

Выбор терапии герпесвирусной инфекции по данным мониторинга чувствительности вируса простого герпеса к этиотропным препаратам

Л.М. Алимбарова, А.А. Лазаренко, И.Ф. Баринский

Selection of the therapy of herpes viral infection based on the data of the monitoring of the sensitivity of the herpes simplex virus to etiotropic drugs

L.M. ALIMBAROVA, A.A. LAZARENKO, I.F. BARINSKY

об авторах: ►

Л.М. Алимбарова — ведущий научный сотрудник ФБГУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, Москва
А.А. Лазаренко — ведущий научный сотрудник ФБГУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, Москва
И.Ф. Баринский — руководитель лаборатории ФБГУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, Москва

Представлены результаты мониторинга чувствительности *in vitro* штаммов вируса простого герпеса (ВПГ), изолированных у 110 пациенток с различными формами герпесвирусной инфекции, к этиотропным препаратам (ацикловиру — АЦВ, валацикловиру — ВалАЦВ) по данным фенотипического метода. Установлено, что независимо от условий выделения 90% штаммов ВПГ были чувствительны к АЦВ, доля нечувствительных штаммов составила 10%, в то время как доля нечувствительных штаммов к ВалАЦВ не превышала 0,9%. Полученные данные имеют большое значение для оценки активности патологического процесса, прогноза заболевания и подбора персонализированной схемы лечения пациентов, предусматривающей выбор противовирусного препарата и его оптимальную дозу с учетом результатов вирусологических исследований.

Ключевые слова: вирус, герпес, терапия, ацикловир, резистентность.

The authors present the results of the monitoring of the sensitivity of herpes simplex virus (HSV) strains *in vitro* isolated from 110 female patients with various forms of the herpes virus infection to etiotropic drugs (acyclovir (ACV)), valacyclovir) based on the data provided by the phenotypic method. The authors established that 90% of HSV strains were sensitive to ACV irrespective of the isolation conditions, and the share of non-sensitive strains was 10% while the share of strains that were not sensitive to valacyclovir was not higher than 0.9%. These data are of great value for the evaluation of the pathological process activity, forecast for the disease and selection of an individualized treatment regimen for patients providing for the selection of an antiviral drug and its optimum dose in view of the results of virology studies.

Key words: virus, herpes, therapy, Acyclovir, resistance.

■ Вирус простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типов является наиболее значимым патогеном герпесвирусной инфекции (ГИ), в том числе таких социально значимых клинических форм, как лабиальный герпес, генитальный герпес, офтальмогерпес [1, 2]. В США распространенность ВПГ-1 и ВПГ-2 инфекций составляет 50 и 20% соответственно [3]. На территории России одним или несколькими серотипами ВПГ инфицированы около 25 млн человек. ГИ встречается во всех популяционных группах, но самый высокий уровень заболеваемости регистрируется в возрастной группе

от 20 до 40 лет [1]. По данным ФБГУ «Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения» Минздравсоцразвития России, заболеваемость ГГ в РФ составила в 2007 г. 22,1 на 100 000 населения; в Московской области — 46,2 на 100 000 населения [4]. Рецидивирующими формами заболевания страдают от 25 до 30% инфицированных людей, у 30% инфекция обнаруживается в субклинической или атипичной форме. Оценить истинную роль ВПГ в развитии ГИ с учетом мало- или бессимптомного течения инфекции нередко оказывается весьма трудно.

К основным этиотропным лекарственным средствам для профилактики и лечения ГИ относятся четыре близких по структуре препарата из группы аналогов нуклеозидов — ацикловир (АЦВ) и его производные — валацикловир (ВалАЦВ), пенцикловир и фамцикловир (ФамЦВ) [1, 3, 5]. АЦВ — синтетический аналог гуанозина, является родоначальником этиотропных препаратов (ЭП) — блокаторов синтеза вирусной ДНК. Все аналоги нуклеозидов имеют сравнимый механизм действия и клиническую эффективность, ингибируют синтез ДНК вирусов герпеса, находящегося в фазе репродукции, но неактивны в отношении вирусов, находящихся в латентном состоянии; обладают очень низкой токсичностью, так как не действуют на ДНК-полимеразу клеток человека и неактивны в здоровых клетках.

