

Попков А.В.¹, Петрова С.В.¹, Пунько О.А.¹, Астахова Е.М.², Гашникова М.П.²,
Тотменин А.В.², Гашникова Н.М.²

Молекулярно-генетическое изучение современной эпидемии ВИЧ-инфекции в Тюменской области

1 - Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Тюменской области "Центр профилактики и борьбы со СПИД", Тюмень; 2 - Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирская область, Кольцово

Popkov A.V., Petrova S.V., Punko O.A., Astahova E.M., Gashnikova M.P., Totmenin A.V.,
Gashnikova N.M.

Molecular genetic study of the modern epidemic of HIV infection in the Tyumen region

Введение

Тюменская область (ТО) - одна из первых российских территорий, активно вовлеченных в эпидемию: в 1999 году в области было выявлено сразу 767, а в 2000 - 2067 человек с диагнозом ВИЧ-инфекция. Резкий подъем заболеваемости в 1999-2001 годах в ТО был связан с распространением опиоидных наркотических препаратов (ханки и героина), доля наркотического пути заражения составляла 78-98%. Максимальное количество случаев заражения регистрировалось в городе Тюмень и прилегающих к городу территориях: в 2000 году доля ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в Тюмени, составляла 73,6% от общего количества выявленных случаев заболевания. Уже в 2008 году ТО относилась к регионам России с высоким уровнем пораженности ВИЧ - 645,7 случаев на 100 тыс. населения, а общее количество инфицированных ВИЧ-1 в 2008 году приблизилось к 9 тыс. человек.

С 2008 года на рынке наркотиков появляются множество препаратов и рецептов кустарного приготовления наркотических средств, а во второй половине 2009 года в ТО, как следствие, отмечается подъем регистрации вновь выявленных случаев ВИЧ. В эпиданамнезе ВИЧ+ лиц ТО все чаще значится употребление синтетических психостимуляторов, так называемых «синтетиков» и «солей». Ситуация продолжала усугубляться и в последующие годы в связи с возросшей доступностью синтетических психостимуляторов, с распространением наркотических препаратов с выраженным эффектом сексуальной расторможенности, многие потребители наркотических средств начинают практиковать смешанное потребление препаратов - полинаркомания. По итогам 2011-14 годов было выявлено больше ВИЧ+ мужчин, чем женщин, что также свидетельствует об активизации наркотического пути инфицирования ВИЧ. Тем не менее, начиная с 2011 года, при абсолютном росте выявленных случаев заражения ВИЧ регистрируется стабильное снижение ежегодных темпов прироста заболеваемости. На 01.05.2016 года в ТО было зарегистрировано 18 423 случая ВИЧ-инфекции. По по-

казателю пораженности населения ВИЧ-инфекцией среди территорий Российской Федерации ТО находится на 8 месте (1107,0 ВИЧ+ лиц на 100 тыс. населения), а по заболеваемости - на 13 (106,6 на 100 тыс. населения).

Целью настоящего исследования являлось изучение молекулярно-генетических особенностей вариантов ВИЧ-1, выделенных от лиц, инфицированных на территориях Тюменской области.

Материалы и методы

В исследование вовлечены 74 человека с диагнозом ВИЧ-инфекция, проживающих в Тюменской области. Образцы крови были связаны с демографическими и клиническими данными посредством анонимных кодированных номеров по требованиям этических норм России. Все пациенты на момент забора крови не принимали АРВТ. Характеристики пациентов-доноров крови включали пол и возраст, путь инфицирования и предполагаемый период заражения, наличие практики употребления наркотических препаратов и вид наркотиков, вирусную нагрузку и количество клеток CD4 на момент постановки диагноза. Вирусная РНК была изолирована из 200 мкл плазмы с использованием наборов РеалБест ДельтаМаг в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Вектор-Бест, Россия). Амплификацию проводили с применением лиофилизированных наборов МастерМикс РТ (Вектор-Бест, Россия), содержащих компоненты РТ и ПЦР с добавлением разработанного лабораторного набора праймеров, позволяющих получить для каждого клинического образца по три фрагмента генома ВИЧ-1: два фрагмента гена pol, кодирующие область протеазы-ревертазы (PR-RT, протяженностью 1400 нт.), область интегразы (IN, 960 нт.) и фрагмент, кодирующий участок основного белка оболочки вируса - env (732 нт.). Определение нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом секвенаторе 3130xl (AppliedBiosystems, США). Все расшифрованные фрагменты областей генов pol и env были обработаны с помощью программы Sequencher 4.1 software (GeneCodesCorporation, AnnArbor, MI, USA).

