

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 616.24-002.9-06:616.98:578.828.6]-07:577.2

А. П. Сафонова, О. Ю. Шипулина, В. И. Шахильдян, О. В. Пиксадова, Д. А. Куевда, Е. А. Долгова

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПНЕВМОЦИСТНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ С ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ**

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

*Пневмоцистная пневмония является широко распространенной инфекцией среди пациентов со сниженным в силу различных причин иммунитетом. До эпидемии ВИЧ-инфекции случаи пневмоцистной пневмонии отмечались у больных с первичной иммунопатией или с медикаментозной иммуносупрессией. Для выявления *Pneumocystis carinii* в клиническом материале используются микроскопические методы, эффективность которых низка. На сегодняшний день является перспективным использование более чувствительных и точных методик на основе ПЦР.*

Ключевые слова: *Pneumocystis carinii*, *Pneumocystis jirovecii*, пневмония, диагностика пневмоцистной пневмонии.

*Pneumocystic pneumonia is a common infection among patients with suppressed immunity for various reasons. Before the HIV infection epidemic, cases of pneumocystic pneumonia were noted in patients with primary with immunopathy or drug-induced immunosuppression. Microscopic studies, the efficiency of which is low, are used to detect *Pneumocystis carinii* in the clinical material. More sensitive and precise polymerase chain reaction-based techniques are currently promising.*

Key words: *Pneumocystis carinii*, *Pneumocystis jirovecii*, pneumonia, diagnosis of pneumocystic pneumonia.

Несмотря на успехи, достигнутые в лечении ВИЧ-инфекции и оппортунистических заболеваний, болезни легких, в том числе и пневмоцистная пневмония, у ВИЧ-инфицированных встречаются по-прежнему часто. Более 3/4 пневмоцистных пневмоний являются СПИД-ассоциированными. Остальные случаи приходится на долю больных с первичным или вторичным иммунодефицитом, в том числе с ятрогенной иммуносупрессией [3]. Дифференциальную диагностику при подозрении на пневмоцистную пневмонию проводят с бактериальными, вирусными и грибковыми пневмониями, в том числе обусловленными цитомегаловирусной инфекцией и туберкулезом [1–5].

Вероятность развития пневмоцистной пневмонии возрастает в тех случаях, когда количество CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов составляет менее 200 кл/мкл. Пневмоцистная пневмония не имеет патогномных признаков (клинических, лабораторных, рентгенологических), поэтому этиологическая диагностика инфекции основана на выявлении возбудителя в биологическом материале из респираторного тракта: мокроте, полученной методом стимуляции, бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ), трахеальном аспирате, биоптатах легочной ткани [1–3, 5]. Пневмоцисты пока не удается выращивать *in vitro*, поэтому в диагностике легочного пневмоцистоза основную роль играют микроскопия окрашенных мазков и гистологическое исследование. При окрашивании мазков по Романовскому–Гимзе выявляются все формы пневмоцист, но анализ требует высокой квалификации специалиста. Мазок легче интерпретировать при специальных окрасках (по Гомори, толуидиновым синим), однако они более трудоемки, требуют больших материальных и временных затрат и не выявляют трофозоитов. Иммунофлуоресценция — высокоинформативный метод, но дорогостоящий [1, 2]. Серодиагностика не применяется. Исследование мокроты неинформативно, так как отсутствие возбудителя в мокроте не исключает пневмоцистную пневмо-

нию. Микроскопия жидкости, полученной при БАЛ, считается самым чувствительным методом. Биопсию проводят редко, поскольку в 90–95% случаев диагноз удается поставить при исследовании жидкости, полученной при БАЛ [1, 2, 4].

Исследование отделяемого респираторного тракта с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) имеет существенные преимущества по сравнению с другими методами, так как внедрение молекулярно-генетических методов позволит точно и быстро диагностировать атипичные, атипичные, стертые формы пневмоний у ВИЧ-инфицированных и унифицировать методы диагностики оппортунистических инфекций.

ПЦР длительное время отвергали как метод диагностики пневмоцистной пневмонии, так как опасались появления ложноположительных результатов в силу возможного бессимптомного носительства *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*). Однако в более поздних работах установлено, что пневмоцистная пневмония скорее является реинфекцией, чем аутоинфекцией, и индивидумы с нормальной иммунной системой не являются носителями пневмоцист [1, 7]. *Pneumocystis carinii* — генетически гетерогенная группа. Пневмоцисты видоспецифичны по отношению к организму-хозяину. Таким образом, пневмоцисты, выделенные из материала, полученного от крыс, обезьян и других млекопитающих, как правило, не выявляются у человека. При сосуществовании двух видов пневмоцист в одном организме-хозяине в преобладающем количестве выделяется видоспецифичный вид. Было принято именовать вид пневмоцист, выявляемых в клинических образцах человека, как *Pneumocystis jirovecii* [6, 8]. Относительно этих данных при создании тест-систем в первую очередь ориентируются на нуклеотидные последовательности ДНК вида *Pneumocystis jirovecii* [6–8].

