

24. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Garten W., Klenk H. Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Virol.* 1999; 73 (12): 10 158–63.
25. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Wolff T., Klenk H.-D. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.* 2002; 76 (4): 1617–25.
26. Zhirnov O.P., Klenk H.-D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis.* 2007; 12 (8): 1419–32.
27. Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76: 8682–9.
28. Zhirnov O.P., Klenk H.-D. Human influenza viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CACO-2 cells. *Virology.* 2003; 313: 198–202.
29. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A. et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (4): 322–33.
30. Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.-D. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antiviral Chem. Chemother.* 2011; 21: 169–74.
31. Zhirnov O.P., Klenk H.-D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral Res.* 2011; 92 (1): 27–36.
32. Zeng H., Goldsmith C., Thawatsupha P. et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *J. Virol.* 2007; 81 (22): 12 439–49.
33. Zielecki F., Semmler I., Kalthoff D. et al. Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. *J. Virol.* 2010; 84 (20): 10 708–18.

Поступила 15.11.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.98:578.828.6:578.53]-092:612.017.1.064(575)

**Е.В. Казеннова<sup>1</sup>, А.В. Васильев<sup>1</sup>, И.А. Лаповок<sup>1</sup>, А.Е. Гришечкин<sup>1</sup>, В.Ю. Лага<sup>1</sup>, Г.Г. Саламов<sup>2</sup>, А.С. Туманов<sup>1</sup>, О.А. Парыгина<sup>3</sup>, Л.А. Рузаева<sup>3</sup>, Л.А. Грезина<sup>4</sup>, Т.П. Серкина<sup>5</sup>, О.А. Кауфман<sup>6</sup>, Н.Д. Ооржак<sup>7</sup>, В.В. Лукашов<sup>8</sup>, М.Р. Бобкова<sup>1</sup>**

## Генетические варианты ВИЧ-1 в азиатской части России

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; <sup>2</sup>Медицинский информационно-аналитический центр РАМН, 107140, Москва; <sup>3</sup>Красноярский краевой, 660049, Красноярск; <sup>4</sup>Ямало-Ненецкий окружной, 629806, г. Ноябрьск; <sup>5</sup>Якутский республиканский, 677044, Якутск; <sup>6</sup>Курганский областной, 640007, Курган; <sup>7</sup>Тувинский республиканский центры по профилактике и борьбе со СПИДом, 667003, Кызыл; <sup>8</sup>Академический медицинский центр, Университет Амстердама, Нидерланды

Статья посвящена исследованию генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в азиатской части Российской Федерации в 2005–2010 гг.

Исследовано 427 образцов ВИЧ-1, собранных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Хабаровске, Магадане, Кургане, Красноярске, Ноябрьске (Ямало-Ненецкий округ), Якутии, Алтайском крае и Тыве. В качестве основных методов субтипирования прибегали к секвенированию нескольких областей генома ВИЧ-1 с последующим филогенетическим анализом или применением специализированных Интернет-ресурсов. Во всех обследованных в 2005–2010 гг. регионах продолжал доминировать вирус, принадлежащий к генетическому варианту подтипа А – IDU-A, характерному для эпидемии ВИЧ-инфекции в России. Этот вариант преобладал в группах потребителей инъекционных наркотиков и лиц, инфицированных гетеросексуальным путем.

Наряду с IDU-A в обследованных регионах встречаются и другие варианты ВИЧ-1, в первую очередь подтип В и рекомбинант CRF03\_AB.

Генетическое разнообразие ВИЧ-1 в целом остается невысоким. Отмечен рост генетической изменчивости среди индивидуальных случаев заражения IDU-A на территории азиатской части Российской Федерации в 2005–2010 гг. (2,6–6,8%) по сравнению с вариантами, распространенными на европейской части страны в 1996–1999 гг. (1%).

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; молекулярный мониторинг; азиатская часть России.

### HIV-1 Genetic Variants in the Asian Part of Russia: a Study (2005-2010)

**E. V. Kazennova<sup>1</sup>, A. V. Vasilyev<sup>1</sup>, I. A. Lapovok<sup>1</sup>, A. E. Grishechkin<sup>1</sup>, V. Yu. Laga<sup>1</sup>, G. G. Salamov<sup>2</sup>, A. S. Tumanov<sup>1</sup>, O. V. Parygina<sup>3</sup>, L. A. Ruzaeva<sup>3</sup>, L. A. Grezina<sup>4</sup>, T. P. Serkina<sup>5</sup>, O. A. Kaufman<sup>6</sup>, N. D. Oordjak<sup>7</sup>, V. V. Lukashov<sup>8</sup>, M. R. Bobkova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Medical Center for Information and Analysis, Russian Academy of Medical Sciences, 107140, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Krasnoyarsk AIDS Center, Russia; <sup>4</sup> Yamalo-Neenets AIDS Center, Russia; <sup>5</sup> Yakutsk AIDS Center, Russia; <sup>6</sup> Kurgan AIDS Center, Russia; <sup>7</sup> Tyva AIDS Center, Russia; <sup>8</sup> Academic Medical Center of Amsterdam University, Amsterdam, Netherlands

The HIV-1 genetic variants circulated in the Asian part of the Russian Federation in 2005-2010 were studied. The samples of HIV-1 (427 in total) were collected in Khabarovsk, Magadan, Kurgan, Krasnoyarsk, Noyabr'sk, Yakutsk, Altay, and Tyva. Sequencing of some genome regions followed by the phylogenetic analysis or specific Internet resource sampling were used as the main methods of the HIV subtyping. The domination of the IDU-A HIV-1 genetic variant typical of HIV-infection epidemic in Russia was shown in all regions tested in 2005-2010. This variant prevailed both in IDUs and heterosexuals. In addition to IDU-A, some other HIV-1 genetic variants were found among them: subtype B and recombinant CRF03\_AB. The HIV-1 genetic polymorphism in Russia was found to be low. An increase in the genetic distance among studied de novo samples was noted in the Asian part of Russia in 2005-2010 (2.6-6.8%) as compared to the European variants in 1996-1999 (10%).

