

Л.Ю. ВОЛОВА, Л.А. ГРЕЗИНА, Т.И. УЛАНОВА

ГУЗ «Ямало-Ненецкий окружной центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, Ямало-Ненецкий автономный округ, Ноябрьск
ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 НА ТЕРРИТОРИИ ЯМАЛА И СРАВНЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ЗНАЧЕНИЯМИ «SCORE»

При определении генотипической резистентности ВИЧ методом секвенирования в качестве матрицы "референсного" штамма используют аминокислотную последовательность известного штамма НХВ-2, относящегося к субтипу В. Однако многочисленными исследованиями установлено, что на территории России широкое распространение приобрели не-В-субтипы ВИЧ. Данные, собранные нами, показывают, что значение low score-мутаций в российской популяции штаммов ВИЧ-1 пока не ясно и, несомненно, вызывает серьезный научный интерес и требует дальнейшего изучения. Ключевые слова: *ВИЧ-инфекция, лабораторная диагностика, ВИЧ-1, мутации, секвенирование, лекарственная устойчивость, эпидемиологический процесс, антиретровирусная терапия*

The amino acid sequence of the known strain НХВ-2 belonging to subtype В is used as a reference strain matrix to determine HIV genotypic resistance by the sequencing technique. However, numerous studies have ascertained that HIV non-B subtypes have been widely accepted in Russia. The authors' data show that the significance of low score mutations in the Russian populations of HIV-1 is yet to be explained, unquestionably, arouses great scientific interest, and calls for further study.

Key words: *HIV infection, laboratory diagnosis, HIV-1, mutations, sequencing, drug resistance, epidemiological process, antiretroviral therapy*

Применение антиретровирусных препаратов (АРВП) в терапии ВИЧ-инфекции вызвало необходимость определения резистентности вируса к применяемым препаратам. В связи с этим в лабораторную практику был внедрен метод секвенирования, который позволил выявлять мутации в области протеазы (П) и обратной транскриптазы (ОТ) гена *pol* ВИЧ-1. Зарубежный опыт по изучению мутаций резистентности опирается в основном на данные, полученные при изучении вируса иммунодефицита человека 1-го типа субтипа В. Поэтому в качестве референсного штамма зарубежными компьютерными программами (ViroSeq HIV-1, HIV db Program) предлагается аминокислотная последовательность штамма НХВ-2 (субтип В). Однако многочисленными исследованиями установлено, что на территории России широкое распространение приобрели не-В-субтипы ВИЧ [1,2]. Известно, что выявляемые мутации не равноценны по своей роли в развитии лекарственной устойчивости: одни мутации обуславливают низкий уровень устойчивости, другие — более высокий, а различные комбинации мутаций могут иметь синергический либо компенсаторный эффект.

С целью количественной оценки каждой мутации присваивают численные значения (*score*), коррелирующие с кратностью увеличения ингибирующей концентрации IC_{50} (концентрация АРВП, угнетающая репликацию ВИЧ на 50%) лекарственного препарата [4, 5]. Мутациям, увеличивающим IC_{50} более чем в 10 раз, присвоено значение *score* от 0,7 до 1,0 (*major score*). Мутациям с менее выраженным эффектом, увеличивающим IC_{50} в 3—5 раз,

присвоено значение *score* от 0,25 до 0,5 (*intermedia score*). Мутациям с наименьшим воздействием на развитие резистентности, имеющим низкое значение IC₅₀, присвоено значение *score* 0,1 (*low score*).

Известно, что для возникновения резистентности достаточно одной *major score*-мутации или двух и более *intermedia score*-мутаций. Для характеристики кумулятивного эффекта мутаций их численные значения (*score*) складываются с целью получения суммарного *score*. Считают, что мутации *low score* в сочетании *intermedia score* или при условии наличия нескольких *low score-мутаций* могут также привести к развитию резистентности. Однако роль многих мутаций *in vivo* окончательно не установлена.