Целью настоящей работы было определение диагностической ценности выявления ДНК *Pneumocystis jirovecii* методом ПЦР в различных видах кли-

нического материала, полученного от ВИЧ-инфицированных пациентов с диагнозом "пневмония".

## Материалы и методы

Были протестированы 483 образца клинического материала (290 образцов БАЛ и 193 образца из биоптатов бронхов) от 360 ВИЧ-инфицированных пациентов в возрасте от 18 до 64 лет с диагнозом "пневмония", проходивших стационарное лечение в инфекционной клинической больнице № 2 Москвы, и 63 пробы БАЛ от больных без ВИЧ-инфекции с диагнозом "туберкулез легких".

Из каждого образца проводили выделение тотальной ДНК с использованием набора "ДНК Сорб-Б" (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Полученные после экстракции образцы анализировали на наличие ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) с использованием тест-системы "АмплиСенс"® *Pneumocystis jirovecii* (carinii)-FRT" (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

В данной тест-системе генетической мишенью служит ген, кодирующий большую субъединицу митохондриальной рРНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii), размер которой составляет 330 пар оснований (п. о.). Размер амплифицированного фрагмента составляет 214 п. о. Избирательная амплификация ДНК *P. jirovecii* (carinii) основана на ПЦР с праймерами, специфичными для вида *P. jirovecii*, а детекция осуществляется с помощью специфического зонда, содержащего флюоресцентный краситель. ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации в формате реального времени проводилась с использованием прибора Rotor Gene 3000/6000 производства Corbett Research, Австралия. Качество выполнения теста оценивается при помощи эндогенного внутреннего контроля, в качестве которого используется участок ДНК гена  $\beta$ -глобина человека. Эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать качество проведения всех этапов биологического анализа, но также и оценивать сохранность клинического и секционного материала. При неадекватном хранении клинического образца может происходить разрушение клеток и деградация ДНК. Некачественно проведенная процедура экстракции ДНК из клинического образца также может привести к значительным потерям ДНК или наличию ингибиторов в препарате очищенной ДНК.

Для дифференциальной диагностики проводилось выявление ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) и ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanus*, *M. microti*) с использованием наборов "АмплиСенс"® CMV-Скрин-Титр-FRT", "АмплиСенс"® *Mycobacterium tuberculosis complex-FI*" (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

## Результаты и обсуждение

Из 360 обследованных положительными на ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) были 42 (11,7%)

Дифференциальная диагностика различных возбудителей пневмоний в зависимости от клинических диагнозов

Клинический диагноз	Количество CD4 <sup>+</sup> -лимфоцитов, кл/мкл	Mycobacterium tuberculosis complex	ЦМВ	<i>P. jirovecii</i> (carinii)
Пневмоцистная пневмония (n = 14)	6—241	1	8	14
Пневмония неясной этиологии (n = 7)	5—241	0	3	7
ТБ ВГЛУ (n = 12)	11—242	5	5	12
Цитомегаловирусная пневмония (n = 8)	17—58	1	8	8

пациента. Разброс значений CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов среди группы больных, положительных на ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii), составил от 1 до 242 кл/мкл.

На момент постановки клинического диагноза врачи не обладали сведениями о результатах лабораторного исследования на ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii), исследование проводилось ретроспективно, после постановки диагноза (см. таблицу). Среди пациентов с положительным результатом ПЦР-теста диагноз "пневмоцистная пневмония" был поставлен 14 (34%) больным. В 7 (17%) случаях был поставлен диагноз "пневмония неясной этиологии", для которых лабораторными методами, кроме ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii), была выявлена только ДНК ЦМВ в БАЛ, что не является основанием предполагать пневмонию цитомегаловирусной этиологии. В 12 (29%) случаях был поставлен диагноз "пневмония неясной этиологии" с сопутствующим диагнозом "туберкулез внетригрудных лимфатических узлов" (ТБ ВГЛУ), так как в пунктатах лимфатических узлов обнаружили ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ). 8 (20%) пациентам был поставлен диагноз "цитомегаловирусная пневмония" на основании обнаружения в биоптатах бронхов ДНК ЦМВ и высокой концентрации ЦМВ в крови. Из них у 4 диагнозов "цитомегаловирусная пневмония" сочетался с диагнозами "пневмоцистная пневмония" и ТБ ВГЛУ.

Из 318 пациентов с диагнозом "пневмония" и отрицательным результатом на ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) диагноз "пневмоцистная пневмония" не был поставлен ни одному пациенту.

Из 14 больных, которым диагноз "пневмоцистная пневмония" был поставлен клинически, ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) обнаружена в 100% доступного клинического материала (у 4 в БАЛ и биоптате бронхов, у 5 в БАЛ и еще у 5 в биоптатах бронхов).

БАЛ, положительный на ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii), дополнительно проверяли на наличие ДНК МБТ — 7 положительных проб, ДНК ЦМВ — 15 положительных проб (см. таблицу).