Key words: HIV-infection, molecular monitoring, Asian part of Russia

Контактная информация:

Казеннова Елена Валерьевна; e-mail: kazennova@rambler.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Таблица 1

Массовая эпидемия ВИЧ-инфекции в России началась в 1996 г., после того как вирус попал в среду потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) с территории Украины. Ограниченное число заносов (если не единственный источник) и скорость, с которой распространялась инфекция, позволили в короткие сроки создать в стране уникальную ситуацию, когда подавляющее большинство ВИЧ-инфицированных составляли ПИН, зараженные однородным в генетическом отношении вирусом, принадлежащим к подтипу А ВИЧ-1 и получившим название IDU-A.

Молекулярный мониторинг проводился в течение всех лет эпидемии ВИЧ-инфекции и на начальных этапах, включая «наркотический», был сосредоточен практически полностью на европейской части России, в то время как азиатская ее часть оставалась «белым пятном» на мировой карте эпидемического процесса [1]. Между тем эпидемия ВИЧ-инфекции в восточных регионах страны, в целом начавшись несколько позже, чем в западной ее части, имеет ряд особенностей, которые могут отразиться на молекулярной структуре вирусной популяции. Одной из таких особенностей является значительное присутствие гетеросексуального пути передачи инфекции, характерного для второго этапа эпидемии.

В данной работе сделана попытка обобщить данные, полученные в ходе исследований, проведенных в регионах Сибири, Дальнего Востока и Якутии в 2005–2010 гг. несколькими группами ученых. Целью исследований были анализ распространенности и оценка соотношения основных генетических вариантов вируса, охарактеризованных на прежних этапах эпидемии ВИЧ-инфекции в России, в указанных регионах.

### Материалы и методы

Образцы крови были собраны от ВИЧ-инфицированных пациентов в 2005–2009 гг. в Хабаровске, Магадане, Кургане, Красноярске, Ноябрьске (Ямало-Ненецкий автономный округ), Якутии, Алтайском крае и Тыве. Общее число образцов составило 427, среди них 216 от ПИН и 175 от лиц, заразившихся гетеросексуальным путем, остальные случаи связаны с вертикальной передачей и переливанием инфицированной крови (табл. 1, 2). Среди пациентов находились как не получавшие терапию («наивные»), так и леченые. Все коллекции собраны благодаря активно-

Распределение обследованных пациентов по регионам азиатской части России\*

Регион регистрации случаев ВИЧ-инфекции	Годы сбора образцов и исследования	Число исследованных образцов
Алтайский край	2005	56
	2009	13
Красноярский край	2005	32
	2009	67
Курганская область	2006	19
Магаданская область	2005	23
Республика Саха (Якутия)	1998–2007	45
Республика Тыва	2006–2007	8
Хабаровский край	2005	34
Ямало-Ненецкий АО	1995–2010	130
Всего...		427

Примечание. Здесь и в табл. 2: представлено кумулятивное количество выявленных в регионе случаев ВИЧ-инфекции по данным на год исследования (<http://www.hivrussia.org>).

му участию сотрудников региональных центров по профилактике и борьбе со СПИДом.

Факторы риска, возможные места заражения, а также эпидемиологические связи с другими ВИЧ-инфицированными лицами выявляли в ходе опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Распределение обследуемых пациентов по основным факторам риска заражения ВИЧ-1 представлено в табл. 2. Кроме того, регистрировали возраст, пол пациента, дату забора клинического материала, дату и географический регион постановки диагноза «ВИЧ-инфекция». Сведения о применении/неприменении пациентом антиретровирусных препаратов получали, руководствуясь записями в амбулаторных картах. Весь полученный клинический материал использовали при информированном согласии пациентов.

В качестве объекта исследования были использованы препараты провирусной ДНК, выделенные из моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), либо препараты вирусной РНК, выделенные из плазмы крови, с применением традиционных методов. Значительная часть образцов провирусной ДНК была подвергнута предварительному исследованию методом сравнительного анализа подвижности

Таблица 2

Распределение исследованных пациентов по основным факторам риска заражения ВИЧ-1

Регион	ПИН	Гетеросексуальные контакты	Гомосексуальные контакты	Вертикальная передача	Переливание инфицированной крови	Прочие*	Всего, %
Алтайский край	28	27	0	0	0	1	56
Красноярский край	43	44	4	5	0	13	109
Курганская область	3	16	0	0	0	0	19
Магаданская область	10	13	0	0	0	0	23
Республика Саха (Якутия)	21	19	0	0	1	7	48
Республика Тыва	1	6	0	1	0	0	8
Хабаровский край	34						34
Ямало-Ненецкий АО	76	50	0	3	0	1	
Итого...	216	175	4	9	1	22	427

Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 среди обследованных пациентов

Регион	Под-тип А	Под-тип В	Рекомби-нант А/В	Рекомби-нант А/Е	Другие генети-ческие варианты	Всего
Алтайский край	69	0	0	0	0	69
Красноярский край	93	6	0	0	0	99
Курганская область	17	0	2	0	0	19
Магаданская область	22	0	1	0	0	23
Республика Саха (Якутия)	42	3	0	0	0	45
Республика Тыва	8	0	0	0	0	8
Хабаровский край	34	0	0	0	0	34
Ямало-Ненецкий АО	118	2	8	2	0	130
Итого...	403	11	11	2	0	427

гетеродуплексов (НМА) по областям генов *gag* или *env* [2, 3] и затем секвенирована по области гена *env*, кодирующей петлю V3 гликопротеина gp120. Часть образцов анализировали только методом прямого секвенирования генома. Образцы вирусной РНК из плазмы, как правило, исследовали по области гена *pol*, кодирующей протеазу и частично – обратную транскриптазу ВИЧ-1 с целью выявления мутаций лекарственной устойчивости в ходе терапии либо эпидемиологического мониторинга.

Исследования были проведены в разное время разными группами исследователей, поэтому способы анализа, наборы праймеров для амплификации нуклеотидных последовательностей и соответствующие им области генома различались. Для анализа гена *pol* ВИЧ-1 в Красноярске и Ноябрьске ЯНАО были использованы коммерческие тест-системы ViroSeq HIV-1 Genotyping System («Abbott Laboratories», США), доступные в диагностических лабораториях центров СПИДа. Остальные образцы исследовали в лаборатории вирусов лейкозов НИИ вирусологии (Москва) с применением in-house-наборов праймеров, описанных ранее [4–7].