Собранные последовательности фрагментов *pol* (PR-RT, IN) и области гена *env* сравнивались с соответствующими референс-последовательностями различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международной базы данных (LosAlamos HIV-1 database) с применением программ ClustalW Multiple alignment и BioEdit software 7.2.5. Филогенетический анализ выполняли с помощью MEGA 6.0.6 используя метод объединения ближайших соседей (neighbor-joining method, NJ) с бутстрепом 1,000 повторов на основе двухпараметрической модели Кимуры. Статистическую значимость топологии филогенетического дерева оценивали с помощью анализа бутстрепов. Новые рекомбинантные последовательности между субтипами или CRF были проанализированы с помощью программ идентификации рекомбинации (RIP <http://www.hiv.lanl.gov>), и SimPlot 3.5.1 используя окно 200 нуклеотидов и построением филогенетического дерева NJ, используя двухпараметрическую модель Кимуры. Для предсказания использования ко-рецепторов ВИЧ-1 проводился анализ последовательности V3-петли каждого варианта вируса с помощью Position-Specific Scoring Matrix (PSSM) (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>) и geno2phenoco-receptor(g2p) (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>), кроме того определяли наличие положительно заряженных аминокислотных остатков в специфических позициях кодонов 11 и/или 25 V3-петли). Анализ наличия мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью ВИЧ-1, проводили с помощью специализированного интернет-ресурса (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/>).

Результаты и обсуждение

Клинические и эпидемиологические данные пациентов.

С целью изучения современной молекулярно-эпидемиологической ситуации по распространению ВИЧ-1 в данное исследование были вовлечены 74 человека с диагнозом ВИЧ-инфекция. Для 2-х образцов с низкой концентрацией РНК ВИЧ-1 не были получены ВИЧ-специфические фрагменты необходимого размера и образцы были исключены из исследования. В результате исследуемая выборка включала 72 человека: 31 (43,1%) мужчин и 41 (56,9%) женщин, средний возраст пациентов составил 35 лет (23-60); 30 человек (41,7%) сообщили об употреблении инъекционных наркотиков (ПИН), 42 человека (58,3%) были инфицированы при гетеросексуальных контактах и один мужчина относился к MSM (1,3%). Среди группы ПИН 28,6% лиц указали внутривенное потребление героина и/или ханки в 46,4% случаев наряду с героинном/ханкой использовали соли и/или синтетические психостимуляторы, 25% лиц употребляли синтетические психоактивные вещества. 82,1% пациентов являлись жителями Тюмени, 17,9% проживали на территориях области. Для одного человека (образец №23) предполагаемой территорией инфицирования была указана другая территория РФ, для остальных – Тюмень/Тюменская область. Для 59,7% лиц можно было достоверно определить предполагаемый период инфицирования, так как они ранее обследовались

на ВИЧ. В том числе, 14,9% было инфицировано до 2010 года, для 37,3% из них период возможного инфицирования ВИЧ включал 2013-2015 гг. Анализ клинических данных позволил определить медиану показателей вирусной нагрузки и количества клеток CD4+: 2.2x10⁴ (5.0x10²–7.0x10⁶) копий/мл и 332 (2–1240) клетки/мкл для общей выборки и 2.2x10⁴ (5.0x10²–3.4x10⁵) копий/мл и 450 (46–1105) клеток/мкл для лиц, инфицированных в 2013-2015 гг, соответственно. Анализ клинико-эпидемиологических данных пациентов, вовлеченных в исследование, дает основания заключить, что настоящая выборка позволяет дать характеристику вариантам ВИЧ-1, распространившимся в период основной вспышки ВИЧ-инфекции 2000-2001 гг, а также описать особенности ВИЧ-1, определяющих современную эпидемию ВИЧ-инфекции в Тюменской области.

