

Лебедев А.В.<sup>1,3</sup>, Казеннова Е.В.<sup>1</sup>, Зверев С.Я.<sup>2</sup>, Нистратова Ю.И.<sup>2</sup>, Лага В.Ю.<sup>1</sup>, Туманов А.С.<sup>1</sup>, Глушченко Н.В.<sup>1</sup>, Ярыгина Е.И.<sup>3</sup>, Бобкова М.Р.<sup>1</sup>

## АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА *env* ВАРИАНТА IDU-A ВИЧ-1 В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ЭПИДЕМИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ РОССИИ (1996—2011)

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

<sup>2</sup>ГКУЗ «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 614088, г. Пермь;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», 109472, г. Москва

Проанализированы 132 генетические последовательности C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1 варианта IDU-A, полученные для вирусов, циркулировавших в разное время среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) и гетеросексуалов на территории Пермского края. В ходе исследования установлено, что степень дивергенции вариантов IDU-A ВИЧ-1 от общего предка в указанном регионе в 2011 г. была выше в 4,3 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с началом эпидемии. Темп эволюции ВИЧ-1 различается в двух изученных группах риска инфицирования. Средние генетические дистанции между вариантами ВИЧ-1, циркулирующими среди гетеросексуалов, больше в среднем в 1,3 раза ( $p = 0,008$ ), чем среди ПИН. Скорость накопления нуклеотидных, в том числе несинонимичных замен в C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1 среди лиц, инфицированных гетеросексуальным путем, была в 1,7 раза выше, чем в группе ПИН. Продемонстрированы различия в положениях кодонов, находящихся под действием положительного отбора, в зависимости от принадлежности вариантов ВИЧ-1 к указанным группам риска.

Ключевые слова: ВИЧ-1; вариант IDU-A; группы риска; эволюция.

**Для цитирования:** Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Зверев С.Я., Нистратова Ю.И., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глушченко Н.В., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Анализ изменчивости гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1 в ходе развития эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Пермского края России (1996—2011). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 222-229.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-222-229

Lebedev A.V.<sup>1,3</sup>, Kazennova E.V.<sup>1</sup>, Zverev S.Ya.<sup>2</sup>, Nistratova Yu.I.<sup>2</sup>, Laga V.Yu.<sup>1</sup>, Tumanov A.S.<sup>1</sup>, Glushchenko N.V.<sup>1</sup>, Yarygina E.I.<sup>3</sup>, Bobkova M.R.<sup>1</sup>

## ANALYSIS OF THE *env* GENE VARIABILITY OF THE IDU-A HIV-1 VARIANT IN THE OUTBREAK OF THE HIV INFECTION EPIDEMIC IN PERM REGION OF RUSSIA (1996-2011)

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>Perm Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Perm, 614088, Russian Federation;

<sup>3</sup>K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472, Russian Federation

In the present work, a total of 132 HIV-1 *env* gene C2-V3-C3 sequences belonging to the IDU-A genetic variant were analyzed. The variants were obtained from the viruses circulating among IDUs and heterosexuals in the Perm region at different periods. It was shown that the rate of the divergence of the IDU-A HIV-1 viruses from a common ancestor increased 4.3 times ( $p < 0.001$ ) in 2011 as compared with the onset of the epidemics. The rate of the HIV-1 evolution was different in the two risk groups of the infection. The mean genetic distance of HIV-1 variants circulating among heterosexuals was 1.3 times longer ( $p = 0.008$ ) than that among IDUs. The accumulation rate of the nucleotide (including nonsynonymous) substitutions in the C2-V3-C3 HIV-1 *env* gene region among individuals infected by heterosexual contacts was 1.7 times higher than that among IDUs. The differences in the positions of the codons subjected to positive selection were demonstrated depending on the infection risk group tested.

Keywords: HIV-1; IDU-A variant; group risk; evolution.

**For citation:** Lebedev A.V., Kazennova E.V., Zverev S.Ya., Nistratova Yu.I., Laga V.Yu., Tumanov A.S., Glushchenko N.V., Yarygina E.I., Bobkova M.R. Analysis of the *env* gene variability of the IDU-A HIV-1 variant in the outbreak of the HIV infection epidemic in Perm region of Russia (1996-2011). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 222-229. (In Russ.). DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-222-229

**For correspondence:** Aleksey V. Lebedev, Junior researcher of the Laboratory of T-lymphotropic viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: lebedevalesha236@gmail.com

### Information about authors:

Lebedev A.V., <http://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Bobkova M.R., <http://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Kazennova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

**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 12 October 2015  
Accepted 19 November 2015

**Для корреспонденции:** Лебедев Алексей Владимирович, мл. науч. сотр. лаб. вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: lebedevalesha236@gmail.com

Вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) характеризуется значительной степенью генетической изменчивости и высокой скоростью эволюции, что обусловлено низкой точностью процесса обратной транскрипции наряду с высоким темпом репликации вируса [1, 2]. Наибольшая скорость эволюции, составляющая от  $2,02 \cdot 10^{-3}$  до  $16,90 \cdot 10^{-3}$  замен на нуклеотидную позицию в год, характерна для V3-области белка gp120, кодируемого геном *env* [3, 4], что определяет выбор этого участка генома для изучения генетических изменений ВИЧ-1 во времени. Кроме того, V3-область *env* содержит основные антигенные и нейтрализующие эпитопы ВИЧ-1. Изменение этой области, а также фланкирующих ее C2- и C3-областей вместе с действием диверсифицирующего (положительного) отбора позволяет вирусу избегать действия нейтрализующих антител, что является основной движущей силой молекулярной эволюции гена *env* ВИЧ-1 [5, 6].

В ранее проведенных исследованиях было показано, что по мере развития эпидемии эволюционные (генетические) дистанции между вариантами ВИЧ-1 и их общим предком возрастают, приводя к увеличению общей гетерогенности вирусной популяции [7, 8]. При анализе эпидемии ВИЧ-инфекции в различных группах риска инфицирования вирусом в разных исследованиях отмечалось более близкое генетическое сходство между вариантами ВИЧ-1, циркулирующими в группах потребителей инъекционных наркотиков (ПИН), по сравнению с вирусами, распространяющимися в результате половых контактов [3, 9, 10]. Высокая гомогенность ВИЧ-1 среди ПИН свидетельствует о том, что темп эволюции вируса на популяционном уровне в данной группе ниже такового среди лиц с половым путем передачи инфекции. Это связано с особенностями распространения вируса в данных группах риска.

Для изучения генетической изменчивости вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в двух основных группах риска — ПИН и лиц с гетеросексуальным путем инфицирования, нами был выбран Пермский край, что обусловлено наличием постоянно пополняемой коллекции образцов от ВИЧ-инфицированных лиц с наличием полных эпидемиологических данных начиная с первого, зарегистрированного в 1988 г., случая заболевания [11].

В Пермском крае широкое распространение ВИЧ-1 началось с момента проникновения варианта IDU-A подтипа A1 в популяцию ПИН в 1996 г., при этом ранее случаев ВИЧ-инфекции в этой группе риска выявлено не было. С начала 2000-х годов произошел выход данного варианта вируса за пределы указанной группы риска и его распространение среди лиц, основным фактором риска заражения которых были гетеросексуальные контакты (гетеросексуалов) [11, 12]. С 1996 г. по настоящее время варианту IDU-A принадлежит основная роль в развитии эпидемического процесса на территории края.

Целью настоящего исследования является анализ генетической изменчивости C2-V3-C3-области гена *env* среди вирусов, относящихся к варианту IDU-A и циркулирующих в основных группах риска на территории Пермского края в ходе развития эпидемии ВИЧ-инфекции.

### Материал и методы

*Исследуемые пациенты.* В исследовании была использована коллекция образцов моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), полученных в период с 1996 по 2011 г. от 132 ВИЧ-инфицированных лиц, про-

живающих на территории Пермского края. На момент забора крови ни одному из пациентов не назначалась антиретровирусная терапия. Выявление факторов риска, возможных мест заражения, эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Весь полученный клинический материал использовали с информированного согласия пациентов на основании одобрения Локальным комитетом по этике на базе ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России проведения научно-исследовательской работы (протокол 06-13 заседания Локального комитета по этике от 05.06.2013).

*Выделение, амплификация и секвенирование ДНК.* Геномную ДНК, включая провирусную ДНК, из МКПК выделяли с применением наборов QIAmp DNA Blood Mini Kit и прибора QIAcube («Qiagen», США) в соответствии с инструкциями производителя. Для получения нуклеотидных последовательностей, соответствующих области C2-V3-C3 гена *env* с координатами 7092—7310 (координаты даны относительно штамма HXB2 ВИЧ-1, номер в GenBank K03455) размером 213 нуклеотидных оснований, фрагменты ДНК амплифицировали методом гнездовой ПЦР с использованием двух пар праймеров: *envF1/envR1* [13] и *ES7/ES8* [14] для первого и второго раунда соответственно. Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator™ v. 3.1 на автоматическом секвенаторе ABI 3130 («Applied Biosystems», США). Обработку полученных сиквентов, а также построение консенсусной последовательности осуществляли с помощью пакета программ DNASTAR Lasergene v. 8.0 («DNASTAR», США).

