Особенностью вспышек являются: растянутость во времени, вовлечение в эпидемический процесс до 60-80% детей, медицинского персонала, преобладание стертых форм типа ОРЗ.

Возникновению внутрибольничных вспышек пневмоцистоза способствует перевод детей с явлениями интерстициальной пневмонии без установленного этиологического диагноза из отделений новорожденных в общие палаты больниц. Распространение пневмоцистной инфекции также может быть связано с нарушением противоэпидемического режима в стационарах; нарушением цикличности заполнения палат и их переуплотнением. К факторам риска возникновения заболевания в больнице относят дефицит полноценного белкового питания. Другой фактор риска, названный авторами «госпитализм» включает продолжительное лечение антибиотиками и кортикостероидами, дефекты питания и продолжительные контакты с другими больными.

Исследования проб атмосферного воздуха стационаров различного профиля и смывов с медицинского оборудования с помощью разработанной на основе ПЦР методики выявления ДНК *Pneumocystis jiroveci* в биологических и клинических материалах показали, что ДНК пневмоцист сохраняется при комнатной температуре в течение 12 дней, а также сохраняется и после 2-х часового УФ-облучения. После обработки исследуемых поверхностей 0,1% раствором хлорамина с последующим УФ-облучением в течение 30 минут результаты ПЦР были отрицательными.

Другими исследователями в эксперименте в пробах воздуха из вольеров, в которых содержались зараженные крысы, была выявлена

ДНК пневмоцист. Эти исследования подтверждают аэрогенный путь передачи этого инфекционного агента.

Обследование медицинского персонала противотуберкулезного стационара, работающего с ВИЧ-инфицированными больными, среди которых маркеры острой *Pneumocystis jiroveci* инфекции выявлялись у 46%, показало, что они также вовлечены в эпидемический процесс и их инфицированность этим микроорганизмом достигает довольно высокого уровня. Маркеры острой пневмоцистной инфекции обнаружены у 34,3% медработников. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что медицинский персонал может инфицироваться от больных и в свою очередь может являться источником пневмоцистной инфекции.

На основании данных сероэпидемиологических исследований показана зависимость частоты инфицирования детей различных групп от условий жизни. Наибольшее число инфицированных *Pneumocystis jiroveci* (77,6%) было выявлено среди детей из домов ребенка; среди детей, посещающих дошкольные учреждения, детей инфицировано было 67,5%, тогда как только 41,3% из детей, не посещающих детские учреждения, имели антитела к *Pneumocystis jirovecii*. Среди детей из домов ребенка был наибольший процент детей с антителами в высоких титрах (43,4%), у детей из дошкольных учреждений высокие титры антител к *Pneumocystis carinii/ jiroveci* наблюдались у 18,8%, а у детей, не посещающих детские учреждения – всего у 6,0%. Данные статистически достоверны.

В эксклюзивном исследовании из плаценты погибшего плода человека были выделены пневмоцисты, что дало основание предположить *трансплацентарную передачу микроорганизма*.

Большое значение в развитии инфекции имеет *активация латентной* пневмоцистной инфекции на фоне иммунодефицита.

Изучение сезонности пневмоцистоза на протяжении 15 лет с 1994 по 2008 год показало, что в отличие от других инфекций, передающихся воздушно-капельным и воздушно-пылевым путями, имеющими пик заболеваемости в зимне-весенний период, достовер-

но наибольшее число заболеваний приходится на август и сентябрь (42,0% и 42,6%; $t=2,75$ и $t=3,01$).

Изучение сезонности у детей показало, что пик заболеваемости приходится на август и сентябрь (41,4% и 39,6%; $t=2,45$ и $t=2,52$). Видимо, это связано с возвращением детей после летнего отдыха в организованные детские коллективы.

Изучение сезонности пневмоцистоза среди взрослого населения показало практически равномерное распределение заболеваний пневмоцистозом по месяцам в течение года. Выявленная закономерность, вероятно, может объясняться тем, что пневмоцистоз у взрослых развивается на фоне иммунодепрессии, что абсолютно не связано со временем года. Соотношение манифестных и бессимптомных форм в различных возрастных группах колеблется в больших пределах.

Группами риска в отношении заражения пневмоцистозом являются:

- дети недоношенные, ослабленные новорожденные, и дети раннего возраста с гипогаммаглобулинемией, гипотрофией и рахитом;
- дети из домов ребенка;
- пожилые люди из домов престарелых;
- больные лейкозом, онкологические больные, реципиенты органов, получающие иммунодепрессанты;
- больные туберкулезом;
- больные цитомегалией и другими вирусными инфекциями;
- ВИЧ-инфицированные.

Для изучения распространенности *Pneumocystis jiroveci* в России и странах СНГ было проведено обследование 1550 здоровых лиц. На основании определения уровней антител класса IgG было выявлено широкое распространение *Pneumocystis jiroveci* на всех изученных территориях. Уровень инфицированности в группах взрослого населения составлял в Душанбе - 45,0%, в Йошкар-Оле - 73,0%, в Москве - 75,0%, в Вильнюсе - 84,0%, в Гомеле - 88,5%.

Исследование 650 сывороток крови практически здоровых взрослых лиц, проживающих в различных городах Республики Армения (2005) выявило, что средний показатель наличия антител класса IgG составил 68,9% и колебался от 53,2% до 87,7%; наивысшие показатели наблюдались в возрастных группах 16-19 лет и 70 лет и старше.

В Литве были обследованы дети с различными патологическими состояниями (305 человек), 49,2% из них оказались серопозитивными. Наибольший процент антител был выявлен среди недоношенных детей – 79%, у детей с дерматитом – 76% и в группе с бронхолегочными заболеваниями – 54,8%. Обследование детей г. Вильнюса показало наличие анти-*Pneumocystis jiroveci* у 35% и только у 2% антитела в высоких титрах, тогда как у детей Гомеля у 89% были выявлены антитела *Pneumocystis jiroveci*, при этом высокие титры были определены у 41%. Мы считаем нужным привести эти данные, так как они были получены через пять лет после Чернобыльской аварии, и на наш взгляд могут иллюстрировать *влияние радиации на активацию пневмоцистной инфекции.*

Тем не менее, дети из относительно благополучных регионов представляют собой группу риска в отношении этой инфекции. Острые респираторные инфекции занимают ведущее место в инфекционной патологии детского возраста. Особого внимания требуют дети с острыми повторными заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей, характеризующимися частотой течения, сложностями лечения и реабилитации. По данным Е.П. Ковалевой, и ряда зарубежных авторов, больные пневмоцистозом чаще встречаются среди детей раннего возраста. Среди недоношенных детей смертность от пневмоцистной пневмонии может составлять 50%. Наши исследования материала (мокроты) от 176 часто болеющих детей в возрасте от 2 месяцев до 14 лет, методами НРИФ и ПЦР выявили антиген *Pneumocystis jiroveci* и ДНК этого возбудителя у 2,85% обследованных, что подтвердило диагноз «пневмоцистоз» у детей при отсутствии клинических проявлений этого заболевания.

Дальнейшие обследования детей и взрослых с заболеваниями респираторного тракта показали высокую пораженность этих контингентов пневмоцистной инфекцией. Из 443 детей у 79 (17,0%) были выявлены антитела класса IgM, свидетельствующие об острой инфекции, при этом в мокроте и бронхоальвеолярном лаваже были обнаружены цисты и трофозоиты у 27 (6,1%) обследованных. Среди 404 взрослых эти показатели были незначительно выше. Антитела класса IgM – у 93 (23,0%) человек, а возбудитель в мокроте и лаваже – у 24 (5,9%). Таким образом, показано наличие острой пневмоцистной инфекции у 23,1% детей и у 28,9% взрослых с респираторной симптоматикой.

Из анализа мировой литературы, проведенного Hughes W.T. следует, что среди недоношенных новорожденных, больные пневмоцистной пневмонией составляют 68,1% от всех заболевших, среди больных лейкемией – 12,3%, другими злокачественными опухолями – 7,3%. При трансплантации органов пневмоцистоз был диагностирован у 3,6%, при первичной иммунной недостаточности у – 2,0%, при коллагенозах у – 0,6%, при нарушениях питания у – 0,3%. В среднем заболеваемость пневмоцистной пневмонией у взрослых, страдающих различными нарушениями иммунитета, составляет 22,7%.

3.1. Пневмоцистоз у лиц с иммунодефицитными состояниями различной природы.

Пневмоцистоз у ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом.

В России официально зарегистрировано около 400 000 ВИЧ-инфицированных. Однако по оценкам международных экспертов, их количество превышает данные официальной статистики в 5-10 раз.

Пневмоцистоз – это ведущая СПИД-ассоциированная инфекция. На долю больных СПИДом приходится $\frac{3}{4}$ всех случаев пневмоцистных пневмоний. Пневмоцистная пневмония была основным сопутствующим заболеванием и у ВИЧ-инфицированных. Изучение ВИЧ-инфекции, как нового инфекционного заболевания началось с того, что в 1981 году в Лос-Анжелесе были диагностированы 5 случаев пневмоцистных пневмоний в сочетании с саркомой Капоши у моло-

дых и ранее здоровых мужчин-гомосексуалистов. Позже паразитологическими методами исследований был подтвержден пневмоцистоз у 60% взрослых больных СПИДом и у 70% детей. Сочетание ВИЧ-инфекции и пневмоцистоза резко ухудшает течение основного заболевания. У больных СПИДом при отсутствии лечения пневмоцистная пневмония всегда приводит к летальному исходу. При поздней диагностике летальность при первичном заболевании составляет около 40%, своевременно начатое лечение пневмоцистоза позволяет снизить летальность до 25%. Тем не менее, через несколько месяцев возможны рецидивы (от 10 до 30%).

Наши исследования, проведенные в 2001-2002 г. совместно с сотрудниками ФГУ Центрального НИИ эпидемиологии и ИКБ №2 г. Москвы (Т.Н.Ермак и др.), больных с диагнозом «ВИЧ-инфекция», у которых развилась острая пневмония, показали, что 61% взрослых серопозитивны в отношении *Pneumocystis jiroveci* и 29,8% из них имеют антитела класса IgM, свидетельствующие об острой инфекции; среди детей обнаружено 52,3%, обладающих анти- *Pneumocystis jiroveci*, у 26,7% из них были выявлены антитела класса IgM. Результаты наших исследований позволили сделать вывод, что этиологическим агентом, вызвавшим острые пневмонии у серопозитивных к *Pneumocystis jiroveci* ВИЧ-инфицированных пациентов, являлись пневмоцисты.

Недавние исследования 483 образцов клинического материала от 360 ВИЧ-инфицированных методом ПЦР, проведенные сотрудниками ФГУ Центрального НИИ эпидемиологии, подтвердили клинический диагноз «пневмоцистная пневмония» в 34% случаев.

В исследованиях, проведенных украинскими учеными (2004), была изучена распространенность *Pneumocystis jirovecii* среди больных с неспецифической патологией легких в условиях Украины. Пневмоцистоз регистрировался у 54% ВИЧ-инфицированных лиц с патологией органов дыхания и у 56% не инфицированных ВИЧ, но с неспецифическими заболеваниями легких. Зараженность пневмоцистной инфекцией у ВИЧ-негативных с неспецифическими заболеваниями легких не зависит от пола и возраста обследованных. Она по-

вышается в холодный сезон года, при проживании в северных регионах Украины, при хронизации патологии в дыхательных органах, а также при наличии в анамнезе у больных производственной вредности и привычки курить. Этими учеными также отмечено, что повышение уровня зараженности *Pneumocystis jiroveci* ВИЧ-инфицированных больных и числа выделяемых ими цист в мокроте коррелирует со снижением уровня CD4+ в крови.

Если в первых сообщениях о СПИДе указывалось на пневмоцистоз, как на ведущую СПИД-ассоциированную инфекцию, то в настоящее время помимо пневмоцистоза, токсоплазмоза, цитомегаловирусной инфекции, туберкулез в 42% является причиной смерти больных ВИЧ-инфекцией. Нужно отметить, что заболевание туберкулезом способно вызвать иммунодепрессию, поэтому мы решили выяснить распространение пневмоцистной инфекции среди этой категории больных. Были обследованы две группы: 125 человек с диагнозом ВИЧ-инфекция стадия 3Б и различные формы туберкулеза и 95 человек с различными формами туберкулеза, но без ВИЧ.

Анализ структуры выявленных маркеров пневмоцистной инфекции у ВИЧ-инфицированных на стадии вторичных заболеваний в зависимости от формы туберкулеза показал, что при диссеминированных и генерализованных формах клинически пневмоцистоз проявляется реже, чем при ограниченных формах. Тем не менее, обращает на себя внимание, что при стабилизации процесса диссеминированного и генерализованного туберкулеза пневмоцистная инфекция протекает манифестно. Лабораторные исследования показали, что высокий процент (61,9%) больных с маркерами острой и недавно перенесенной пневмоцистной инфекции был выявлен у ВИЧ-инфицированных с ограниченными формами туберкулеза.

Среди больных туберкулезом без ВИЧ-инфекции 44,8% имели маркеры острой и недавно перенесенной пневмоцистной инфекции, при этом, у лиц с генерализованным туберкулезом маркеры острой инфекции не превышали 34,4%, тогда как у больных инфильтративным туберкулезом они составили 56,3%.

Таким образом, было показано, что пневмоцистоз как оппортунистическая инфекция актуален как при СПИДе, так и при туберкулезе.

Результаты наших исследований согласуются с результатами американских ученых (2000 г.), показавших, высокий (89%) уровень смешанного инфицирования возбудителями туберкулеза и пневмоцистоза.

Пневмоцистная инфекция у больных с заболеваниями системы крови и гемобластозами.

Пневмоцистная пневмония является частым осложнением у больных гемобластозами (49%) и реже у больных солидными опухолями (4%), что объясняется двумя существенными факторами, связанными с нарушениями иммунитета. С одной стороны, для лимфопролиферативных заболеваний характерно нарушение Т-лимфоцитарного звена иммунитета, а с другой стороны, применение ряда иммуносупрессивных препаратов снижает число Т-хелперов. К таким препаратам прежде всего относятся глюкокортикостероиды, подавляющие воспалительный ответ организма, фагоцитоз альвеолярных макрофагов и выработку антител к *Pneumocystis jiroveci*, также они снижают число Т-хелперов. Использование флюдорабина, подавляющего Т-лимфоциты и, в частности, CD4+, часто приводит к осложнению основного процесса пневмоцистной пневмонией.

Применение иммуносупрессивной терапии после трансплантации органов также приводит к развитию пневмоцистной пневмонии, как вторичного заболевания.

