

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 616.98:578.826.8]-092:612.017.1.064]-078

Лебедев А.В.^{1,4}, Нешумаев Д.А.², Казеннова Е.В.¹, Лаповок И.А.¹, Лага В.Ю.¹, Туманов А.С.¹, Глущенко Н.В.¹,
Плотникова Ю.К.³, Пономарева О.А.³, Ярыгина Е.И.⁴, Бобкова М.Р.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ В 1999 И 2012 гг.

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 660049, г. Красноярск; ³КГБУЗ «Иркутский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 664035, г. Иркутск; ⁴ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии», 109472, г. Москва

Проведен сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших на территории Иркутской области Российской Федерации в 1999 и 2012 гг., по областям *pol* и *env* генома вируса. В результате исследования показано доминирование в регионе генетического варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1 (100%). У пациентов, не получавших антиретровирусную терапию, не было зарегистрировано первичных мутаций лекарственной устойчивости в составе гена *pol*. В ходе исследования установлено значительное увеличение гетерогенности по областям генов *env* и *pol* популяции вирусов варианта IDU-A, циркулировавших в среде потребителей инъекционных наркотиков в регионе в 2012 г. (12,88 и 2,16% соответственно), по сравнению с вариантами, вызвавшими вспышку ВИЧ-инфекции в 1999 г. (1,64 и 0,47% соответственно). Кроме того, при сравнении генетических дистанций нуклеотидных последовательностей вариантов вируса, полученных в 2012 г. от ВИЧ-инфицированных лиц — потребителей инъекционных наркотиков и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, был установлен факт влияния пути передачи на изменчивость популяции вируса. Среди вирусов варианта IDU-A, циркулировавших на данной территории в 2012 г., распространенность X4-тропных вариантов составила 24,7%.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита 1-го типа; вариант IDU-A; мутации лекарственной устойчивости; генетическая дистанция; тропизм.

Для цитирования: Лебедев А.В., Нешумаев Д.А., Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глущенко Н.В., Плотникова Ю.К., Пономарева О.А., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 112-118.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-112-118

Lebedev A.V.^{1,4}, Neshumaev D.A.², Kazennova E.V.¹, Lapovok I.A.¹, Laga V.Yu.¹, Tumanov A.S.¹,
Glushchenko N.V.¹, Plotnikova Yu.K.³, Ponomareva O.A.³, Yarygina E.I.⁴, Bobkova M.R.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENETIC VARIANTS OF THE HIV-1 CIRCULATING IN THE IRKUTSK REGION IN 1999 AND 2012

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation; ²Krasnoyarsk Regional AIDS Center, Krasnoyarsk, 660049, Russian Federation; ³Irkutsk Regional AIDS Center, Irkutsk, 664035, Russian Federation; ⁴Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472, Russian Federation

The *pol* and *env* genome regions of the HIV-1 genetic variants circulating in the Irkutsk region of Russia in 1999 and 2012 were compared. The results of this work showed the dominance of the HIV-1 subtype A IDU-A genetic variant (100%) in this region. No primary resistance mutations in the *pol* gene in the treatment-naive patients were found. The heterogeneity of the viral population was found to be significantly increased based on the *pol* and *env* analysis among HIV-variants isolated in 2012 (12.88% and 2.16%) from the intravenous drug users as compared to HIV-variants that caused the outbreak of the HIV infection in 1999 (1.64% and 0.47%). In addition, the comparison of genetic distances of the *pol* and *env* gene sequences in the viruses isolated in 2012 from the HIV-positive persons infected through heterosexual intercourse and intravenous drug use demonstrated that the transmission route influenced the variability of the virus population. Among the viruses of IDU-A variant circulating in the area in 2012 the prevalence of X4-tropic variants was 24.7%.

Key words: HIV-1; IDU-A variant; drug resistance mutations; genetic distance; tropism.

For citation: Lebedev A.V., Neshumaev D.A., Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Tumanov A.S., Glushchenko N.V., Plotnikova Yu.K., Ponomareva O.A., Yarygina E.I., Bobkova M.R. Comparative analysis of genetic variants of the HIV-1 circulating in the Irkutsk region in 1999 and 2012. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 112-118. (In Russ.).

Для корреспонденции: Лебедев Алексей Владимирович, младший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: lebedevalesha236@gmail.com

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-112-118

For correspondence: Aleksey V. Lebedev, Junior research scientist, Laboratory of Leukosis Viruses D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gama-leya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: lebedevalesha236@gmail.com

Information about authors:

Lebedev A.V., <http://orcid.org/0000-0001-6787-9345>
Neshumayev D.A., <http://orcid.org/0000-0002-3826-6088>
Kazenova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-7912-4270>
Lapovok I.A., <http://orcid.org/0000-0002-6328-1415>
Laga V.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-0987-5439>
Tumanov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6221-5678>

Glushchenko N.V., <http://orcid.org/0000-0001-6028-1244>
Plotnikova Yu.K., orcid.org/0000-0003-2912-9118
Ponomareva O.A., <http://orcid.org/0000-0001-9154-211X>
Yarygina E.I., <http://orcid.org/0000-0002-4214-039X>
Bobkova M.R., <http://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 15-15-00050).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 18 May 2015

Accepted 19 November 2015

С момента проникновения в 1996 г. варианта ВИЧ-1 подтипа А1, названного впоследствии IDU-A, в среду потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) началось стремительное распространение этого варианта вируса по всей России [1, 2]. В начале 2000-х годов вариант IDU-A вышел за пределы данной группы риска и стал распространяться уже гетеросексуальным путем [3]. За 2012 г. более 38% впервые выявленных ВИЧ-позитивных лиц, по данным Федерального центра СПИД, заразились в результате гетеросексуальных контактов [4].