Учитывая изложенное выше, целью настоящей работы было изучение причин формирования и выявления мутаций с различными значениями *score* в области П и ОТ у изучаемых штаммов и их связь с противовирусной терапией, а также выяснение селективных факторов, вызывающих отбор мутантных штаммов с различными значениями *score*. Кроме того, представлялось важным проследить связь *low score-мутаций* с генетическим подтипом ВИЧ-1.

Материалы и методы. Проведено 118 определений лекарственной резистентности ВИЧ для 96 пациентов с территории Ямала. Возраст пациентов на момент инфицирования варьировал от 4 мес до 54 лет, в среднем составил 25,1 года. Среди обследованных было 50 мужчин и 46 женщин. По этнической принадлежности пациенты распределились следующим образом: русских было 78, украинцев — 8, татар — 7, 2 ненца, 1 белорус. Основными факторами риска заражения ВИЧ-1 было употребление инъекционных наркотиков: 46 (52,6%) человек, гетеросексуальные контакты 48 (45,6%) человек и вертикальный путь передачи 2 (1,8%) человека.

Из 96 пациентов 76 человек обследованы для выявления лекарственной устойчивости однократно (76 исследований), 20 пациентов обследованы 2—3 раза (42 исследования). Среди указанных пациентов группу наивных пациентов составили 70 человек (77 тестов), группу леченых — 30 человек (41 тест).

Для выявления мутаций в гене *pol* использовали коммерческий тест ViroSeq™ HIV-1 фирмы "Abbot" (США). Эта тест-система обеспечивает все этапы лабораторной работы от выделения РНК до получения нуклеотидной последовательности исследуемого образца. Секвенирование проводили с использованием прибора ABI PRISM 3100 ("Applied Biosystems", США). Результаты секвенирования анализировали с помощью программы ViroSeq™ HIV-1. Субтип ВИЧ-1 определяли с помощью программы, разработанной в Стенфордском университете и представленной на сайте <http://hivdb.stanford.edu> с использованием программы HIV db Program (Genotypic Resistance Interpretation Algorithm версия 4.2.6., последнее обновление 10.12.07.).

Результаты и обсуждение. Проведенным исследованием определены нуклеотидные и аминокислотные последовательности П и ОТ у 118 образцов, полученных от 96 ВИЧ-1-инфицированных пациентов. При определении субтипа получены результаты, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Выявление субтипов ВИЧ у пациентов Ямало-Ненецкого центра СПИД

Субтип ВИЧ-1	В	А/В	Не-В-субтипы	В том числе				Итого
				А	CRF01_AE	CRF01_AE/A	A/CRF01_AE	
Количество пациентов	2 (2,1)	7 (7,3)	87 (90,6)	33 (34,4)	13 (13,5)	21 (21,9)	20 (20,8)	96 (100)

Примечание. В скобках - процент

При анализе результатов с помощью программного обеспечения было выявлено, что *major score*- и *intermedia score*-мутации были выявлены только на фоне проводимой

противовоспалительной (ПВТ)-терапии. В 16 (39%) случаях эти мутации определены в последовательности ОТ и лишь в 1 (2,4%) случае в последовательности П (табл. 2).

Таблица 2

Частота выявления мутаций устойчивости ВИЧ у пациентов Ямало-Ненецкого центра СПИД

Группа пациентов	Количество исследований	Количество случаев выявления, абс. (%)			
		<i>major score-</i> и <i>intermedia score-</i> мутации		<i>low score</i> -мутации	
		к ИОТ	к ИП	к ИОТ	к ИП
Наивные	77	0	0	14 (18,4)	75 (98,7)
Леченые	41	16 (39)	1 (2,4)	7 (17)	30 (100,0)

Примечание. Здесь и в табл.3: ИОТ – ингибиторы ОТ; ИП – ингибиторы П

Наиболее часто встречающиеся *major score-* и *intermedia score-* мутации приведены в табл. 3. **(на последней странице!!!)**

Мутации с *low score* обнаружены в последовательности ОТ у 18,4% наивных пациентов и у 17% пациентов, принимавших ПВТ, а в последовательности П у 98,7% наивных пациентов и у 100% пациентов, принимавших ПВТ (см. табл. 2). Таким образом, мутации *low score* встречались практически с одинаковой частотой как в группе пациентов, принимающих АРВП, так и у наивных пациентов. Наиболее часто встречающиеся *low score*-мутации приведены в табл. 3.

При анализе результатов у 20 пациентов, обследованных в динамике (двух- и трехкратно с интервалом 6—28 мес), установлено, что *low score*-мутации не исчезали и не появлялись на фоне проводимой терапии, в то время как *major score-* и *intermedia score-* мутации возникали на фоне приема противовирусных препаратов и переставали выявляться после отмены терапии. Таким образом, селективным фактором для отбора и закрепления в изучаемой популяции (как среди В-субтипов, так и среди не-В-субтипов) *major score-* и *intermedia score-* мутаций, бесспорно, является АРВП. В то же время причины селекции *low score*-мутаций в изучаемой популяции ВИЧ пока не ясны, возможно, они связаны противовирусной терапией только у В-субтипов.

Таблица 4

Частота встречаемости *low score*-мутаций у В- и не-В-субтипов

Показатель	Ингибитор										
	ОТ				П						
	мутация										
	A62V	A98G	T215I	G333E/D	M36I	L63P	V77I	L10I	L10F	L10V	K20R
	<i>Наивные</i>										
Встречаемость в образцах ЯНАО у не-В-субтипов (67 образцов),%	16,4	1,5	1,5	4,5	98,5	14,9	38,8	9	3	3	6
Встречаемость в образцах у В-субтипа [8] (6488 образцов),%	0	0	0	0	13	55	25	8	0	3	2
	<i>АРВП</i>										
Встречаемость в образцах ЯНАО у не-В-субтипов (31 образец),%	9,7	0	0	3,2	100	22,6	32,3	9,7	0	0	3,2
Встречаемость среди В-субтипа [8] (6620 образцов),%	2	3	1	11	35	78	27	42	13	7	15

Примечание. ЯНАО – Ямало-Ненецкий автономный округ

В табл. 4 сравнивается частота встречаемости *low score*-мутаций в исследованных нами штаммах не-В-субтипов и частота встречаемости этих мутаций среди штаммов В-субтипа (по данным сайта Стэнфордского университета). При этом видно, что *low-score*-мутации выявляли у не-В-субтипов гораздо чаще, чем у субтипа В (исключение составляет только мутация L63P). Так, мутацию M36I встречали практически тотально, что подтверждается результатами зарубежных авторов, согласно которым эта мутация свойственна вариантам не-В-субтипа и является полиморфным сайтом ВИЧ-1 [6].

Мутацию V77I встречали примерно в 1,5 раза чаще у изученных нами не-В-субтипов по сравнению с В-субтипом. По данным [7], V77I не исследована *in vivo*. Она регистрировалась *in vitro* при пассаже штамма NL4-3 в культуре клеток CEMX 174 на фоне увеличивающихся концентраций сангвинавира, ритонавира, индинавира. Мутация появлялась на поздних сроках пассажа и коррелировала с реверсией A71V. В изученном нами материале мутация V77I в последовательности П в 38% случаев выявлена в сочетании с мутацией A62V в последовательности ОТ. По данным зарубежных исследователей, мутация A62V относится к *intermedia score*-мутациям [1, 7], но вызывает формирование резистентности только в комбинации с Q151M. В наших исследованиях A62V не была ассоциирована с Q151M.

По данным А. Л. Сухановой и соавт. [3], распространенность мутаций V77I и A62V среди наивных пациентов в российской популяции ВИЧ-1 составляет 56,9 и 57,1% соответственно. В нашем случае распространенность этих мутаций была значительно ниже и составляла 38,8 и 16,4% (см. табл. 4).

Особое внимание привлекает мутация L63P, которую встречали в 3,5 раза реже у изученных нами не-В-субтипов по сравнению с В-субтипом ВИЧ-1. Кроме того, при динамическом обследовании пациентов, находящихся на терапии, эта мутация в одном случае появлялась на фоне терапии ингибиторами П, а в другом случае исчезала при их назначении.