В нашем исследовании, проведенном ранее совместно с сотрудниками Гематологического научного центра РАМН (проф. Галстян Г.М. и др.), 27 больных с заболеваниями системы крови, осложненными острой дыхательной недостаточностью (22 человека) и неясными поражениями легких (5 человек), было показано, что клиническая и рентгенологическая картина пневмоцистной пневмонии неспецифична. Диагноз установили на основании исследования бронхоальвеолярного лаважа, биоптатов легкого (на наличие антигенов *P. jiroveci*) и сыворотки крови (на наличие анти- *P. jiroveci* кл. IgG и

IgM). Пневмоцистная пневмония была диагностирована у 8 из 27 больных.

С октября 1997 г. в отделении реанимации ГНЦ РАМН исследование на пневмоцистоз было включено в план обязательного обследования больных с острой дыхательной недостаточностью, а также больных с длительной лихорадкой, у которых имелась картина неясного поражения легких.

В 2006-2008 г.г. нами совместно с сотрудниками ГУ ГНЦ РАМН и ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН было проведено обследование 450 пациентов с различными гематологическими диагнозами с подозрением на пневмоцистную пневмонию. Исследовали бронхоальвеолярный лаваж (на антигены *P. jiroveci*) и сыворотку крови (на наличие анти- *P. jiroveci* кл. IgG и IgM).

Проведенное исследование выявило острую пневмоцистную инфекцию, практически, у трети обследованных пациентов. У лиц с миеломной болезнью маркеры острой инфекции были зарегистрированы у 43,3% больных; 35,6% - у больных лимфомой. У больных острым лейкозом и анемией диагноз пневмоцистоз был поставлен в 34,3% и 33,3% случаев соответственно.

Обследование 45 детей из Морозовской Детской Клинической Больницы с диагнозом иммунная нейтропения показало, что маркеры острой инфекции пневмоцистоза были выявлены у 33,3%.

Приведенные данные еще раз подтверждают уязвимость гематологических больных (взрослых и детей) этим активным, в отношении иммунодепрессированных лиц, оппортунистом.

4. Моделирование пневмоцистной инфекции.

Для более глубокого изучения причин развития пневмоцистной инфекции у человека моделирование этой инвазии на животных начали проводить Weller R., Frenkel J., Hughes W. и их соавторы с 1955 года. Пневмоцистоз удалось воспроизвести на крысах, мышах, хорьках. Эти животные естественные пневмоцистоносители, их не нужно было дополнительно заражать *Pneumocystis carinii*, для реактивации применяли кортикостероиды в больших количествах, цитостатики, радиоактивное облучение, тим- и спленэктомию, в общем, все, что

провоцирует иммунодефицитное состояние у человека. В экспериментах было показано, что наиболее эффективны сочетания цитостатиков и кортикостероидов. Спленэктомия не вызывает пневмоцистной пневмонии, а тимэктомия дает ожидаемый результат только на новорожденных крысах. Радиоактивное облучение в этих экспериментах не было достаточным для развития пневмоцистоза у подопытных животных.

В 1995 году отечественными учеными (Лавдовская М.В., Коваленко Ф.П., Лысенко А.Я. и др.) удалось моделирование генерализованного пневмоцистоза на крысах линии Wistar с применением иммунодепрессанта трикорда-40 при одновременном введении лейшманий из селезенки экспериментально зараженного этим возбудителем золотистого хомяка. Результаты паразитологического исследования показали активизацию латентной пневмоцистной инфекции, усиленной дополнительным супрессорным ко-фактором – возбудителем висцерального лейшманиоза.

Нами, в экспериментах на животных с использованием мини-свиней светлогорской породы в качестве лабораторной модели, было показано значение иммунодефицитного состояния организма и качества белкового питания для возникновения пневмоцистоза.

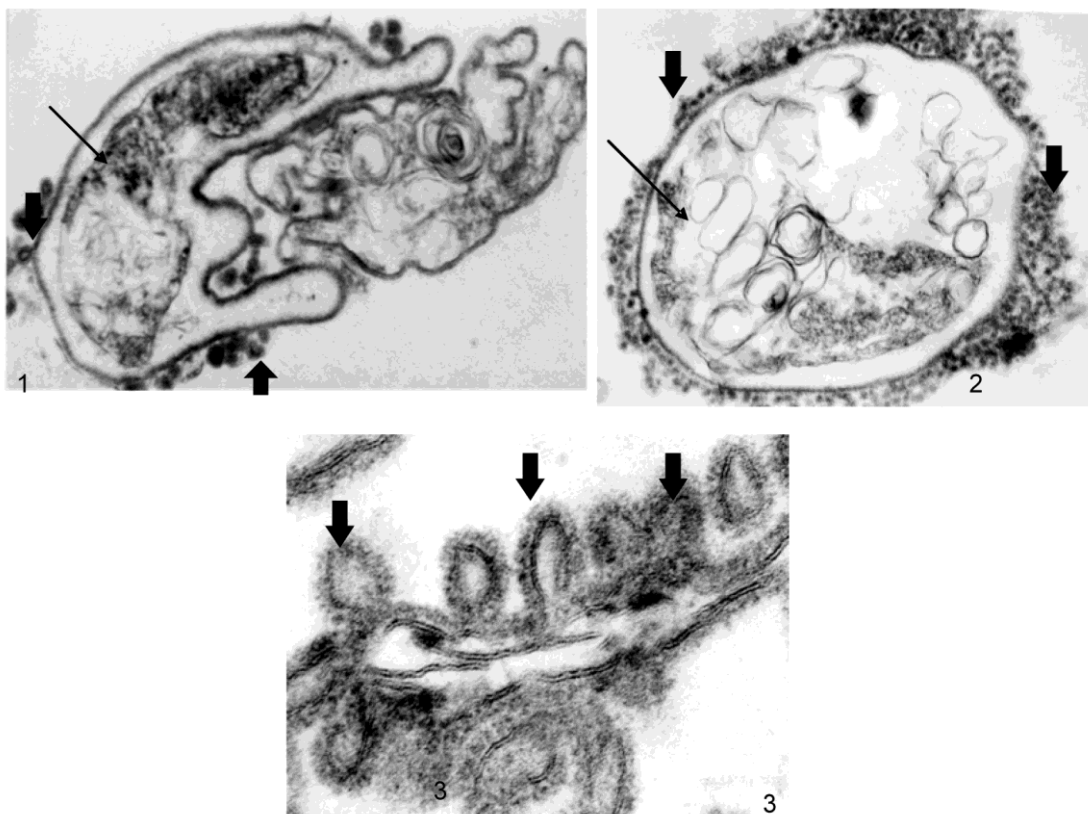
Вместе с тем, изучение возможного спектра микроорганизмов в биомассе, полученной из легких мини-свиней, дало неожиданные результаты.

Для этой цели был применен метод ультратонких срезов, специально разработанный и выполненный Диденко Л.В. для выявления микроорганизмов в биологическом материале. В препаратах были обнаружены зрелые цисты с хорошо выраженными спорозоидами.

Наряду с пневмоцистами было обнаружено большое количество вирусных частиц, ультраструктурная организация которых соответствовала строению коронавируса. Вирионы были представлены округлыми или овальными частицами, размер которых варьировал от 80 до 130 нм. Хорошо выявлялась плотная мембрана, покрытая булаво-видными отростками, образующими характерный вид короны, величина отростков составляла от 12 до 24 нм.

Зрелые и незрелые вирусные частицы плотно контактировали с наружной поверхностью пневмоцист. Обнаружение тесной структурной связи коронавируса с пневмоцистами наводит на мысль о неслучайной взаимосвязи этих микроорганизмов. И подтверждает тезис об усилении пневмоцистной инфекции в присутствии эндогенного кофактора (вируса или бактерий) (Рис.1).

Рисунок 1. Коронавирусы, плотно контактирующие с наружной поверхностью клеточной стенки пневмоцист.



Подписи к рисункам

Рис.1 *P.carinii* (циста) ↑, коронавирус ▲. Ув 26 500

Рис.2 *P.carinii* (циста) ↑, коронавирус ▲. Ув. 24 000.

Рис.3 Почкование коронавируса ▲. Ув.84 000.

5. Клиническая картина

Продолжительность инкубационного периода минимум 8-10 дней, максимум 2-5 недель. Начало заболевания похоже на проявление банальной инфекции дыхательных путей, что затрудняет своевременное распознавание пневмоцистоза.

Пневмоцистоз у детей развивается обычно на 4-6 месяце жизни, когда иммунная система новорожденного еще полностью не сформировалась. Наиболее подвержены этому заболеванию недоношенные, больные рахитом, с гипотрофией и поражениями ЦНС.

У детей раннего возраста пневмоцистоз протекает как классическая интерстициальная пневмония с четкими стадиями патологических процессов.

На основании морфологических изменений при манифестном течении заболевания выделяют три стадии пораженного легкого:

- отечная (7-10 дней);
- ателектатическая (до 4-х недель);
- эмфизематозная (ее продолжительность варьибельна).

Заболевание начинается постепенно.

На первой стадии симптомы поражения легких выражены незначительно. На первый план выступают явления интоксикации – снижается аппетит, прекращается нарастание массы тела, вялость, бледность и цианоз носогубного треугольника, легкое покашливание. Нормальная в начале заболевания температура сменяется субфебрильной. В легких появляются непостоянные мелко- и среднепузырчатые хрипы. Возникает типичное вздутие передневерхних отделов грудной клетки, тимпанический оттенок при перкуссии, особенно в межреберном пространстве. Дыхание учащается до 50-70 в минуту, становится поверхностным, иногда бывает покашливание.

Во второй ателектатической стадии заболевания выражены симптомы, типичные для интерстициальной пневмонии: подъем температуры до фебрильной ($\geq 39^\circ$), резкая одышка, учащенное дыхание до 80-100 в минуту, соотношение пульса и дыхания нередко 1:1. В этой стадии появляется навязчивый лающий коклюшеобразный ночной кашель, который сопровождается выделением характерной вязкой, а позже и пенистой мокротой. Постоянный цианоз. Далее происходит нарастание расширения грудной клетки, значительное увеличение межреберных пространств, диафрагма опущена. Выслушивается жесткое, местами ослабленное дыхание, иногда отмечаются мелко-

и среднепузырчатые хрипы. Поражения столь массивны, что могут возникать явления легочно-сердечной недостаточности, а в дальнейшем закончиться пневмотораксом.

В третьей, эмфизематозной стадии состояние улучшается, уменьшается одышка, урежается дыхание, менее выражено вздутие грудной клетки, но длительно сохраняется коробочный звук при перкуссии.

У грудных детей пневмоцистоз может протекать по типу ларингита, обструктивного бронхита или бронхиолита, у детей старше года - как астматический бронхит. В ряде случаев наступает летальный исход при клинической картине отека легких.

У более старших детей стадии заболевания стерты и пневмоцистоз в ряде случаев протекает без пневмонии, часто, как хронический бронхолегочный процесс.

У взрослых пневмоцистная пневмония развивается у лиц, с вторичным иммунодефицитом, но в отдельных случаях и без явных признаков иммунодефицита. Инкубационный период краткий – от 2 до 5 суток, начало – острое. Пневмоцистная пневмония может развиваться у больных, получающих иммуносупрессивную терапию (кортикостероиды). При медикаментозной иммуносупрессии это заболевание проявляется на фоне снижения дозы кортикостероидов. Продромальный период обычно продолжается 1-2 недели. Постепенно температура становится субфебрильной, возникает умеренная одышка при физической нагрузке, усиливается сухой кашель, продуктивный бывает редко. Характерен цианоз, раздувание крыльев носа, тахикардия; могут нарастать приступы сердечно-сосудистой недостаточности. Боли в грудной клетке и плевральные боли возникают нечасто по передней поверхности грудной клетки, ноющего характера, усиливающиеся при дыхании.

Пневмоцистная пневмония при СПИДе, как правило, характеризуется вялым хроническим процессом. Первоначально аускультативная симптоматика не выявляется. К летальному исходу приводит дыхательная недостаточность, связанная с резким нарушением вентиля-

ции легких и газообмена. Возможны также абсцессы, спонтанный пневмоторакс и экссудативный плеврит.

Рентгенологическая картина на первый взгляд кажется невыразительной.

В начале (I стадия) заболевания рентгенологически пневмоцистная пневмония может выявляться у 60% больных. У больных СПИДом рентгенологическая картина появляется значительно отсроченно от начала заболевания. Даже при явной клинике пневмоцистной пневмонии, у больных после трансплантации костного мозга рентгенологическая картина может быть нормальной в 15% случаев, а у 58% наблюдаются билатеральные инфильтраты. На мысль, что пневмония может быть пневмоцистной, наводит сочетание дыхательной недостаточности с неизменной рентгенологической картиной. Однако последующие исследования выявляют в прикорневых отделах легких облаковидное понижение прозрачности и усиление интерстициального рисунка. Далее отмечают мелкоочаговые тени, лежащие в обоих полях симметрично, напоминая крылья бабочки.

В разгаре заболевания (II стадия) в легких появляются обильные очаговые тени, местами сливающиеся в крупные участки уплотнения, перемежающиеся участками вздутия.

Структура легкого становится матовой («ватной»), т.е. по рисунку напоминает тонкий, неравномерно растянутый слой ваты с более или менее плотными участками. Это же понижение прозрачности может выявляться и при компьютерной томографии. У 75% больных СПИДом определяются диффузные интерстициальные инфильтраты.

III стадия характеризуется наличием лобулярных вздутий, расположенных субплеврально, которые могут привести к их разрыву с образованием сухого серповидного пневмоторакса при неполном спадании легкого, т.к. патологические элементы, заполняющие альвеолярную и бронхиальную системы, препятствуют этому. В результате увеличения общего объема легких диафрагма опущена, иногда даже уплощена (Рис.2.).

Клиническое наблюдение - Больная А., 23 года, житель Москвы, поступила в стационар с диагнозом ВИЧ 4Б (СПИД) стадия вторичных заболеваний: Инфильтративный туберкулез верхней доли правого легкого в фазе распада и бронхогенного обсеменения МБТ (+). Считает себя больной за 1 мес. до поступления в стационар инфекционной больницы. Жалобы на потерю в весе за 1мес на 20 кг, озноб, непродуктивный кашель, одышку в покое и при минимальной физической нагрузке. Наличие фебрильной температуры на высоте озноба до 40 °С. С указанными жалобами госпитализирована в стационар инфекционной больницы. После проведенного обследования включающего – полипозиционную рентгенографию, клинический и биохимический анализы крови, определение CD4+ = 4 кл/мм³, CD8+ = 34 кл/мм³, а также CD4+ / CD8+ = 0,1. Определена вирусная нагрузка = 750000 коп\мл. После консультации фтизиатра с вышеуказанным диагнозом больная переведена в специализированный стационар.