Одна из наиболее крупных вспышек ВИЧ-инфекции на территории России была зарегистрирована в Иркутской области в 1999 г. среди ПИН. Молекулярно-эпидемиологические исследования вспышки показали, что она была вызвана вариантом IDU-A подтипа А ВИЧ-1 и характеризовалась высокой гомогенностью вирусной популяции [5].

С момента вспышки ВИЧ-инфекции в Иркутской области прошло более 10 лет. На сегодняшний день этот регион считается одним из наиболее неблагополучных по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации. На территории Иркутской области, по данным Федерального центра СПИД на 22.11.12, было зарегистрировано 37 170 ВИЧ-инфицированных лиц, показатель пораженности составил 1349,3 на 100 тыс. населения, при этом аналогичный показатель для РФ в целом составил 440,0 на 100 тыс. населения [4].

На территории РФ непрерывно проводится молекулярный мониторинг эпидемии ВИЧ-инфекции начиная с первого зафиксированного в стране случая в 1987 г. [6, 7]. Изучение распространения и генетический анализ вариантов ВИЧ-1, для которого характерна высокая степень изменчивости генома [8], имеют большое значение для понимания особенностей развития эпидемии ВИЧ-инфекции в стране.

Молекулярной основой генетической изменчивости ВИЧ-1 являются возникновение мутаций в вирусном геноме, происходящих главным образом за счет ошибок обратной транскриптазы при синтезе ДНК [9], и рекомбинационные процессы [10]. Однако степень генетической вариативности генов ВИЧ-1 неодинакова.

Наименьшая степень генетической изменчивости среди структурных генов ВИЧ-1 характерна для гена *pol* [11], кодирующего ферменты вируса, необходимые на этапах его репродукции, такие как протеаза, обратная транскриптаза и интегразы [12]. На сегодняшний день основными мишенями антиретровирусных (АРВ) препаратов остаются ферменты ВИЧ-1 [11]. Случайно

возникшие мутации лекарственной устойчивости (ЛУ) у циркулирующих в вирусной популяции вариантов в условиях приема АРВ-препаратов дают им эволюционное преимущество относительно «диких» штаммов, что может привести к закреплению и накоплению возникших мутаций ЛУ в составе генома вируса. Доминирование резистентных вариантов в вирусной популяции в конечном счете может привести к неэффективности лечения. Кроме того, в условиях широкомасштабной АРВ-терапии представляют опасность случаи первичного заражения устойчивыми штаммами ВИЧ-1 [13, 14].

Выделяют 2 вида мутаций ЛУ ВИЧ-1 – первичные и вторичные. Первичные мутации непосредственно вызывают снижение чувствительности вируса к АРВ-препаратам, но при этом, как правило, ухудшают и его репликативную способность. Вторичные мутации не влияют на уровень ЛУ, но в большей или меньшей степени восстанавливают репликативную способность вируса, несущего первичные мутации [15]. Подавляющее большинство мутаций ЛУ ВИЧ-1 локализуется в области гена *pol*, кодирующей протеазу и первые 240 аминокислотных остатков обратной транскриптазы.

Наибольшей изменчивости подвержен ген *env* ВИЧ-1 [11, 16], одним из продуктов которого является белок оболочки вируса gp120 [17], ответственный за связывание вируса с первичным рецептором CD4, а также с хемокиновыми корцепторами CCR5 и/или CXCR4 [18]. Взаимодействие gp120 с рецепторами активирует процесс слияния мембран, ведущий к проникновению вирусного генома в клетки-мишени. Домен белка gp120 – петля V3, являющаяся основной антигенной детерминантой вируса и наиболее иммуногенным эпитопом ВИЧ-1 [19], отвечает за связывание с корцептором и участвует в структурных изменениях, происходящих при контакте ВИЧ-1 с молекулой CD4. Соответственно большая часть мутаций возникает именно в области gp120, приводя к ускользанию вируса от иммунного ответа.

В зависимости от типа используемых ВИЧ-1 хемокиновых рецепторов CCR5 или CXCR4 вирусы подразделяют на R5-тропные и X4-тропные либо вирусы с двойной тропностью [20]. В связи с разработкой и внедрением препаратов – антагонистов корцептора CCR5, таких как маравирик и викривирик, определение вирусного тропизма имеет принципиальное значение, так как в отношении X4-тропных вариантов вирусов антагонисты корцептора CCR5 заведомо неэффективны [21].

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг., и оценка распро-

страненности R5- и X4-тропных вариантов вируса на данной территории.

Материал и методы

В исследовании была использована коллекция ДНК из мононуклеарных клеток периферической крови и/или плазма крови, собранная от 97 лиц, проживающих на территории Иркутской области, с зарегистрированным диагнозом «ВИЧ-инфекция» в период с 1999 по 2012 г. Забор образцов крови и получение препаратов крови у ВИЧ-инфицированных осуществляли в 2012 г. Из 97 пациентов на момент забора крови 15 находились на лечении АРВ-препаратами, 82 пациентам АРВ-терапия не назначалась.

Выявление факторов риска, возможных мест заражения, эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Кроме того, регистрировали возраст, пол пациента, дату забора клинического материала, дату и регион постановки диагноза «ВИЧ-инфекция». Сведения о применении/неприменении пациентом АРВ-препаратов получали, руководствуясь записями в амбулаторных картах. Весь полученный клинический материал использовали с информированного согласия пациентов на основании одобрения Локального комитета по этике на базе ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» на проведение научно-исследовательской работы (протокол 06-13 заседания Локального комитета по этике от 05.06.13).

Геномную ДНК, включая провирусную ДНК, из клеток крови выделяли с применением наборов QIAmp DNA Blood Mini Kit и прибора QIAcube («Qiagen», США) в соответствии с инструкциями производителя.

Генотипирование вариантов вируса проводили путем анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol*, кодирующей протеазу и 2/3 обратной транскриптазы ВИЧ-1, с использованием набора ViroSeq (версия 2) (ViroSeq HIV-1 Genotyping System, «Celera Diagnostics», США).

Для получения нуклеотидных последовательностей, соответствующих области C2-V5 гена *env* с координатами 7001–7647 (координаты даны для варианта ВИЧ-1 HXB2, регистрационный номер GeneBank K03455), фрагменты ДНК амплифицировали методом «гнездовой» ПЦР с использованием двух пар праймеров: Eп-vF1/EnvR1 [22] и ES7/ES8 [23] для 1-го и 2-го раундов соответственно.

Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator™ v. 3.1 на автоматическом секвенаторе ABI 3130 («Applied Biosystems», США) с последующей обработкой полученных последовательностей в пакете программ DNASTAR Lasergene v. 8.0 («DNASTAR», США).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей методом ClustalW и филогенетический анализ методом максимального правдоподобия (ML, maximum-likelihood) проводили с помощью программы MEGA v.5.05 (<http://megasoftware.net>). Выбор модели нуклеотидных замен осуществляли с использованием приложения jModeltest 2.0 (<http://jmodeltest.org>). В качестве оптимальной была выбрана обобщенная реверсивная модель со скоростью нуклеотидных замен описываемой гамма-распределением (GTR + G).

Анализ мутаций ЛУ проводили с использованием ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software v. 2.8 и ба-

зы данных Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Подтипы ВИЧ-1 определяли с использованием программы REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 2), представленной на сайте Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu>)

Определение степени внутригрупповой изменчивости осуществляли путем расчета матрицы генетических дистанций, полученной при попарном сравнении последовательностей друг с другом с использованием модели Тамура-Нея (TrN) в пакете программы MEGA v.5.05.

Тропизм ВИЧ-1 определяли методом SMV с применением онлайн ресурса geno2pheno, доступного по адресу <http://www.geno2pheno.org/cgi-bin/geno2pheno.pl>. Для предсказания фенотипа была выбрана вероятностно ложноположительных результатов, т.е. вероятность классификации R5-вирусов как X4, равная 10%, в соответствии с рекомендациями Европейской экспертной группы по тестированию тропизма ВИЧ-1 в клинике (Recommendations from the European Consensus Group on Clinical Management of HIV-1 Tropism Testing) [24].

Статистический анализ проводили в пакете прикладных программ Statistica v.10.0 («StatSoft», США). Статистическую значимость различий оценивали с использованием *U*-теста Манна-Уитни и критерия χ^2 в модификации Пирсона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Нуклеотидные последовательности от пациентов из Иркутской области, выделенные в 1999 г., получены из базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank (регистрационные номера: KM247291-KM247294; KM247296-KM247300, AF284043-AF284054, AF284056).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования были получены нуклеотидные последовательности области гена *pol* и *env* ВИЧ-1 от 97 и 69 ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих на территории Иркутской области, соответственно. Пациенты были разделены на группы исходя из основного фактора риска заражения ВИЧ-1 на ПИН и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов. Распределение обследованных пациентов по полу, возрасту и основным факторам риска заражения представлено в табл. 1.

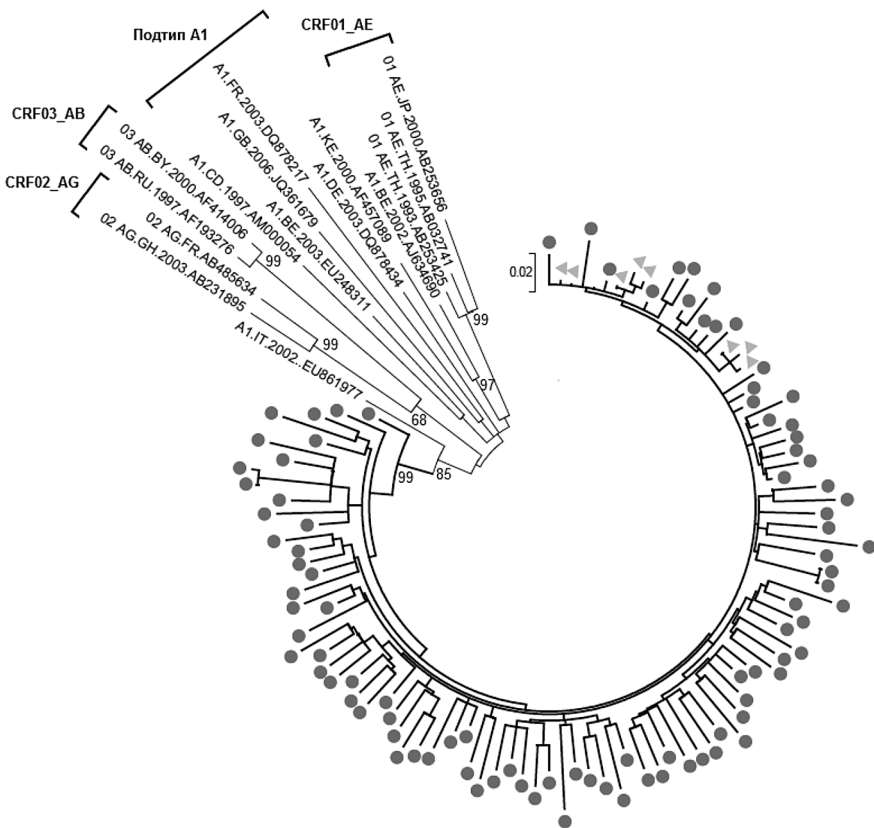
Как видно из табл. 1, распределение образцов по основным факторам риска передачи вируса составило 49,5 и 50,5% для ПИН и группы лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, соответственно. Таким образом, на сегодняшний день наблюдается увеличение доли гетеросексуального пути передачи вируса

Таблица 1

Распределение исследованных пациентов по основным факторам риска заражения ВИЧ-1

Группа риска	Количество образцов, <i>n</i> (%)	Пол		Возраст (медиана), годы*
		мужчины, <i>n</i> (%)	женщины, <i>n</i> (%)	
ПИН	48 (49,5)	35/48 (72,9)	13/48 (27,1)	32,7 ± 0,5 (33)
ГС	49 (50,5)	8/49 (16,4)	41/49 (83,6)	32,7 ± 0,9 (31)
Всего...	97 (100)	43/97 (44,3)	54/97 (55,7)	32,7 ± 0,5 (33)

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – среднее ± стандартная ошибка; ГС – лица, заразившиеся гетеросексуальным путем.



Филогенетическое ML-дерево образцов ВИЧ-1 подтипа A1 из Иркутской области. Последовательности гена участка *pol* образцов ВИЧ-1 из Иркутской области ($n = 97$) отмечены кругом, референс-последовательности варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1 – треугольником. Кластер варианта IDU-A ВИЧ-1 выделен жирным шрифтом. В качестве группы сравнения были использованы нуклеотидные последовательности аналогичного региона генома ВИЧ-1 подтипа A1, CRF01_AE, CRF02_AG и CRF03_AB. Статистическая поддержка узлов ветвления представлена в виде бутстрэп-значений (указаны значения 60% и более), полученных при 500 итерациях.

в Иркутской области по сравнению с ситуацией на период 1999–2000 гг., когда доминирующим (98%) был парентеральный путь передачи при внутривенном потреблении психоактивных препаратов [5]. Распределение пациентов по полу в исследуемых группах риска было неодинаковым. В группе ПИН большинство составляют лица мужского пола (72,9%), тогда как в группе лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, – женщины (83,6; $p < 0,01$). Средний возраст ВИЧ-инфицированных пациентов в обеих группах оказался одинаковым и составил 32,7 года. Необходимо отметить, что средний возраст ВИЧ-инфицированных пациентов, исследованных в ходе вспышки ВИЧ-инфекции среди ПИН в 1999 г., составлял 23,3 года [5], тогда как в настоящем исследовании он был 32,7 года. По результатам опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза установлено, что большинство пациентов из группы ПИН-2012 (82%) заразились ВИЧ-1 в период 1999–2001 гг. Таким образом, можно утверждать, что значительная часть ВИЧ-инфицированных ПИН из когорты 2012 г. заражена вариантом вируса, который циркулировал среди лиц, употребляющих психоактивные препараты внутривенно, в 1999 г.

Изучение распространенности генетических вариантов ВИЧ-1. В ходе анализа полученных последователь-

ностей была установлена принадлежность всех исследованных образцов ($n = 97$) ВИЧ-1 к подтипу A1.

Филогенетический анализ 97 нуклеотидных последовательностей области гена *pol* ВИЧ-1 с генотипом A1, кодирующих протеазу, выделенных в Иркутской области в 2012 г., показал, что все они (97/97, 100%) образуют единый кластер с 9 ранее полученными нуклеотидными последовательностями той же области генома варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1, выделенными в Иркутской области в 1999 г. (см. рисунок). Кроме того, все исследуемые образцы принадлежат к одной монофилиетической группе с вариантом ВИЧ-1 EU861977 (A-0r), который, по данным литературы, является родоначальником варианта IDU-A [25]. Исследование вариантов ВИЧ-1, относящихся к монофилиетической группе IDU-A ВИЧ-1, не выявило групповой специфичности при анализе нуклеотидных последовательностей, выделенных от пациентов из группы риска ПИН и лиц, инфицированных при гетеросексуальных контактах. Таким образом, установлено, что на территории Иркутской области в 2012 г. по-прежнему доминирует генетический вариант IDU-A.

Анализ резистентности ВИЧ-1. Для выявления случаев передающейся резистентности среди пациентов из Иркутской области провели анализ мутаций ЛУ по области гена *pol*, кодирующей протеазу и 2/3 части обратной транскриптазы. В ходе анализа 82 образцов от пациентов, не получающих АРВ-терапию, не было выявлено ни одной первичной мутации ЛУ. В 52 (52/82, 63,4%) образцах, полученных от «наивных» пациентов, выявлена мутация A62V. У 20 (20/82, 24,4%) пациентов замена A62V была ассоциирована с мутациями L101/V, L33F, A71T и V118I. Наиболее часто мутация A62V регистрировалась в сочетании с вторичной мутацией L101/V ($p < 0,01$), ассоциированной с чувствительностью к ингибиторам протеазы (19/20, 95%). Как было обнаружено ранее, замена A62V в области обратной транскриптазы для варианта A1 (IDU-A) является мутацией полиморфизма [26] и не обуславливает ЛУ в отсутствие первичных мутаций (например, Q151M) [7, 27]. Полное отсутствие мутаций, ассоциированных с ЛУ, выявлено только у 8 (8/82, 9,8%) пациентов.

В ходе анализа 9 нуклеотидных последовательностей, полученных от «наивных» пациентов из Иркутской области в 1999 г., также не было зарегистрировано первичных мутаций ЛУ, а замена A62V обнаружена во всех образцах (9/9, 100%).

Для 15 пациентов, находящихся на АРВ-терапии, использовали следующие схемы лечения: ламивудин/зидовудин (ЗТС /AZT) либо ламивудин /абакавир (ЗТС/АВС) или ламивудин/ставудин (ЗТС/d4Т), третьим препаратом схемы был либо лопинавир/ритонавир (LPV/r), либо

Таблица 2

Основные мутации ЛУ, выявленные в области гена *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы, у ВИЧ-инфицированных лиц, находящихся на АРВ-терапии (*n* = 5)

Класс препаратов	Мутации	Количество	
		абс.	%
ННИОТ	L100I	1	12,5
	K101E	2	25
	K103N	1	12,5
	V106A	1	12,5
	G190S	2	25
	P225H	1	12,5
НИОТ	M41L	1	11,1
	L74V	2	22,2
	M184V	4	44,5
	K219E	2	22,2

дарунавир, либо дарунавир/ритонавир (DRV/RTV), либо эфавиренц (EFV).

У 10 (10/15, 66,7%) из этих пациентов не было выявлено первичных мутаций ЛУ, при этом 5 из них через некоторое время после начала приема АРВ-препаратов самостоятельно отказались от продолжения курса терапии. У 5 пациентов, продолживших АРВ-терапию, отмечена высокая вирусная нагрузка (1185–504 589 копий РНК/мл), что наряду с отсутствием первичных мутаций ЛУ, вероятно, может свидетельствовать о низкой приверженности лечению данных лиц.

Первичные мутации ЛУ были выявлены у 5 пациентов, получающих АРТ (5/15, 33,3%). Значение показателя вирусной нагрузки, полученное на фоне терапии, у данных лиц лежало в интервале 4087–337987 РНК/мл, что указывало на неэффективность терапии. С учетом полученных данных можно говорить о необходимости замены терапии только у этих 5 пациентов, находящихся на лечении. Зарегистрированные первичные мутации ЛУ, выявленные у лиц, получающих АРВ-терапию, представлены в табл. 2. Как видно из представленных данных, наиболее часто встречающимися мутациями ЛУ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) были замены K101E и G190S (факт высокой частоты встречаемости этой мутации у лиц, инфицированных вариантом IDU-A, был нами сообщен ранее [28]), к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ) – замена M184V. Мутаций ЛУ к ингибиторам протеазы выявлено не было.

Оценка степени генетической изменчивости. Исследования, проведенные в 1999 г., показали очень низкие генетические различия между вирусами, циркулирующими в среде ПИН. Среднее значение генетической дистанции между вариантами ВИЧ-1 в группе ПИН по области гена *env*, кодирующей участок С2-V3, выделенными в Иркутске и Иркутской области в 1999–2000 гг., не превышало 1,8% [5]. Такую гомогенность популяции, несмотря на высокую способность вируса к изменчивости, можно объяснить особенностями заражения в группе ПИН. В результате инфицирования лиц в группе ПИН (в большинстве случаев из одного источника) происходит практически одновременное заражение вирусом сразу нескольких человек через нестерильный медицинский

инструментарий либо с наркотическим препаратом. Таким образом, лица в этой группе риска инфицируются фактически одним и тем же вариантом вируса, и генетическое разнообразие ВИЧ-1 в популяции остается на невысоком уровне. Однако, по данным литературы [29, 30], со временем гетерогенность вирусной популяции в пределах одной группы риска увеличивается.

Для получения данных о генетических изменениях в популяции ВИЧ-1 среди ПИН на территории Иркутской области в 1999 и 2012 гг. были определены генетические дистанции по С2-V3 области гена *env* и области гена *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы. Для анализа областей генов *env* и *pol* использовали 34 и 36 нуклеотидных последовательностей соответственно, полученных в настоящем исследовании, а также 13 и 9 нуклеотидных последовательностей указанных областей генов, полученных ранее.

Значения средней внутригрупповой изменчивости (\pm стандартная ошибка) области гена *env*, кодирующей участок С2-V3 (размер фрагмента – 234 нуклеотидные пары (н. п.)), составили $12,88 \pm 1,23$ (диапазон 3,22–22,68) для образцов ВИЧ-1 2012 г. и $1,64 \pm 0,52$ (диапазон 0,43–4,05) для образцов 1999 г. По области гена *pol* (1302 н. п.) значения внутригрупповой изменчивости составили $2,16 \pm 0,19$ для образцов ВИЧ-1 2012 г. и $0,47 \pm 0,10$ для образцов 1999 г.

Статистически значимые различия генетической изменчивости в пределах групп 1999 и 2012 гг. в 7,9 раза по гену *env* ($p < 0,001$) и в 4,5 раза по гену *pol* ($p < 0,001$) свидетельствуют о том, что гетерогенность популяции ВИЧ-1 варианта IDU-A в данной группе риска значительно выросла по сравнению с таковой в начале эпидемии ВИЧ-инфекции среди ПИН в Иркутской области в 1999–2000 гг., что, по всей вероятности, является следствием естественной дивергенции между вирусами в популяции.

В связи с увеличением числа лиц, заразившихся вариантом IDU-A ВИЧ-1 в результате гетеросексуальных контактов, представляло интерес оценить генетическую изменчивость вируса в зависимости от пути передачи среди лиц, не получавших АРВ-терапию. С этой целью проведен сравнительный анализ генетических дистанций между вирусами, циркулирующими в группах ПИН и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов. Кроме того, в отдельную группу были выде-

Таблица 3

Генетическая изменчивость областей генов *env* и *pol* в исследованных группах риска заражения ВИЧ-инфекцией

Группа риска	Ген	Нуклеотидные последовательности, <i>n</i>	Среднее \pm стандартная ошибка, %	Максимум–минимум, %
ПИН	<i>pol</i>	36	$2,16 \pm 0,19$	0,69–3,98
	<i>env</i>	34	$10,70 \pm 0,82$	3,11–17,15
ГС	<i>pol</i>	33	$2,94 \pm 0,20$	1,63–4,53
	<i>env</i>	28	$13,33 \pm 0,95$	6,74–34,55
ГС/ПИН	<i>pol</i>	13	$2,65 \pm 0,23$	1,16–3,82

Примечание. ГС/ПИН – лица, заразившиеся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН.

лены случаи заражения в результате гетеросексуальных контактов с ПИН, на что указали 15,8% (13/82) пациентов из исследуемой когорты. Для анализа использовали участок гена *env*, кодирующий область C2-V5 (523 н. п.), и участок гена *pol*, кодирующий протеазу и 2/3 обратной транскриптазы (1302 н. п.) Значения генетических дистанций представлены в табл. 3.

Из представленных в табл. 3 результатов видно, что значение генетической дистанции по анализируемому участку гена *pol* в группе лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, в 1,3 раза выше, чем у ПИН ($p < 0,001$), и в 1,1 раза выше такового у лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН ($p = 0,001$). В свою очередь генетическая изменчивость в группе лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН, достоверно ($p = 0,023$) выше, чем у ПИН. Таким образом, наблюдается увеличение генетической дистанции по области гена *pol* при «переходе» ВИЧ-1 из группы риска ПИН в группу риска лиц, основным фактором заражения которых был гетеросексуальный контакт. При этом лица, составляющие группу половых партнеров ПИН, являются промежуточным связующим звеном в цепи передачи вируса из группы риска ПИН в группу лиц с гетеросексуальным путем передачи, не имеющих половых контактов с ПИН (так называемая проводниковая группа).

Схожие различия в степени генетической изменчивости были выявлены между группами риска ПИН и лиц с гетеросексуальным путем передачи вируса при анализе гена *env* ВИЧ-1. Степень изменчивости указанного гена была 1,2 раза ($p < 0,01$) выше среди лиц, инфицированных в результате гетеросексуальных контактов. Ввиду малой величины выборки лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН, значение генетической дистанции в данной группе не учитывалось при сравнительном анализе по области гена *env*.

Таким образом, можно заключить, что степень гетерогенности популяции ВИЧ-1 связана с изменением пути передачи вируса и определяется, вероятно, как естественной дивергенцией между вирусами в популяции, так и эволюционным процессом в ходе смены группы риска. Однако не стоит исключать и другие причины, которые могут влиять на уровень изменчивости популяции ВИЧ-1, что требует дальнейших исследований.

Анализ тропизма. При анализе тропизма вариантов IDU-A ВИЧ-1 ($n = 69$) с целью оценки распространенности R5- и R5X4/X4-тропных вариантов вируса, циркулировавших на территории Иркутской области, было установлено, что 52 (52/69, 75,3%) образца являются R5-тропными и 17 (17/69, 24,7%) – R5X4/X4-тропными вариантами. Данное распределение по типу используемых вирусом корцепторов согласуется с результатами аналогичного исследования вирусов варианта IDU-A, проведенного на территории России в 2014 г., согласно которому доля R5-тропных вариантов составила 73,9%, а R5X4/X4-тропных – 26,1% [31].

Таким образом, полученный в настоящем исследовании показатель распространенности X4-тропных вирусов среди варианта IDU-A в популяции ВИЧ-инфицированных в Иркутской области совпадает с таковым по России в целом.

Полученные в ходе настоящего исследования нуклеотидные последовательности депонированы в GeneBank

под номерами KC254616-KC254643, KC509769-KC509886, KP057516-KP057579 (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>).

Выводы

1. На территории Иркутской области в 2012 г. продолжал доминировать генетический вариант ВИЧ-1 IDU-A подтипа A1 (97/97, 100%).

2. В ходе исследования у пациентов, не получающих лечения АРВ-препаратами, не было выявлено первичных мутаций ЛУ.

3. Гетерогенность популяции вирусов варианта IDU-A ВИЧ-1, циркулировавших среди ПИН, по генам *env* и *pol* в 2012 г. выросла в 7,9 и 4,5 раза соответственно по сравнению с 1999 г. ($p < 0,0001$).

4. Выявлены достоверные различия ($p < 0,05$) между генетической изменчивостью вируса по генам *env* и *pol* в группах риска ПИН (10,70 и 2,16% соответственно) и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов (13,33 и 2,94% соответственно).

5. Среди вирусов варианта IDU-A, выделенных на территории Иркутской области в 2012 г., распространенность вариантов с фенотипом R5X4/X4 составляет 24,7%.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (проект №15-15-00050).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 8–14, 16–20, 23–25, 28–31 СМ. REFERENCES)

1. Ладная Н.Н., Покровский В.В., Бобков А.Ф., Селимова Л.М., Савченко И.Г., Казеннова Е.В. и др. Распространение субтипов ВИЧ-1 в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1998; (3): 19–23.
2. Бобков А.Ф., Казеннова Е.В., Селимова Л.М., Ханина Т.А., Ладная Н.Н., Бобкова М.Р. и др. Молекулярно-вирусологические особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в России и других странах СНГ. *Вестник РАМН*. 2003; (12): 83–5.
3. Суханова А.Л., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р., Кравченко А.В., Селимова Л.М., Ханина Т.А. и др. Варианты вируса иммунодефицита человека типа 1, обнаруживаемые в России среди инфицированных половым путем. *Вопросы вирусологии*. 2004; (1): 4–7.
4. Справка: ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2012 г. Количество ВИЧ-инфицированных в России за 2012 год. Available at: <http://www.hivrussia.ru/stat/2012-3.shtml>.
5. Покровский В.В., Бобков А.Ф., Казеннова Е.В., Селимова Л.М., Ханина Т.А., Бобкова М.Р. и др. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вспышки ВИЧ-инфекции в Иркутской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2001; (4): 18–20.
6. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Потеев Н.С. Первый случай ВИЧ-инфекции у гражданина СССР. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1992; (11): 19–22.
7. 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.
15. Носик М.Н. Проблема резистентности вируса иммунодефицита человека к антиретровирусным препаратам. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59 (4): 5–9.
21. Васильев А.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Предсказание фенотипа R5/X4 вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, с использованием компьютерных методов. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54 (3): 17–21.
22. Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Исмаилова А., Бейшеева Н. и др. Молекулярно-генетическая харак-

теристика вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (5): 26–32.

26. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Естественные полиморфизмы гена *pol* варианта ВИЧ-1 IDU-A. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. 2012; 4 (4): 44–51.
27. Волова Л.Ю., Грезина Л.А., Уланова Т.И. Результаты исследования резистентности ВИЧ-1 на территории Ямала и сравнение частоты встречаемости мутаций с различными значениями «Score». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; (2): 43–6.

REFERENCES

1. Ladnaya N.N., Pokrovskiy V.V., Bobkov A.F., Selimova L.M., Savchenko I.G., Kazennova E.V. et al. Spread of HIV-1 subtypes in Russia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 1998; 3 (5): 19–23. (in Russian)
2. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ladnaya N.N., Bobkova M.R. et al. The molecular and virological specificities of the epidemic of HIV infections in Russia and other CIS countries. *Vestnik RAMN*. 2003; (12): 83–4. (in Russian)
3. Sukhanova A.L., Kazennova E.V., Bobkova M.R., Kravchenko A.V., Selimova L.M., Khanina T.A. et al. Variants of human immunodeficiency virus type 1, detected in Russia among those infected by the sexual route. *Voprosy virusologii*. 2004; 49 (1): 4–7. (in Russian)
4. HIV infection in the Russian Federation in 2012. Number of HIV-infected people in Russia in 2012. Available at: <http://www.hivrussia.ru/stat/2012-3.shtml> (in Russian)
5. Pokrovskiy V.V., Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Bobkova M.R. et al. Moleculo-epidemiological characteristics of a HIV infection outbreak in the Irkutsk region. *Zhurnal mikrobiologii*. 2001; (4): 18–20 (in Russian)
6. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Potekaev N.S., Gabrilovich D.I., Makarova N.Y. et al. 1-st case of HIV-infection in a citizen of the USSR. *Zurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1992; (11): 19–22. (in Russian)
7. Kazennova E.V., Antonova O.V., Kuzin S.N., Serkina T.P., Sokolova L.S., Vasil'ev A.V. et al. Molecular and epidemiology studies of HIV-1 prevalence in the Republic of Sakha (Yakutia). *Voprosy virusologii*. 2011; 56 (5): 30–4. (in Russian)
8. Peeters M., Sharp P.M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS*. 2000; 14(Suppl. 3): S129–40.
9. Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 1988; 242 (4882): 1171–3.
10. Robertson D.L., Sharp P.M., McCutchan F.E., Hahn B.H. Recombination in HIV-1. *Nature*. 1995; 374 (6518): 124–6.
11. Santoro M.M., Perno C.F. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol*. 2013; 2013: 481314.
12. Abram M.E., Parniak M.A. Virion instability of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) mutated in the protease cleavage site between RT p51 and the RT RNase H domain. *J. Virol*. 2005; 79 (18): 11952–61.
13. Lukashov V.V., de Ronde A., de Jong J.J., Goudsmit J. Epidemiology of HIV-1 and emerging problems. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2000; 16 (4): 463–6.
14. Ammaranond P., Cunningham P., Oelrichs R., Suzuki K., Harris C., Leas L. et al. Rates of transmission of antiretroviral drug resistant strains of HIV-1. *J. Clin. Virol*. 2003; 26(2): 153–61.
15. Nossik M.N. A Problem of the HIV drug resistance. *Voprosy virusologii*. 2014; 59 (4): 5–9. (in Russian)
16. Araujo L.A., Almeida S.E. HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition. *Viruses*. 2013; 5(2): 595–604.
17. Miranda L.R., Schaefer B.C., Kupfer A., Hu Z., Franzusoff A. Cell surface expression of the HIV-1 envelope glycoproteins is directed from intracellular CTLA-4-containing regulated secretory granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(12): 8031–6.
18. Lin G., Baribaud F., Romano J., Doms R.W., Hoxie J.A. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins site. *J. Virol*. 2003; 77 (2): 931–42.
19. Sirois S., Sing T., Chou K.C. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Curr. Protein Pept. Sci*. 2005; 6(5): 413–22.
20. Hendrix C.W., Collier A.C., Lederman M.M., Schols D., Polard R.B., Brown S. et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2004; 37 (2): 1253–62.
21. Vasilyev A.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Prediction of phenotype R5/X4 of HIV-1 variants circulating in Russia, by using computer methods. *Voprosy virusologii*. 2009; 54 (3): 17–21. (in Russian)
22. Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Ismailova A., Beysheeva N. et al. Molecular-genetic characterization of the HIV-1 variants abundant in Kirghizia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57 (5): 26–32. (in Russian)
23. Delwart E., Shpaer E.G., Louwagie J., McCutchan F.E., Grez M., Rübnsamen-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.
24. Vandekerckhove L., Wensing A., Kaiser R., Brun-Vézinet F., Clotet B., De Luca A. et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect. Dis*. 2011; 11(5): 394–407.
25. Riva C., Romano L., Saladini F., Lai A., Carr J.K., Francisci D. et al. Identification of a possible ancestor of the subtype A1 HIV Type 1 variant circulating in the former Soviet Union. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008; 24 (10): 1319–25.
26. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Natural polymorphisms of HIV-1 IDU-A variant *pol* gene. *VICH-infektsiya i immunosupressiya*. 2012; 4 (4): 44–51. (in Russian)
27. Volova L.Yu., Grezina L.A., Ulanova T.I. The results of a study of HIV-1 resistance in the area of Yamal and the comparison of the frequency of mutations with different score values. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (2): 43–6. (in Russian)
28. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., Bobkova M.R., Shafer R.W. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS*. 2014; 28(17): F1–8.
29. Lukashov V., Op de Coul E.L., Coutinho R.A., Goudsmit J. HIV-1 strains for Dutch injecting drug users in heterosexually infected individuals in the Netherlands. *AIDS*. 1998; 12 (6): 635–41.
30. Ou C.Y., Takebe Y., Luo C.C., Kalish M., Auwanit W., Bandea C. et al. Wide distribution of two subtypes of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1992; 8 (8): 1471–2.
31. Lopatukhin A., Kireev D., Kuevda D., Korovina G., Dementeva N., Pokrovskaya A. et al. First broad experience of HIV-1 genotypic tropism testing in the Russian Federation. In: *14th European AIDS Conference, October 16–19, 2013*. Brussels, Belgium; 2013: 206–7.