

ВСПЫШКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В МИНСКЕ СРЕДИ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ ИНЪЕКЦИОННЫХ НАРКОТИКОВ И ЕЕ ОСОБЕННОСТИ

¹ *Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь;*

² *Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья,
г. Минск, Республика Беларусь*

Цель исследования – расшифровка вспышки ВИЧ-инфекции среди потребителей инъекционных наркотиков в г. Минске, установление филогенетических связей между ВИЧ, изолированного от разных пациентов и определение общих источников инфицирования.

Основным положением молекулярной эпидемиологии ВИЧ-1 является многократно показанная связь эпидемиологических отношений между инфицированными лицами и филогенетических отношений между инфицирующими их вариантами вирусов. Иначе говоря, чем ближе эволюционные отношения между изолятами вируса, тем, как правило, ближе эпидемиологическая связь между лицами, от которых они получены.

Первым опытом практического применения этого положения является анализ возможного непреднамеренного инфицирования врачом нескольких пациентов при проведении медицинских манипуляций в ротовой полости – так называемый случай дантиста из Флориды, США [5]. В дальнейшем аналогичный подход был использован в ряде исследований при анализе эпидемиологической связи между ВИЧ-инфицированной матерью и рожденным ею ребенком, а также реципиентами и донорами крови, в том числе и в Республике Беларусь [1, 3, 4]. В ряде случаев возможного преднамеренного заражения ВИЧ-1, молекулярные данные были использованы в качестве судебных доказательств [2].

За период с 2014 по 2015 гг. нами было получено 85 образцов плазмы крови от первично выявленных ВИЧ-инфицированных пациентов, жителей г. Минска. Из них 60 были лица мужского пола, средний возраст $33,7 \pm 4,4$ года и 25 – женщин, средний возраст $32,8 \pm 6,2$ года. Все пациенты были ко-инфицированы вирусом гепатита С, а двое ВИЧ-инфицированных являлись носителями вирусов гепатита В и С.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили на коммерческой тест-системе ИФА «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ», производства ЗАО «Вектор-Бест»,

Новосибирская область, п. Кольцово, АБК, Россия. Серологические исследования для одновременного выявления антител классов М и G к антигенам вируса гепатита С, и HBsAg вируса гепатита В методом иммуноферментного анализа (ИФА), проводили на тест-системах «Бест анти-ВГС» и «Вектогеп В-HBs-антиген», производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово, АБК, Россия.

Выделение РНК ВИЧ из образцов сыворотки/плазмы крови пациентов с ВИЧ/СПИД выполняли с помощью комплекта реагентов для выделения РНК из клинического материала «РИБО-сорб», производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Выделение РНК для количественного определения копий РНК/мл проводили с использованием набора «Экстракция1000», прилагаемого к тест-системе для количественного определения РНК ВИЧ-1 и РНК ВГС в сыворотке/плазме крови «РеалБест РНК ВИЧ количественный» и «РеалБест ДНК ВГВ количественный», «РеалБест РНК ВГС количественный», производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Исследования проводили на амплификаторе CFX96 BioRad, США.

Обратную транскрипцию для получения кДНК ВИЧ по участкам генов gag/pol и env (петля V3 gp120) проводили в объеме 20 мкл по следующей прописи: 5x РТ-буфер – 4 мкл, обратный праймер (3'VNOT-для гена env) 0,5 мкл, смесь трифосфатов 1,0 мкл (10 mM), ингибитор РНКаз – 0,5 мкл, обратная транскриптаза – 1,0 мкл, РНК – 10 мкл, бидистиллированная вода – 2,5 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводили в следующем режиме: 42°C – 60 мин; 70°C – 15 мин.

Полимеразную цепную реакцию в гнездовом варианте выполняли на амплификаторах AB2700, США и «Corbett Research», Австралия в два этапа в объеме 25 (ген pol) и 50мкл (ген env).

Секвенирование вируса гепатита В проводили по Р участку (протеаза, обратная транскриптаза). Размер полученного фрагмента составил 1123 п.о.

Анализ продуктов ПЦР проводили в 0,8% и 2% агарозном геле.

