

Е. В. Богословская, Г. А. Шипулин, Л. Ю. Башкирова, С. И. Браславская, Н. Н. Ладная, В. В. Покровский, А. И. Круглова, Е. Н. Кудрявцева, Л. Ю. Лобанова, Г. Г. Саламов, Е. В. Буравцова

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В МОСКВЕ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ*

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

Представлены результаты определения распространенности первичной устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам среди пациентов Москвы и Московской области. Было обследовано 27 пациентов с недавней сероконверсией и 49 беременных ВИЧ-инфицированных в возрасте до 25 лет. Для определения мутаций устойчивости ВИЧ использовали тест-систему ViroSeq HIV-1 фирмы "Abbott" (США). Нами не обнаружено ни одной первичной мутации ВИЧ, что позволяет делать вывод о возможности назначения первой линии антиретровирусной терапии без предварительного тестирования лекарственной устойчивости ВИЧ.

Ключевые слова: ВИЧ, секвенирование, мутации устойчивости.

The paper gives the results of determining the spread of primary resistance of HIV to antiretrovirus drugs in the patients of Moscow and the Moscow Region. Twenty-seven patients with recent seroconversion and 49 pregnant HIV-infected women at the age of less than 25 years were examined. A ViroSeq HIV-1 (Abbott) was used to determine HIV resistance mutations. The authors detected none primary HIV mutation, which led to the conclusion that first-line antiretrovirus drug therapy might be used, without pretesting the drug resistance of HIV.

Key words: HIV, sequencing, resistance mutation.

В настоящее время, несмотря на известный успех, достигнутый в области лечения ВИЧ-инфекции, не существует схем антиретровирусной (АРВ) терапии со 100% эффективностью. Среди разнообразных причин неэффективности терапии главное место занимает формирование лекарственной устойчивости ВИЧ в результате выработки мутаций резистентности. В связи с этим молекулярное тестирование лекарственной устойчивости, направленное на выявление таких мутаций, является наравне с определением вирусной нагрузки важным лабораторным исследованием при проведении АРВ-терапии, так как в большинстве случаев позволяет подобрать оптимальную комбинацию препаратов [5].

Остается открытым вопрос о необходимости назначения тестов на наличие лекарственной устойчивости ВИЧ до начала лечения, поскольку частота встречаемости устойчивых штаммов вируса у пациентов, не получавших терапию, может сильно варьировать в зависимости от истории использования АРВ-препаратов в определенном регионе. Согласно рекомендациям WHO HIVResNet (сеть организаций, деятельность которых направлена на предотвращение распространения резистентности ВИЧ), анализ, направленный на выявление мутаций устойчивости ВИЧ у пациентов, не получавших АРВ-терапию, целесообразно проводить в случае, если первичная резистентность в регионе превышает 10—15%. Под первичной резистентностью подразумевают частоту выявления резистентных штаммов среди циркулирующих штаммов ВИЧ. Для целей эпидемиологического надзора тестирование предпочтительно выполнять в острую стадию ВИЧ-инфекции, так как в этом случае выше

вероятность того, что устойчивый штамм вируса не будет вытеснен более жизнеспособными штаммами, лишенными мутаций устойчивости. Если первичная резистентность составляет менее 5%, то такая распространенность считается низкой, в этом случае рекомендуется вновь оценить данный показатель через 1—2 года. При обнаружении в выборочных исследованиях первичной резистентности на уровне 5—10% необходимо проведение расширенных исследований по определению частоты первичной резистентности в разных регионах страны и детальное выяснение причин повышения распространения устойчивых штаммов ВИЧ.

Уровень распространенности резистентных штаммов может быть связан с длительностью применения АРВ-терапии на конкретной территории, с охватом терапией ВИЧ-позитивного населения, с особенностями применения АРВ-препаратов (приверженность к терапии, показания к смене препаратов и др.) и с эффективностью профилактических мероприятий. Великобритания имеет один из самых высоких уровней распространенности первичной резистентности к АРВ-препаратам (14%) [6] по сравнению с США (7%) [2], Францией (6%) [3] и другими европейскими странами (10%) [8].