Ранее туберкулезом не болела, контакт с больным туберкулезом не известен, в семье туберкулез не регистрировался. Много лет не проходила флюорографическое исследование. Имеет среднее образование, не работает, ребенок девочка 1,5 лет. Пациент проживает в благоприятных условиях, на вредных производствах не работала, наследственных заболеваний в семье нет. Курит 1-2 пачки сигарет в день, алкоголь употребляет систематически и много, начало употребления наркотических веществ относит к 1998 г - внутривенно героин, со слов больной последний год эксцессов употребления героина не было. Венерические заболевания - в начале 2004 года получала лечение по поводу впервые установленного диагноза сифилиса, хронический гепатит С в анамнезе с 1998г, ВИЧ инфекция выявлена в 1999 году при обследовании по поводу беременности. С 2004 года получает (ВААРТ), профилактического лечения по поводу ОИ не получала. При обследовании – состояние тяжелое, жалобы на одышку в покое 32 в1 мин, резкая слабость (больная лежит, самостоятельно повернуться в постели не может), кашель «лающий» со скудной мокротой слизистого характера, однократно скудное кровохарканье в виде

прожилок крови в мокроте, при росте 170 см больная весит 45 кг, отмечается выраженный цианоз губ, лица шеи кистей рук, «мраморность» кожи туловища, подкожно-жировой слой отсутствует, периферические лимфатические узлы не увеличены, Дыхание жесткое, в нижних отделах легких мелкопузырчатые хрипы. Край печени острый, выступает на 6-7 см из-под края реберной дуги, при пальпации болезненности нет. Рентгенологическая картина соответствует инфильтративному туберкулезу S1S2 правого легкого с распадом, одновременно выявляется мономорфная диссеминация на протяжении всего левого легкого и правого легкого (Рис.2). Рентгенологическая картина в большей степени соответствует сочетанию инфильтративного туберкулеза легких в фазе распада и очаговой пневмонии иного генеза. При исследовании методом люминесцентной микроскопии мокроты и аспирата из бронха, полученного при ФБС-выявлены МБТ в большом количестве. В клиническом анализе крови отмечено снижение гемоглобина - 87 г/л, эритроциты до 2,1 млн., лейкоциты до $1,3 \times 10^9$, лимфоциты до 8%, ускорение СОЭ до 60 мм\час. Биохимические показатели крови ЛДГ-850 МЕ/л, С учетом полученных данных обследования больной продолжена ВААРТ, начата противотуберкулезная терапия 4 препаратами основного ряда с хорошей переносимостью. Одновременно исследована кровь и мокрота больной на наличие основных ОИ.

При исследовании мокроты выявлены все формы пневмоцист (трофозоиты, прецисты и цисты).

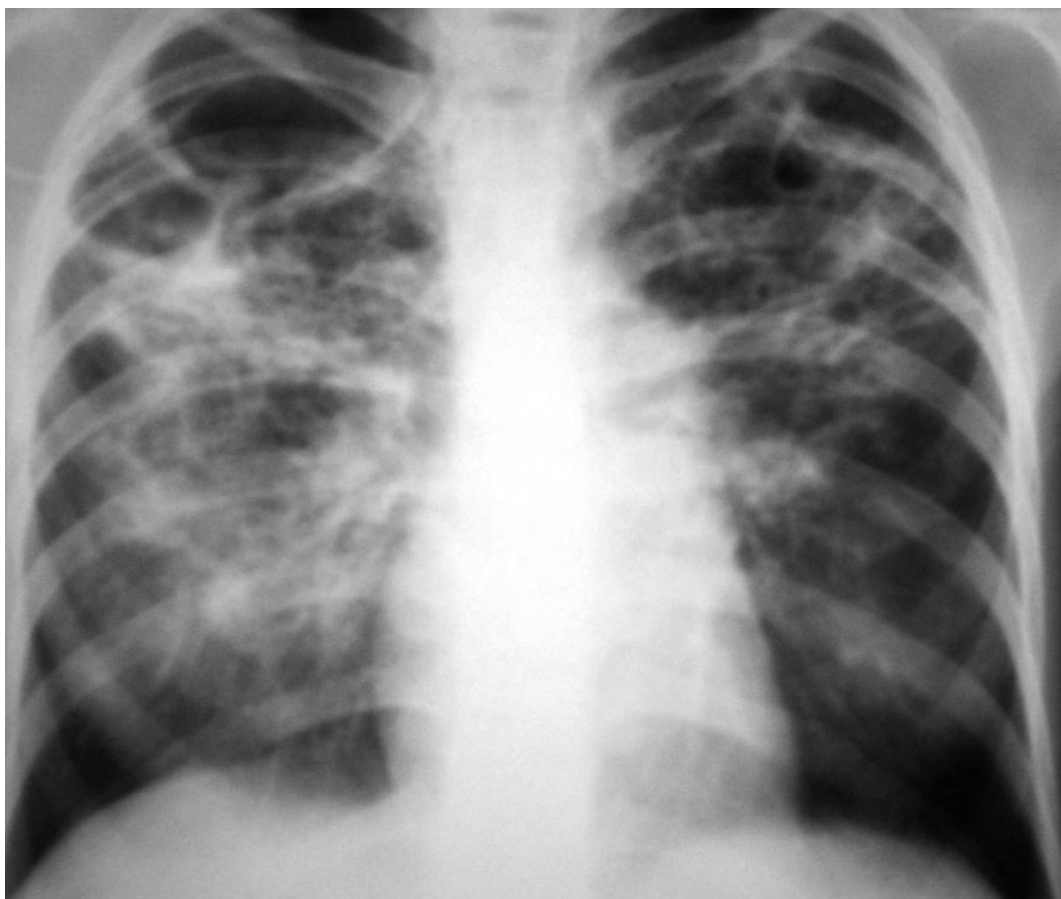
При исследовании крови обнаружены антитела классов IgM в титре 1:1400 и IgG – 1:820.

Больная с первых суток находится в отделении интенсивной терапии. До получения ответов результата исследования начата терапия Бисептол 480 – 1920 мг на 1 прием, 4 приема в сутки, Метраджил внутривенно капельно 500мг 2 раза в сутки. Стероидные гормоны, кислородотерапия. На 5 сутки температура тела нормализовалась, одышка уменьшилась до 23 в покое, больная себя обслуживает, на 10 сутки проведен рентгенологический контроль- диссеминация полно-

стью рассосалась, сохраняется инфильтрация легочной ткани верхней доли правого легкого. Больная переведена в отделение.

Через 4 мес. от начала противотуберкулезной терапии достигнута негитивация мокроты, полости распада не определяются, выписана на амбулаторное лечение.

Рисунок 2. Больная А 23 года. Диагноз: ВИЧ 4Б. Стадия вторичных заболеваний. Пневмоцистоз. Пневмоцистная пневмония, полостная форма. Диффузные билатеральные интерстициальные инфильтраты в легком множественные разнокалиберные полости больше в S1S2 правого легкого.



Лабораторное исследование больных с яркой клинической картиной пневмоцистоза выявляет:

- гипохромную анемию;
- гиперлейкоцитоз до $20-50 \times 10^9/\text{л}$;
- эозинофелия достигает 14-24%;
- СОЭ ≥ 50 мм/час;
- ЛДГ > 250 и более (до 700-800 МЕ/л);
- артериальная гипоксемия ($\text{PaO}_2 > 80$ мм рт.ст.) характерна для 80% больных пневмоцистозом;
- увеличение альвеолярно-артериального градиента ((А-а)ДО) характерно для 80% больных пневмоцистозом;
- уменьшение Т-хелперов (CD4+) > 200 кл/мл³.

Еще до недавнего времени считалось, что увеличение суммарной активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) > 250 и более (до 700-800 МЕ/л), при норме 150-210 МЕ/л говорит об активизации процесса пневмоцистной пневмонии. Работы последних лет показали, что повышенный уровень ЛДГ не является строго специфичным для *Pneumocystis jiroveci* - инфекции, т.к. выявляется у 60% больных пневмониями и указывает на паренхиматозное поражение легких.

Патологоанатомическая картина, как макроскопическая, так и микроскопическая, довольно типичная.

Макроскопически – легкие увеличены, тяжелые, плотные на ощупь, бледно-фиолетового цвета. Ткань легких мясистая, легко рвется, на разрезе серовато-синюшная мраморного рисунка. При надавливании из легких вытекает пенная кровянисто-серозная жидкость.

При микроскопическом исследовании в просвете альвеол и терминальных бронхиол, особенно в пенисто-ячеистых массах, обнаруживается большое количество пневмоцист. В альвеолах, вокруг конгломератов паразита лежат макрофаги, нейтрофильные лейкоциты. Часто наблюдаются макрофаги в которых лежат пневмоцисты.

II. Лабораторная диагностика пневмоцистоза.

Для диагностики пневмоцистоза необходимо использовать комплекс лабораторных методов исследования, включающий паразитологический и иммунологические тесты (табл. 1).

Таблица 1. Диагностика пневмоцистной инфекции

Цель исследования	Pneumocystis jiroveci	
	Методы исследования	Материал исследования
Определение антител класса IgG	ИФА, НРИФ	Сыворотка крови
Определение антител класса IgM	ИФА, НРИФ	Сыворотка крови
Определение возбудителя, антигенов и ДНК	1. морфология 2. НРИФ 3. ПЦР	Мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, биоптат

2.1. Правила сбора клинического (секционного) материала для паразитологических и иммунологических исследований.

2.1.1. Для патологоанатомического исследования в течение первых суток после гибели больного производят взятие фрагментов легочной ткани, включающей альвеолы, в стерильные одноразовые флаконы стерильными инструментами. Работу проводят с соблюдением противоэпидемического режима, согласно СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Из полученных материалов приготавливают мазки-отпечатки легкого или мазки из пенистого содержимого альвеол.

2.1.2. При жизни легочную ткань получают при проведении трансбронхиальной биопсии при фибробронхоскопии, что позволяет выявить пневмоцисты в 66-98%, однако, этот метод забора материала показан далеко не всем больным. Другой способ получения материала возможен при открытой биопсии легкого или с помощью чрезкожной интраторакальной аспирации легочной иглой у больных, которым противопоказано проведение трансбронхиальной биопсии

при прогрессирующем течении заболевания. Метод открытой биопсии легкого дает наилучшие (100%) результаты и приравнивается по результату к хирургическому вмешательству, при этом получается достаточно большой объем материала для исследования и ложноотрицательный результат полностью исключается.

2.1.3. В клиниках исследуют бронхоальвеолярный лаваж для выявления цист и трофозоитов. С помощью фибробронхоскопа заклинивают один из дистальных бронхов и вводят в него порциями по 20 мл. физиологического раствора, общее количество которого составляет 100-200 мл, и отсасывают его. Специалисты считают этот метод простым и безопасным.

2.1.4. Более простым методом получения материала для выделения пневмоцист является забор индуцированной мокроты. Через ультразвуковой распылитель делается ингаляция 3% раствором хлорида натрия и собирается мокрота в стерильную чашку. Если мокрота легко отделяется, ее надо собирать несколько раз в течение суток в одну посуду, сохраняя до исследования при $t +4^{\circ}\text{C}$.

2.1.5. Для получения материала от детей раннего возраста можно использовать прямую ларингоскопию без медикаментозной подготовки или метод воспроизведения кашлевого рефлекса путем надавливания на корень языка. Слизь при этом забирается тампоном.

Из полученного материала готовят мазки для дальнейшего исследования.

Лаважную жидкость центрифугируют при 1,5 тыс. об/мин, разводя фосфатным буфером до нужной концентрации и готовят мазки.

Мокроту для разжижения обрабатывают муколитическим раствором спутолизина (дитиотреитол), нейтрализуют фосфатным буфером, инкубируя 3 минуты, центрифугируют при 1.5 тыс. об/мин и готовят мазки.

Все перечисленные материалы исследуют как паразитологическими методами с целью выявления всех форм пневмоцист, так иммунологическими на наличие антигенов *Pneumocystis jiroveci*.

2.1.6. Для иммунологического исследования сыворотки, забор крови производят из вены. Кровь центрифугируют при 1500 об/мин 10 мин и отсасывают сыворотку, которую можно сохранять при t 4-6°C в течение недели или в замороженном состоянии при -20°C достаточно долго. Исследуют антитела в НРИФ и ИФА.

2.2. Паразитологический метод основан на прямом морфологическом выявлении пневмоцист в биологическом материале (легочной ткани, бронхо-альвеолярном лаваже (БАЛ), индуцированной мокроте (ИМ)).

Для **окраски паразитологических препаратов** с целью выявления *Pneumocystis jiroveci* используют классические методы: импрегнация метенамин-серебряным нитратом по Гомори, окраска толуидиновым синим, гематоксилином и эозином, по Грамму и раствором Шиффа, а также методом Романовского-Гимза.

Диагноз «пневмоцистоз» основывается на выявлении паразитов, характерных размеров и формы (цисты, прецисты и трофозоиты) или по характерной эозинофильной пене (окраска гематоксилином и эозином), внутри которой лежат цисты.

При серебрении по Гомори полисахариды стенки цисты окрашиваются скоплением осадка серебра и создается впечатление, что она нарисована черной тушью, трофозоиты при этом не окрашиваются.