Очистку продуктов ПЦР осуществляли с использованием колонок производства фирм Sigma и этанол/ацетатной преципитацией.

Электрофоретическую разгонку фрагментов ДНК проводили на анализаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США).

Анализ полученных фрагментов проводили с использованием программных продуктов «Sequencing Analysis Software v.5.1.1», BioEdit, SeqScape v.3.

Филогенетический анализ полученных фрагментов осуществляли с помощью программы Mega» (дерева с корнем построены методом присоединения соседей – neighbor-joining method).

По состоянию на 1 января 2016 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 19 827 случаев ВИЧ-инфекции, количество людей, живущих с ВИЧ – 15 378, показатель распространенности составил 162,2 на 100 тысяч населения. За 2015 г. выявлено 2 305 ВИЧ-инфицированных (2014 г. – 1811). Показатель заболеваемости составил 24,3 на 100 тысяч населения (за аналогичный период 2014 г. – 19,1). Темп прироста – 27,2% [<http://ivc.by/main/169-epidsituaciya-po-vich-infekcii-v-respublike-belarus-na-1-yanvarya-2016-goda.html>].

Анализ эпидситуации по ВИЧ/СПИД в областных городах и городе г.Минске позволил определить, что за один год, с 1 декабря 2014 г. по 1 декабря 2015 г. наибольший прирост случаев ВИЧ-инфекции наблюдался в г. Минске – 797. Такого прироста новых случаев ВИЧ/СПИД не наблюдалось за весь период регистрации ВИЧ-инфекции (рис. 1).

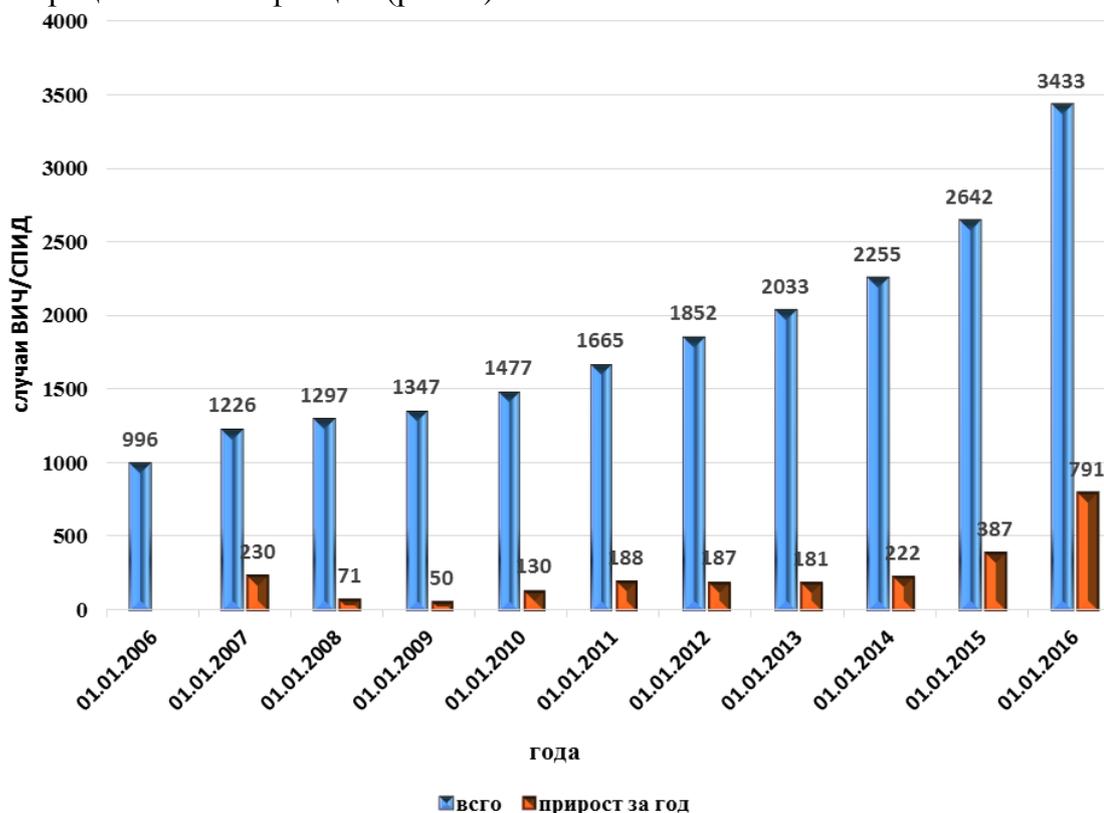


Рис. 1. Случаи ВИЧ/СПИД в г. Минске за период с 2006 по 01.01.2016 гг.