В России до настоящего времени на отдельных территориях проводилось ограниченное количество исследований по мониторингу резистентности ВИЧ к АРВ-препаратам у пациентов, не получавших терапию [1, 7]. Уровень первичной резистентности в этих исследованиях сильно различался (менее 1% [1] и более 13% [7]). В связи с такими противоречивыми данными поставили задачу оценить уровень распространенности первичной резистентности ВИЧ среди пациентов Москвы и Московской области, где опыт применения АРВ-тера-

*Работа выполнена в рамках программы "Развитие стратегии лечения населения РФ, уязвимого к ВИЧ/СПИДу".

пии наиболее длительный и массовый по сравнению с другими регионами России.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование включены две группы не получавших АРВ-терапию ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в Москве и Московской области. 1-ю группу составили 27 ВИЧ-инфицированных с недавней сероконверсией, а именно с первым положительным результатом иммунного блотинга в 2004—2006 гг. и предыдущим отрицательным или сомнительным результатом в течение 1 года или менее до первого положительного теста. 2-ю группу составили 49 ВИЧ-инфицированных беременных в возрасте до 25 лет, у которых первый положительный результат теста на антитела к ВИЧ получен в 2005—2006 гг.

Образцы

Исследовали 76 биологических образцов: 16 — плазмы крови и 60 — сыворотки крови от ВИЧ-инфицированных пациентов. В 1-ю группу были включены 27 образцов (16 плазмы и 11 сыворотки), во 2-ю группу — 49 образцов сыворотки крови.

Лабораторные методы исследования

Для определения вирусной нагрузки использовали тест-систему ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора "АмплиСенс ВИЧ-Монитор" (рег. удостоверение № 003723-01 от 20.08.04) с линейным диапазоном измерения от 500 до 800 000 копий/мл.

Для определения мутаций устойчивости ВИЧ использовали тест-систему ViroSeq™ HIV-1 фирмы "Abbott" (США) с аналитической чувствительностью $2 \cdot 10^3$ копий/мл.

Метод определения мутаций устойчивости в тест-системе ViroSeq™ HIV-1 состоит из 6 этапов:

- выделение РНК методом осаждения РНК изопропанолом;
- обратная транскрипция РНК в кДНК с использованием фермента Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV-ревертаза);
- амплификация области *pol* гена ВИЧ-1 размером 1,8 кб, которая включает весь ген протеазы и примерно две трети гена обратной транскриптазы;
- очистка продуктов амплификации и оценка их концентрации методом электрофореза в агарозном геле;
- автоматическое секвенирование с использованием прибора ABI PRISM 3100 ("Applied Biosystems", США);
- анализ результатов секвенирования с помощью программы ViroSeq™.

Субтип ВИЧ-1 определяли с помощью программы, разработанной в Стенфордском университете и представленной на сайте <http://hivdb6.stanford.edu>. Программа позволяет не только определить субтип, но и получить информацию обо всех

выявленных мутациях с комментариями и шкалой устойчивости, в результате чего можно сделать вывод о наличии лекарственной устойчивости той или иной степени.

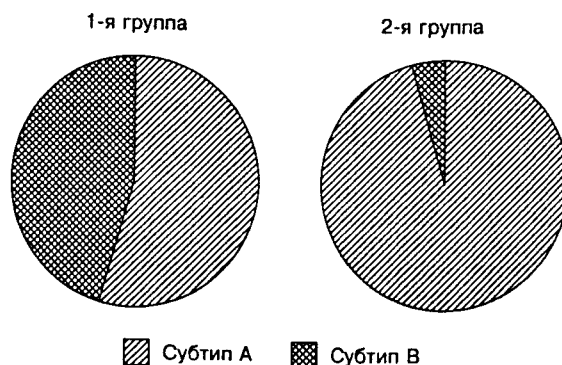
Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования 76 образцов сыворотки и плазмы в 57 образцах был получен специфический амплификационный сигнал с помощью тест-системы ViroSeq™ HIV-1, в 19 образцах такой сигнал отсутствовал. В 12 из 19 образцов была определена концентрация РНК ВИЧ-1 с помощью тест-системы "АмплиСенс ВИЧ-Монитор". В 9 образцах концентрация РНК ВИЧ-1 составила < 500 копий/мл. В 3 образцах показатель "вирусной нагрузки" составил соответственно $2,5 \cdot 10^3$, $4,0 \cdot 10^4$ и $3,3 \cdot 10^3$ копий/мл, хотя специфический амплификационный сигнал не выявлялся тест-системой ViroSeq™ HIV-1. Дискордантные результаты могут быть связаны с мутациями в месте локализации праймеров для амплификации разных субтипов [5].