Анализ генетической гетерогенности вирусных вариантов, выделенных от ВИЧ-инфицированных лиц.

Для 72 лиц с диагнозом ВИЧ-инфекция из плазмы крови была выделена вирусная РНК и для вариантов ВИЧ-1 получены фрагменты, кодирующие протеазу-ревертазу (70 образцов), интегразу (68) и основной белок оболочки (50) ВИЧ-1. Для каждой из областей генома исследованных ВИЧ-1 был выполнен филогенетический анализ. Филогенетические деревья, построенные для нуклеотидных последовательностей гена *pol* (PR-RT, IN), приведены на рисунках 1-3. Генотипирование вирусов по области PR-RT показало, что один вариант ВИЧ-1 (Tumen11) объединился с кластером субтипаВ, один (Tumen22) – с кластером CRF03_AB, два образца (Tumen19, 33) – с кластером CRF63_02A1, оставшиеся исследованные варианты вируса распределились среди ВИЧ-1 субтипа А (A1).

По области IN ВИЧ-1 (рисунок 2) наблюдаемое следующее распределение изученных вирусов: вариант Tumen11 – группировался с субтипом В; Tumen31, относящийся к субтипу А ВИЧ-1 по области PR-RT, по области IN попал в кластер CRF63_02A1 ВИЧ-1, тогда как Tumen33, генотипированный по области PR-RT, как CRF63_02A1 ВИЧ-1, вместе с большинством вариантов ВИЧ-1 принадлежал кластеру субтипа А ВИЧ-1.

По области *env* подтвердилась топология Tumen11 (субтип В) ВИЧ-1, а варианты вируса Tumen31 и Tumen33 были генотипированы, как субтип А ВИЧ-1 (рисунок 3).

Филогенетический анализ позволил выявить несколько эпидемиологических сетей распространения ВИЧ-1. В частности, были обнаружены 6 пар генетически близких вариантов ВИЧ-1, достоверно объединявшихся на филогенетическом дереве, построенном на основе анализа PR-RT ВИЧ-1. Интересно, что пары объединяют варианты вируса, выделенные от лиц, инфицированных ВИЧ-1 в разные годы (Tumen13 и Tumen21, Tumen31 и Tumen58). Для 3-х из них топология ветвей подтверждалась и филогенетическим анализом последовательности IN и *env* ВИЧ-1 (Tumen17-67, Tumen13-21, Tumen16-48), что указывает на высокую вероятность эпидемиологической связи между названными парами пациентов.