Таким образом, возник закономерный вопрос, за счет каких групп пациентов происходит рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией в г. Минске. Мы использовали методы молекулярной эпидемиологии, которые позволяют определить не только субтип вируса, но и направление его заноса, и филогенетические связи между вирусами, изолированными от разных пациентов.

Было исследовано 85 образцов крови от первично выявленных пациентов с ВИЧ-инфекцией. В результате проведенных серологических исследований, было установлено, что во всех образцах имеются антитела к ВИЧ-1, вирусу гепатита С, а две пробы содержали HBsAg. По результатам ПЦР было определено, что 7 проб оказались отрицательными в отношении РНК ВИЧ, 14 имели низкий уровень вирусной нагрузки, а 10 не содержали РНК вируса гепатита С. Обе пробы, полученные от пациентов, имевших ко-инфекцию вирусом гепатита В, оказались положительными и в ПЦР.

Проведенные секвенирование и последующий филогенетический анализ по участкам генов *env* и *pol* ВИЧ-1 61 образца, позволили определить, что 59 относились к субтипу A1 (96,7%), а два – к В (3,3%). Проведенный филогенетический анализ позволил выделить 9, не связанных между собой групп пациентов (рис. 2).

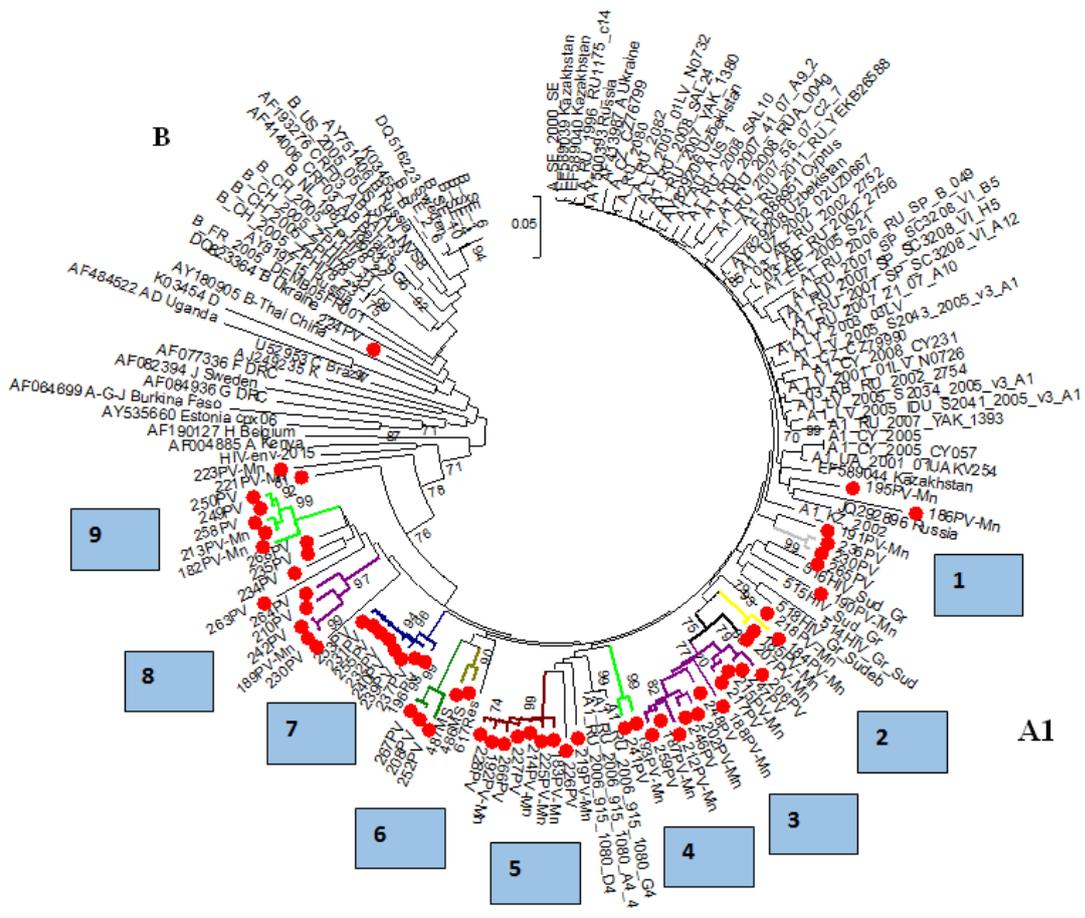


Рис. 2. Филогенетический анализ ВИЧ-1, изолированного от пациентов из г. Минска, по участку гена env

Секвенирование и последующий филогенетический анализ по участкам генов core/E1 и NS5 ВГС позволил получить неожиданные данные. Оказалось, что секвенированные образцы, в отличие от ВИЧ-1, относились к трем разным подгенотипам вируса гепатита С – 1a, 1b и 3a (рис. 3). При этом только отдельные изоляты формировали группы с единым источником происхождения. При анализе этих групп оказалось, что, например, 230PV и 237PV, а также 187PV и 189PV, относились к 1a подтипу вируса гепатита С и имели общий источник происхождения, но по ВИЧ-инфекции эти же изоляты находились в разных группах. Эти данные указывают на то, что эти пациенты были инфицированы вирусом гепатита задолго до заражения ВИЧ-инфекцией.

Оба образца 196PV и 203PV, полученные от пациентов-мужчин и секвенированные по участку гена Р вируса гепатита В, относились к D2 подгенотипу вируса и имели единый источник происхождения вируса (рис. 4).