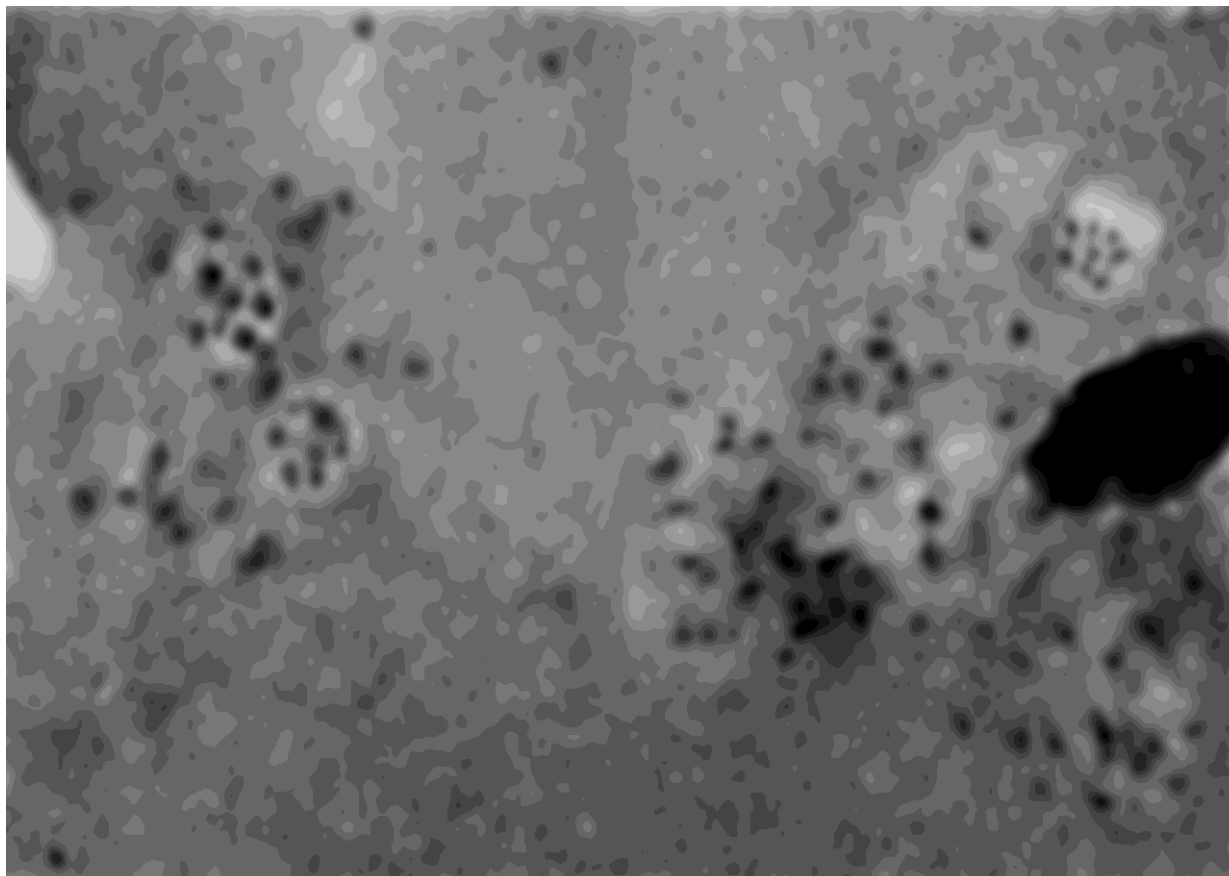
Толуидиновый синий также окрашивает стенку цисты, но в пурпурно-фиолетовый цвет. Окраске по Грамму и реактивом Шиффа подвергаются как цисты, так и трофозоиты.

Наиболее универсальным для выявления цист, трофозоитов и спорозоитов является метод Романовского-Гимза. Характерным и диагностическим является обнаружение розовых цист, оболочка которых при работе микровинтом микроскопа имеет вид прозрачного кольца, а внутри лежат от 4-х до 8-и красно-фиолетовых включений (Рис. 3). Наличие большого количества трофозоитов говорит об активации инфекционного процесса.

Витальная окраска нейтральным красным также позволяет выявить возбудителя в активной фазе.

Все перечисленные методы окраски требуют высокой квалификации исследователя для точной идентификации *Pneumocystis jirovecii*; к тому же эти методы служат лишь для индикации и направлены на общие грибные полисахариды оболочки цист.

Рисунок 3. Пневмоцисты. Окраска по Романовскому-Гимза.



2.3. Молекулярная диагностика пневмоцистоза.

Нужно сразу оговориться, что лицензированных молекулярно-генетических тест-систем для диагностики пневмоцистоза пока нет.

Американским исследователям (Т.К. Jensen, М. Boye, V. Bille-Hansen, 2001) удалось применить гибридизацию *in situ* в целях выявления *Pneumocystis carinii* в легких крыс и человека с использованием биотинимерованных олигонуклеотидных зондов, нацеленных на рибосомальную РНК (rRNA), а также в легких человека и хорьков путем флуоресцентной гибридизации *in situ*, нацеленной на специфические малые подгруппы r РНК генов.

В ряде работ показано определение пневмоцист методом ПЦР путем амплификации ДНК паразита с праймерами, специфичными для митохондриальной r РНК, в серии конечных разведений исследуемых материалов. Исследуемые образцы подвергали перевариванию протеинкиназой К в течение 2-х часов при 56 °С, экстрагировали фенол-хлороформом, разбавляли и амплифицировали с рAZ102Е и Н. Затем проводили электрофорез продуктов ПЦР в 2% агарозном геле и окрашивали этидиум-бромидом. ДНК экстрагировали из исследуемого материала, серийно разбавляли до разведения 1:20000. Хотя этот метод не стандартизирован, но его результаты хорошо согласовывались с результатами, полученными другими методами.

2.4. Методы культивирования *Pneumocystis carinii*.

В настоящее время нет надежной системы культивирования пневмоцист *in vitro*.

Отсутствие такой системы значительно затрудняет разработку диагностических тест-систем, воспроизведение инфекционного процесса *in vitro*, оценку эффективности лечения, а также решения ряда принципиальных эпидемиологических вопросов (источников инфекции, инфекционной дозы и др.).

Работы по разработке принципов и приемов культивирования *Pneumocystis carinii* давно ведутся во всем мире. Есть два принципа культивирования возбудителя: с использованием клеточных культур (клеточные линии однослойной культуры фибробластов человека (Wi-38), легочные эпителиальные клетки А-549, а также клетки эмбриона курицы и почки зеленой мартышки (Vero), использование специализированной питательной среды, культуральных пластин с пористыми мембранами и на бусах.

Наиболее эффективным оказался метод, предложенный Merali S. и соавторами (1999). Этим исследователям удалось получить чистую культуру *Pneumocystis carinii*, растущую на пористой, покрытой коллагеном мембране. Культивируемые организмы оказались заразными для иммуносупрессированных крыс; их можно сохранять в замороженном состоянии и использовать для возобновления культуры.

Эти исследования создали перспективу для дальнейших экспериментальных и практических разработок.

2.5. Иммунологические методы выявления маркеров пневмоцистоза.

Геном *Pneumocystis carinii* – приблизительно 7.7 Мб., для гриба это маленький геном. Антигены этого паразита были идентифицированы методом иммуноблотинга, используя поликлональные и моноклональные антитела. Наибольшее значение имеет поверхностный комплекс гликопротеина, названный различными авторами главным поверхностным гликопротеином (MSG), gp A, gp120. MSG представляет собой семейство белков, кодируемых примерно 100 генами, которые сгруппированы по их местоположению (Dr. J. Stringer). Белки MSG способны распознавать клетки хозяина и, благодаря, своей изменчивости обходят его иммунную защиту. Около 10% генома пневмоцисты принадлежит генному семейству MSG. Этот гликопротеин имеет молекулярную массу в пределах от 95 kDa, выделенного от человека (*Pneumocystis jiroveci*) до 140 kDa, выделенных у других видов животных (*Pneumocystis carinii*).

Иммунофлюоресцентные методы для выявления цист и трофозоитов основаны как на использовании моноклональных, так и поликлональных антител. Мышиные моноклональные антитела могут быть получены против цист или против трофозоитов, также против отдельных антигенов *Pneumocystis jiroveci*/ *carinii*. В настоящее время только две фирмы в Европе выпускают тест-системы для диагностики пневмоцистоза:

«Medac» (Германия) и «BIO-RAD» (Франция) выпускает тест-системы НРИФ на основе моноклональных антител для выявления пневмоцист в мазках из мокроты и бронхоальвеолярных смывов. Этот метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, даже большей, нежели гистохимическое окрашивание препаратов.

В НИИЭМ им Н.Ф.Гамалеи РАМН разработаны и выпускаются три вида диагностикумов пневмоцистоза. Эти методы прошли многолетние клинико-эпидемиологические испытания и показали себя надежными, чувствительными и специфичными.

«ПневмоцистоФлюоАГдиагностика» - набор реагентов предназначен для проведения непрямой реакции флюоресценции для выявления всех форм пневмоцист (цист, прецист и трофозоитов) в мазках, приготовленных из мокроты, бронхоальвеолярного лаважа.

В состав набора входят следующие компоненты:

1. Компонент №1. 18-ти луночные стекла с нанесенным на 5 и 6 лунки второго и третьего рядов антигеном *P. carinii* 6 стекол
2. Флакон № 2. Контрольная сыворотка, положительная (K^+) содержащая антитела к *P. carinii*, инактивированная, человеческая, лиофильно высушенная 6 фл.
3. Флакон № 3. Контрольная сыворотка, отрицательная (K^-), не содержащая антитела к *P. carinii*, инактивированная, человеческая, лиофильно высушенная 1 фл.
4. Флакон № 4. Иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие против иммуноглобулинов человека, сухие 1 фл.
5. Флакон № 5. Альбумин бычий, меченный родамином, сухой (БСА-Р) 1 фл.
6. Инструкция по применению 1 шт.

Гарантийный срок хранения набора реагентов – 1 год.

Учет результатов начинают с оценки контролей. В положительных контрольных образцах (K^+) должна наблюдаться яркая флюоресценция желто-зеленого цвета на 3-4 креста в клетках овальной или формы величиной от 2 μ (трофозоиты) до 5-10 μ (прецисты и цисты). В контроле с отрицательными контрольными образцами (K^-) свечение должно отсутствовать или быть не более чем на один крест. Более подробно смотри в Приложении 1.

Иммунологические методы, выявляющие специфические антитела классов IgG и IgM (НРИФ и ИФА), также играют значительную роль в диагностике пневмоцистоза, особенно при эпидемиологических исследованиях или при диагностике, когда у больного невозможно взять лаважную жидкость или мокроту. Антитела класса IgG

среди здорового населения выявляют достаточно часто (60-80%). Наличие анамнестических анти- *Pneumocystis jiroveci* класса IgG говорит о встрече с этим инфекционным агентом в прошлом в течение жизни. Исследование антител должно происходить в динамике при обязательном титровании сыворотки. Выявление 4-х кратного нарастания IgG и/или определение антител IgM против *Pneumocystis jiroveci* говорит об остром инфекционном процессе, вызванном этим возбудителем. Обнаружение антител к пневмоцисте у детей раннего возраста (до 1 года) имеет диагностическое значение.

Набор реагентов - «ПневмоцистоФлюоАТдиагностика» предназначен для выявления антител к пневмоцистам классов IgM и IgG в сыворотках крови больных детей и взрослых с бронхолегочной патологией с подозрением на пневмоцистоз и лиц с иммунодефицитными состояниями. Набор основан на непрямом иммунофлюоресцентном методе с использованием в качестве антигена целых, инактивированных формалином клеток *P. carinii*, высокоспецифических сывороток (K+ и K-) и моноклональных антител, меченных ФИТЦ.

В состав набора входят следующие компоненты:

- 18-ти луночные стекла с нанесенными на все лунки целыми клетками пневмоцист (инактивированными) – 6 штук;
- Контрольная положительная сыворотка (K1+), содержащая анти-пневмоцистные антитела (IgM) – 1 флакон;
- Контрольная положительная сыворотка (K2+), содержащая анти-пневмоцистные антитела (IgG) – 1 флакон;
- Контрольная отрицательная сыворотка (K-) не содержащая анти-пневмоцистные антитела – 1 флакон;
- Иммуноглобулины анти-IgM, меченные ФИТЦ;
- Иммуноглобулины анти-IgG, меченные ФИТЦ;
- Инструкция по применению – 1 шт;
- Паспорт контроля ОБТК.

Гарантийный срок хранения набора реагентов – 1 год.

Учет результатов начинают с оценки контролей. В исследуемых сыворотках, содержащих специфические антитела, и в K+ наблюдает-

ся желто-зеленое свечение, в отрицательном контроле (К-) свечение отсутствует. Более подробно смотри в Приложении 2.

Набор реагентов «ПневмоцистоСтрип» предназначен для выявления антител к антигену *Pneumocystis carinii* в сыворотках крови больных детей и взрослых с подозрением на пневмоцистоз и у здоровых при проведении эпидемиологических исследований. Этот набор основан на непрямом иммуноферментном анализе на твердой фазе с использованием пероксидазы хрена в качестве маркерного фермента.

В состав набора входят следующие компоненты.

- Компонент №1: Планшет полистироловый с адсорбированным антигеном *P.carinii* (разборный, 12 x 8) 2 шт.
- Флакон № 2: Моноклональные антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата 1) – 0,1 мл 1 фл.
- Флакон № 3: Моноклональные антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата 2) – 0,1 мл 1 фл.
- Флакон № 4: Положительный контрольный образец (K1⁺), инактивированный, содержащий антитела класса IgM к *P.carinii*, лиофильно высушенный – 4 фл.
- Флакон № 5: Положительный контрольный образец (K2⁺), инактивированный, содержащий антитела класса IgG к *P.carinii*, лиофильно высушенный – 4 фл.
- Флакон № 6: Отрицательный контрольный образец (K⁻), инактивированный, не содержащий антитела к *P.carinii*, лиофильно высушенный – 2 фл.
- Флакон № 7: Фосфатно-солевой буфер с Твином 20 (ФСБ-Т), концентрат – 12,5 мл 2 фл.
- Флакон № 8: Субстратный буферный раствор для разведения хромогена (СБ) – 10 мл 2 фл.
- Флакон № 9: Хромоген (ТМБ) – 1,4 мл 1 пр.
- Флакон № 10: Бычий сывороточный альбумин (БСА) - 100 м 2 фл.
- Флакон № 11: Стоп-реагент (0,5 М серная кислота) 1 фл.