В ходе анализа компьютерных текстов поиск последовательностей генома ВИЧ-1 проводили на Интернет-сайте Национальной лаборатории в Лос-Аламосе, США (<http://hiv-web.lanl.gov>). Генетические дистанции между нуклеотидными последовательностями рассчитывали по двухпараметрическому методу Kimura. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью метода «ближайших соседей». Оценку подтиповой принадлежности проводили либо методом построения филогенетического дерева, либо с применением специализированных Интернет-ресурсов COMET v0.1 (<http://comet.retrovirology.lu/>) и REGA v2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>). Достоверность установленных филогенетических связей оценивали методом bootstrap при 300–500 независимых построениях каждого филогенетического дерева. Все операции осуществляли с использованием программы Mega 4.0.2 (<http://www.megasoftware.net>).

### Результаты

*Алтайский край.* Исследования проводили ученые из НИИ вирусологии (2005) и Университета Амстердама (2009) [8]. Результаты анализа нуклеотидной последовательности гена *env* в НИИ вирусологии показали, что все изученные образцы ВИЧ-1, выделенные на территории Алтайского края, близки к варианту вируса подтипа А (IDU-A), ранее обнаруживаемого в других городах России и других республиках бывшего СССР (Казахстан, Беларусь, Узбекистан) [4, 5, 9–11].

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *env* продемонстрировал, что алтайские варианты ВИЧ-1 образуют две общие ветви (кластеры) с ранее опубликованными последовательностями двух близкородственных вариантов ВИЧ-1

подтипа А, выделенных в Казахстане, в Павлодаре и Караганде [6]. Это наводит на мысль о существовании как минимум двух заносов вируса ВИЧ-1 подтипа А на территорию Алтайского края.

Эти результаты подтвердились в результате сравнительных исследований гена *pol*, проведенных в Университете Амстердама: все 13 образцов ВИЧ-1 принадлежали к тому же варианту подтипа А ВИЧ-1 – IDU-A.

Таким образом, на территории Алтайского края в указанный период циркулировали преимущественно генетические варианты ВИЧ-1 подтипа А, характерного для других территорий Российской Федерации (табл. 3).

*Красноярский край.* На территории Красноярского края исследования проводили те же группы специалистов. В работе НИИ вирусологии (2005) образцы крови, полученные от 32 пациентов, анализировали с помощью НМА по генам *env* и *gag* (НМА/*env* и НМА/*gag*). Результаты анализа обоих генов свидетельствовали о том, что все образцы относятся к подтипу А ВИЧ-1. Полученные данные были подтверждены результатами анализа нуклеотидных последовательностей области гена *env*, кодирующей участок С2-V3 гликопротеина gp120 ( $n = 8$ ).

Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от красноярских пациентов представлены на рис. 1, из которого следует, что нуклеотидные последовательности гена *env* также образуют кластеры с последовательностями вариантов ВИЧ-1 подтипа А, выделенными в странах СНГ (Казахстан) и на территории РФ (Алтайский край).

Таким образом, на территории Красноярского края также циркулируют преимущественно генетические варианты ВИЧ-1 подтипа А, характерного для других территорий Российской Федерации.

В ходе анализа красноярских вариантов ВИЧ-1 по гену *pol*, проведенного несколько позднее – в 2009 г. [8], обнаружено несколько отличная от описанной картина. Исследование было проведено среди пациентов, испытавших неуспех терапии, с целью поиска мутаций ВИЧ-1, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, а также среди «наивных» пациентов. По данным филогенетического анализа большинство образцов вируса кластеризовалось с вариантами IDU-A ( $n = 74$ ), оставшиеся 6 образцов принадлежали к подтипу В. Наиболее интересной находкой оказалась тот факт, что 4 из 6 образцов были получены от

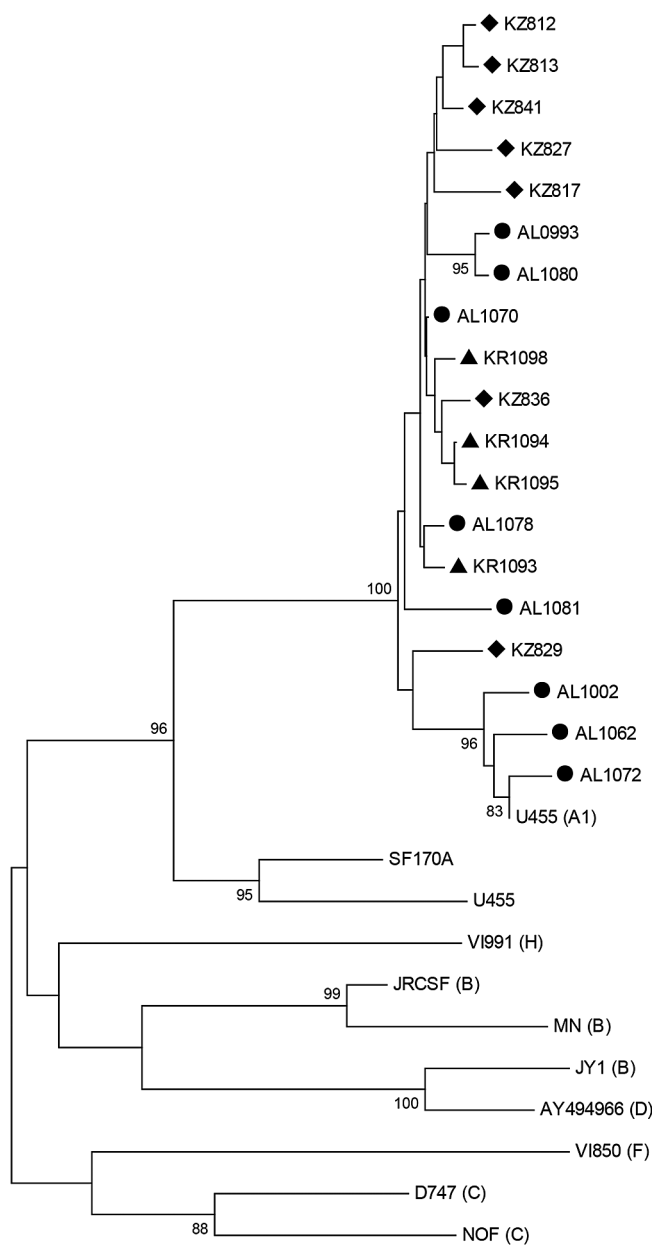


Рис. 1. Результаты филогенетического анализа фрагментов гена *env* ВИЧ-1 размером 231 п.н., кодирующих область V3-петли, в составе образцов из Красноярска, Алтая и Казахстана.