При определении субтипа ВИЧ-1 получены следующие результаты: в 1-й группе выявлено 53% пациентов с субтипом А и 47% с субтипом В, во 2-й группе — соответственно 97,5 и 2,5%. В обеих группах доминировал субтип А, он выявлен у 84% обследованных. Результаты представлены на рисунке.

Полученные данные согласуются с результатами других исследований, выполненных ранее [1]. Некоторые различия в распределении субтипов в исследуемых группах связаны с факторами риска заражения ВИЧ-инфекцией. В 1-й группе были установлены причины заражения ВИЧ для половины участников, из них 50% инфицировались ВИЧ при гомосексуальных контактах, 31% — при гетеросексуальных контактах и 19% — при употреблении наркотиков с помощью нестерильного инструментария. Во 2-й группе основную причину заражения установить не удалось, так как работа велась в основном с депонированными образцами, но гомосексуальный путь передачи исключается, поскольку данная группа представлена беременными.

Полученные после секвенирования 57 образцов данные о частоте выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью ВИЧ, представлена в табл. 1 и 2.



Распределение субтипов ВИЧ-1 в исследуемых группах.

Таблица 1

Частота (в %) выявления мутаций в гене протеазы

Группа ВИЧ-инфицированных	L10I	K20R	M36I	L63P	A71I	V77I
1-я (с сероконверсией)	11,7	5,8	47	47	0	53
2-я (беременные)	0	5	97,5	17,5	2,5	72,5
Всего...	3,5	5,2	82	26,3	1,7	66,6

При анализе результатов с помощью программного обеспечения ViroSeq® было выявлено, что большая часть выявленных мутаций не вызывает устойчивость ВИЧ к лекарственным препаратам. Исключение составила мутация T69S в гене обратной транскриптазы, которая была отнесена к мутациям, потенциально приводящим к развитию устойчивости к АРВ-препарату из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы — зальцитабину (ddC). Необходимо отметить, что препарат зальцитабин в настоящее время снят с производства и не используется для лечения больных ВИЧ-инфекцией. В связи с этим обнаруженная мутация T69S не имеет значения для решения вопроса о назначении или изменении схемы ВААРТ.

При анализе результатов с помощью программы, разработанной в Стенфордском университете, все выявленные мутации были отнесены либо к мутациям полиморфизма, либо к вторичным мутациям (т. е. мутациям, которые могут вносить вклад в развитие устойчивости в присутствии первичных мутаций, но сами по себе устойчивость не вызывают). Частота обнаружения таких мутаций зависит от субтипа и как следствие от исследуемой группы и основных факторов риска заражения ВИЧ-инфекцией. Во 2-й группе (беременные), где преобладает субтип А, отмечена высокая частота выявления мутаций M36I и V77I в гене протеазы по сравнению с 1-й группой. Мутация в положении 36 слабо влияет на развитие устойчивости и часто присутствует у субтипов ВИЧ, отличных от В. Мутация в положении 77 относится к мутациям полиморфизма. В 1-й группе, где почти половина пациентов инфицирована субтипом В, наряду с мутациями, преобладающими во 2-й группе, обнаружена и высокая частота выявления мутаций, характерных для субтипа В — L10I и L63P, причем мутация в положении 63 относится к мутациям полиморфизма.

Зависимость между субтипом и частотой распространения мутаций прослеживается и для гена обратной транскриптазы. Мутация A62V характерна для образцов с субтипом А и чаще выявлялась во 2-й группе, где преобладает субтип А. Данная мутация может быть связана с развитием устойчивости только в присутствии мутации Q151M. Высокая частота и сочетанное выявление мутаций V77I (в гене протеазы) и A62V (в гене обратной транскриптазы) в высоком проценте случаев (55) также не редкое явление для российских образцов, связанное, по-видимому, с молекулярной эволюцией подтипа А в России [1].