В биоптатах бронхов, положительных на ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii), не обнаружено ДНК МБТ, ДНК ЦМВ — 9 положительных проб.

Одновременно мы исследовали 63 пробы БАЛ, поступившие от больных без ВИЧ-инфекции с диагнозом "туберкулез легких". В 63 исследуемых образцах ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) не обнаружена.

**Заключение**

Было протестировано 483 образца клинического материала от 360 ВИЧ-инфицированных пациентов. Положительный результат на ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) получен у 42 пациентов, при этом клинические диагнозы среди этих пациентов распределились следующим образом: 34% — "пневмоцистная пневмония", 17% — "пневмония неясной этиологии", 29% — "пневмония неясной этиологии" с сопутствующим диагнозом ТБ ВГЛУ, 20% — "цитомегаловирусная пневмония". В БАЛ, поступившем от больных без ВИЧ-инфекции с диагнозом "туберкулез легких", ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) не обнаружена.

У пациентов с ВИЧ-инфекцией при снижении количества CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов менее 200 кл/мкл при возникновении клинической респираторной симптоматики требуется дополнительное обследование для выявления роли *Pneumocystis jirovecii* (carinii) в этиологии пневмонии.

Лабораторный диагноз подтвердил клинический у всех пациентов с пневмоцистной пневмонией. Диагноз "пневмоцистная пневмония" может быть подтвержден при выявлении в БАЛ и биоптатах бронхов ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) методом ПЦР.

Обнаружение ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) в БАЛ и биоптатах часто сочеталось с выявлением ДНК ЦМВ и ДНК МБТ, что может являться доказательством сочетанной инфекции, требующей назначения соответствующего этиотропного лечения.

Проведенные нами исследования указывают на достаточную диагностическую специфичность метода ПЦР в дифференциальной диагностике легочных заболеваний.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Каражас Н. В., Дехнич А. В. // Клини. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 1999. — № 1. — С. 12—22.
2. Лыкова Е. А. // Инфекции и антимикроб. химиотер. — 2001. — Т. 3, № 1. — С. 9—13.
3. Пневмоцистоз — эпидемиология, клиника, диагностика и лечение: Метод. рекомендации. — М., 1999.
4. Шепеленко А. Ф., Миронов М. Б., Попов А. А. // Лечащий врач. — 2006. — № 1. — С. 21—23.
5. Ascioğlu S., Rex J. H., de Pauw B. et al. // Clin. Infect. Dis. — 2002. — P. 34—37.
6. Stringer J. R., Beard C. B., Miller R. F., Wakefield A. E. // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 8, N 9. — P. 891—896.
7. Tamburrini E. et al. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 1998. — Vol. 22. — P. 37—42.
8. Wakefield A. E., Fritscher C. C., Malin A. S. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Vol. 32, № 12. — P. 2959—2961.

Поступила 12.02.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 616.98:578.828.61-078.33

Ю. Р. Ситдыкова, Л. В. Серебровская, А. В. Кравченко

**МОНИТОРИНГ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ: ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

*Исследовали содержание иммунологических маркеров у больных ВИЧ-инфекцией и их клиническое значение. В исследование были включены 45 больных ВИЧ-инфекцией. Определяли абсолютное и относительное содержание CD4-лимфоцитов, процентное содержание CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45Ro<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>-лимфоцитов.*

*Неблагоприятными прогностическими признаками в отношении прогрессирования ВИЧ-инфекции и эффективности ВААРТ является низкое значение соотношения "наивных" CD4-клеток и клеток памяти, высокий уровень экспрессии CD4-лимфоцитами маркера CD95, CD8-лимфоцитами — маркеров CD38, CD57 и снижение экспрессии CD28. Выраженное снижение уровня экспрессии маркера CD28 CD4-лимфоцитами может свидетельствовать о глубоком поражении иммунной системы и, возможно, связано с развитием вторичных заболеваний. Исследование экспрессии CD8-лимфоцитами CD38 может быть рекомендовано в качестве маркера для оценки эффективности антиретровирусной терапии в том случае, если по какой-либо причине исследование вирусной нагрузки невозможно.*

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, иммунологические маркеры, ВААРТ, восстановление иммунной системы, "наивные" клетки.

*The study covered 45 patients with HIV infection. The absolute and relative counts of CD4 lymphocytes, the content of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45Ro<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocytes were determined.*

*Low naive CD4 cells/memory cells ratio, the high expression of the marker CD95 by CD4 lymphocytes and that of the markers CD38, CD57 by CD8 lymphocytes and the decreased expression of CD28 are poor prognostic signs of the progression of HIV and the efficiency of highly active antiretroviral therapy. The significantly reduced CD4 lymphocytic expression of the marker CD28 may suggest severe immunity suppression and, possibly, be associated with the development of secondary diseases. Examining CD8 lymphocytic expression of CD38 may be recommended as a marker to evaluate the efficiency of antiretroviral therapy when a viral burden cannot be investigated for any reason.*

**Key words:** HIV infection, immunological markers, highly active antiretroviral agents, immunity recovery, naive cells.