Включены референс-последовательности подтипов ВИЧ-1 и последовательности вариантов, типичных для стран бывшего СССР. Bootstrapping анализ проведен в 500 повторах, показаны значения  $\geq 80\%$ . Сокращенные названия вариантов подтипа А ВИЧ-1: KR – Красноярск, AL – Алтайский Край, KZ – Казахстан.

лиц, заразившихся гетеросексуальным путем, и лишь 2 – от мужчин, имеющих секс с мужчинами (группа MSM), среди которых варианты подтипа В встречались ранее.

**Курган.** Образцы из Кургана и Курганской области были доставлены в количестве 19 и исследованы в 2007 г. (НИИ вирусологии). Результаты анализа 6 из них, полученные при применении стандартного алгоритма исследования (РВИА → НМА → секвенирование → филогенез), были позднее подтверждены данными анализа с применением программ COMET v0.1 и REGA v2.0. Согласно всем полученным данным, у 16 пациентов в Кургане был обнаружен вари-

ант IDU-A, у трех оставшихся (гетеросексуалов) выявлялся рекомбинант CRF03\_AB.

**Магаданская область.** Результаты НМА-анализа генов *gag* и *env* (НИИ вирусологии, 2005) показали, что 22 образца относятся к подтипу А, а один является рекомбинантом А/В (у пациента, приехавшего в Магадан из Калининградской области, где рекомбинантная форма CRF03\_AB получила наибольшее распространение). Полученные данные были подтверждены результатами анализа нуклеотидных последовательностей области гена *env*, кодирующей участок С2-V3 гликопротеина gp120 ( $n = 10$ ).

В результате филогенетического анализа установлено, что некоторые нуклеотидные последовательности гена *env*, выявленные у ВИЧ-инфицированных лиц на территории Магаданской области, образуют общую ветвь (кластер) с нуклеотидными последовательностями вариантов ВИЧ-1 подтипа А, выделенных в Украине, а другие – с выявленными в РФ (Хабаровский край), что позволяет сделать предположение о множественных заносах вируса на территорию области.

Таким образом, среди анализированных образцов ВИЧ-1 из Магаданской области, как и с других территорий Восточной Сибири, доминирует вариант ВИЧ-1 генетического подтипа А.

**Якутия.** Коллекция сывороток и/или плазм и ДНК МКПК была собрана на территории Якутии от 48 лиц, зарегистрированных с диагнозом «ВИЧ-инфекция» в период с 1998 по 2007 г., и исследована в Институте вирусологии в 2008 г.

В результате анализа методами РВИА, ПЦР с последующим НМА-*gag/env* в 44 образцах выявлен вариант вируса *gagAenvA*, в двух – *gagBenvB*.

Филогенетический анализ области гена *env*, кодирующей V3 петлю (273 п.н.) 10 произвольно выбранных образцов с генотипом *envA* и 2 образцов с генотипом *envB* показал, что все нуклеотидные последовательности первой группы образуют общую ветвь с ранее полученными последовательностями той же области вариантов IDU-A, выделенных в других регионах страны в разное время, и референс-штаммами подтипа А1 [12]. Из двух пациентов второй группы один был инфицирован в результате гетеросексуальных контактов, а другой – при употреблении психоактивных препаратов внутривенно. Как следовало из филограммы, первый вариант образовывал субкластер с восточноевропейскими IDU-B-вариантами, выделенными на территории России и Украины [5, 6, 10]. Последовательность ВИЧ-1 второго пациента кластеризовалась с вариантами подтипа В от гомо- и гетеросексуалов, а также ПИН из Западной Европы, что свидетельствовало об ином источнике заражения пациента.

**Тыва.** Из 8 образцов, исследованных в 2006 г., лишь один был получен от мужчины – потребителя наркотиков, один ребенок заразился в результате вертикальной передачи, остальные (женщины) принадлежали к группе гетеросексуалов. Все методы исследования, примененные в отношении этой коллекции в Институте вирусологии, однозначно указывали на присутствие варианта IDU-A во всех образцах, кроме одного – у ПИН, инфицированного вариантом *gagAenvB*.

**Хабаровский край.** Анализ 34 образцов плазмы крови, полученных из Хабаровского края (НИИ вирусоло-

Генетическая изменчивость области гена *env* ВИЧ-1 в образцах, принадлежащих к подтипу А

Регион	Генетическая дистанция, %
Алтайский край	2,60±1,89
Красноярский край	2,63±1,03
Курганская область	6,72±1,93
Магаданская область	6,78±2,72
Республика Саха (Якутия)	6,70±4,50
Республика Тыва	Не определяли
Хабаровский край	1,59±0,42
Ямало-Ненецкий АО	Не определяли

### Обсуждение

Полученные результаты позволяют сделать однозначный вывод о доминировании в исследованных регионах азиатской части России того же генетического варианта подтипа А, который прежде вызвал эпидемию ВИЧ-инфекции в европейской части страны. Этот вывод нельзя назвать неожиданным, так как весь предшествующий ход эпидемии предсказывал именно такое развитие событий.

В истории эпидемии ВИЧ-инфекции в России можно выделить несколько этапов. Первый этап характеризовался низким числом случаев заражения и относительно высокой гетерогенностью популяции вируса, при этом основным путем передачи вируса были гомосексуальные и гетеросексуальные контакты [14, 15]. В охарактеризованных случаях преобладали подтип В ВИЧ-1 (35%), доминирующий среди мужчин, практикующих секс с мужчинами, и подтип G (35%), связанный с нозокомиальной вспышкой на юге России [4].