В литературе имеются противоречивые сведения относительно уровня резистентности ВПГ к ЭП [3, 5, 6]. По данным исследований, проведенных в Англии и США, у иммунокомпетентных пациентов (с рецидивирующим генитальным герпесом, кератитом, генерализованной ГИ, энцефалитом), получавших АЦВ эпизодически, уровень резистентности изолятов ВПГ к АЦВ составляет 0,1—6,4% [1, 3, 6]. Относительно высокий уровень резистентности к АЦВ установлен у изолятов ВПГ-1. У иммунокомпетентных лиц, получавших АЦВ повторно или в режиме длительной профилактической или иммуносупрессивной терапии, уровень резистентности выше и составляет 6,0—17,0%, у лиц с умеренной степенью иммунодефицита — 3,5—10%, у ВИЧ-положительных пациентов — 3,5—17,0%; у реципиентов органов и тканей — 2,5—10,0%, у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток — 4,1—36,0%. У больных с иммунодефицитом, особенно при наличии нарушений со стороны клеточного звена иммунитета, резистентные к АЦВ штаммы ВПГ могут привести к развитию устойчивых к противовирусной терапии генерализованной или диссеминированной форм ГИ, а также к летальному исходу. В большинстве резистентных к АЦВ изолятов, полученных от больных с разными формами ГИ, обнаруживается относительный дефицит вирусной тимидинкиназы либо нарушение структуры вирусной тимидинкиназы или ДНК-полимеразы.

По данным литературы, резистентность ВПГ к ВалАЦВ может развиваться вследствие фенотипического дефицита вирусной тимидинкиназы либо из-за скрытых изменений в тимидинкиназе или ДНК-полимеразе у 0,19% иммунокомпетентных больных и значительно чаще (2,1%) у лиц с выраженным иммунодефицитом [3].

Целью настоящего исследования явился мониторинг чувствительности штаммов ВПГ, изолированных у пациенток с различными формами ГИ, к ЭП для адекватного подбора различных вариантов терапии (препарата и его дозы).

Материал и методы

Под наблюдением находились 110 женщин в возрасте 18—45 лет с различными клиническими формами, длительностью и тяжестью течения ГИ. По возрастным группам пациентки распределились следующим образом: моложе 19 лет — 3 женщины, от 20 до 29 лет — 49, от 30 до 39 лет — 42 и старше 42 лет — 16 пациенток. Верификацию диагноза проводили с учетом анамнестических и клинических данных, результатов общепринятых лабораторных методов исследования. 83 (75,4%) пациентки ранее получали противовирусную терапию АЦВ или ВалАЦВ перорально (см. таблицу 1). Один курс терапии получили 22 (26,5%) женщины, два курса — 17 (20,5%), три курса и более — 44 (53%) пациентки.

Материалом для исследования служили образцы крови, слюны, мочи, секрета из цервикального канала, влагалища и уретры. Забор и хранение образцов биологического материала производили в соответствии со стандартными методиками, описанными нами ранее [7].

Выделение вируса из клинического материала проводили на монослойной культуре перевиваемых клеток линии Vero-B (ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского»). В качестве питательной среды для выделения и поддержания культуры вирусов использовали среду Игла МЕМ (НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова), содержащую сыворотку эмбрионов коровы (ПанЭко, Россия), 2 ммоль глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. Инкубирование инфицированных культур клеток проводили в CO₂-термостате при 36 ± 1°C в течение 96 ч. С целью выявления характерного вирусспецифического цитопатического действия (ЦПД) клетки ежедневно просматривали под микроскопом. В отсутствие характерного ЦПД проводили 2—3 слепых пассажа, материалом для которых являлся материал от предыдущих пассажей. После 3-го пассажа проводили идентификацию вируса и определение его инфекционной активности по стандартным методикам.