- Инструкция по применению 1 шт.
- Полулогарифмическая бумага для построения калибровочного графика 1 шт

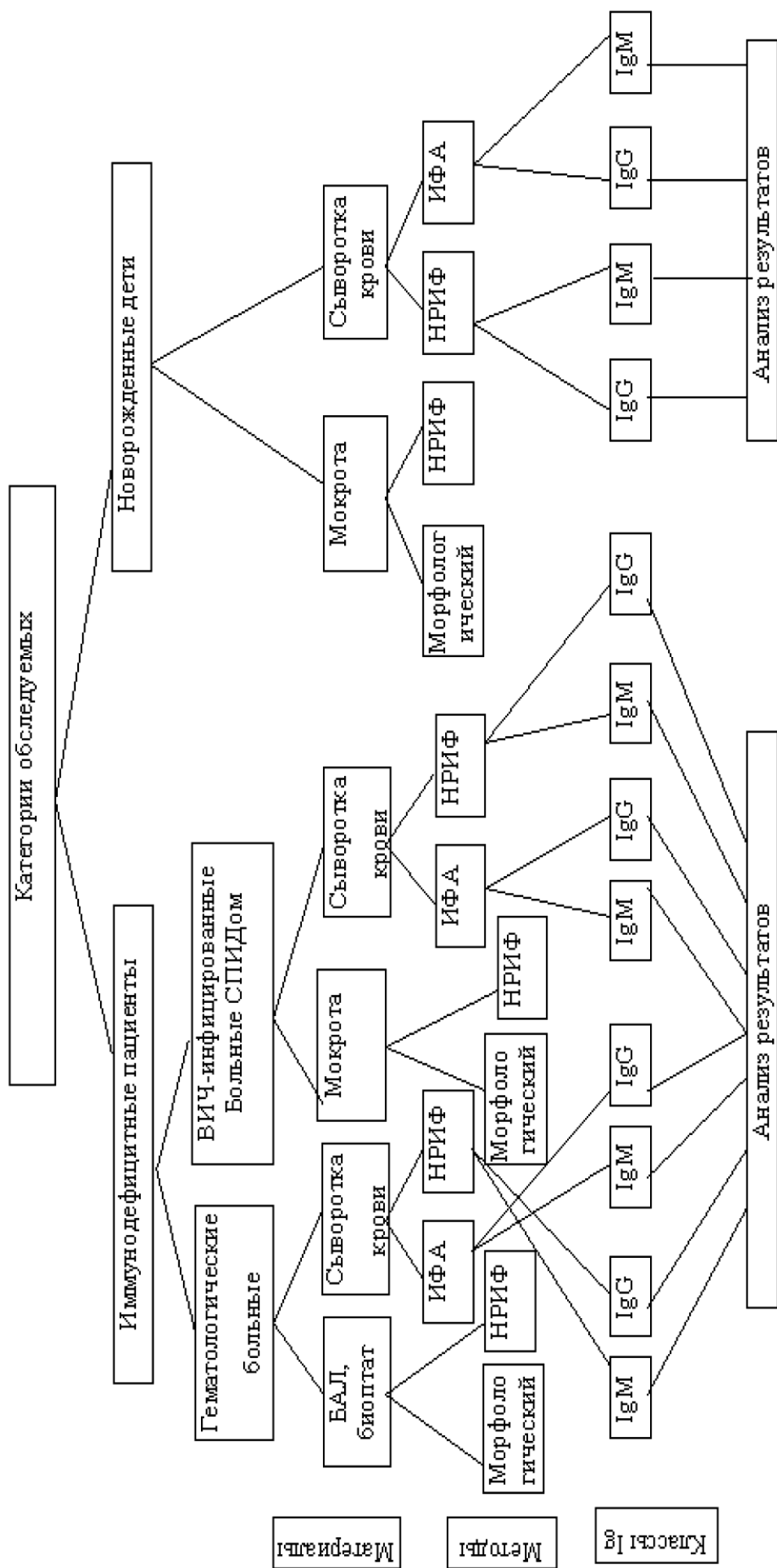
Этот набор реагентов позволяет провести анализ 30 сывороток на антитела класса IgM и 30 сывороток на антитела класса IgG, при этом точно определить титры антител. Гарантийный срок диагностикума 1 год. Более подробно смотри в Приложении 3.

Применение комплекса диагностических методов позволяет проводить своевременную качественную прижизненную диагностику, за которой должна последовать адекватная терапия.

На основании анализа контингентов, входящих в группы риска в отношении пневмоцистоза, и методов диагностики, применяемых в наших исследованиях, был разработан предлагаемый алгоритм лабораторной диагностики пневмоцистоза (Рис.4)

Рисунок 4

Алгоритм лабораторной диагностики пневмоцистоза



III. Профилактика и лечение пневмоцистоза

1. Профилактика

Профилактика пневмоцистоза может быть разделена на санитарно-эпидемиологическую и медикаментозную.

Учитывая широкую распространенность этого возбудителя и высокий процент носителей среди взрослого населения, необходимо проводить обследования по эпидемиологическим показаниям медицинского персонала детских учреждений, больниц, онкологических и гематологических Центров, Центров трансплантации и сердечно-сосудистой хирургии на носительство *Pneumocystis jiroveci*, чтобы исключить внутрибольничную инфекцию.

Полноценное питание уменьшает риск заболевания пневмоцистозом. Как уже говорилось, важность белкового питания нами показана на модели мини-свиней. Румынские ученые нашли, что в 90% подтвержденных случаев пневмоцистоза белковое недоедание является самым тяжелым фактором риска при заболевании детей раннего возраста.

Медикаментозная профилактика пневмоцистной пневмонии делится на первичную и вторичную.

Первичная профилактика должна предотвратить пневмоцистоз у еще не болевших людей. Основным критерий для начала профилактики – снижение числа CD 4+ лимфоцитов ниже 200. Тем не менее, до сих пор нет единого мнения когда начинать первичную профилактику.

Вторичная профилактика проводится в целях предупреждения повторного заболевания пневмоцистной пневмонией и подразумевает постоянный прием противопневмоцистного препарата после первичного эпизода заболевания.

Ориентиром для начала медикаментозной профилактики пневмоцистоза у больных СПИДом, гемобластозами или при трансплантации органов служит уровень CD4+ ниже 300 в мм², также увеличение альвеолярно-артериального кислородного градиента (A-a >25мм рт.столба). При этом нужно учитывать, что у больного не развивается

пневмоцистная пневмония только пока он принимает лекарственные препараты. Для отдельных групп больных профилактика может продолжаться 6 - 12 мес.

Основные препараты, используемые для профилактики пневмоцистоза:

- **Бисептол** (Бактрим) состоит из сульфаметазола и триметоприма. Сочетание этих двух препаратов, каждый из которых оказывает бактериостатическое действие, обеспечивает сильную бактерицидную активность на разных стадиях развития микроорганизмов, дает хороший лечебный эффект. Для него характерно медленное развитие устойчивости к нему микроорганизмов.
- **Дапсон** оказывает антибактериальное действие в отношении микобактерий лепры и туберкулеза. Для профилактики пневмоцистоза его можно применять в сочетании с пириметамином или с пентамидином (аэрозоль). Пириметамин (хлоридин) обладает антипротозойным действием, эффективен в отношении токсоплазм и лейшманий.
- **Пентамидин** (аэрозоль) используют как в сочетании с дапсоном, так и отдельно, когда больной не переносит не бисептол, ни дапсон. Однако аэрозольный пентамидин, применяемый отдельно, менее эффективен, и некоторые исследователи относят за его счет развитие генерализованного пневмоцистоза с выявлением возбудителя в миокарде, печени, тимусе и других органах.

Для профилактики может использоваться пентамидин для парентерального и внутримышечного введения.

Основной этап профилактики – раннее выявление и изоляция больных. После выписки больных необходима заключительная дезинфекция палат: влажная уборка, ультрафиолетовое облучение и обработка предметов 5% раствором хлорамина.

2. Лечение

Применение высокоактивной противоретровирусной терапии (НААРТ) вызывает резкое снижение случаев вторичных осложнений СПИД, включающих, в том числе, и пневмоцистные пневмонии. Тем не менее, для лечения пневмоцистоза необходимо специфическое лечение.

Наиболее часто при лечении детей, а также больных СПИДом, гемобластозами и при трансплантации органов с клиникой пневмоцистоза выбирают *триметоприм-сульфаметоксазол* (бактрим, бисептол).

Бисептол является ингибитором системы фолиевой кислоты. Триметоприм-сульфаметоксазол назначают перорально или внутривенно (в дозе 20 мг/кг-триметоприм и 100 мг/кг - сульфаметоксазол в сутки в течение 2 недель). Однако у 60% пациентов возможно развитие побочных реакций, таких как лейкопения, сыпь, тошнота, анемия, нейтропения. У 50% больных СПИДом эти явления могут проявиться на 11 день с начала применения препарата.

В таких случаях можно использовать триметоприм в сочетании с *дапсоном* 20 мг/кг в день триметоприма (в 4-х дозах) и 100 мг дапсона, курс -21 день. При этом отмечается высокая эффективность лечения, тем не менее, побочные явления могут иметь место.

Дапсон назначают по 100 мг перорально в течение 21 дня, но его относят к препаратам резерва, т.к. без других препаратов малоэффективен и его не назначают при тяжелых пневмониях.

Пентамидин – повреждает системы репродукции пневмоцист. Этот препарат наиболее длительно применяют при терапии пневмоцистоза. В клинической практике используют пентамидин-изетионат (он менее нефротоксичен) и пентамидин-метансульфат. Особенно часто его используют для лечения больных СПИДом. Однако у 45-50% этих пациентов возникают тяжелые побочные реакции, чаще на 7-14 день лечения. Этот препарат обладает токсическим действием на печень, почки, вызывает нейтропению, тромбоцитопению, повышение температуры, сыпь на коже, слизистых, азотемию и нарушение

концентрации глюкозы в крови. Введение пентамидина лучше осуществлять внутривенно медленно, капельно в течение 60-90 минут. Возможно внутримышечное введение, но инъекции болезненные и могут осложняться стерильными абсцессами. Прием таблетированного пентамидина неэффективен ввиду того, что он не всасывается в желудочно-кишечном тракте. Сложности, сопутствующие применению пентамидина внутримышечно и парентерально, привели к необходимости разработки других методов введения препарата в организм. Для аэрозольного введения пентамидина используют водный раствор пентамидина-изотоната по 600 мг на ингаляцию. Курс -21 день. При таком введении лекарства менее выражены гипогликемия, гепато- и нефротоксичность, тем не менее, отмечено появление кашля и бронхоспазма, который легко купируется бронходилататорами. Особенно часто этот метод используют для лечения пневмоцистных пневмоний у больных СПИДом.

Нужно отметить, что часть исследователей считает, что ингаляционная терапия пентамидином способствует возникновению ранних рецидивов пневмоцистоза, чаще отмечаются внелегочные поражения и спонтанный пневмоторакс. Возможно, это связано с неправильным выбором размера частиц для ингаляций. Если частицы ингаляционной смеси имеют диаметр 10 мкм, они оседают или в ротоглотке или в верхних дыхательных путях, оптимальным является размер частиц до 1-2 мкм в диаметре.

В последнее время для лечения пневмоцистоза у больных СПИДом все шире применяется *альфа-дифторметилорнитин (ДФМО)*. Этот препарат хорошо переносится, мало токсичен. Помимо действия на пневмоцисты ДФМО блокирует репликацию ретровирусов и цитомегаловируса, оказывает также иммуномоделирующее действие (восстанавливает функции Т-супрессоров и повышает иммунорегуляторный индекс ОКТ4/ОКТ8).

Препарат назначают в дозе 6 г на 1 м² поверхности тела в 3 приема в течение 8 недель. При благоприятном течении заболевания улучшение наступает в среднем через 4 дня после начала терапии.

Постепенно нормализуется температура, улучшаются объективные показатели ФВД, рентгенологическая картина. Через 3-4 недели у 20-25% больных пневмоцисты не обнаруживаются.

К препаратам резерва относятся: триметрексат, клиндамицин в сочетании с спримахином, эфлорнитин, атовакон.

В настоящее время разрабатываются новые классы противогрибковых антибиотиков, активных в отношении *Pneumocystis jiroveci* – пневмокандины и бенаномицины.

Механизм действия пневмокандинов, являющихся пептидами по химической структуре, заключается в нарушении синтеза клеточной стенки за счет ингибирования 1,3-β-D-гликан-синтетазы, тогда как бенаномицины связываются с маннозопротеинами плазматической мембраны, что вызывает ее повреждение и осмотический лизис пневмоцист.

Сордарины (GM193663, GM211676, GM222712) являются представителями новых классов противогрибковых препаратов, высокоактивных в отношении пневмоцист.

В настоящее время ведется поиск и разработка новых препаратов, активно действующих на *Pneumocystis jiroveci*, из уже известных групп, как например, WR6026 - представитель 8-аминохинолинов и вместе с тем новые селективные ингибиторы дегидрофолатредуктазы.

Еще одним направлением (пока экспериментальным) в терапии пневмоцистоза является применение синтетического сурфактанта в сочетании со стандартной терапией.

Необходимо отметить, что после проведенного лечения и выздоровления полного восстановления сурфактантной системы легких не происходит. Это может явиться причиной колонизации легких другими микроорганизмами. Это показано рядом авторов в том числе и нами в материалах, приведенных ранее. Схемы лечения пневмоцистоза препаратами в Таблице 2.

Таблица 2. Препараты, применяемые при лечении пневмоцистоза.

Препарат	Применение	Курс лечения	Реакция организма на препарат	Принципы воздействия
Пентамидин	4мг/кг разв. в 100мл 5% глюкозы кап в/в 1 раз в сутки	14-21 день	Возможны побочные явления у 5% больных	Повреждает системы <i>репродукции пневмоцист</i>
Бисептол	20 мг/кг – триметоприм и 100 мг/кг сульфаметоксазол в сутки	2 нед.-максим. 1 мес.	Препарат переносится хорошо и предпочтительнее пентамидина	Ингибитор фолиевой кислоты
Дапсон	100 мг. перорально	21 день для нетяжелых форм	Предпочтительнее в сочетании с триметопримом, эффективность 100%	
Альфа-дифторметил орнитин (ДФМО)	6г на м ² поверхности тела в сутки в 3 приема	В течение 8 недель	Хорошо переносится, мало токсичен. Состояние начинает улучшаться в сред. через 4 дня после начала терапии. Через 3-4 нед. у 20-25% больных Р.і. не обнаруживается	Действует на Р.і., блокирует репродукцию ретровируса, ЦМВ, оказывает иммуномоделирующее действие

Список литературы

1. Галстян Г.М., Городецкий В.М., Тихонова Л.Ю. и др. /Клинические проявления, диагностика и течение пневмоцистной пневмонии у больных с заболеваниями системы крови.// Терапевтический архив.1999,№7,С.33-39.
2. Диденко Л.В., А.Ф.Быковский А.Ф., Каражас Н.В. и др. / Обнаружение коронавируса при экспериментальной пневмоцистной инфекции
3. Ермак Т.Н., Литвинова Н.Г., Самитова Э.Р. и др. /Пневмоцистная пневмония в сочетании с туберкулезом как первые клинические проявления на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. //Терапевтический архив .2005. - №11.С.21-23.
4. Ермак Т.Н., Ревкова Т.М., Скворцов П.А. /Клиническая диагностика пневмоцистной пневмонии у больных ВИЧ-инфекцией.//Эпидемиол. и инфекц. бол. 2004. 4.С.52-54.
5. Ермак Т.Н., Самитова Э.Р., Токмалаев А.К. и др./ Пневмоцистная пневмония, туберкулез легких, их сочетание у больных ВИЧ-инфекцией.//Эпидемиология и инфекционные болезни.2008-№3. С. 34-38.
6. Ковалева Е.П., Н.А.Семина, Т.Н.Ермак / Пневмоцистоз – от зооноза к антропонозу//МЗ РФ, РАМН, ВНПОЭМП.- Мат.VIII съезда ВО-ЭМП.- М.,2002.
7. Кунакбаева А.Ф., Зигангирова Н.А., Каражас Н.В. и др. /Выявление ДНК *Pneumocystis carinii* в клиническом материале у детей с респираторной патологией. ЖМЭИ, 2006 №6 С.44-47.
8. Кунакбаева А.Ф., Каражас Н.В., Зигангирова Н.А. и др. /Выявление ДНК *Pneumocystis carinii* в пробах воздуха и смывах с медицинского оборудования в больничных стационарах. ЖМЭИ, 2006 №7 С.100-103.
9. Лавдовская М.В., Коваленко Ф.П., Лысенко А.Я. и др. /Способ моделирования пневмоцистоза .1995. Патент RU(11) 2040042 (13) С1.
10. Лысенко А.Я., Турьянов М.Х., Лавдовская М.В., и др.// ВИЧ- инфекция и СПИД-ассоциируемые заболевания. М.1996