Второй этап начался в 1996 г., когда ВИЧ-1 проник в среду российских ПИН с территории Украины. Стремительное распространение вируса среди ПИН быстро привело к формированию уникальной молекулярно-эпидемиологической ситуации, когда подавляющее большинство инфицированных в стране составляли ПИН, при этом на территории всех регионов страны доминировал распространившийся из одного источника вариант подтипа А ВИЧ-1, получивший название IDU-A, и отличающийся крайне высокой гомогенностью структуры генома [4, 5]. Исключение составила изолированная от остальной территории России Калининградская область, где абсолютное большинство случаев ВИЧ-инфекции было связано с вариантом ВИЧ-1, образовавшимся в результате рекомбинации между IDU-A и ВИЧ-1 подтипа В, имеющим генотип gagA/envB и названным впоследствии CRF03\_AB (рис. 2).

Приблизительно в начале столетия (2001–2003) эпидемия вступила в новый, третий этап, когда в эпидемический процесс все интенсивнее стали вовлекаться лица, у которых основным фактором риска заражения являются гетеросексуальные контакты. К этому моменту массовая эпидемия уже захватила некоторые регионы азиатской части России, в других она только начиналась. Известно, что гетеросексуальная передача вируса от одного лица к другому замедлена по сравнению с передачей любым из гемоконтактных

логии, 2005), проведенный аналогично описанному в предыдущих разделах, продемонстрировал их высокое сродство с генетическими вариантами подтипа А, циркулирующими в соседних регионах (Иркутск, Красноярск, Алтай, Казахстан), при этом степень их генетической гетерогенности оказалась крайне низкой.

Ямало-Ненецкая АО. Исследование мутаций ВИЧ-1, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, позволяет параллельно проводить определение подтипа, ориентируясь на последовательность гена *pol*. Для этого на первых этапах исследования подтип ВИЧ-1 анализировали в программе HIVdb Program: Sequence Analysis (<http://hivdb.stanford.edu>). Однако позднее выяснилось, что эта программа ошибочно расценивает вариант IDU-A как рекомбинантную форму AE, поэтому в дальнейшем для определения генетического варианта ВИЧ-1 использовали другие программы (REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 2), <http://hivdb.stanford.edu> и COMET HIV-1, <http://comet.retrovirology.lu/>), результаты которых полностью совпадали с данными филогенетического анализа. Подробно эта работа описана в статье [13].

В результате анализа 130 образцов обнаружено, что из них 118 являются представителями подтипа А, по два образца относятся к подтипу В и рекомбинантной форме АВ, а еще два оказались истинными рекомбинантами AE, происходящими из Юго-Восточной Азии, что и подтвердилось в ходе тщательного эпидемиологического расследования.

Поскольку в данной работе была исследована только область гена *pol*, анализ генетической дистанции не проводили.

### Анализ генетической вариабельности варианта подтипа А ВИЧ-1 в области петли V3

Сравнение уровней генетической вариабельности в области петли V3 и прилегающих к ней областей С2 и С3 гена *env* проводилось между вариантами подтипа А ВИЧ-1, полученными из каждого исследованного региона, за исключением Тывы из-за малого числа данных секвенирования. Результаты этого анализа отражены в табл. 4.

Как видно из представленных данных, максимальные значения генетической дистанции (> 6%) были зарегистрированы в Кургане, Магадане и Якутии, а минимальные (< 2%) – в Хабаровском крае. Последний факт имеет простое объяснение: степень генетической гетерогенности, оказавшаяся крайне низкой, по-видимому, обусловлена общностью источников и ограниченным периодом заражения для большинства обследованных – ПИН, находящихся в условиях изоляции в исправительных учреждениях.

Что касается Магадана и Якутии – регионов, характеризующихся значительным наплывом временной рабочей силы из всех регионов России и СНГ, сложившаяся здесь ситуация позволяет предположить множественные заносы вируса на территорию области на протяжении эпидемии. В таких условиях уровень генетической вариабельности оказывается предсказуемо высок. Интересно отметить, что все образцы из Кургана принадлежали лицам, заразившимся половым путем, и хотя число секвенированных образцов было ограниченным, возможно, именно способом преимущественного заражения объясняется высокий уровень изменчивости вируса в этом регионе.