Устойчивость ВПГ к противовирусным препаратам выявляли с помощью фенотипического метода, который утвержден Clinical and Laboratory Standards Institute (США) в качестве стандартного метода оценки чувствительности ВПГ к противовирусным препаратам [8]. Изолятом вируса (инфицирующая доза 50—100 ТЦД₅₀), выделенным от больного, заражали чувствительные клетки (vero-B). Через 1 ч. после заражения к клеткам добавляли ростовую среду, содержащую 10% ЭТС и серийные разведения ЭП—АЦВ (Zovirax) или ВалАЦВ (Valtrex) фирмы GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A. (Великобритания) в диапазоне от 0,01 до 100,0 мкг/мл. Инкубацию инфицированных культур в присутствии ЭП проводили в CO₂-термостате при 36 ± 1°C в течение 96 ч., ежедневно просматривая культуру под микроскопом и отмечая наличие ЦПД ви-

руса. Чувствительность к ЭП оценивали по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК) препарата, которую рассчитывали по стандартной методике. Изолят вируса считали резистентным к ЭП, если: МИК ацикловира была равна или превышала 1,0 мкг/мл (для ВПГ-1) — 2,0 мкг/мл (для ВПГ-2), а МИК валтрекса была равна или превышала 1,5 мкг/мл для ВПГ-1 и 4,5 мкг/мл для ВПГ-2.

Специфические маркеры ВПГ определяли общепринятыми вирусологическими методами до и через 2 нед. после окончания терапии. *Маркеры специфического гуморального ответа* к ВПГ-1, ВПГ-2 (IgM и IgG) определяли в образцах сыворотки крови больных методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов VectoHSV — IgG-strip, VectoHSV — IgM (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическую обработку полученных данных проводили общепринятыми методами вариационной статистики с использованием прикладных программ «Exell-5.0».

Результаты и их обсуждение

Изучены штаммы ВПГ *in vitro*, изолированные от пациенток с различными формами ГИ, а также проведен анализ спектра их чувствительности к ЭП. При изучении штаммов ВПГ, изолированных у женщин с различными формами ГИ, было установлено, что среди всех обследованных преобладали (66,3%) пациентки, инфицированные ВПГ-1; ассоциация двух штаммов выявлена у 25,5% больных. Инфицированность пациенток ВПГ увеличивается с возрастом: высокий уровень инфицированности регистрируется в двух возрастных группах: 20—29 и 40—45 лет. Полученные результаты свидетельствуют о высокой частоте распространения вируса в популяции и соответствуют эпидемиологическим данным, полученным ранее другими исследователями [1—3].

Следует отметить, что при проведении пассажей на культуре клеток вирус был выделен нами во время 1-го пассажа (через 1—2 сут. после инфицирования культуры клеток) у 58 (52,7%) пациентов, после 2-го пассажа — у 23 (20,9%), после 3-го пассажа — у 29 (26,4%).

Раннее выявление цитодеструктивного действия вируса в культуре клеток в 1—2-е сутки в 48,1% случаев коррелировало с выраженностью инфекционного процесса и соответствовало ранней стадии рецидива инфекции. Обнаружение цитодеструктивного действия вируса после 2-го и/или 3-го пассажей было характерно для пациенток с вялотекущим инфекционным процессом, а также при бессимптомном вирусомыделении и микстинфекции.

Наиболее часто ВПГ выделяли из образцов мочи — в 44,5% случаев, в образцах слюны вирус был выявлен в 34,5% случаев, в материале из урогенитального тракта и крови — в 12,7 и 5,45% случаев

соответственно. У 27,3% пациентов ВПГ выделяли одновременно из двух биологических материалов — из образцов слюны и мочи, у 6,36% пациентов — из трех материалов (из крови, слюны и мочи). Последние данные особенно важны для определения степени генерализации ГИ и внесения необходимой коррекции в тактику лечения заболевания.