11. Покровский В.И., Малеев В.В., Киселев О.И. Информационный экспресс бюллетень. Коронавирус SARS- возбудитель атипичной пневмонии (временные методич. рекоменд.) СПб, М., 2003.
12. Пневмоцистоз – эпидемиология, клиника, диагностика и лечение. Метод. рекомендации./ Правительство Москвы, комитет здравоохранения. Сост. Каражас Н.В., Малышев Н.А., Смагулов К.З. –М., 1999, - 17 с.
13. Сафонова А.П., Шипулина О.Ю., Шахгильдян В.И. и др. Молекулярная диагностика пневмоцистной пневмонии у ВИЧ инфицированных больных с легочной патологией. //Эпидемиология и инфекционные болезни. 2008-№3. С. 58-60.
14. Юдицкий М.В., Пироцкий Н.Н., Ключникова И.Л. и др. /Особенности клиники туберкулезного процесса у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. В кн.: Сборник материалов Научно-практической конференции «Проблемы туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией» 2005 г.М. С. 119-120.
15. Ascioğlu S., Rex J.H., de Pauw B. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus// Clin.Infect.Dis.2002 .- vol. 34-p.7/
16. Bartlett M.S., Vermund S.H., Jacobs R. et al./ Detection of Pneumocystis carinii DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons //J.Clin.Microbiol.- Oct. 1997.- vol.35.-p.2511-2513.
17. Caliendo A.M., Peter L. Hewitt, Jessica M. Allega, et al. /Performance of a PCR Assay for Pneumocystis carinii from Respiratory Specimens// J.Clin.Microbiol.- Apr.1998.- vol.36.- №4.-p.979-982.
18. Collin B.A., Ramphal R./ Pneumonia in the compromised host including cancer patients and transplantant patients.//Infect. Dis. Clin. North. Am. 1998.-vol.12.- p. 781.
19. Curtis J.Randall, Paul R. Yarnold, David N. Schwartz et al./ Improvements in Outcomes of Acute Respiratory Failure for Patients with Human Immunodeficiency Virus-related Pneumocystis carinii Pneumonia // Am.J.Respir.Crit.Care Med.- Aug. 2000.-vol.162.-№2.- p.393-398.

20. Gigliotti F, Haidaris C.G. /Antigenic characterization of *Pneumocystis carinii*.//
Semin. Respir. Infect. 1998 Dec vol. 4.-№13.-p.313-22.
- 21.Fishman J.A./ Prevention of infection due to *Pneumocystis carinii*
//Antimicrob. Agents. Chemother. 1998, vol.42.- p.995/
- 22.Helweg-Larsen J., Jensen J.S., Benfield T., et al. / Diagnostic use of PCR
for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples.
//J.Clin.Microbiol. 1998, vol.36, 2068-2072/
- 23.Hughes Walter T./ *Pneumocystis carinii* vs. *Pneumocystis jiroveci*:
Another Misnomer //Emerg. Infect. Dis. – Feb.2003.-vol.9.-№2.-p.276-277.
- 24.Jensen T.K., Boye M., Bille-Hansen V. /Application of Fluorescent In
Situ Hybridization for Specific Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumo-
nia in Foals and Pigs.// Vet Pathol. 2001.vol. 38.- 269-274.
- 25.Koziel H., Phelps D.S., Fishman J.A., et al./ Surfactant protein-A reduc-
es binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by human alveolar
macrophages in vitro//Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998, vol.18.-p.834-
843.
- 26.Ledergerberg B., Mocroft A., Reiss P., et al. /Discontinuation of second-
ary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with
HIV infections who have a response to antiretroviral therapy.// N. Engl. J.
Med. 2001; 344. pp.168-174.
- 27.Merali S., Frevert U., Williams J.H., et al./ Continuous axenic cultiva-
tion of *Pneumocystis carinii*. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 96, pp.
2402-2407, March 1999. Microbiology.
- 28.Nevéz G., Raccurt C., Jounieaux V., et al. / *Pneumocystosis* versus pul-
monary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-
positive patients. //AIDS.1999. Mar. 13 (4) pp.535-6.
- 29.Vargalis S.L., Carolina A.Ponce, Francis Gigliotti , et al./ Transmission
of *Pneumocystis carinii* DNA from a Patient with *P. carinii* Pneumonia to
Immunocompetent Contact Health Care Workers// J.Clin.Microbiol. –
Apr.2000.-vol.38. №4.- p.1536-1538.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набора реагентов для проведения непрямой реакции
флюоресценции для выявления специфических антигенов
*Pneumocystis carinii***

«ПневмоцистоФлюоАГдиагностика»

Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/06120

Пневмоцистоз – заболевание, вызываемое *Pneumocystis carinii*. Клинические проявления характеризуются тяжелыми интерстициальными пневмониями, нередко со смертельным исходом. Пневмоцистоз чаще поражает ослабленных детей, стариков и лиц молодого возраста со сниженным иммунитетом, ВИЧ-инфицированных, больных СПИ-Дом, онкологических и гематологических больных. На распространение этой инфекции влияет экологическая обстановка, высокий радиационный фон и неполноценное питание с низким содержанием белка.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления всех форм пневмоцист в материалах от больных бронхо-легочными заболеваниями с подозрением на пневмоцистоз.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Состав набора

- | | |
|--|----------|
| 7. Компонент №1. 18-ти луночные стекла с нанесенным на 5 и 6 лунки второго и третьего рядов антигеном <i>P. carinii</i> | 6 стекол |
| 8. Флакон № 2. Контрольная сыворотка, положительная (K^+) содержащая антитела к <i>P. carinii</i> , инактивированная, человеческая, лиофильно высушенная | 6 фл. |
| 9. Флакон № 3. Контрольная сыворотка, отрицательная (K^-), не содержащая антитела к <i>P. carinii</i> , инактивированная, человеческая, лиофильно высушенная | 1 фл. |
| 10. Флакон № 4. Иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие против иммуноглобулинов человека, сухие | 1 фл. |
| 11. Флакон № 5. Альбумин бычий, меченный родамином, сухой (БСА-Р) | 1 фл. |
| 12. Инструкция по применению | 1 шт. |

2.2. Принцип метода

Набор для выявления антигена *P.carinii* основан на непрямом иммунофлюоресцентном методе с использованием целых, инактивированных формалином клеток *P. carinii*, высокоспецифических сывороток человека и иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека.

Анализ состоит из следующих этапов:

I. Исследуемые образцы биологического материала человека помещают в пустые лунки 18-ти луночного предметного стекла. В 5-х и 6-х лунках второго и третьего рядов адсорбирован антиген *P.carinii* для контроля. Во все лунки вносят положительную сыворотку (K^+), кроме 5 и 6 лунок третьего ряда, в них вносят отрицательную сыворотку (K^-).

II. Остатки непрореагировавших положительной и отрицательной сыворотки удаляют отмывкой, и в лунку наносят смесь иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека, и альбумина, меченного родамином, которые взаимодействуют с антителами.

III. Лунки отмывают, подсушивают и исследуют под люминисцентным микроскопом.

IV. В исследуемых материалах, содержащих антиген *P.carinii*, наблюдается желто-зеленое свечение.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора, определенная на стандартной панели предприятия (СПП СПП, рег.№ 15.001-01) составляет 100 %.

3.2. Специфичность набора, определенная на стандартной панели предприятия (СПП СПП, рег.№ 15.001-01) составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми образцами биологических материалов и контрольными образцами положительной и отрицательной сыворотки следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения НРИФ необходимы:

- холодильник бытовой,
- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С,
- центрифуга со скоростью вращения ротора 3000-5000 об/мин,
- люминесцентный микроскоп,
- автоматические пипетки, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, с погрешностью измерения объемов не более 5%.
- одноразовые наконечники автоматическим пипеткам,
- физиологический раствор,
- ацетон.

6. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Забор материала (лаважа, мокроты и др.) производится в стерильные флаконы, объемом 15 мл. Мокроту собирать несколько раз (3-4) в течение 12 ч, сохраняя флакон при температуре от 2 до 8 °С.

2. Свежие образцы могут храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение одних суток.

3. Допускается хранение материала при температуре минус 20 °С и ниже в течение 3-х месяцев.

4. В работе должны использоваться автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Перед проведением анализа компоненты набора выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин. Стекла, хранившиеся при температуре минус 20°C, разморозить и просушить при комнатной температуре в течение 10 минут.

7.1. Приготовление раствора №1.

Содержимое флаконов №2 (K⁺) растворить в 100 мкл физиологического раствора.

Хранение: 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.2. Приготовление раствора №2.

Содержимое флакона №3 (K⁻) растворить в 100 мкл физиологического раствора.

Хранение: 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.3. Приготовление раствора №3.

Содержимое флакона №4 (Иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие против иммуноглобулинов человека) растворить в 0,2 мл физиологического раствора, получая исходное разведение.

Хранение: в течение 3-х недель при температуре от 2 до 8 °С.

7.4. Приготовление раствор № 4.

Содержимое флакона №5 (альбумин, меченный родамином) растворить в 0,2 мл физиологического раствора, получая исходное разведение.

Хранение: в течение 3-х недель при температуре от 2 до 8 °С.

7.5. Приготовление раствора люминесцентной сыворотки № 5.

Из исходных разведений иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека (Раствор 3) и альбумина, меченного родамином (Раствор 4) приготовить смесь рабочих разведений согласно указаниям на этикетках флаконов. Порядок приготовления раствора приведен ниже в таблице 1.

Таблица 1. Приготовления смеси растворов иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека и БСА-Р

Наименование компонента	Рабочее разведение препарата, указанное на флаконе	Количество препарата (мкл)	Количество физиологического раствора (мкл)
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:8 1:16	20 10	130
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:8 1:32	20 5	135
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:8 1:64	20 2,5	137,5
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:16 1:16	10 10	140
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:16 1:32	10 5	145
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:16 1:64	10 2,5	147,5
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:32 1:16	5 10	145
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:32 1:32	5 5	150
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:32 1:64	5 2,5	152,5

^{*)}160 мкл смеси необходимо для обработки одного стекла

Приготовленные растворы стабильны в течение 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.6. Подготовка влажной камеры

В чашку Петри положить круг фильтровальной бумаги, смоченной водопроводной водой.

8. ПРОВЕДЕНИЕ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ (НРИФ)

8.1. Осадок биологического материала после центрифугирования наносится в пустые лунки (одну или две) по 5 мкл.

8.2. Препарат фиксировать холодным ацетоном в течение 30 мин (после высыхания образца).

8.3. Во все лунки с исследуемым материалом, а также в две средние лунки 5-го и 6-го ряда с положительным контролем антигена (с адсорбированными пневмоцистами) внести по 5 мкл раствора № 1, содержащего положительную сыворотку (K^+).

8.4. В последние лунки 5-го и 6-го рядов с положительным контролем антигена (с адсорбированными пневмоцистами) внести по 5 мкл раствора № 2, содержащего отрицательную сыворотку (K^-).

8.5. Инкубировать стекла 30 мин при 37 °С во влажной камере.

8.6. Отмыть стекла 1 раз водопроводной водой в течение 2 мин и 2 раза физиологическим раствором в течение 5 мин, поместив их в емкость с растворами; высушить стекла на воздухе при комнатной температуре в течение 10 мин.

8.7. Внести в каждую лунку по 5 мкл раствора № 5, содержащего смесь иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека и альбумина, меченого родамином.

8.8. Инкубировать стекла 30 мин при 37 °С во влажной камере.

8.9. Отмыть два раза по 5 мин физиологическим раствором (рН 7,2-7,4), поместив стекла в емкость с раствором и один раз дистиллированной водой; высушить на воздухе при комнатной температуре в течение 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результат реакции непрямой иммунофлюоресценции учитывается с помощью люминесцентного микроскопа (объектив х40, окуляр х6,3), используя водную иммерсию. Порядок расположения фильтров в микроскопе (от лампы): БС 8-3, СЗС-24-4, ФС 1-1 и запирающий свет ЖС-18+19 №1.

9.2. В положительных контрольных образцах (K^+) должна наблюдаться яркая флюоресценция желто-зелёного цвета на 3-4 креста в клетках овальной или круглой формы величиной от 2 μ (трофозоиты) до 5-10 μ (прецисты и цисты). В контроле с отрицательными контрольными образцами (K^-) свечение должно отсутствовать или быть не более чем на один крест.

10. ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов «ПневмоцистоФлюоАГдиагностика» выпускается в виде упакованного в картонную пачку набора. Стекла упакованы в полиэтиленовый пакет с замком. Один набор рассчитан на проведение 84 анализов.

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Допускается транспортирование всеми видами транспорта при температуре до 25°C не более 3 суток. Не допускать замораживания.

Хранить при температуре от 2 до 8°C.

Стекла с нанесенным на них антигеном хранить отдельно при температуре минус 20°C.

Срок годности 1 год.

Рекламации на качество Набора просьба направлять в Государственное учреждение НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН (филиал "Медгамал" ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН).

Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

Тел., факс: (499) 193-30-50, (499) 190-43-89

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для НРИФ «ПневмоцистоФлюоАТдиагностика»
для диагностики пневмоцистоза**

Пневмоцистоз – заболевание, вызываемое *Pneumocystis carinii*. Клинические проявления характеризуются тяжелыми интерстициальными пневмониями, нередко со смертельным исходом. Пневмоцистоз чаще поражает ослабленных детей, стариков и лиц молодого возраста со сниженным иммунитетом, ВИЧ - инфицированных, больных СПИДом, онкологических и гематологических больных. На распространение этой инфекции влияет экологическая обстановка в регионе, высокий радиационный фон и неполноценное питание с низким содержанием белка.

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор предназначен для выявления антител классов IgM и IgG к антигену *P. carinii* в сыворотках крови больных с бронхолегочной патологией с подозрением на пневмоцистоз и лиц с иммунодефицитными состояниями.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Состав набора

1. 18-ти луночные стекла с нанесенным на все антигеном <i>P. carinii</i> (целые клетки пневмоцист инактивированные)	- 6 стекол
2. Контрольная сыворотка, положительная (K1+), содержащая IgM антитела к <i>P. carinii</i> , инактивированная, человеческая, лиофилизированная, - по 0,1 мл	- 1 фл
3. Контрольная сыворотка, положительная (K2+), содержащая антитела IgG к <i>P. carinii</i> , инактивированная, человеческая, лиофилизированная, - по 0,1 мл	- 1 фл.
4. Контрольная сыворотка, отрицательная (K-), не содержащая антитела к <i>P. carinii</i> , инактивированная, человеческа, лиофилизированная, - 0,1 мл	- 1 фл.

5. Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие против иммуноглобулинов человека (АТ.- IgM ФИТЦ) - 0,2 мл	- 1 фл.
6. Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие против иммуноглобулинов человека (АТ.- Ig G ФИТЦ) - 0,2 мл	- 1 фл.
7. Альбумин бычий, меченный родамином, сухой (БСА-Р) -0,2 мл	- 1 фл.
8. Инструкция	- 1 шт.

2.2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор для выявления антител IgM и IgG к IgM и IgG антигену *P. carinii* основан на непрямом иммунофлуоресцентном методе с использованием в качестве антигена целых, инактивированных формалином клеток *P. carinii*, высокоспецифических сывороток (К+ и К-) и анти-человеческих сывороток, меченных ФИТЦ.

Анализ состоит из следующих этапов:

I. Исследуемые пробы сывороток помещают во все лунки предметного стекла, кроме контрольных. В контрольные лунки с антигеном вносят контрольные сыворотки (К+) и (К-). Антиген, находящийся в (К+) и в исследуемом материале, соединяется со специфическими антителами к *P. carinii*

II. Сыворотку удаляют отмывкой и в лунки наносят смесь иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих против иммуноглобулинов человека и альбумина, меченного родамином, которые взаимодействуют с антителами.

III. Лунки отмывают, подсушивают и исследуют под люминисцентным микроскопом ЛЮМАМ РПО-11 ув x 400, водная иммерсия.

В исследуемых сыворотках, содержащих антитела к *P. carinii* и в (К+), наблюдается желто-зеленое свечение на 3-4 креста, в (К-) - свечение отсутствует или не более чем на один крест.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Достоверность полученных результатов зависит от выполнения следующих правил:

- Ацетон, используемый для фиксации образцов должен быть охлажденным.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Используйте стеклянную посуду, вымытую и тщательно ополоснутую дистиллированной водой.
- Разводите реагенты, не допуская любого загрязнения.
- Не допускайте высыхания сыворотки в лунках во время инкубации во влажной камере.
- Используйте для внесения каждой пробы чистый наконечник.
- Пипетки и другое оборудование должны проверяться на точность и правильность работы.
- Если допущена ошибка при внесении анализируемого образца, нельзя удалив его, вносить в ту же лунку другой образец; такая лунка блокируется.

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены:

- а) получением неправильного рабочего разведения исследуемых сывороток;
- б) контаминацией отрицательных сывороток на рабочем стекле или во вспомогательном планшете положительными сыворотками из соседних лунок.

Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток необходимо:

- а) при отборе 10 мкл сыворотки для предварительного разведения **не погружать** наконечник глубоко в сыворотку, чтобы исключить налипание сыворотки на внешнюю поверхность наконечника.
- б) тщательно перемешивать сыворотку при предварительном разведении 1:10.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения НРИФ необходимы: холодильник, термостат, центрифуга 10 000 об/мин., люминесцентный микроскоп, автоматические пипетки и одноразовые наконечники к ним.

5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Забор крови производится согласно общепринятой процедуре из вены с соответствующими предосторожностями.
- Свежие образцы могут храниться при +2-8°C в течение одной недели. Образцы могут быть заморожены и оттаяны только один раз, так как повторение этой процедуры может привести к искажению результатов. После размораживания сыворотку следует тщательно размешать.
- Длительное хранение сывороток должно быть в замороженном виде при - 20°C или ниже.
- Образцы, содержащие осадок, перед анализом должны быть осветлены центрифугированием при 5-10 тыс. об/мин.
- Не использовать образцы с гемолизом, гиперлипидемией.
- В работе должны использоваться автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Раствор 1.

Содержимое флаконов №1 (K+ IgM)IgG) разводят в 100 мкл физиологического раствора.

Хранение: 1 сутки при 4°C.

Раствор 2.

Содержимое флаконов №2 (K2+) разводят в 100 мкл физиологического раствора

Хранение: 1 сутки при 4°C.

Раствор 3.

Содержимое флакона №3 (K-) разводят в 100 мкл физиологического раствора.

Хранение: 1 сутки при 4°C.

Раствор 4.

Содержимое флакона №4 (иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие против иммуноглобулинов человека (АТ - IgM ФИТЦ)IgM IgG) разводят в 0,2 мл физиологического раствора, получая исходное разведение, которое хранится при 4°C в течение 3-х недель при 4°C. Далее из исходного разведения готовят рабочее согласно указанию на этикетке флакона.

Хранение: 1 сутки при 4°C.

Раствор 5.

Содержимое флакона №5 (иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие против иммуноглобулинов человека (АТ - Ig G ФИТЦ)IgM IgG) разводят в 0,2 мл физиологического раствора, получая исходное разведение, которое хранится при 4°C в течение 3-х недель при 4°C. Далее из исходного разведения готовят рабочее согласно указанию на этикетке флакона.

Хранение: 1 сутки при 4°C.

Раствор 6.

Содержимое флакона №6 (альбумин бычий, меченный родамином) разводят в 0,2 мл физиологического раствора, получая исходное разведение, которое хранится в течение 3 недель при 4°C . Далее из исходного разведения готовят рабочее согласно указанию на этикетке флакона.

Хранение: 1 сутки при 4°C

7. ПРОВЕДЕНИЕ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ (НРИФ)

1. Исследуемые сыворотки титруют двукратно, начиная с разведения 1:20 и до 1:160, наносят по 5 мкл каждого разведения на все лунки с 1 по четвертый ряд. 5 ряд – (К+), 6 ряд – (К-)
2. Контрольные сыворотки вносят по 5 мкл (К+) в 5 –ый ряд, а (К-) - в 6 ряд.
3. Инкубация 30 мин при 37°C во влажной камере (не допускать высыхания!)

4. Отмывка три раза физиологическим раствором по 5 минут.
5. Стекла подсушить на воздухе.
6. Нанести смесь (анти-человеческой кроличьей сыворотки, меченой ФИТЦ и альбумина, меченного родамином) по 5 мкл в каждую лунку. Приготовление смеси ниже в таблице.
7. Контакт 30 мин. при 37°C во влажной камере
8. Отмывка три раза по 5 мин. физиологическим раствором и в последний раз дистиллированной водой.

Диагностический титр антител 1:20.

8.УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят по четырех крестовой системе:

- 4 креста – сверкающая флюоресценция желтовато-зеленого цвета.
- 3 креста – яркая флюоресценция желтовато-зеленого цвета.
- 2 креста и 1 крест – слабое свечение всей клетки.

Иммуноглобулины в разведении 1:20 не должны образовывать с гетерологичными антигенами комплекс, светящийся на 3-4 креста.

9.ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов «ПневмоцистоФлюоАТдиагностика» выпускается в виде упакованного в картонную бандероль набора. Один набор рассчитан на проведение 108 исследований, включая контрольные образцы.

10.УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТПРОВКИ

Хранить при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование всеми видами транспорта при температуре не выше 25°C не более 3 суток. Не допускать замораживания.

Срок годности: 1 год

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Таблица.

Рабочее разведение препарата, указанное на флаконе	Количество препарата (мкл)	Количество фи- зиологического раствора (мкл)	Общий объ- ем (мкл)
Люм.сыв-ка 1:16 Родамин 1:16	10 10	140	160
Люм.сыв-ка 1:16 Родамин 1:32	10 5	145	160
Люм.сыв-ка 1:16 Родамин 1:64	10 2,5	147,5	160
Люм.сыв-ка 1:32 Родамин 1:16	5 10	145	160
Люм.сыв-ка 1:32 Родамин 1:32	5 5	150	160
Люм.сыв-ка 1:32 Родамин 1:64	5 2,5	152,5	160

160 мкл препарата необходимо для обработки одного стекла.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М и G к *Pneumocystis carinii*

«ПневмоцистоСтрип»

Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/06119

Пневмоцистоз – заболевание, вызываемое *P. carinii*. Клинические проявления характеризуются тяжелыми интерстициальными пневмониями, нередко со смертельным исходом. Пневмоцистоз чаще поражает ослабленных детей, стариков и лиц молодого возраста со сниженным иммунным статусом. На распространение этой инфекции влияет экологическая обстановка в регионе, высокий радиационный фон и неполноценное питание с низким содержанием белка.

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор реагентов предназначен для выявления антител классов IgM и IgG к антигену *P. carinii* в сыворотке крови больных людей с подозрением на пневмоцистоз и у здоровых при проведении эпидемиологических исследований.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор для выявления антител классов IgM и IgG к антигену *P. carinii* основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа с использованием пероксидазы хрена в качестве маркерного фермента.

Анализ состоит из следующих этапов:

- II. Анализируемый образец сыворотки крови человека добавить в лунку планшета с адсорбированными на ее поверхности антигенами *P. carinii*. Если в образце сыворотки крови содержатся IgM или IgG антитела, они соединяются с этими антигенами.

- III. Остатки образца сыворотки крови удалить отмывкой. Затем в лунку добавить конъюгаты моноклональных антител против IgM или IgG человека, меченные пероксидазой, которые взаимодействуют с иммобилизованными в лунках IgM или IgG антителами к антигену *P.carinii*.
- IV. Лунки промыть и добавить хромоген – тетраметилбензидин (ТМБ). Далее, во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в голубой цвет в лунках планшета. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна содержанию антител к антигену *P.carinii* в исследуемых образцах сыворотки крови человека. После остановки реакции кислотой голубая окраска меняется на желтую.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- Компонент №1: Планшет полистироловый с адсорбированным антигеном *P.carinii* (разборный, 12 x 8) 2 шт.
- Флакон № 2: Моноклональные антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата 1) – 0,1 мл 1 фл.
- Флакон № 3: Моноклональные антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата 2) – 0,1 мл 1 фл.
- Флакон № 4: Положительный контрольный образец ($K1^+$), инактивированный, содержащий антитела класса IgM к *P.carinii*, лиофильно высушенный – 4 фл.
- Флакон № 5: Положительный контрольный образец ($K2^+$), инактивированный, содержащий антитела класса IgG к *P.carinii*, лиофильно высушенный – 4 фл.
- Флакон № 6: Отрицательный контрольный образец (K^-), инактивированный, не содержащий антитела к *P.carinii*, лиофильно высушенный – 2 фл.
- Флакон № 7: Фосфатно-солевой буфер с Твином 20 (ФСБ-Т), концентрат – 12,5 мл 2 фл.
- Флакон № 8: Субстратный буферный раствор для разведения хромогена (СБ) – 10 мл 2 фл.

- Флакон № 9: Хромоген (ТМБ) – 1,4 мл 1 пр.
- Флакон № 10: Бычий сывороточный альбумин (БСА) - 100 м 2 фл.
- Флакон № 11: Стоп-реагент (0,5 М серная кислота) 1 фл.
- Инструкция по применению 1 шт.
- Полулогарифмическая бумага для построения калибровочного графика 1 шт

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора, определенная на стандартной панели предприятия (СПП, рег.№ 15.001-01) составляет 100 %.

3.2. Специфичность набора, определенная на стандартной панели предприятия (СПП, рег. № 15.001-01 составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- холодильник, обеспечивающий температуру от 2 до 8 °С;
- термостат, обеспечивающий температуру (37 ± 1) °С;
- центрифуга, обеспечивающая скорость вращения ротора от 3 000 до 5000 об/мин;
- автоматические пипетки одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости 50-1000 мкл, с погрешностью измерения объемов не более 5%;

- автоматическая пипетка многоканальная, позволяющая отбирать объёмы жидкости 50-300 мкл, с погрешностью измерения объемов не более 5%;
- одноразовые наконечники для пипеток, кюветы,
- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620-650 нм, или при длине волны 450 нм;
- вода дистиллированная;
- цилиндр мерный.

6. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Забор крови из вены производится согласно общепринятой процедуре с соответствующими предосторожностями.

Свежие образцы сыворотки крови могут храниться при температуре от 2 до 8°C в течение одной недели. Образцы могут быть заморожены и оттаяны только один раз, так как повторение этой процедуры может привести к искажению результатов. После размораживания образцы сыворотки крови следует тщательно размешать. Длительное хранение образцов необходимо осуществлять при температуре минус 20 °C или ниже.

Образцы сыворотки крови, содержащие осадок, перед анализом должны быть осветлены центрифугированием при 3-5 тыс. об/мин в течение 15 мин.

Не использовать образцы с гемолизом, гиперлипидемией.

В работе должны использоваться автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Перед проведением анализа компоненты набора выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин.

7.1. Приготовление раствора 1.

Содержимое флакона № 7 растворить в 250 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

Раствор 1 применяется:

- а) для промывки лунок планшетов,
- б) для разведения исследуемых образцов сыворотки крови человека.

Хранение: до 1 недели при температуре от 2 до 8 °С.

7.2. Приготовление раствора 2.

К содержимому флакона № 8, содержащему 10 мл СБ для разведения хромогена, добавить 0,7 мл ТМБ из флакона № 9.

Раствор 2 готовится непосредственно перед использованием.

При приготовлении раствора ТМБ рекомендуется использовать флакон из темного стекла.

7.3. Приготовление раствора 3 для разведения конъюгата.

Содержимое флаконов № 10 растворить в 10 мл раствора 1.

7.4. Приготовление контрольных и анализируемых образцов.

7.4.1. Положительные контрольные образцы ($K1^+$ и $K2^+$) развести в 160 мкл раствора 1, а отрицательный - в 320 мкл.

7.4.2. Анализируемые образцы сыворотки крови человека для определения титра антител класса IgG развести в соотношении 1: 100, 1: 1000 и 1:10000 раствором 1, для определения антител класса IgM – в соотношении 1: 200, 1: 2000 и 1:20000.

7.5. Приготовление рабочих растворов конъюгатов.

7.5.1. К 10 мл раствора 3 добавить 100 мкл концентрата конъюгата антител к IgM из флакона №2.

7.5.2. К 10 мл раствора 3 добавить 100 мкл концентрата конъюгата антител к IgG из флакона №3.

Рабочие растворы конъюгатов использовать в течение 1 ч после приготовления.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Для выявления иммуноглобулинов класса М и G к Pneumocystis carinii в образцах сыворотки крови человека анализ можно проводить на разных планшетах (например: планшет № 1 – для выявления антител класса IgM, планшет № 2 – IgG), либо на 1 планшете при исследовании ограниченного количества образцов.

8.1. Внести в лунки А1-А3 по 50 мкл положительного контрольного образца, а в лунки В1-В3 по 50 мкл отрицательного контрольного образца (см. схему постановки ИФА).

8.2. Внести в оставшиеся лунки с антигеном P.carinii по 50 мкл каждого разведения анализируемого образца (см схему постановки ИФА).