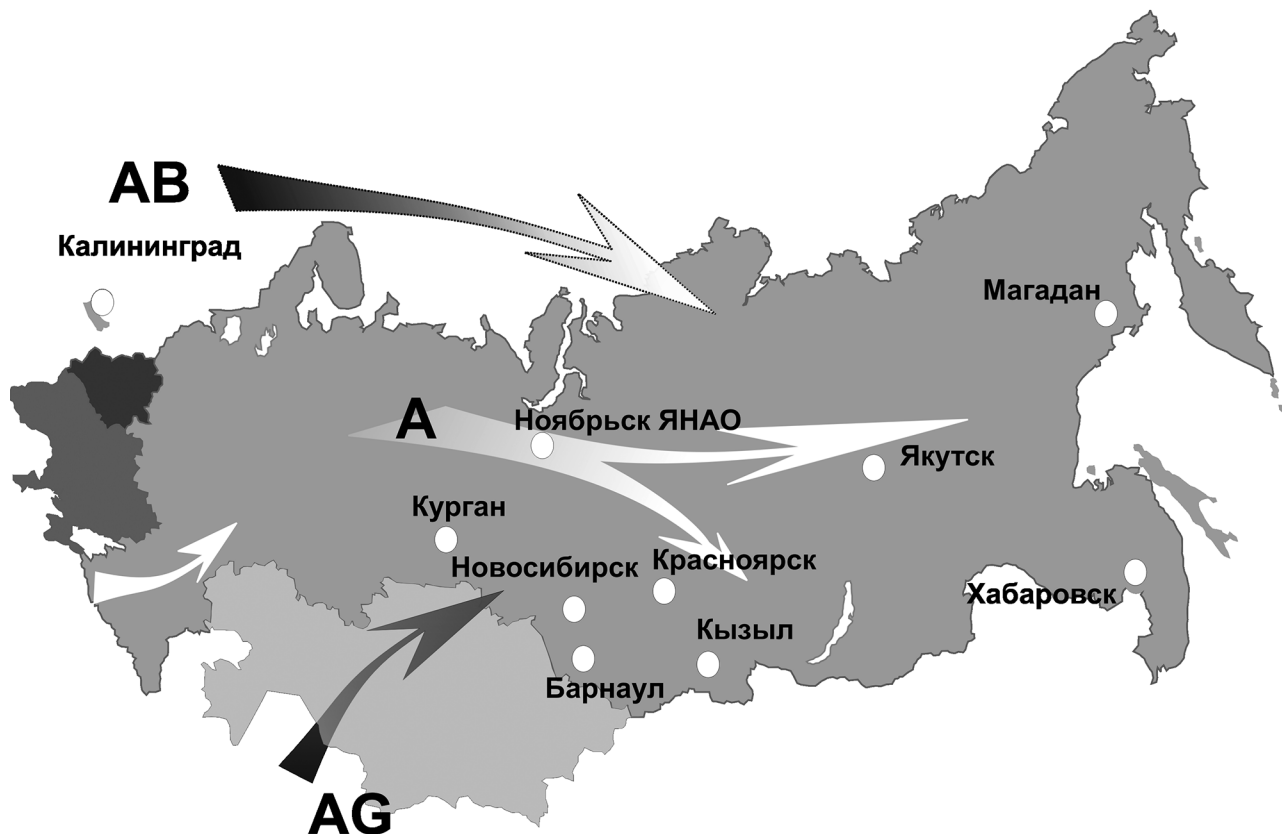


Рис. 2. Основные молекулярные варианты ВИЧ-1 на территории азиатской части России и их происхождение.

На карту нанесены города – центры регионов, где проводилось исследование в 2005–2010 гг. А – вариант IDU-A, доминирующий на всей территории страны; АВ – рекомбинантный вариант CRF03\_AB, типичный для Калининградской области; АG – рекомбинантный вариант CRF03\_AG, выявленный в Новосибирской области [3].

способов, а сам вирус получает возможность в течение периода циркуляции в пределах одного организма испытать на себе воздействие иммунной системы человека в виде клеточного и гуморального иммунного ответа. В этих условиях формировался молекулярный «ландшафт» эпидемии ВИЧ-инфекции в азиатской части страны.

Основным источником заражения лиц, проживающих в регионе, стали контакты с российскими ВИЧ-инфицированными пациентами, большинство которых, включая гетеросексуалов, ранее были инфицированы вирусом доминирующего варианта подтипа А, поэтому указанный вариант доминирует и в исследованном регионе.

Тем не менее некоторые особенности состава генетических вариантов в регионе обращают на себя внимание. В частности, значительно возросла генетическая варибельность доминирующего варианта IDU-A (2,6–6,8%) по сравнению с первыми годами эпидемии. Отчасти это объясняется естественной дивергенцией вируса от исходного варианта независимо от пути его передачи, отчасти, вероятно, связано с относительным замедлением распространения инфекции в результате смещения характера передачи в сторону гетеросексуального пути и связанным с ним повышением значения селекции под действием иммунной системы.

Другим заметным явлением стали несколько случаев обнаружения вируса подтипа В у гетеросексуалов в Красноярском крае и Якутии; ранее этот вариант встречался практически только в группе МСМ. Фе-

номен взаимного проникновения вариантов вируса между основными группами риска также можно было прогнозировать; относительная «закрытость» группы МСМ не позволяет пока дать ответ на вопрос, встречается ли в этой группе вариант подтипа А, однако на выяснение этого вопроса будут направлены ближайшие исследования.

Начиная с 2006 г. в Новосибирской области все чаще выявляется рекомбинантный вирус CRF02\_AG [16], происхождение которого связывают с присутствием в данном регионе заметного числа лиц из Центральной Азии, где этот вариант был выявлен раньше [9] (см. рис. 2). В настоящей работе не было выявлено ни одного случая заражения генетическим вариантом CRF02\_AG; возможно, причина этого состоит в том, что данное исследование проводилось в 2005–2010 гг., когда указанный вариант вируса еще не получил широкого распространения в Сибирском регионе и России в целом. Заметим, что в последние годы (2010–2012) единичные случаи обнаружения рекомбинанта CRF02\_AG становятся повсеместными.

Таким образом, как и предполагалось, основным фактором, определяющим генетическую гетерогенность популяции ВИЧ-1 в азиатской части России, является не географическое положение региона, а сложившиеся экономические и социальные связи, направление миграционных потоков и распространения наркотиков.

Вместе с тем в некоторых соседних странах, прежде всего в Китае, наблюдается распространение вариантов ВИЧ-1, отличных от циркулирующих в России и

странах СНГ, в частности подтипа В, и циркулирующих рекомбинантных форм CRF07\_BC и CRF08\_BC вируса в Китае [17] и Японии [18]. Усиливающиеся экономические и социальные связи с этими странами могут наложить свой «генетический отпечаток» и на эпидемию ВИЧ-инфекции, в первую очередь в приграничных районах Сибири и Дальнего Востока. Выяснение вопроса о реализации этой возможности является неотложным как для оценки эффективности используемых диагностических (в основном молекулярных) тестов, так и для формирования стратегии лекарственной терапии.

В части работы, касающейся анализа степени изменчивости ВИЧ-1, полученные результаты позволяют уверенно говорить об увеличении генетической дистанции между вариантами ВИЧ-1 в исследованных регионах по сравнению с первыми годами российской эпидемии, когда уровень генетической вариабельности не превышал 1%. По нашему мнению, одной из важнейших причин увеличения данного показателя является накопление значимых мутаций при половом пути передачи на протяжении сравнительно более длительной персистенции возбудителя в организме хозяина. Это предположение находит отклик в работе [19], где было продемонстрировано замедление скорости эволюции ВИЧ-1 (т. е. снижение генетической дистанции между циркулирующими вариантами, имеющими общего предка) в случае ускорения самой эпидемии. Логично предположить, что замедление эпидемии, связанное с ростом полового пути передачи, способно сказаться на изменчивости вируса обратным образом. Этот тезис будет подробнее исследован в будущих работах, в частности проводимых на территориях Сибири и Дальнего Востока страны.

### Выводы

1. Во всех обследованных в 2005–2010 гг. регионах азиатской части Российской Федерации продолжал доминировать вирус, принадлежащий к генетическому варианту подтипа А, характерному для второго периода эпидемии ВИЧ-инфекции в России.

2. Данный вариант ВИЧ-1 преобладал в обеих основных группах лиц, подверженных риску заражения, – потребителей инъекционных наркотиков и лиц, инфицированных гетеросексуальным путем.

3. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 в целом остается невысоким, однако отмечено его постепенное увеличение за счет взаимного проникновения вариантов вируса между группами риска, а также появления новых генетических вариантов.

4. Ретроспективный анализ области петли V3 и прилегающих к ней областей С2 и С3 продемонстрировал наличие тенденции к росту генетической изменчивости у вариантов подтипа А ВИЧ-1, получивших распространение на территории азиатской части Российской Федерации в 2005–2010 гг. (2,6–6,8%), по сравнению с вариантами, распространенными на европейской части страны в 1996–1999 гг. (1%).

Работа выполнена при финансовой поддержке Седьмой рамочной программы Европейского Союза по проекту: «Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)» № 223131 и Международного научно-технического центра (МНТЦ) по проекту № 3826.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Taylor B.S., Hammer S.M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359 (18): 1965–6.
2. Heyndrickx L., Janssens W., Zekeng L., Musonda R., Anagonou S., Van der Auwera G. et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J. Virol.* 2000; 74 (1): 363–70.
3. Dehwart E.L., Shpaer E.G., Louwagie J., McCutchan F.E., Grez M., Rubsamen-Waigmann H. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science.* 1993; 262 (5137): 1257–61.
4. Бобков А.Ф., Покровски В.В., Селимова Л.М., Ладная Н.Н., Казеннова Е.В., Карасева Н.Г. и др. Генетическое разнообразие вирусов иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) на территории России. Доклады Академии наук РФ. 1997; 353: 822–4.
5. Бобков А.Ф., Покровский В.В., Селимова Л.М., Ладная Н.Н., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. и др. Генетическая характеристика вариантов вируса иммунодефицита человека 1-го типа, вызвавших эпидемию среди наркоманов в странах СНГ. Вопросы вирусологии. 1998; 43: 253–6.
6. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Sukhanova A.L., Bobkova M.R., Pokrovsky V.V., Zeman V.V. et al. An HIV type 1 subtype A outbreak among injecting drug users in Kazakhstan. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2004; 20 (10): 1134–6.
7. Roudinskii N.I., Sukhanova A.L., Kazennova E.V., Weber J.N., Pokrovsky V.V., Mikhailovich V.M. et al. Diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtype A, CRF03\_AB protease in Eastern Europe: selection of the V771 variant, its rapid spread in injecting drug user populations. *J. Virol.* 2004; 78 (20): 11 276–87.
8. Rumyantseva O.A., Olkhovskiy I.A., Malysheva M.A., Ruzaeva L.A., Vasilyev A.V., Kazennova E.V. et al. Epidemiological networks, drug resistance of HIV type 1 in Krasnoyarsk region, Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2009; 25 (9): 931–6.
9. Kurbanov F., Kondo M., Tanaka Y., Zalaliev M., Giasova G., Shima T. et al. Human immunodeficiency virus in Uzbekistan: epidemiological, genetic analyses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2003; 19 (9): 731–8.
10. Lazouskaya N.V., Eremin V.F., Adema K.W., Gasic E.L., Baan E., Lukashov V.V. The HIV type 1 epidemic in Belarus: predominance of Eastern European subtype A strains, circulation of subtype B viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2005; 21 (9): 830–3.
11. Lukashov V.V., Karamov E.V., Eremin V.F., Titov L.P., Goudsmit J. Extreme founder effect in an HIV type 1 subtype A epidemic among drug users in Svetlogorsk, Belarus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1998; 14 (14): 1299–303.
12. Казеннова Е.В., Антонова О.В., Кузин С.Н., Серкина Е.П., Соколова С.С., Васильев А.В. и др. Молекулярно-эпидемиологическое исследование распространения ВИЧ-1 на территории Республики Саха (Якутия). Вопросы вирусологии. 2011; 56 (5): 30–4.
13. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Васильев А.В., Лага В.Ю., Грезина Л.А., Волова Л.Ю. и др. Проблемы субтипирования ВИЧ-1 на основе анализа гена pol и способы их разрешения. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия. 2010; (3): 42–8.
14. Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Selimova L., Kazennova E., Karasyova N., Kravchenko A. et al. Genetic heterogeneity of HIV type 1 in Russia: identification of H variants, relationship with epidemiological data. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1996; 12 (18): 1687–90.
15. Liitsola K., Laukkanen T., Denisova A., Grishkevichius A., Smolskaja T., Ustina V. et al. Genetic characterization of HIV-1 strains in the Baltic countries, Russia. *Scand. J. Infect. Dis.* 1996; 28 (6): 537–41.
16. Гашишкова Н.М., Сафронов П.Ф., Никонова Ю.В., Уназаева Н.В., Лантева Т.А. Свойства изолятов CRF02\_AG ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011; (3): 38–43.
17. Hemelaar J., Gouws E., Ghys P.D., Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS.* 25 (5): 679–89.
18. Kitsutani, P.T., Naganawa, S., Shiino, T., Matsuda, M., Honda, M., Yamada, K. et al. HIV type 1 subtypes of nonhemophilic patients in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998; 14 (12): 1099–103.
19. Maljkovic Berry L., Ribeiro R., Kothari M., Athreya G., Daniels M., Lee H.Y. et al. Unequal evolutionary rates in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pandemic: the evolutionary rate of HIV-1 slows down when the epidemic rate increases. *J. Virol.* 2007; 81 (19): 10 625–35.

### REFERENCES

1. Taylor B.S., Hammer S.M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359 (18): 1965–6.
2. Heyndrickx L., Janssens W., Zekeng L., Musonda R., Anagonou S., Van der Auwera G. et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J. Virol.* 2000; 74 (1): 363–70.

