

соответствующие квазивиды *HCV*, от пациентов из обоих внутрисемейных очагов - FM и FS - образуют два статистически значимых филогенетических кластера. Ни одна из контрольных последовательностей не группируется с изолятами из исследуемых внутрисемейных очагов.

В случае очага FS анализ разнообразия квазивидов позволяет установить, без привлечения данных анамнеза, факт заражения матерью (m_FS) ребенка (ch_FS). Квазивиды *HCV* у этих пациентов образуют четыре монофилетических кластера, по два кластера, для каждого пациента. Генетическое расстояние между кластерами для пациента m_FS существенно больше, чем расстояние между двумя кластерами пациента ch_FS. При этом оба кластера квазивидов пациента ch_FS имеют общего предка с одним из кластеров пациента m_FS.

Квазивиды *HCV* пациентов из семейного очага FM обладают меньшим филогенетическим разнообразием и образуют две отдельные ветви, исходящие от общего предка.

Заключение: Применение разработанного алгоритма для анализа эпидемиологической связи случаев ВГС позволяет установить наличие филогенетического родства изолятов даже по прошествии значительного промежутка времени от момента предполагаемого инфицирования (8 лет для FM и FS). В некоторых случаях предложенный алгоритм позволяет установить цепочку инфицирования (семейный очаг FS).

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВСПЫШКИ ВГА, ИМЕВШЕЙ МЕСТО НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2010 ГОДУ

Карандашова И.В., Пименов Н.Н., Неверов А.Д., Михайловская Г.В.,
Долгин В.А., Браславская С.И., Комарова С.В., Чуланов В.П.

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва,
Россия

Введение. Вирусный гепатит А (ВГА) является одной из наиболее распространенных в мире кишечных инфекций. Это острое заболевание печени, передающееся фекально-оральным путем, возбудителем которого является вирус гепатита А (HAV), относящийся к семейству *Picornaviridae*. Для ВГА характерны контактно-бытовой способ передачи инфекции, приводящий к спорадическим случаям заболевания, в то время как пищевой и водный пути - к вспышкам. В 2010 году

на территории Москвы и Московской области (МО) была зарегистрирована крупная вспышка ВГА. Вспышка началась в последних числах декабря 2009 г. и продолжалась по март 2010 г. Количество заболевших достигло 828 человек. **Целью** данного исследования являлось определение молекулярно-биологических характеристик данной вспышки.

Материалы и методы. В исследование было включено 187 образцов сыворотки крови больных вирусным гепатитом А, поступивших из инфекционных больниц Москвы и МО, 480 образцов сыворотки крови персонала ряда предприятий торговли Москвы и МО, 2 образца от контактных лиц, 65 образцов продовольственного сырья и пищевых продуктов, 12 образцов элюатов водных проб и 8 образцов проб питьевой воды из эпидемического очага вирусного гепатита А в Москве и МО. Образцы сыворотки крови персонала предприятий торговли контактных лиц были тестированы на наличие антител к вирусу гепатита А (anti-HAV IgM и anti-HAV IgG) с использованием ИФА-тест-систем «Вектоген А-IgM-стрип» и «Вектоген А-IgG» («Вектор-Бест», Россия), соответственно. Сыворотки крови, которые по результатам ИФА, содержали только anti-HAV IgG, не тестировали с помощью молекулярно-биологических методов на наличие РНК вируса гепатита А. Для проведения качественного теста на наличие в исследуемом материале РНК вируса гепатита А были использованы 79 образцов сыворотки крови, среди которых были 1) все anti-HAV IgM-положительные образцы; 2) 67 образцов, не содержащих искоемых серологических маркеров и 3) 9 anti-HAV IgM-отрицательных/anti-HAV IgG-слабоположительных образцов. Все образцы сыворотки крови заболевших были протестированы на наличие РНК HAV.