8.3. Планшет поместить в полиэтиленовый пакет и инкубировать 18 ч при комнатной температуре или 2 ч при 37°С.

8.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть планшет 5 раз промывочным раствором (раствор 1, см п.7.1.), добавляя в каждую лунку 300 мкл. Рекомендуется оставлять раствор в лунках планшета после каждого цикла на 1 мин.

Примечание 1:

1.Промывку при помощи автоматического вошера следует проводить в режиме с 5-ью циклами промывки и внесением в лунки по 350 мкл промывочного раствора.

2. Если остаточный объем в лунке превышает 10 мкл, удалить влагу из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге.

8.5. Внести в лунки планшета по 50 мкл рабочих растворов конъюгатов (см схему 1). Вложить планшет в пакет и инкубировать 2 ч при 37°С.

8.6. По окончании инкубации промыть лунки как описано в п. 8.4.

8.7. Внести во все лунки по 50 мкл раствора 2, планшет закрыть крышкой и инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 10-30 мин. Внимательно следить за развитием окраски.

8.8. Реакцию остановить добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента из флакона № 11.

Примечание 2:

При использовании стрипов см. Таблицу расхода реагентов.

Таблица расхода реагентов

Количество одновременно, используемых стрипов	Конъюгат (мкл)	Раствор для разведения конъюгата (мл)	ТМБ (мкл)	СБ (мл)
3	20	2	140	2
6	40	4	280	4
9	60	6	420	6
12	80	8	560	8

Схема постановки ИФА (планшет № 1, выявление иммуноглобулинов класса М)*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1 ⁺	K1 ⁺	K1 ⁺	C7 1:200	C7 1:2000	C7 1:20000	C15 1:200	C15 1:2000	C15 1:20000	C23 1:200	C23 1:2000	C23 1:20000
B	K ⁻	K ⁻	K ⁻	C8 1:200	C8 1:2000	C8 1:20000	C16 1:200	C16 1:2000	C16 1:20000	C24 1:200	C24 1:2000	C24 1:20000
C	C1 1:200	C1 1:2000	C1 1:20000	C9 1:200	C9 1:2000	C9 1:20000	C17 1:200	C17 1:2000	C17 1:20000	C25 1:200	C25 1:2000	C25 1:20000
D	C2 1:200	C2 1:2000	C2 1:20000	C10 1:200	C10 1:2000	C10 1:20000	C18 1:200	C18 1:2000	C18 1:20000	C26 1:200	C26 1:2000	C26 1:20000
E	C3 1:200	C3 1:2000	C3 1:20000	C11 1:200	C11 1:2000	C11 1:20000	C19 1:200	C19 1:2000	C19 1:20000	C27 1:200	C27 1:2000	C27 1:20000
F	C4 1:200	C4 1:2000	C4 1:20000	C12 1:200	C12 1:2000	C12 1:20000	C20 1:200	C20 1:2000	C20 1:20000	C28 1:200	C28 1:2000	C28 1:20000
G	C5 1:200	C5 1:2000	C5 1:20000	C13 1:200	C13 1:2000	C13 1:20000	C21 1:200	C21 1:2000	C21 1:20000	C29 1:200	C29 1:2000	C29 1:20000
H	C6 1:200	C6 1:2000	C6 1:20000	C14 1:200	C14 1:2000	C14 1:20000	C22 1:200	C22 1:2000	C22 1:20000	C30 1:200	C30 1:2000	C30 1:20000

*) С - анализируемые образцы

Схема постановки ИФА (планшет № 2, выявление иммуноглобулинов класса G)*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K2 ⁺	K2 ⁺	K2 ⁺	C7 1:100	C7 1:1000	C7 1:10000	C15 1:100	C15 1:1000	C15 1:10000	C23 1:100	C23 1:1000	C23 1:10000
B	K ⁻	K ⁻	K ⁻	C8 1:100	C8 1:1000	C8 1:10000	C16 1:100	C16 1:1000	C16 1:10000	C24 1:100	C24 1:1000	C24 1:10000
C	C1 1:100	C1 1:1000	C1 1:10000	C9 1:100	C9 1:1000	C9 1:10000	C17 1:100	C17 1:1000	C17 1:10000	C25 1:100	C25 1:1000	C25 1:10000
D	C2 1:100	C2 1:1000	C2 1:10000	C10 1:100	C10 1:1000	C10 1:10000	C18 1:100	C18 1:1000	C18 1:10000	C26 1:100	C26 1:1000	C26 1:10000
E	C3 1:100	C3 1:1000	C3 1:10000	C11 1:100	C11 1:1000	C11 1:10000	C19 1:100	C19 1:1000	C19 1:10000	C27 1:100	C27 1:1000	C27 1:10000
F	C4 1:100	C4 1:1000	C4 1:10000	C12 1:100	C12 1:1000	C12 1:10000	C20 1:100	C20 1:1000	C20 1:10000	C28 1:100	C28 1:1000	C28 1:10000
G	C5 1:100	C5 1:1000	C5 1:10000	C13 1:100	C13 1:1000	C13 1:10000	C21 1:100	C21 1:1000	C21 1:10000	C29 1:100	C29 1:1000	C29 1:10000
H	C6 1:100	C6 1:1000	C6 1:10000	C14 1:100	C14 1:1000	C14 1:10000	C22 1:100	C22 1:1000	C22 1:10000	C30 1:100	C30 1:1000	C30 1:10000

*) C - анализируемые образцы

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Результаты иммуноферментного анализа регистрировать с помощью спектрофотометра с вертикальным ходом луча, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допустима регистрация результатов ИФА только с фильтром 450 нм.

9.2. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

1. среднее значение оптической плотности в лунках с K1⁺ и K2⁺ должно быть не менее 0,8 опт.ед.;

2. среднее значение оптической плотности в лунках с K⁻ должно быть не более 0,15 опт.ед при двухволновом режиме измерения и 0,25 опт.ед при измерении на одной длине волны.

9.3. Образец сыворотки крови человека считается положительным, когда

$$ОП_c \geq ОП_{крит},$$

где:

ОП_с – оптическая плотность анализируемого образца сыворотки крови человека;

ОП_{крит} - критическая оптическая плотность, которую рассчитывают по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = 0,5 (\text{ОП}_{\text{К}^+} + \text{ОП}_{\text{К}^-}),$$

где:

ОП_{К⁺} - среднее значение оптической плотности соответствующего положительного контрольного образца (К1⁺ или К2⁺);

ОП_{К⁻} - среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца (К⁻).

9.4. Для полуколичественной оценки результатов титрования исследуемых образцов сыворотки крови человека предлагается следующий метод:

Исходя из величин экстинкции конечных растворов в лунках с разведениями образца сыворотки крови вычисляется процент связывания антигена, адсорбированного на планшете с антителами исследуемого образца.

Так, например, при определении антител класса IgM анализируются образцы сыворотки крови человека в разведениях 1:200, 1:2000 и 1:20000 и расчет титра антител проводится по следующим формулам:

$$S_{200} = \frac{\text{ОП}_{\text{С } 200} - \text{ОП}_{\text{К}^-}}{\text{ОП}_{\text{К}^+} - \text{ОП}_{\text{К}^-}} * 100 \%$$

$$S_{2000} = \frac{\text{ОП}_{\text{С } 2000} - \text{ОП}_{\text{К}^-}}{\text{ОП}_{\text{К}^+} - \text{ОП}_{\text{К}^-}} * 100 \%,$$

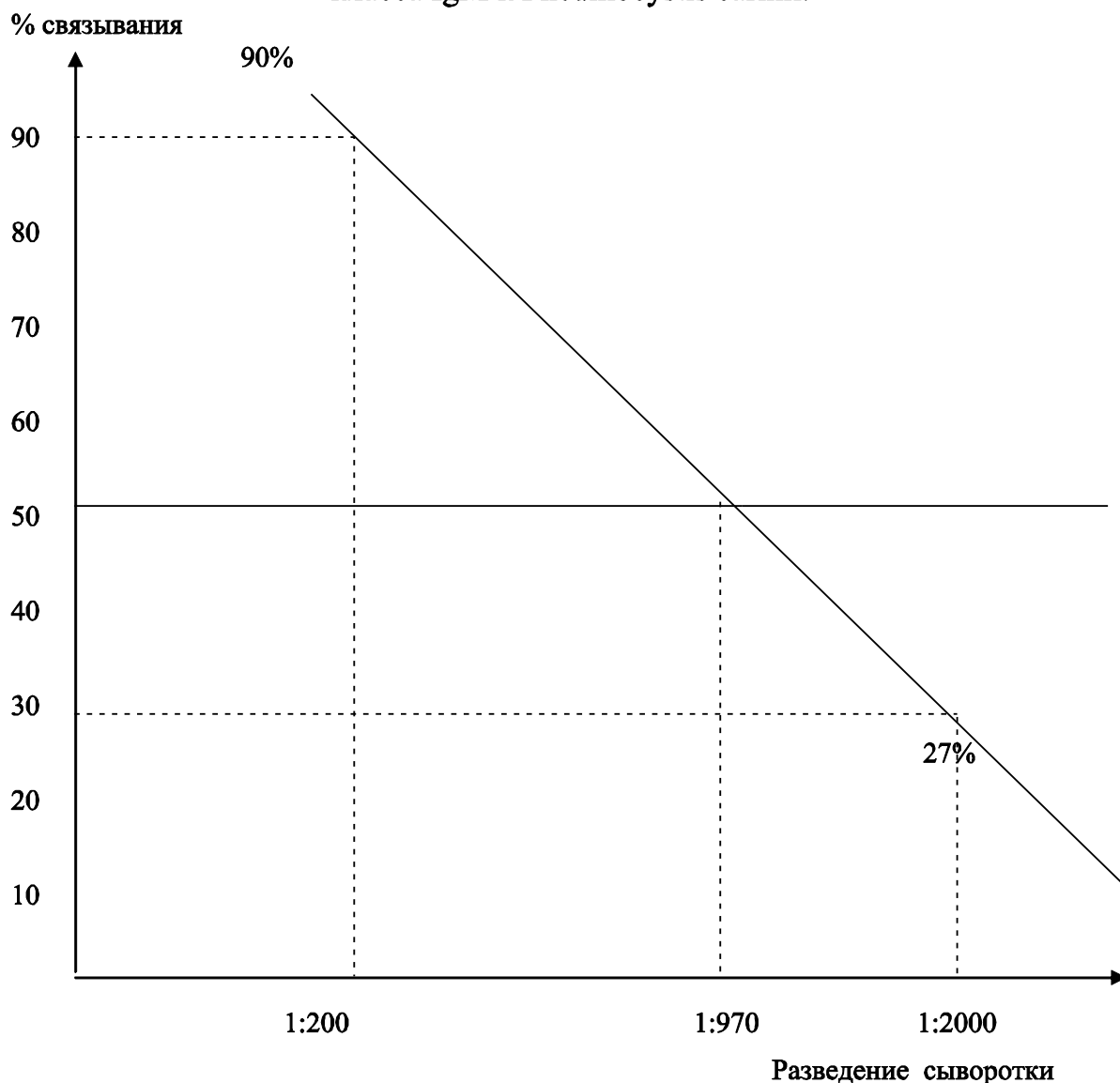
$$S_{20000} = \frac{\text{ОП}_{\text{С } 20000} - \text{ОП}_{\text{К}^-}}{\text{ОП}_{\text{К}^+} - \text{ОП}_{\text{К}^-}} * 100 \%,$$

где:

S₂₀₀; S₂₀₀₀; S₂₀₀₀₀ - процент связывания антигена, адсорбированного на планшете с антителами класса IgM, содержащимися в исследуемом образце сыворотки крови человека в соответствующих разведениях.

Титром антител к *P.carinii* считают такое разведение образца сыворотки крови, в котором она обеспечивает 50% связывание с антигеном. Величину такого разведения рассчитывают методом графической интерполяции в полулогарифмической системе координат, где по оси абсцисс (в логарифмическом масштабе) отложены величины разведений исследуемого образца : 1:200; 1:2000; 1:20000, а по оси ординат (в линейном масштабе) – процент связывания антигена с антителами (рис.1). Для построения калибровочного графика вначале наносят точки, соответствующие процентам связывания для каждого из разведений (например: 1:200 и 1:2000). Затем, соединяют эти точки прямой и находят точку пересечения этой прямой с горизонтальной линией, проходящей через 50% на оси ординат.

Рис. 1. Типичный калибровочный график для определения титра антител класса IgM к *Pneumocystis carinii*.



Пример: $S_{200}=90\%$, $S_{2000}=27\%$ Титр исследуемой сыворотки = 1:970

Примечание 3: расчет титра антител класса IgG проводят по тому же принципу – откладывая по оси абсцисс lg величины разведений исследуемого образца сыворотки крови: 1:100; 1:1000; 1:10000, а по оси ординат (в линейном масштабе) – процент связывания антигена с антителами.

Расчет титра антител класса IgG проводится по следующим формулам:

$$S_{100} = \frac{ОП_{С 100} - ОП_{К^-}}{ОП_{К^+} - ОП_{К^-}} * 100 \%$$

$$S_{1000} = \frac{ОП_{С 1000} - ОП_{К^-}}{ОП_{К^+} - ОП_{К^-}} * 100 \%,$$

$$S_{10000} = \frac{ОП_{С 10000} - ОП_{К^-}}{ОП_{К^+} - ОП_{К^-}} * 100 \%,$$

где:

S_{100} ; S_{1000} ; S_{10000} – процент связывания антигена, адсорбированного на планшете, с антителами класса IgG, содержащимися в анализируемом образце сыворотки крови человека, в соответствующем разведении.

10. ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов «ПневмоцистоСтрип» выпускается упакованным в картонную коробку. Один набор рассчитан на проведение анализов 30 образцов сыворотки крови человека на два показателя (IgM и IgG).

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Транспортирование в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С, в условиях исключающих замораживание. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 3-х суток.

Хранение в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Срок годности: 1 год.

Рекламации на качество Набора реагентов просьба направлять в Государственное учреждение ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН (филиал "Медгамал" ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН). Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18. Тел., факс: (499) 193-30-50, (499) 190-43-89.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
I. Современные представления о пневмоцистной инфекции	
1. История вопроса	4
2. Этиология и патогенез	5
3. Эпидемиология	9
3.1. Пневмоцистоз у лиц с иммунодефицитными состояниями различной природы	15
4. Моделирование пневмоцистной инфекции	19
5. Клиническая картина	21
II. Лабораторная диагностика	29
III. Профилактика и лечение пневмоцистоза	
1. Профилактика	40
2. Лечение	42
Список литературы	46
Приложения	49

Примечание.

По поводу приобретения лицензированных диагностических наборов и для получения консультативной помощи обращаться по телефонам:

8-495-193-43-89

8-495-193-43-91.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК