

Носик М.Н.<sup>1</sup>, Киселева И.А.<sup>1</sup>, Бочкова М.С.<sup>2</sup>, Рыжов К.А.<sup>1</sup>, Кравченко А.В.<sup>3</sup>, Покровский В.В.<sup>3</sup>

## Создание панели изолятов вируса иммунодефицита 1-го типа, резистентных к антиретровирусным препаратам

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 115088, Москва; <sup>2</sup>ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; <sup>3</sup>ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва

Создана панель из 16 изолятов ВИЧ-1, выделенных от больных, которые получали лечение и у которых была выявлена резистентность к лекарственным препаратам. Показано, что данные изоляты обладают устойчивостью к нуклеозидным аналогам ингибитора обратной транскриптазы (ОТ) (ретровир, эпивир) и ненуклеозидным аналогам ингибитора ОТ (вирамун). Изоляты характеризуются стабильной репродукцией вируса. Средний показатель процента клеток, экспрессирующих вирусный Аг, составил 14–20%. Инфекционный титр вируса составил 2,4 Ig ТЦИД<sub>50</sub>. При анализе нуклеотидных последовательностей выделенных изолятов установлено, что все они относятся к субтипу А, доминирующему на большей части РФ. Данная панель может служить биотехнологической базой для изучения антиретровирусных препаратов нового поколения и создания экспериментальных вакцинных препаратов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; панель изолятов ВИЧ-1; резистентность к АРВ-препаратам.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(1): 24–27.

Nossik M.N.<sup>1</sup>, Kiseleva I.A.<sup>1</sup>, Bochkova M.S.<sup>2</sup>, Ryzhov K.A.<sup>1</sup>, Kravtchenko A.V.<sup>3</sup>, Pokrovsky V.V.<sup>3</sup>

### A panel of the drug-resistance HIV-1 clinical isolates

<sup>1</sup>I.I. Mechnikov Research institute for Vaccines and Sera, 115088, Moscow, Russia; <sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia

A panel of 16 HIV-1 isolates was designed. Those isolates were isolated from patients undergoing HAART and developing resistance to the antiretroviral drugs. It was shown that the isolates were resistant to nucleoside RT inhibitors (retrovir, epivir) and non-nucleoside inhibitors (viramun). Isolates had stable replication activity. Average rate of cells expressing viral Ag was 14–20%. The infectious titer was 2.4 Ig TCID<sub>50</sub>. The sequencing showed that all isolates were of the subtype A dominating in the major part of Russian Federation. This panel could be used as the biotechnological base for studying antiretroviral drugs of new generation and for the design of experimental vaccines.

Key words: HIV-infection; panel of HIV-1 isolates; drug resistance.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 24–27. (In Russ.)

В силу широкой распространенности применения высокоактивной антиретровирусной (АРВ) терапии формирование резистентности у ВИЧ-инфицированных лиц к лекарственным препаратам приобретает все большее значение. К сожалению, возникновение штаммов ВИЧ, устойчивых к действию АРВ-препаратов, неизбежно вследствие высокой скорости репликации вируса, приводящей к большой частоте мутаций в вирусном геноме, а также в связи с тем, что АРВ-терапию необходимо проводить на протяжении всей жизни пациента.

Все больше появляется сообщений о передаче резистентных штаммов ВИЧ лицам, которые ранее не проходили АРВ-терапию, в результате чего проводимое лечение не дает положительных результатов [1–4]. В настоящее время в странах Европы и Соединенных Штатах Америки у 16–27% пациентов, не получавших ранее АРВ-терапию, и у 50–70% пациентов, прошедших АРВ-терапию, лечение не дает никаких положительных результатов [5, 6]. В странах с низким и средним уровнем дохода уровень передачи резистентных штаммов ВИЧ лицам, которые ранее не проходили АРВ-терапию, остается пока довольно низким (3,7%) и не превышает 5% [7]. В России этот показатель составляет 1% [8–10]. Но с учетом увеличивающегося доступа к АРВ-терапии неизбежно, что в нашей стране мы тоже столкнемся с

проблемой резистентности штаммов ВИЧ-1 к АРВ-препаратам. Это потребует корректировки существующих схем лечения и разработки новых лекарственных препаратов.

Цель данной работы состояла в создании панели изолятов ВИЧ 1-го типа (ВИЧ-1), резистентных к АРВ-препаратам, применяемым в настоящее время, для изучения АРВ-препаратов нового поколения.

### Материалы и методы

*Изоляты вируса.* Вирус выделяли из крови ВИЧ-инфицированных лиц старше 18 лет и с их письменного информированного согласия по стандартной методике [11].

*Клетки.* В работе использовали перевиваемые лимфобластоидные клеточные линии MT-4 и Jurkat из коллекции «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, а также лимфоциты периферической крови (ЛПК), которые выделяли по стандартной методике [1, 2]. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров, 100 мкг/мл гентамицина. Жизнеспособность клеток определяли подсчетом количества живых и погибших клеток после их окрашивания 0,1% раствором трипанового синего.

*Исследование репродукции вируса* проводили на мо-

дели неинфицированных лимфобластоидных клеток MT-4, Jurkat. Клетки инфицировали лизатом ЛПК пациентов и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> 98% влажности в течение 5–10 дней до момента учета результатов. Учет результатов проводили окрашиванием клеток тетразолиевым красителем («Sigma», США) и спектрофотометрией и методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого иммуноферментного набора фирмы «Биорад» (Франция) на фотометре «Мультискан», световой микроскопией: исследование цитопатического действия (ЦПД) вируса на клетки и вирусиндуцируемого синцитийобразования (синцитий – конгломерат нескольких клеток с общей клеточной оболочкой, образовавшейся в результате слияния их мембран).

**Иммунофлюоресценция.** Реакцию непрямой иммунофлюоресценции для определения уровня T4-, T8-лимфоцитов и клеток, экспрессирующих антигены ВИЧ, проводили с использованием набора моноклональных антител (производства ГУ НИИ иммунологии Минздрава России на микроскопе «Оптон», Германия).

**Исследование противовирусного действия химиопрепарата.** Исследуемый препарат добавляли к клеткам и инфицировали вирусом в дозе 0,01 ТЦИД<sub>50</sub>/клетка. Применяли три разные схемы введения:

- за 1 ч до заражения клеток вирусом;
- одновременное заражение клеток вирусом и внесение препарата;
- через 1 ч после заражения клеток.

Инкубировали культуры клеток при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности 5–6 дней. Результаты учитывали по оценке жизнеспособности клеток при помощи красителя, наличию ЦПД и вирусиндуцируемого синцитийобразования, а также по наличию антигена вируса в культуральной жидкости (иммуноферментная тест-система для выявления антигена р24 ВИЧ-1 ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-скрин НПО «Диагностические системы»).

Степень цитодеструкции оценивали под микроскопом по общепринятой четырехкрестовой системе знаками + или - соответственно количеству погибших клеток в каждой из четырех лунок, соответствующих одному исследуемому показателю.

++++ – 100% гибель клеток в четырех лунках, использованных в опыте на одно разведение;

+++ – 75% гибель клеток в каждой из четырех лунок;

++ – 50% гибель клеток в каждой из четырех лунок;

+ – 25% гибель клеток в каждой из четырех лунок.

Степень защиты клеток от цитодеструктивного действия вируса определяли по формуле:

$$\% \text{ защиты} = A - B / K - B \cdot 100,$$

где *A* – количество жизнеспособных клеток в опытной группе; *B* – то же в инфицированной культуре (контроль вируса); *K* – то же в неинфицированной культуре (контроль клеток).

**Анализ нуклеотидных последовательностей.** Генетический анализ области, кодируемой геном *pol*, проводили с помощью субтипспецифических праймеров, подходящих для изучения вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории России [12]. Рассчитали и синтезировали праймеры, комплементарные наиболее консервативной области генома ВИЧ – фрагменту гена *pol* – гену обратной транскриптазы (ОТ), которые позволяют выявлять с высокой эффективностью большинство субтипов ВИЧ-1, в особенности субтип А, наиболее распространенный на территории РФ. Последовательности подбирали по консенсусной последовательности субтипа А, взятой из базы данных генетических последовательностей национальной лаборатории Los Alamos, с помощью программы для подбора праймеров Oligo 7. Проверку

Таблица 1

Клинико-эпидемиологические показатели у пациентов с ВИЧ-инфекцией, проживающих в Центральном федеральном округе

Половой состав	Возраст, годы	Стадия заболевания	Количество РНК-копий в 1 мл	Количество CD4 <sup>+</sup> -клеток в 1 мл
Женщина	29	IVБ	61 718	313
Мужчина	21	IVA	36 303	177
Мужчина	20	IVБ	22 934	266
Мужчина	24	IVБ	42 114	154
Мужчина	29	IVБ	40 235	147
Мужчина	33	IVБ	37 794	268
Женщина	24	III	4 289	340
Мужчина	32	III	8 772	352
Мужчина	36	III	29 596	223
Мужчина	36	IVA	3 668	200
Мужчина	33	IVA	17 590	226
Женщина	22	IVA	17 699	301
Мужчина	33	III	1 102	285
Мужчина	31	IVA	93 051	105
Мужчина	38	IVA	18 590	280
Мужчина	30	IVA	7 103	287

проводили по базе данных, используя консенсусные последовательности всех субтипов ВИЧ-1 и последовательностей ДНК человека с помощью программы Vector NTI Advance.

Для анализа субтипов использовали данные HIV Drug Resistance Database.

### Результаты и обсуждение

В ходе работы были собраны образцы крови от 16 ВИЧ-инфицированных лиц, получающих АРВ-

Таблица 2

Схема лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией АРВ-препаратами

НИОТ	ННИОТ	ИП	ИС
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
Комбивир	Эфавиренц	–	–
Ламивудин	Этравирин	Дарунавир	Энфувиртид
Диданозин + зидовудин	Эфавиренц	–	–
Зидовудин + ламивудин	Эфавиренц	–	–
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
Диданозин + некавир	Невиррапин	–	–
Комбивир	Эфавиренц	–	–
Диданозин + зидовудин	Эфавиренц	–	–
Комбивир (ламивудин + зидовудин)	Невиррапин	–	–
Зидовудин + ламивудин	Невиррапин	–	–
Абакавир + диданозин	–	Дарунавир	–
Ламивудин	Эфавиренц	Атазанавир	–
АЗТ + диданозин	Эфавиренц	–	–
Комбивир (ламивудин + зидовудин)	Эфавиренц	–	–

Примечание. АЗТ – азидотимидин.

Таблица 3

## Фенотипические и генотипические свойства выделенных изолятов

Субтип	Клетки, экспрессирующие Ag, %	Наличие синцития	Инфекционный титр вируса, Ig ТЦИД <sub>50</sub>
A	20	-	2,0
A	15	+	2,0
A	20	-	2,5
A	15	-	2,0
A	19	-	2,5
A	20	-	3,0
A	18	+	2,0
A	23	+	2,5
A	16	-	2,5
A	14	+	2,0
A	18	+	2,0
A	14	+	2,5
A	16	+	3,0
A	14	+	2,0
A	15	+	2,0
A	30	-	3,5

терапии и проживающих на территории Центрального региона РФ. В исследованную группу изолятов ВИЧ-1 входили вирусы, выделенные от ВИЧ-инфицированных лиц, находившихся на III (25%) и IV (75%) стадии ВИЧ-инфекции (классификация В.И. Покровского). Эффективность выделения вирусов составила 100%. При серологическом анализе сывороток крови методом ИФА и иммуноблотта выявили наличие антител к детерминантам ВИЧ-1. Клинико-эпидемиологические показатели обследованных лиц представлены в табл. 1.

Среди обследованных 81% составили мужчины и 19% женщины. Средний возраст больных 29,4 года, женщины моложе мужчин (25 и 30,5 года соответственно).

Больные получали лечение комбинацией препаратов, относящихся к нуклеозидным и нуклеозидным аналогам ингибитора ОТ (НИОТ и ННИОТ), а также ингибиторами протеазы (ИП) и ингибитором связывания (ИС) вируса с мембраной клетки (табл. 2).

Результаты исследований изолятов на мононуклеарных клетках крови и лимфобластоидных клеточных линиях показали, что для изолятов характерна стабильная репродукция вируса, сопровождаемая характерным цитопатическим действием и синцитиообразованием (табл. 3). Клетки, экспрессирующие вирусный Ag, составили в среднем 14–20%. Инфекционный титр вируса, определяемый по 50% тканевой цитопатической дозе вируса на культуре клеток, составил 2,4 Ig ТЦИД<sub>50</sub>.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на АРВ-терапию, полностью подавить репликацию вируса не удастся. Это подтверждается и данными, полученными в ходе проверки антивирусного действия химиопрепаратов разных классов (табл. 4).

В ходе проверки антивирусного действия НИОТ (ретровир, эпивир) и ННИОТ (вирамуно) показано, что они не оказывают противовирусного действия в отношении вируса, вследствие чего показатель защиты клеток от инфицирования не достигает 50%. При этом отмечена выраженная цитодеструктивная дегенерация клеток. Между тем при внесении аналогичных препаратов в культуру клеток, инфицированных референс-штаммом,

Таблица 4

## Исследование противовирусной активности химиопрепаратов

№ изолята	ЦПД	Защита, %		
		НИОТ		ННИОТ
		ретровир, 2,67 мкг/мл	эпивир, 5 мкг/мл	вирамуно, 5 мкг/мл
Контроль клеток	0		98	
Контроль вируса	4		47	
Контроль вируса	0	93	85	91
1	4	33	31	20
2	3	44	39	34
3	4	31	29	30
4	3	39	40	45
5	3	48	45	45
6	3	39	38	40
7	3	37	39	42
8	4	32	34	30
9	4	36	38	37
10	4	39	42	44
11	4	35	37	40
12	3	44	40	45
13	4	38	38	41
14	4	22	20	39
15	3	42	44	43
16	4	30	33	28

наблюдается защитное действие химиопрепаратов (процент защиты 85–93%). Это свидетельствует о том, что штаммы устойчивы к лекарственным препаратам данного класса.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей выделенных изолятов установили, что все они относятся к субтипу А, доминирующему на большей части РФ [9, 13, 14].

Все 16 изолятов, выделенных от больных, которые получали АРВ-терапию и у которых выявлена резистентность к лекарственным препаратам, депонированы в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России (№ депонентов 1188, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216, 1217, 1218).

Таким образом, в ходе работы создана панель из 16 изолятов ВИЧ-1, выделенных от больных, которые получали лечение и у которых выявлена резистентность к лекарственным препаратам, широко применяющимся в АРВ-терапии: к НИОТ и ННИОТ. Данная панель может служить биотехнологической базой для изучения АРВ-препаратов нового поколения и создания экспериментальных вакцинных препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naïve to the antiretroviral drugs. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 111. doi: 10.1186/1471-2334-9-111.
2. Hrazic M., Pellegrin I., Deveaux C. et al. Genotypic drug resistance during HIV-1-primary infection in France (1996–1999): frequency and response to treatment. *AIDS.* 2002; 16: 793–6.
3. Lapadula G., Izzo I., Gargiulo F. et al. Updated prevalence of genotypic resistance among HIV-1 positive patients naïve to antiretroviral therapy: a single center analysis. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 747–53.