Образцы проб питьевой воды были сконцентрированы на базе ГУ НИИ ЭЧиГОС им. А.Н. Сысина РАМН, в котором было проведено микробиологическое исследование полученных концентратов. Для оценки микробиологических показателей (ОМЧ, ТКБ, колифагов, спор сульфитредуцирующих клостридий) исследовалось 500 мл каждой пробы. Для молекулярно-биологического исследования каждый образец был сконцентрирован на фильтровальном модуле с мембранами с усиленным положительным зарядом (до 40 мв/см²). Образцы концентратов и элюатов водных проб были протестированы на наличие РНК вируса гепатита А, РНК энтеровирусов, РНК ротавирусов, РНК астровирусов и РНК норовирусов. Образцы смывов с продуктов питания были протестированы на наличие РНК вируса гепатита А и РНК энтеровирусов.

Для выделения РНК использовали 100 мкл сыворотки крови и 1000 мкл образцов концентратов и элюатов водных проб и смывов с продук-

тов питания. Выделение РНК из 100 мкл проводили с помощью автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NucliSENS® easyMAG™» («BioMérieux», Франция), из 1000 мкл – с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» («ФГУН ЦНИИЭ»). Выявление РНК *HAV* проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиСенс® *HAV-FL*» («ФГУН ЦНИИЭ»). Выявления РНК энтеровирусов проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus*» («ФГУН ЦНИИЭ»). Выявление РНК ротавирусов группы А, норовирусов 2 генотипа и астровирусов проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиСенс® *Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL*» («ФГУН ЦНИИЭ»). Обратную транскрипцию проводили с помощью комплекта реагентов «REVERTA-L» («ФГУН ЦНИИЭ»). ПЦР проводили с использованием реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ. Для РНК *HAV*-положительных проб проводилось субтипирование вируса гепатита А с использованием субтипспецифичной ПЦР. Для определения штаммов проводилось секвенирование двух переменных фрагментов генома (маркерных последовательностей МП) *HAV*: *VP1/2B* длиной 410 н.п. и *2C* длиной 648 н.п. Для 151 образца были получены последовательности вирусного генома, из них для 119 образцов – по двум переменным областям *VP1/P2B* и *2C*, для 27 – только по региону *VP1/2B* и для 5 – только по региону *2C*. Филогенетический анализ штаммов осуществлялся методом Minimum Evolution модель TN93 (MEGA 3.1), статистическая значимость филогении оценивалась методом bootstrap 1000 повторов. Изоляты идентичные по двум МП принимались за один штамм. К близкородственным штаммам относили штаммы, отличающиеся друг от друга не более чем на две замены в пределах двух МП.

Результаты: Среди всех образцов сыворотки крови, собранных от заболевших, 168 образцов (89,9%) содержали РНК вируса гепатита А. По результатам генотипирования 153 образца вируса гепатита А (91,1%), выявленные в исследуемых пробах, относились к IA субтипу *HAV* и 12 образцов (7,1%) – к IIIA субтипу. 3 образца (1,8%) не были типированы вследствие низкого содержания вируса гепатита А в пробе. В 127 образцах заболевших выявлен идентичный штамм IA субтипа *HAV*, что свидетельствует о едином источнике заражения, и является доказательством того, что эпидемическая вспышка гепатита А в Москве и МО вызвана этим штаммом возбудителя (вспышечным штаммом). В шести образцах были выявлены шесть штаммов, близкородственных вспышечному, можно предположить, что эти образцы эпидемиологически связаны со вспышечной заболеваемостью. В восьми образцах выявлены штаммы IA субтипа, которые значительно отличаются от штамма, вызвавшего вспышку, и, следовательно, эти образцы

эпидемиологически не связаны со вспышечной заболеваемостью. Все образцы, в которых выявлен IIIA субтип *HAV*, эпидемиологически не связаны со вспышкой. Вирус гепатита А IIIA субтипа, выявленный в трех образцах сыворотки крови, принадлежащих сотрудникам одного из ГОУ ЦО Москвы, представлен идентичным штаммом, что является доказательством связанности случаев инфицирования. Остальные образцы вируса гепатита А IIIA субтипа были представлены уникальным для каждого образца штаммом. В результате проведенного филогенетического анализа было показано, что все выявленные штаммы IA субтипа *HAV* относятся к кластеру штаммов эндемичных для стран СНГ, причем вспышечный штамм, близкородственные ему штаммы и часть штаммов, значительно отличающихся от вспышечного, попадают в подкластер штаммов, эндемичных для европейской части Российской Федерации (РФ). Все выявленные штаммы IIIA субтипа вируса гепатита А, относятся к кластеру штаммов, встречающихся на территории Среднеазиатских республик.

Среди 79 образцов сыворотки крови персонала предприятий торговли и контактных лиц, которые тестировались на наличие РНК *HAV*, РНК вируса гепатита А была выявлена только в двух *anti-HAV IgM*-положительных образцах (из трех), что свидетельствует о заболевании этих лиц ВГА. В этих образцах был выявлен вспышечный штамм *HAV*, и, следовательно, эти случаи инфицирования эпидемиологически связаны со вспышечной заболеваемостью. В одном *anti-HAV IgM*-положительном образце РНК вируса гепатита А не была обнаружена, что свидетельствует о недавно перенесенном ВГА.

В смывах с образцов продовольственного сырья и пищевых продуктов РНК *HAV* и энтеровирусов обнаружена не была. В образцах концентратов и элюатов водных проб РНК *HAV*, РНК энтеровирусов, РНК ротавирусов, РНК астровирусов и РНК норовирусов обнаружена не была. Результаты микробиологического исследования образцов концентратов водных проб по всем тестируемым показателям были отрицательными.

Заключение: В результате проведенного исследования был выявлен штамм, вызвавший вспышку ВГА в Москве и МО, близкородственные ему штаммы и штаммы, не связанные с рассматриваемой вспышечной заболеваемостью. Факт выявления близкородственных штаммов в пределах одной вспышки может свидетельствовать о длительном существовании хронического очага инфекции вируса гепатита А на определенной территории. Большинство выявленных изолятов *HAV* относятся к IA субтипу, преобладающему в европейской части РФ. Все выявленные штаммы IA субтипа *HAV* относятся к кластеру штаммов эндемичных для стран СНГ, причем вспышечный

штамм, близкородственные ему штаммы и часть штаммов, значимо отличающихся от вспышечного, попадают в подкластер штаммов, эндемичных для европейской части России. Все выявленные штаммы ША субтипа вируса гепатита А значительно отличаются от изолятов, характерных для европейской части РФ и попадают в кластер штаммов ША субтипа, эндемичных для республик Средней Азии.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА D (HDV)

Коновалов А.С., Карандашова И.В., Куевда Д.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Вирус гепатита D (HDV) является РНК содержащим, гепатотропным вириодом (несовершенным вирусом), относящимся к семейству *Deltavirus*. HDV нуждается в хелперной функции вируса гепатита В, который обеспечивает вирус гепатита Дельта белками поверхностной оболочки (HBsAg). Поэтому HDV способен к эффективной репликации только в присутствии HBV.

Кoinфекция - одновременное заражение вирусами гепатита В и D носит характер острого тяжелого заболевания с высоким риском развития фульминантного гепатита (до 20%). Заражение вирусом гепатита D больного хроническим гепатитом В или носителя вируса гепатита В (суперинфекция) в 70-80% случаев ведет к быстрому развитию цирроза.

К настоящему времени пути высокоэффективной терапии HDV-инфекции не разработаны. Основные трудности возникают при HDV/HBV-суперинфекции хронического течения. Многочисленные попытки использовать для лечения данной группы больных практически все новейшие противовирусные средства не дали устойчивых положительных результатов. Основным средством лечения остаётся интерферон. Наилучшие результаты даёт длительное лечение высокими дозами интерферона альфа2а. Показано, что эффективность терапии интерфероном зависит от формы болезни и тяжести состояния больных. Принципиально важным является тщательный отбор больных вирусным гепатитом D для лечения интерфероном. Основное значение при этом имеет контроль над уровнем РНК HDV. Наибольший процент устойчивого ответа был получен при относительно невысоком исходном содержании РНК в плазме крови, при этом у пациенты с