Для пар Tumen18-42, Tumen23-39 ВИЧ-1 поддержка

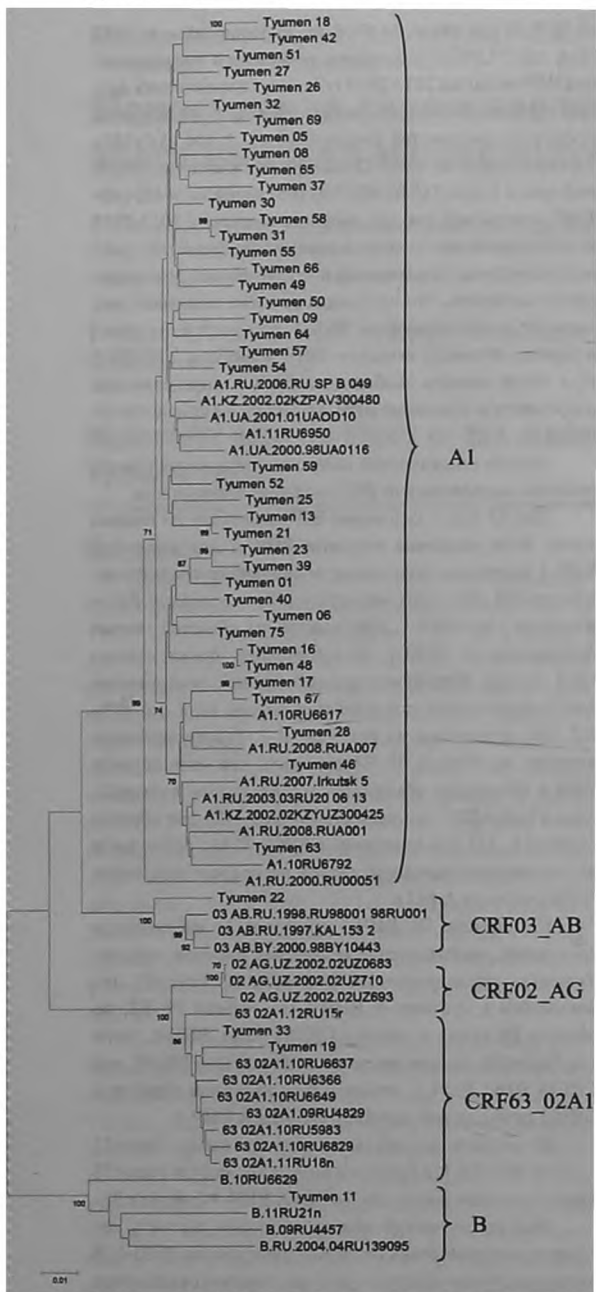


Рисунок 1. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей области гена pol (PR-RT) исследованных вариантов ВИЧ-1, выделенных в Тюменской области

их объединения в подветвь по области IN была ниже уровня достоверности, а варианты Tyumen31 и Tyumen58 по области IN вообще относились к разным геновариантам ВИЧ-1 (рисунки 1, 2). Полученные данные указывают на то, что пациенты Tyumen31, Tyumen18 и/или Tyumen42, Tyumen23 и/или 39 и имеют в анамнезе повторное инфицирование ВИЧ-1.