3. Delwart E.L., Shpaer E.G., Louwagie J., McCutchan F.E., Grez M., Rubsamens-Waigmann H. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science*. 1993; 262 (5137): 1257–61.
4. Бобков А.Ф., Покровский В.В., Селимова Л.М., Ладная Н.Н., Казеннова Е.В., Карасева Н.Г. и др. Генетическое разнообразие вирусов иммунодефицита человека I-го типа (ВИЧ-1) на территории России. Доклады Академии Наук РФ. 1997; 353: 822–4.
5. Бобков А.Ф., Покровский В.В., Селимова Л.М., Ладная Н.Н., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. и др. Генетическая характеристика вариантов вируса иммунодефицита человека I-го типа, вызвавших эпидемию среди наркоманов в странах СНГ. Вопросы вирусологии. 1998; 43: 253–6.
6. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Sukhanova A.L., Bobkova M.R., Pokrovsky V.V., Zeman V.V. et al. An HIV type 1 subtype A outbreak among injecting drug users in Kazakhstan. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004; 20 (10): 1134–6.
7. Roudinskii N.I., Sukhanova A.L., Kazennova E.V., Weber J.N., Pokrovsky V.V., Mikhailovich V.M. et al. Diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtype A, CRF03\_AG protease in Eastern Europe: selection of the V77I variant, its rapid spread in injecting drug user populations. *J. Virol.* 2004; 78 (20): 11 276–87.
8. Rumyantseva O.A., Olkhovskiy I.A., Malysheva M.A., Ruzaeva L.A., Vasilyev A.V., Kazennova E.V. et al. Epidemiological networks, drug resistance of HIV type 1 in Krasnoyarsk region, Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2009; 25 (9): 931–6.
9. Kurbanov F., Kondo M., Tanaka Y., Zalaliev M., Giasova G., Shima T. et al. Human immunodeficiency virus in Uzbekistan: epidemiological, genetic analyses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2003; 19 (9): 731–8.
10. Lazouskaya N.V., Eremin V.F., Adema K.W., Gasich E.L., Baan E., Lukashov V.V. The HIV type 1 epidemic in Belarus: predominance of Eastern European subtype A strains, circulation of subtype B viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2005; 21 (9): 830–3.
11. Lukashov V.V., Karamov E.V., Eremin V.F., Titov L.P., Goudsmit J. Extreme founder effect in an HIV type 1 subtype A epidemic among drug users in Svetlogorsk, Belarus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998; 14 (14): 1299–303.
12. Kazennova E.V., Antonova O.V., Kuzin S.N., Serkina E.P., Sokolova S.S., Vasilyev A.V. et al. Molecular, epidemiology studies of HIV-1 prevalence in the Republic of Sakha (Yakutia). *Voprosy virusologii*. 2011; 56 (5): 30–4 (in Russian).
13. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Vasilyev A.V., Laga V.Yu., Grezina L.A., Volova L.Yu. et al. Problems of HIV-1 subtyping on the base of pol gene, ways of their resolving. *VICH-infektsiya i immunosuppressii*. 2010; (3): 42–8 (in Russian).
14. Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Selimova L., Kazennova E., Karasyova N., Kravchenko A. et al. Genetic heterogeneity of HIV type 1 in Russia: identification of H variants, relationship with epidemiological data. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996; 12 (18): 1687–90.
15. Liitsola K., Laukkanen T., Denisova A., Grishkevichius A., Smolskaja T., Ustina V. et al. Genetic characterization of HIV-1 strains in the Baltic countries, Russia. *Scand. J. Infect. Dis.* 1996; 28 (6): 537–41.
16. Гашикова Н.М., Сафронов П.Ф., Никонорова Ю.В., Уназаева Н.В., Лантева Т.А. Свойства изолятов CRF02\_AG ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011; (3): 38–43.
17. Hemelaar J., Gouws E., Ghys P.D., Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS*. 2007; 21 (5): 679–89.
18. Kitsutani, P.T., Naganawa, S., Shiino, T., Matsuda, M., Honda, M., Yamada, K. et al. HIV type 1 subtypes of nonhemophilic patients in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998; 14 (12): 1099–103.
19. Maljkovic Berry I., Ribeiro R., Kothari M., Athreya G., Daniels M., Lee H.Y. et al. Unequal evolutionary rates in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pandemic: the evolutionary rate of HIV-1 slows down when the epidemic rate increases. *J. Virol.* 2007; 81 (19): 10 625–35.

Поступила 20.09.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 615.276.2/4.015.2:615.371].03:616.98:578.833]-084

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

## Иммуномодуляторы и специфические инактивированные вакцины в экстренной профилактике экспериментальных арбовирусных инфекций

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва

Выявлена достоверная эффективность защитного действия отечественных иммуномодуляторов (ИМ) ридостина, полирибоната, глюкозамурамилдипептида, милайфа и пептидогликана-160 при экспериментальных инфекциях на мышах, спровоцированных вирусом восточного энцефаломиелита лошадей (альфа-вирусная инфекция) и вирусами клещевого энцефалита (КЭ) и желтой лихорадки (флавивирусная инфекция). Эффект экстренной специфической профилактики достоверно возрастает при сочетании применения этих отобранных иммуностимуляторов со специфическими вакцинами. При альфа-вирусной инфекции сочетанное действие специфической вакцины и ридостина сопровождалось повышением уровня специфического гуморального иммунитета (специфические антитела) и клеточного иммунитета (адоптивный перенос иммунных лимфоцитов). Сочетанное использование специфической вакцины и ИМ ридостина может быть рекомендовано для клинических испытаний при КЭ в очагах инфекции.

Ключевые слова: *арбовирусная инфекция; иммуномодулятор; вакцина; иммунитет.*

### Immunomodulators and Specific Inactivated Vaccines in Urgent Prophylaxis under Experimental Arboviral Infection

*I. F. Barinsky, L. M. Alimbarova, A. A. Lazarenko, A. A. Davydova*

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

A reliable protective activity of the home-manufactured immunomodulators (ridostin, polyribonate glucose-muramyl-dipeptide, Mylife, and peptidoglycane-160) was detected in mice. The mice were infected with the equine eastern encephalomyelitis virus (EEEV, an alphavirus), or with the tick-borne encephalitis virus (TBEV), or the yellow fever (YF) virus (both flaviviruses). The effect of the urgent vaccination reliably increases when the vaccination is combined with the immunomodulators listed above. Under the alphavirus infection, the combined effects of the vaccine and ridostin were accompanied with increased specific humoral and cellular immune response (virus-specific antibodies and adoptive transfer of immune lymphocytes). The combined application of the specific vaccine and ridostin can be recommended for clinical trials of TBE in the foci of infection.

Key words: *arbovirus infection, immunomodulator, vaccine, immune response*

Контактная информация:

Баринский Игорь Феликсович, д-р мед. наук, проф.; e-mail: barinsky@mail.ru