4. Little S., Holte S., Routy J. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 385–94.
5. Hirsch M.S., Gunthard H.F., Schapiro J.M. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an international AIDS society-USA panel. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47: 266–85.
6. Shafer R.W., Rhee S.Y., Bennett D.E. Consensus resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antivir. Ther.* 2008; 13: 59–68.
7. WHO HIV drug resistance fact sheet. Available at: [http://www.who.int/hiv/facts/drug\\_resistance/en/index.html](http://www.who.int/hiv/facts/drug_resistance/en/index.html)
8. Nosik M., Ryzhov K., Kravtchenko A. et al. Genotypic Analyses of HIV in antiretroviral drug-naïve patients from Moscow and Moscow Region, Russia. In: *Proceedings 6th IAS conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention*. 2011, July 17–20; Rome; Italy: CDA002.
9. Казеннова Е.В., Антонова О.В., Кузин С.Н. и др. Молекулярно-эпидемиологическое исследование распространения ВИЧ-1 на территории Республики Саха (Якутия). *Вопросы вирусологии*. 2011; 5: 30–4.
10. Рахманова А.Г., Петрова Л.В., Яковлев А.А. и др. Результаты определения резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных больных по материалам ГИБ № 30 им. С.П. Боткина. В кн.: *2-я конференция по вопросам ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и Центральной Азии (EECAAC 2008)*. 2008, Май 3–5; Москва. М.: 2008: 90.
11. Маренникова С.С., Степанова Л.Г., Носик М.Н. и др. О штаммовых особенностях циркулирующего в СССР ВИЧ-1 по данным изучения его свойств в клеточных культурах. *Вопросы вирусологии*. 1991; 5: 356–61.
12. Носик М.Н., Рыжов К.А., Киселева И.А., Кравченко А.В., Покровский В.В. Биологические свойства штаммов вируса иммунодефицита человека, выделенных от ВИЧ-инфицированных лиц на территории России за 2009–2010 гг. *ЗНИСО*. 2011; 4: 31–4.
13. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Pokrovsky V.V. et al. The genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 circulating in the territory of Russia. In: *Proceedings 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*. 2009; July 19–22; Cape Town; South Africa: CDA034.
14. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Kravtchenko A.V. et al. Epidemiological monitoring of HIV-infection in the territory of Russia. In: *VIII Miedzynarodowej naukowii-praktycznej konferencji Dynamika naukowych Badan-2012*. 2012; July 7–15; Przemysl; Poland; Nauka I studia; 8: 72–4.
- during HIV-1-primary infection in France (1996–1999): frequency and response to treatment. *AIDS*. 2002; 16: 793–6.
3. Lapadula G., Izzo I., Gargiulo F. et al. Updated prevalence of genotypic resistance among HIV-1 positive patients naïve to antiretroviral therapy: a single center analysis. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 747–53.
4. Little S., Holte S., Routy J. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 385–94.
5. Hirsch M.S., Gunthard H.F., Schapiro J.M. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an international AIDS society-USA panel. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47: 266–85.
6. Shafer R.W., Rhee S.Y., Bennett D.E. Consensus resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antivir. Ther.* 2008; 13: 59–68.
7. WHO HIV drug resistance fact sheet. Available at: [http://www.who.int/hiv/facts/drug\\_resistance/en/index.html](http://www.who.int/hiv/facts/drug_resistance/en/index.html)
8. Nosik M., Ryzhov K., Kravtchenko A. et al. Genotypic Analyses of HIV in antiretroviral drug-naïve patients from Moscow and Moscow Region, Russia. In: *Proceedings 6th IAS conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention*. 2011, July 17–20; Rome; Italy: CDA002.
9. Kazennova E.V., Antonova O.V., Kuzin S.N. et al. Molecular-epidemiological study of HIV-1 in the territory of Saha Republic (Yakutia). *Voprosy virusologii*. 2011; 5: 30–4. (in Russian)
10. Rakhmanova A.G., Petrova L.V., Yakovlev A.A. et al. Results of study of HIV drug resistance among HIV patients basing on clinical material from S.P. Botkin State Infectious Disease Clinic N 30. In: *2nd Conference on HIV/AIDS in Eastern Europe and Central Asia (EECAAC 2008)*. 2008, May 3–5 [2-ya konferentsiya po voprosam VICH/SPID v Vostochnoy Evrope i Tsentral'noy Azii (EESAAS 2008)]. 2008, May 3–5; Moscow. (in Russian)
11. Marennikova S.S., Stepanova L.G., Nosik M.N. et al. Biological properties of HIV-1 strains circulating in the USSR. *Voprosy virusologii*. 1991; 5: 356–61. (in Russian)
12. Nosik M.N., Ryzhov K.A., Kiseleva I.A., Kravtchenko A.V., Pokrovsky V.V. *Biological properties of HIV-strains isolated from HIV-infected individuals in the territory of Russia in 2009–2010 years*. *ZNiSO*. 2011; 4: 31–4. (in Russian)
13. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Pokrovsky V.V. et al. The genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 circulating in the territory of Russia. In: *Proceedings 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*. 2009; July 19–22; Cape Town; South Africa: CDA034.
14. Ryzhov K.A., Nosik M.N., Kravtchenko A.V. et al. Epidemiological monitoring of HIV-infection in the territory of Russia. In: *VIII Miedzynarodowej naukowii-praktycznej konferencji Dynamika naukowych Badan-2012*. 2012; July 7–15; Przemysl; Poland; Nauka I studia; 8: 72–4.

## REFERENCES

1. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naïve to the antiretroviral drugs. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 111. doi: 10.1186/1471-2334-9-111.
2. Hrazic M., Pellegrin I., Deveaue C. et al. Genotypic drug resistance

Поступила 23.05.13

Received 23.05.13