Для контроля эффективности терапии проводили вирусологическое обследование больных в динамике до и через 2 нед. после окончания лечения, при этом прекращение выделения вируса было зарегистрировано у 94 пациенток. У 16 больных вирус выделяли повторно, однако уровень инфекционной активности выделенного изолята был достоверно ниже первоначального показателя. У 9 женщин с повторным выделением вируса удалось изолировать вирус только из одного образца биологического материала.

Пенцикловир, АЦВ и их пролекарства (ВалАЦВ, ФамАЦВ) являются «золотым стандартом» этиотропной терапии. Общее количество этих препаратов, используемых для профилактики и лечения ВПГ-1 и ВПГ-2 инфекции, превышает $2,3 \cdot 10^6$ кг [5]. В то же время в литературе появляется все большее число публикаций о штаммах ВПГ, выделенных как у иммунокомпетентных, так и у иммунокомпромированных пациентов, резистентных к ЭП [1, 3, 6]. Особое значение проблема резистентности ВПГ к ЭП приобретает в настоящее время в связи с увеличением доли иммунодефицитных пациентов, в том числе с трансплантацией органов и тканей, онкологическими заболеваниями, ВИЧ-инфекцией и др.

В связи с этим на втором этапе исследований мы изучали чувствительность выделенных изолятов к АЦВ и ВалАЦВ. Анализ спектра чувствительности выделенных штаммов вируса к АЦВ показал, что независимо от условий выделения 90% штаммов были чувствительными к АЦВ; доля нечувствительных штаммов ВПГ составила 10%. Полученные результаты совпадают с опубликованными ранее данными, свидетельствующими о возможности варьирования уровня резистентности изолятов к АЦВ у пациентов с ГИ в пределах от 0,1 до 36,0% [1, 3, 6].

При анализе структуры чувствительности к АЦВ было установлено, что в структуре чувствительности преобладают умеренно чувствительные штаммы (55,4%), в то время как на долю высокочувствительных штаммов приходится 44,6% изолятов. В структуре чувствительности к ВалАЦВ наибольшая часть изолятов ВПГ находилась в зоне высокой чувствительности; доля нечувствительных штаммов к ВалАЦВ составила 0,9%.

Из литературы известно, что резистентность вируса к ЭП зависит от фенотипических свойств вируса, а также от особенностей макроорганизма хозяина [1, 2]. В связи с этим был проанализирован анамнез больных с нечувствительными штаммами вируса, который показал, что у 6 пациенток ГИ была установле-

ТАБЛИЦА

Режимы дозирования ЭП при лечении пациентов с ГИ в зависимости от спектра чувствительности инфицирующего агента

Препарат	Режимы дозирования и продолжительность лечения			
	лечение ГИ		супрессивная терапия ГИ**	
ВалАЦВ	500 мг 2 раза в сутки внутрь, 5—10 дней*	1-й день: 3 г однократно; 2-й день: 500 мг 2 раза в сутки внутрь	500 мг 1 раз в сутки внутрь	500 мг 2 раза в сутки внутрь при иммунодефиците
АЦВ	200 мг x 5 раз в сутки внутрь, 5—10 дней*	10 мг на 1 кг массы тела внутривенно каждые 8 часов, 5—10 дней	400 мг 2 раза в сутки внутрь	400 мг 3 раза в сутки внутрь

Примечание. * Стандартная схема применения препарата.

** Проведение супрессивной терапии зависит от выраженности симптоматики, вирусологического и иммунного статуса.

на более 5 лет назад, у 5 — более 10 лет назад. Ранее 8 из 11 пациенток получали три и более курсов терапии с АЦВ, но без видимого эффекта. У всех женщин исходно отмечался высокий уровень инфекционной активности вируса, который достоверно снижался в процессе лечения, однако не достигал нормальных значений. Заболевание протекало у данных пациенток на фоне выраженного иммунодефицита, обусловленного вирусной инфекцией.