Таблица 5

Различия в выявлении *major/intermedia* и *low score*-мутации у не В-субтипов

Мутация	Критерий сравнения		
	Появляются на фоне ПВТ	Исчезают при отмене ПВТ	Совпадение частоты встречаемости с В-субтипом
<i>Major score</i> и <i>intermedia score</i>	Да	Да	Совпадает
<i>Low score</i>	Нет	Нет	Не совпадает

На основании собранных нами на сегодняшний день данных прослеживаются существенные различия между *major/intermedia* и *low score*-мутациями, выявленными у не-В-субтипов (табл. 5). Однако истинные причины эволюционной селекции и закрепления *low score*-мутаций в российской популяции ВИЧ-1 пока не ясны и, несомненно, вызывают серьезный научный интерес и требуют дальнейшего изучения.

- Выводы.**
1. Эпидемия ВИЧ на Ямале характеризуется гетерогенностью популяции ВИЧ-1 подтипа А с тенденцией к доминированию рекомбинантных и мозаичных вариантов.
 2. В штаммах, изученных нами, наличие *major score*- и *intermedia score*-мутаций являлось свидетельством лекарственной резистентности.
 3. В штаммах, изученных нами, наличие *low score*-мутаций не было связано с развитием лекарственной резистентности.
 4. Формирование популяции ВИЧ-1 — сложный многогранный процесс. В отборе квазивидов вирусной популяции ВИЧ-1 участвуют не только противовирусные препараты, но и другие факторы.

5. Необходимо изучать связь мутаций не только с АРВТ, но и с другими возможными факторами эволюционной селекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика, лечение / Покровский В. В., Ермак Е. Н., Беляева В. В., Юрин О. Г. — М, 2000. - С. 374-379.
2. Волова Л. Ю., Грезина Л. А. // Журн. микробиол. — 2008. - № 4. - С. 92-95.
3. Суханова А. Л., Казенкова Е. В., Рудинский Н. И. // Вопр. вирусол. — 2004. — Т. 49, № 6. — С. 4—9.
4. Celera's ViroSeq HIV-1 Genotyping System. Celera Diagnostics, LLC. Копирайт 2001. - 2002. - С. 49-53.
5. De Gmtola V. // Antiviral Ther. - 2005. - Vol. 5, N 1. -P. 41-48.
6. KantorR., Kat&nstein D. // J. Clin. Virol. - 2004. - P. 152-159.
7. Los Alamos HIV Drug Resistance Database (http://resdb.lanl.gov/Resist_DB/).
8. Stanford University HIV Drug Resistance Database, (<http://hivdb6.stanford.edu>).

Опубликовано: Клиническая лабораторная диагностика. - 2010.-№2.- С.43-46

Таблица 3

Анализ встречаемости мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ (score указана в соответствии с данными [4])

Мутация в группах пациентов	<i>Major score-</i> и <i>intermedia score-</i> мутации в области ОТ, обуславливающие резистентность к НИОТ и ННИОТ										<i>Major score-</i> и <i>intermedia score-</i> мутации в области П, обуславливающие резистентность к ИП					<i>Low score-</i> мутации в области ОТ, не обуславливающие резистентность к НИОТ и ННИОТ				<i>Low score-</i> мутации в области П, обуславливающие резистентность к ИП					
	Выявленные мутации																								
	P25H	A62V	R70R/N	L74V	V75S	K101Q /E/N	K103N	V108I	M184V	G190S	K219Q	M46L	I54V	V82A /F/T/S	I84V	L90V	A98G	Y115F	V118I	G333D	L101F/V	K20R	M36I	L63P	V77I
	Значение выявленных score - мутаций																								
	0,25- 0,5	0,23*	0,25- 0,5	0,7- 1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5- 0,75- 1,0	0,7		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Наивные (76 случаев)	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	8	4	75	13	26
На фоне терапии ИОТ/ИП/ИОТ+ИП (42 случая)	1	3	2	1	2	3	2	2	3	4	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	3	1	42	11	11

Примечание. НИОТ – нуклеозидные ингибиторы ОТ; ННИОТ – нунуклеозидные ингибиторы ОТ; * - учитывается только в присутствии мутации Q151M