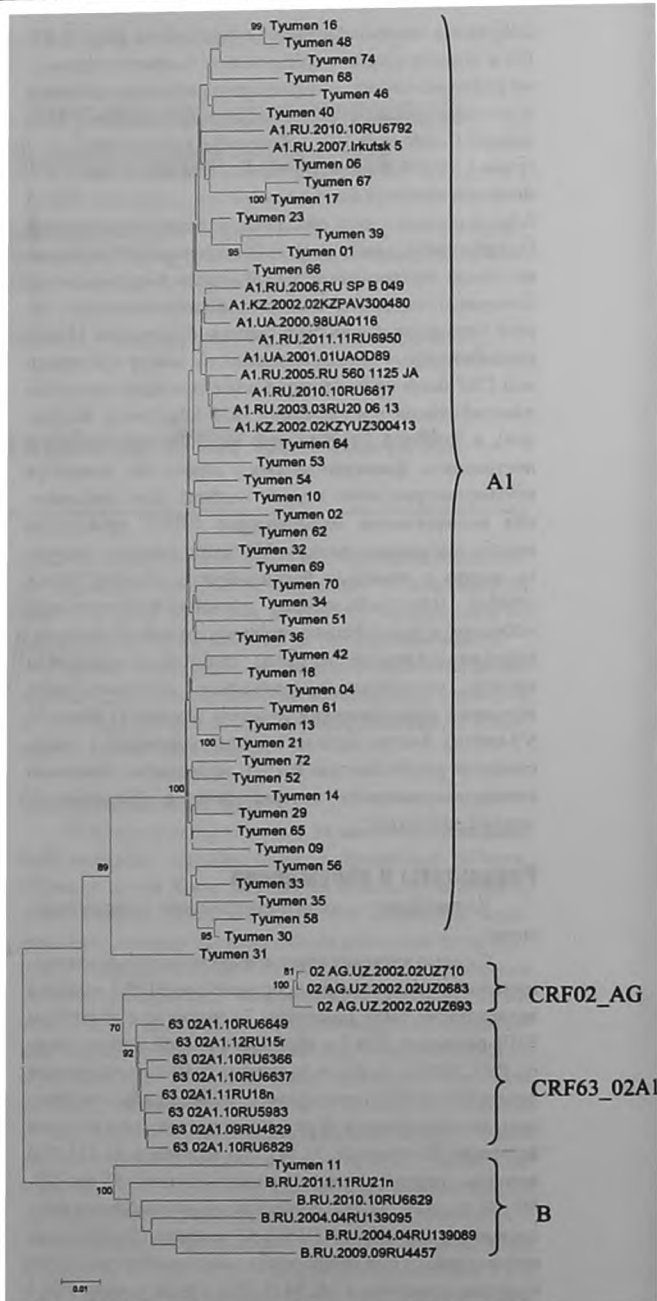


Рисунок 2. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей области гена pol (IN) исследованных вариантов ВИЧ-1, выделенных в Тюменской области

Суммируя результаты генотипирования, можно сделать заключение, что в Тюменской области доминирующим, определяющим развитие современной эпидемии, остается субтип А ВИЧ-1, распространенность которого регистрируется на уровне 93,1%, в группе риска МСМ продолжается циркуляция субтипа В ВИЧ-1,

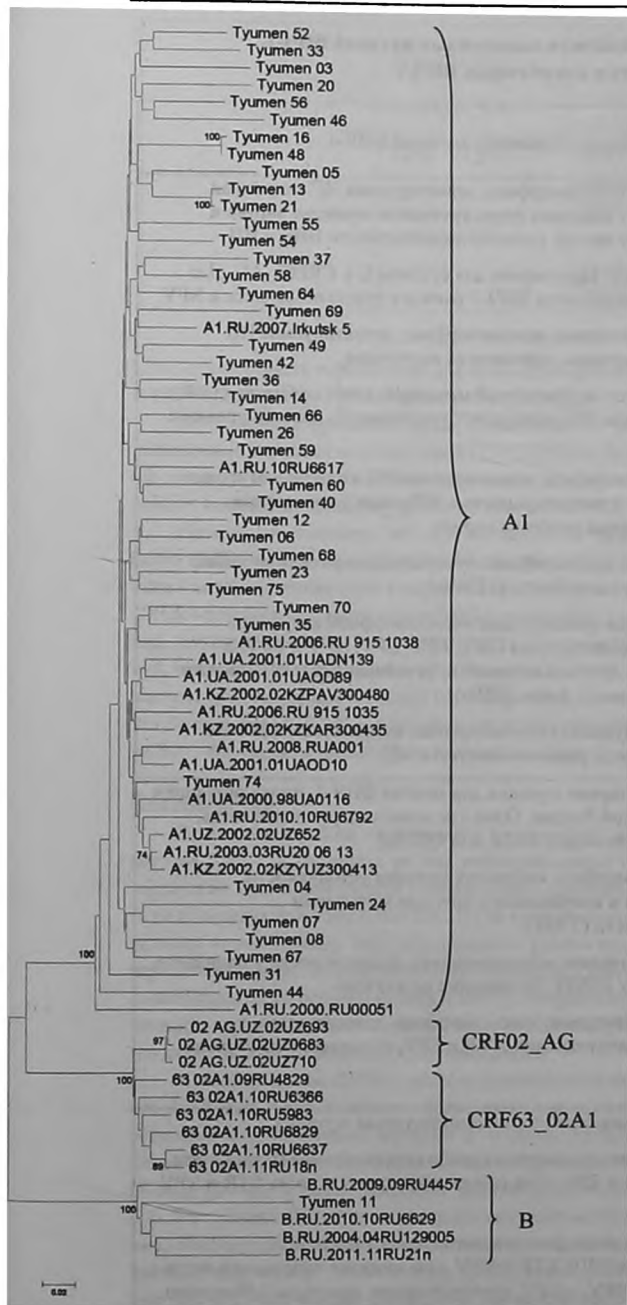


Рисунок 3. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей области гена env исследованных вариантов ВИЧ-1, выделенных в Тюменской области

который был выявлен в одном случае (1,4%). По одному случаю были найдены рекомбинантные формы ВИЧ-1 CRF63_02A1 (1,4%) и CRF03_AB (1,4%), в двух случаях (2,8%) были выявлены уникальные рекомбинантные формы URF63_A1 ВИЧ-1, мозаичный геном которых был частично идентичен субтипу А, частично – CRF63_02A1

(Tyumen31, Tyumen33).