В настоящее время в терапии ГИ главное место занимает стратегия, направленная на развитие персонализированной терапии, улучшающей качество жизни пациента, основными задачами которой является своевременная диагностика имеющегося заболевания, определение рисков и прогноза течения патологического процесса, подбор эффективных методов лечения и оценка их эффективности. Как правило, при ГИ противовирусная терапия назначается эмпирически без проведения вирусологических исследований, что в свою очередь не всегда сопровождается адекватным результатом. Поэтому для реализации поставленных задач требуется исследование как индивидуальных характеристик пациента, так и вирусного патогена. Проведение фенотипического исследования вируса показано при подозрении на неэффективность лечения, в том числе при сохранении высыпаний более 1 нед. после начала терапии, при появлении атипичных очагов поражения или новых высыпаний, несмотря на противовирусную терапию. Фенотипический метод исследования вируса является высокоспецифичным, информативным диагностическим средством в арсенале клинициста, позволяющим назначать оптимальную схему терапии для пациента в зависимости от характеристик возбудителя заболевания, контролировать эффективность

противовирусной терапии, выявлять устойчивость к терапии, корректировать дозы и режим введения препаратов [8].

Исходя из вышеизложенного, при выявлении у пациентов с ГИ штаммов, обладающих различным спектром чувствительности к ЭП, целесообразно назначение персонализированной терапии. Так, при выявлении высокочувствительных штаммов вируса показано применение АЦВ в стандартной дозировке (см. таблицу), в то время как при выявлении умеренно чувствительных штаммов возможно либо увеличение дозы АЦВ, либо замена таблетированной формы препарата на раствор АЦВ для инфузий с увеличением дозы до 10 мг на 1 кг массы тела каждые 8 ч., способной эффективно подавлять репродукцию вируса, либо использование препаратов с иным механизмом действия. Ранее сообщалось, что у пациентов с АЦВ-резистентностью при назначении ВалАЦВ или ФамЦВ вероятно развитие кросс-резистентности к пенцикловиру. Однако в нашей работе такой закономерности выявлено не было, что в свою очередь подчеркивает назначение ВалАЦВ в качестве препарата выбора при наличии резистентности к АЦВ [3, 6]. Для лечения пациентов с АЦВ-резистентными формами наиболее перспективным является использование препаратов с иным механизмом действия, отличным от аналогов нуклеозидов.

Вывод

Полученные данные свидетельствуют о том, что мониторинг чувствительности штаммов ВПГ к ЭП у больных с ГИ имеет большое значение для подбора оптимальной схемы лечения, повышения экономической эффективности терапии и качества жизни пациента. ■

Литература

1. Борисенко К.К. Генитальный герпес. Неизвестная эпидемия: герпес. Смоленск; 1997; 58—61, 75—83.
2. Davison A.J., Eberle R., Hayward G.S. et al. Family herpesviridae / In Virus Taxonomy. Eight report of the international committee on taxonomy of viruses 2005; 193—212.
3. Bacon T. H., Levin M. J., Leary J. J. et al. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 114—128.
4. ФГУ «ЦНИИОИЗ Минздравсоцразвития РФ» — www.mednet.ru
5. Weinberg A., Leary J.J., Sarisky R.T. et al. Factors that affect in vitro measurement of the susceptibility of herpes simplex virus to nucleoside analogues. J Clin Virology 2007; 38: 139—145.
6. Agut H., Boutolleau D., Deback C. et al. Testing the susceptibility of human herpesviruses to antivirals. Future Microbiol 2009; 4: 1111—1123.
7. Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Баринский И.Ф. Культуральный метод в диагностике герпесвирусных инфекций. Инфекционные болезни 2010; 8: 3: 24—28.
8. Swierkosz E.M, Hodinka R. L., Moore B. M. et al. Antiviral susceptibility testing: herpes simplex virus by plaque reduction assay. Approved standart. Clinical and Laboratory Standards Institute 2004; 24 (7): 1—39.