Таким образом, как показывают наши исследования, в отличие от вспышки ВИЧ-инфекции в 1996 г. в г. Светлогорске, где пациенты инфицировались при внутривенном введении контаминированного опиумсодержащего наркотика, и в результате чего все ВИЧ-инфицированные имели один и тот же вариант ВИЧ-1, вспышка в г. Минске была связана с множественными не связанными между собой случаями инфицирования разных групп молодых людей в результате введения новых синтетических наркотических препаратов при внутривенном введении.

Как показали наши исследования, все пациенты уже имели значительный опыт введения наркотиков внутривенно, на что указывают результаты генотипирования и филогенетического анализа вируса гепатита С, изолированного от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Выводы:

1. Вспышка ВИЧ-инфекции в г. Минске в 2014-2015 гг. пациентов-наркопотребителей была связана с инфицированием ВИЧ-1 подтипа А1.
2. Инфицирование произошло из нескольких не связанных между собой источников, на что указывают результаты филогенетического анализа;
3. Все пациенты имели опыт внутривенного введения наркотических препаратов, на что указывает обнаружение у них вируса гепатита С подтипов 1a, 1b и 3a, полученных из разных источников;
4. Для снижения заболеваемости в данной группе риска необходимы целевые профилактические мероприятия в данной группе риска.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Еремин, В. Ф.* Применение молекулярно-генетических методов для расследования случаев заражения через кровь / В. Ф. Еремин, Н. В. Лазовская, С. Р. Боровко // *Здравоохранение*. 2009. № 10. С. 39-45.
2. *Analysis of a rape case by direct sequencing of the human immunodeficiency virus type 1 pol and gag genes / Albert J. [et al.] // J. Virol.* 1994. Vol. 68. P. 5918-5924.
3. *Genomic human immunodeficiency virus type 1 RNA variation in mother and child following intra-uterine virus transmission / G. A. Mulder-Kampinga [et al.] // J. Gen. Virol.* 1993. Vol. 74. P. 1747-1756.
4. *HIV-1 sequence variation between isolates from mother-infant transmission pairs / C. M. Wike [et al.] // AIDS Res. Human Retrovir.* 1992. Vol. 8. P. 1297-1300.
5. *Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice / C.-Y. Ou [et al.] // Science.* 1992. Vol. 256. P. 1165-1171.