Такие URF63_A1 ВИЧ-1, так называемые, вторичные рекомбинантные формы ВИЧ-1, могли возникнуть в организме лиц при повторном заражении разными генетическими вариантами (субтипа А и CRF63_02A1) ВИЧ-1. В данном случае один пациент (Tyumen31) в начале 2000-х практиковал употребление героина внутривенно, а позже имел незащищенные случайные половые контакты; второй пациент (Tyumen33) употребляет с 2012 года синтетические психотропные вещества внутривенно, в анамнезе у него отмечен наркотический контакт с ВИЧ+ партнером и случайные незащищенные половые контакты. Ни один из данных пациентов не выезжал за территорию Тюменской области, так же, как и пациент, инфицированный CRF63_02A1 (Tyumen1), из чего можно сделать предположение о циркуляции в Тюменской области генетических вариантов CRF63_02A1 и URF63_A1 ВИЧ-1.

Анализ первичной (передаваемой) резистентности и тропизма изученных вариантов ВИЧ-1.

Одним из перспективных классов анти-ВИЧ препаратов является группа ингибиторов интегразы (ИИ) ВИЧ-1. В России в современные схемы терапии ВИЧ-инфекции все шире внедряется ИИ исентресс (ралтегравир), планируется включение в перечень и других ИИ ВИЧ-1. Ингибиторы протеазы и обратной транскриптазы/ревертазы (ИП, ИОТ) ВИЧ-1 являются наиболее широко используемыми препаратами в клинической практике, поэтому актуальной является информация о первичной резистентности циркулирующих вариантов ВИЧ-1 к данным АРВП. Для всех нуклеотидных последовательностей, кодирующих протеазу, ревертазу и интегразу выделенных вариантов ВИЧ-1, был проведен анализ наличия мутаций, влияющих на чувствительность к ИП, НИОТ, ННИОТ и ИИ (таблица 1).

Результаты анализа выявили достаточно необычный набор мутаций ВИЧ-1, отличный от распространяющихся мутаций первичной резистентности, встречающихся среди вариантов ВИЧ-1 с других территорий. Среди циркулирующих в Тюменской области вариантов ВИЧ-1 были найдены лишь единичные случаи основных мутаций (с распространенностью 1,5-1,6%), определяющих резистентность ВИЧ-1 к ИП, ННИОТ и ИИ. Описанные вторичные (акцессорные) мутации ВИЧ-1, непосредственно связанные с развитием резистентности вируса к АРВП, также имели незначительную степень распространенности, что может являться благоприятным признаком современной территориальной эпидемии ВИЧ-инфекции.

Вместе с тем, среди изученных вариантов ВИЧ-1 с достаточно высокой частотой (в основном среди лиц, инфицированных в 2010-2015 гг) встречались мутации, способные улучшать репродуктивные характеристики ВИЧ-1 в присутствии ИП/снижать чувствительность к ИП (K20R, L10V, I, K20I и, возможно, T74S).

При мутационном анализе последовательностей, кодирующих интегразу ВИЧ-1, в 94% исследованных вирусом субтипа А встречалась мутация L74I. В этой связи

Таблица 1. Данные по спектру и распространенности выявленных мутаций ВИЧ-1, влияющих на чувствительность к ингибиторам ВИЧ-1