Полученные нами данные во многом сходны с данными А. Л. Сухановой и соавт. [1], показавши-

ми низкую частоту встречаемости первичных мутаций устойчивости ВИЧ (менее 1%). В работе Е. Vazquez de Parga и соавт. [7] была выявлена высокая распространенность мутаций устойчивости ВИЧ по России (12,9% к ингибиторам обратной транскриптазы и 3,9% к ингибиторам протеазы).

Обнаружение в России, где АРВ-терапия до настоящего времени применялась не более чем у 1% зарегистрированных ВИЧ-инфицированных, уровня резистентности, превышающего показатели в тех странах, где уровень охвата пациентов терапией уже несколько лет достигает 50% и более, заставило нас провести дополнительный анализ всех выявленных в указанной работе [7] мутаций с помощью программы Стенфордского университета (<http://hivdb6.stanford.edu>). В ряде случаев мутации, которые были отнесены авторами к мутациям резистентности, программой были определены либо как мутации полиморфизма (например, V77I, I93L в гене протеазы), либо как мутации, не связанные с развитием резистентности (например, A62V [1] (в гене обратной транскриптазы и M36I в гене протеазы)). Некоторые из выявленных мутаций программой были расценены как нетипичные мутации, например D67K, D67S, K65E, K70T (в гене обратной транскриптазы), I50M, L90S (в гене протеазы). Тем не менее авторы оценивали эти мутации наравне с остальными, которые вносят вклад в развитие устойчивости. Если в описываемой работе учитывать только те мутации, которые приводят к формированию лекарственной устойчивости, то частота выявления мутаций устойчивости снизится до 9,4% к ингибиторам обратной транскриптазы и до 3,2% к ингибиторам протеазы. При этом наибольшая частота встречаемости мутаций, связанных с резистентностью, была выявлена в Иркутске, что является довольно странным, так как до 2006 г. в Иркутске АРВ-терапия проводилась у единичных пациентов. А. Л. Суханова и соавт. [1] также анализировали резистентность ВИЧ у пациентов из Иркутской области, и ни у одного из обследованных не выявили штаммов ВИЧ с наличием мутаций устойчивости, за исключением мутаций полиморфизма.

Отдельно хотелось бы отметить мутацию P236S в гене обратной транскриптазы, которая была выявлена практически в 5% случаев [7] и которая расценивается Стенфордской программой как нетипичная, но при этом ассоциируется с устойчивостью к делавердину. Надо отметить, что данный препарат никогда не использовался в России и достаточно редко используется за рубежом. Согласно зарубежным публикациям, устойчивость к делавердину связана с мутацией P236L, в то время как похожих работ относительно мутации P236S нет.

Таблица 2

Частота (в %) выявления мутаций в гене обратной транскриптазы

Группа ВИЧ-инфицированных	A62V	T69S	G333D
1-я (с сероконверсией)	35,3	0	23,5
2-я (беременные)	65	5	7,5
Всего...	57	3,5	12,3

Таким образом, высокий уровень распространенности резистентности ВИЧ, обнаруженный в исследовании E. Vazquez de Parga и соавт. [7], не соответствует полученным нами данным. Для разъяснения ситуации необходимо провести дополнительные пороговые исследования в тех регионах, где наблюдается высокий уровень пороговой резистентности, в частности в Иркутске.

В результате нашей работы по оценке уровня распространенности первичной резистентности ВИЧ к АРВ-препаратам среди ВИЧ-инфицированных пациентов с недавней сероконверсией, не получавших терапии, не было обнаружено ни одной первичной мутации устойчивости ВИЧ в Московском регионе, где АРВ-терапия применяется с 1997 г. Это позволяет делать оптимистические прогнозы относительно эффективности массового применения терапии в обследуемом регионе без предварительного тестирования резистентности у каждого пациента.

© А. А. СОРОКИНА, Б. П. БОГОМОЛОВ, 2007

УДК 616.935-036.11-07:616.31-018.73

А. А. Сорокина, Б. П. Богомолов

СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПРИ ОСТРОЙ ДИЗЕНТЕРИИ

ФГУ Центральная клиническая больница с поликлиникой УД Президента РФ, Москва

Представлены результаты обследования состояния слизистой оболочки полости рта у 37 взрослых больных острой дизентерией Зонне и Флекснера в динамике. Выявлены воспалительные изменения слизистой оболочки полости рта, которые наиболее часто проявлялись катаральным гингивитом, хейлитом, катаральным и десквамативным глосситом, афтозным стоматитом и сопровождалась впервые выявленной или обострением хронической герпетической инфекции, поднижнечелюстным лимфаденитом.

Ключевые слова: дизентерия, слизистая оболочка полости рта.

The paper presents the results of studying the oral mucosa in 37 adult patients with acute Sonne and Flexner dysentery over time. There are oral mucosal inflammatory changes which appear as catarrhal gingivitis, cheilitis, catarrhal and desquamated glossitis, aphthous stomatitis and are accompanied by new-onset or exacerbated chronic herpes infection, as well as submandibular lymphadenitis.

Key words: dysentery, oral mucosa.

В современных условиях в группе острых кишечных заболеваний дизентерия занимает видное место. В ее этиологической структуре дизентерия Зонне составляет 60—80%, реже встречается дизентерия Флекснера и очень редко — дизентерия, вызываемая другими видами бактерий [5].

Сведения о состоянии слизистой оболочки полости рта при острой дизентерии у взрослых отсутствуют. В единственной доступной нам монографии П. Н. Степанова (1946), посвященной хронической дизентерии, наиболее полно представлено описание верхних отделов пищеварительной системы, включая ротоглотку [7].

По данным ЦКБП УД Президента РФ, с 2002 по 2006 г. в инфекционный корпус было госпитализировано 210 больных дизентерией: 27 больных в 2006 г., 54 в 2005 г., 62 в 2004 г., 36 в 2003 г. и 31 человек в 2002 г.

В 2006—2007 гг. нами обследовано 37 больных дизентерией (22 женщины и 15 мужчин) в возрасте от 20 до 86 лет. У 29 обнаружена копрокультура ши-

ЛИТЕРАТУРА

1. Суханова А. Л., Рудинский Н. И., Богословская Е. В. и др. // Мол. биол. — 2005. — № 6. — С. 934—941.
2. Bennett D. E., Zaidi I. F., Heneine W. et al. // Antivir. Ther. — 2003. — Vol. 8. — P. 133.
3. Chaix M. L., Descamps D., Mouajjah S. et al. // Antivir. Ther. — 2003. — Vol. 8. — P. 137.
4. Eshleman S. H., Hackett J. Jr., Swanson P. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42, N 6. — P. 2711—2717.
5. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. <http://AIDSinfo.nih.gov> (accessed 10 Oct. 2006).
6. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study. UK Group on Transmitted HIV Drug Resistance. // Br. Med. J. — 2005. — Vol. 331. — P. 1368—1374.
7. Vazquez de Parga E., Rakhmanova A., Perez-Alvarez L. et al. // J. Med. Virol. — 2005. — Vol. 77, N 3. — P. 337—344.
8. Wensing A. M., van de Vijver D. A., Angarano G. et al. // J. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 192, N 6. — P. 958—966.

Поступила 20.03.07

геллы Зонне, у 8 — копрокультура шигеллы Флекснера. Течение болезни было среднетяжелым у 34 и тяжелым у 3 человек. Согласно клинической классификации шигеллезов В. И. Покровского и соавт. [5], колитическая форма диагностирована у 19 и гастроэнтероколитическая форма — у 18 пациентов.

Целью исследования явилось изучение состояния слизистой оболочки полости рта у больных дизентерией в остром периоде заболевания в сопоставлении с общими клиническими проявлениями в динамике.

Осмотр полости рта проводили на 2—20-е сутки болезни. Отмечались дискомфорт в полости рта и языке, изменение вкусовых ощущений, сухость губ, трещины в углах рта, густой налет на языке, набухание и кровоточивость десен. Пациенты жаловались на саднение в области твердого неба. Общими для всех больных были повышенная температура тела (до 38—39,0°C), озноб, боли внизу живота, тошнота, рвота, многократный жидкий стул с примесью крови и слизи. У 25 больных обрашала