	Мутации ВИЧ-1, распространенность	Функциональная значимость мутаций ВИЧ-1
Мутации ВИЧ-1, связанные с резистентностью к ИП	K20R (13,1%)	K20R высоко полиморфная, селективируемая ИП вторичная мутация, улучшающая репродуктивные свойства вируса в присутствии других мутаций резистентности ВИЧ к ИП.
	K20I (5,2%)	K20I мутация, характерная для субтипа G и CRF02_AG. Для других геновариантов ВИЧ-1 снижает чувствительность к NFV.
	K20M (1,6%)	K20M относительно неpolиморфная, селективируемая ИП вторичная мутация, значение её не изучено.
	T74S (11,5)	T74S является полиморфной мутацией, слабо селективируемой большинством ИП, определяет устойчивость низкого уровня к ИП.
	L10V,I (6,6%)	L10I/V полиморфная, селективируемая ИП вторичная мутация, снижающая чувствительность к ИП и/или улучшающая репродуктивные свойства вируса.
	V82I (1,6%)	V82I высоко полиморфная, субстрат-специфичная мутация, характерная для субтипа G ВИЧ-1.
	L33F (1,6%)	L33F является относительно неpolиморфной вторичной мутацией, селективируется DRV, FPV, LPV, NFV и TPV. В сочетании с другими мутациями устойчивости к ИП снижает чувствительность к ним ВИЧ-1.
A71I (1,6%)	A71I относительно неpolиморфная, выявляется у ВИЧ-1 с множественной резистентностью к ИП.	
Мутации ВИЧ-1, связанные с резистентностью к НИОТ	A62V (8,2%)	A62V характерная мутация для многих ВИЧ-1, циркулирующих в Центральной России. Одна - не влияет на резистентность, только в комплексе с K65R или Q151M.
	V118I (6,6%)	V118I полиморфная вторичная мутация устойчивости, проявляется в комбинации с другими мутациями резистентности (TAM).
	T69S (4,9%)	T69S относительно неpolиморфная, селективируемая у пациентов, получающих НИОТ, её значение не изучено.
	K101Q,R (3,2%)	K101Q относительно неpolиморфная, селективируемая у пациентов, получающих NVP и EFV, её значение не изучено.
Мутации, связанные с резистентностью к НИИОТ	V179I (16,4%)	V179I полиморфная, часто селективируемая мутация.
	E138A (4,9%)	E138A общая полиморфная слабо селективируемая мутация при приеме ETR и RPV. Она снижает чувствительность ETR и RPV ~2-раза.
	Y181C (1,6%)	Y181C неpolиморфная, селективируемая у пациентов, получающих NVP, ETR и RPV. Она снижает чувствительность к NVP, ETR, RPV, и EFV, соответственно, примерно >50-кратно, 5-кратно, 3-кратно, и 2-кратно. Ассоциируется со сниженным ответом на режим с EFV.
	N108I (1,6%)	V108I относительно неpolиморфная, селективируемая у пациентов, получающих NVP, EFV и ETR. Вызывает низкое ~2-кратное снижение чувствительности к NVP и EFV, но не к ETR или RPV.
V90I (1,6%)	V90I полиморфная вторичная мутация, слабо селективируемая у пациентов, получающих НИИОТ, ассоциируется со слабым снижением чувствительности.	
Мутации, связанные с резистентностью к ИИ	L74I (94,0%)	L74I по информации Стэндфордского университета, данная мутация может выявляться в 23% наивных пациентов,

	T66I (1,5%)	инфицированных субтипом А ВИЧ-1. T66I основная мутация, селективируемая у лиц, принимающих EVG. T66I в 15 раз снижает чувствительность к EVG, не снижая к RAL или DTG. E157Q вторичная мутация, слабо селективируемая у лиц, принимающих RAL, in vitro селективируется на EVG. E157Q снижает чувствительность к RAL в 5 раз, к EVG в 2 раза. T97A полиморфная мутация, заависит от субтипа ВИЧ, селективируется RAL и EVG. В комбинации с Y143CR значительно снижает чувствительность к RAL.
	E157Q (1,5%)	
	T97A (1,5%)	

L74I можно считать характерной для популяции субтипа А ВИЧ-1, распространенной на данной территории.

Предсказание тропности исследуемых ВИЧ-1, использования вирусных ко-рецепторов CCR5/CXCR4, осуществляли с помощью анализа полученных аминокислотных последовательностей петли V3 гена env ВИЧ-1.

Необходимо отметить, что при исследовании тропности ВИЧ-1 нами были получены неожиданные результаты – выявлена необычайно высокая распространенность CXCR4-тропных вариантов среди ВИЧ-1, выделенных от лиц, инфицированных 1-5 лет назад (16,6%). Причем для лиц, от которых были выделены CXCR4 варианты ВИЧ-1, имелось подтверждение недавней ВИЧ-инфекции, так как эти пациенты в 2010-2013 годах проходили обследование на ВИЧ-инфекцию и имели отрицательный диагноз.

Заключение

Проведенная работа по изучению генетических вариантов ВИЧ-1, выделенных от лиц, инфицированных на территории Тюменской области в начале 2000-х (2000-2009 гг.) и в последующие годы (2010-2015 гг.) не выявила значительных отличий между циркулирующими в разные годы вариантами вируса. Доминирующим на территории Тюменской области был и остается субтип А ВИЧ-1. На филогенетических деревьях не было выявлено кластеризации ВИЧ-1 (по давности инфицирования, по группам риска).

К особенностям ВИЧ-1, распространяющихся после 2010 года, можно отнести более высокую частоту встречаемости вторичных мутаций в области, кодирующей протеазу вируса, влияющих на фитнес ВИЧ-1 (K20R, L10V,I) и более высокую распространенность CXCR4-тропных ВИЧ-1 среди недавно инфицированных лиц. Последние результаты значительно отличаются от данных, полученных коллегами из ЦНИИ эпидемиологии для циркулирующих российских вариантов ВИЧ-1 субтипа А. Проведенное ЦНИИ эпидемиологии в разных регионах исследование показало, что для субтипа А ВИЧ-1 характерной чертой являлось высокое сродство к ко-рецептору CCR5, что дает возможность без предварительного анализа использовать в терапии ВИЧ-инфекции лекарственные препараты - ингибиторы CCR5. Клинический опыт, изучение патогенеза ВИЧ-инфекции связывает появление в организме ВИЧ-инфицированных лиц CXCR4-тропных вариантов ВИЧ-1 с прогрессированием заболевания, переходом заболевания в стадию СПИДа. Результаты настоящего исследования указывают на не-

обходимость дополнительного изучения распространенности CXCR4-тропных вариантов ВИЧ-1 среди недавно инфицированных лиц.

Выявление в 3% исследованных клинических образцов, полученных от лиц, не выезжавших за пределы области, URF63_A1 ВИЧ-1 указывает на вероятность заноса на данную территорию новых, не распространявшихся ранее рекомбинантных геновариантов ВИЧ-1 (CRF63_02A1).

Обнаруженные при филогенетическом исследовании вариантов ВИЧ-1 различные эпидемические сети с одной стороны являются подтверждением распространения ВИЧ-инфекции из собственных очагов эпидемии, сформировавшихся в Тюменской области в предыдущие годы. С другой стороны, существование таких эпидемических цепочек, включающих варианты ВИЧ-1, имеющие высокую степень генетической идентичности, должно учитываться при корректном проведении эпидемических расследований. Установление степени генетической идентичности вариантов ВИЧ-1 обязательно должно проводиться по нескольким областям генома.

Опыт обнаружения уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 показал, что для проведения корректного анализа гетерогенности распространяющихся вариантов ВИЧ-1 необходимо исследовать не менее двух различных областей генома, выполняя сравнительный генспецифичный филогенетический анализ.

Попков Александр Владимирович - главный врач ГБУЗ ТО «Центр профилактики и борьбы со СПИД», заслуженный врач РФ; Петрова Светлана Владимировна - заведующая эпидемиологическим отделом ГБУЗ ТО «Центр профилактики и борьбы со СПИД»; Пунько Ольга Алексеевна - заведующая клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ ТО «Центр профилактики и борьбы со СПИД»; Гашишкова Наталья Матвеевна к.б.н., заведующая отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Топтменни А. В. к.б.н., заведующий лабораторией отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Астахова Е.М. старший лаборант-исследователь отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Гашишкова М.П. лаборант-исследователь отдела микростатических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Автор, ответственный за переписку - Гашишкова Наталья Матвеевна, телефон: +7(383)3634700, доп. 21-40; +79139405479; e-mail: ngash@vector.nsc.ru