*Определение подтипа и филогенетический анализ.* Принадлежность последовательности к вирусам разных подтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 определяли с использованием программ REGA HIV-1 Subtyping Tool v. 2.0. (<http://hivdb.stanford.edu>) и COMET HIV-1 (<http://comet.retrovirology.lu/>). Выравнивание последовательностей методом ClustalW и филогенетический анализ с использованием метода максимального правдоподобия (ML — maximum-likelihood) проводили с помощью программы MEGA v. 6 [15]. Выбор оптимальной модели нуклеотидных замен осуществляли с использованием приложения jModelTest 2.0 [16]. В качестве таковой была выбрана обобщенная реверсивная модель (GTR) с учетом гамма-распределения (+G).

*Анализ последовательностей.* Попарные нуклеотидные и аминокислотные дистанции последовательностей образцов ВИЧ-1 от их самого последнего общего предка (tMRCA — the most recent common ancestor) (степень дивергенции между ними) определяли с использованием моделей Тамуры—Нея (TrN + G) и Джонса—Тейлора—Торнтон (JTT + G) соответственно, с учетом гамма-распределения. Несинонимичные (число несинонимичных замен на несинонимичный сайт — dN) и синонимичные (число синонимичных замен на синонимичный сайт — dS) дистанции определяли модифицированным методом Нея—Годжобори (MNG) с рассчитанным значением отношения транзиций/трансверсий (MEGA 6). Отношение несинонимичных замен к синонимичным (dN/dS) для последовательностей, полученных в определенные периоды, свидетельствующее о наличии положительного (dN/dS > 1), отрицательного (dN/dS < 1) или нейтрального (dN/dS = 1) отбора [17], а также положения кодонов, на-

Таблица 1

Распределение обследованных ВИЧ-инфицированных пациентов по полу и возрасту ( $n = 132$ )

Время получения образца, год	Количество образцов, $n$	Мужчины/женщины, $n$ (%)	Медиана (МКИ**) возраста, годы
1996—1998*	17	15/2 (88/12)	23,0 (21,0—31,0)
2000—2002*	14	10/4 (71/29)	21,0 (18,0—23,0)
2003—2005	23	6/17 (26/74)	
ПИН	12	5/7 (42/58)	23,0 (19,5—27,5)
Гетеросексуалы	11	1/10 (9/91)	
2008	41	15/25 (38/62)	
ПИН	19	8/13 (38/62)	30,0 (28,0—35,0)
Гетеросексуалы	21	7/12 (43/57)	
2011	38	13/25 (34/66)	
ПИН	20	9/11 (45/55)	28,5 (25,0—34,0)
Гетеросексуалы	18	4/14 (22/78)	

Примечание. \* — для данных периодов получены образцы только от ПИН; \*\* — межквартильный интервал.

ходящиеся под позитивной селекцией, определяли с использованием программного пакета HYPHY, доступного на веб-ресурсе <http://www.datamonkey.org> [18]. Тесты на селекцию проводили с использованием метода фиксированных эффектов (FEL) и модели нуклеотидных замен Хасегава—Кишино—Яно (HKY85). Кодоны считали положительными в отношении действия отбора при  $p < 0,1$ . Поскольку отношение  $dN/dS$  при использовании данного метода для оценки действия отбора на уровне единичных сайтов кодонов может быть неопределяемым (при  $dN = 0$  и  $dS = 0$ ) или стремящимся к бесконечности (при  $dS \rightarrow 0$ ), мы приводим нормализованные значения разности между этими показателями — Norm.  $dN - dS$ . Частоту встречаемости аминокислот в каждом конкретном положении анализируемых последовательностей определяли с помощью онлайн-ресурса <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html>.

**Статистический анализ.** Весь статистический анализ проводили в пакете прикладных программ Statistica v.12.0 («StatSoft», США). Статистическую значимость различий оценивали с использованием  $U$ -теста Манна-Уитни и  $t$ -теста Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Характеристика исследуемых групп.** В ходе исследования определены нуклеотидные последовательности C2-V3-C3-области гена *env* 132 образцов ВИЧ-1, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Пермском крае. Из них 82 (62,1%) принадлежали ПИН, 50 (37,9%) — гетеросексуалам. Данные о пациентах суммированы в табл. 1.

Среди исследованных образцов, полученных нами от гетеросексуалов в 2003—2005, 2008 и 2011 гг., большинство принадлежали пациентам женского пола, доля которых составляла 90,9, 57,1 и 77,7% соответственно. Среди пациентов-мужчин в охваченный в исследовании период эпидемии основным путем инфицирования являлся парентеральный при употреблении инъекционных наркотиков. Медиана возраста пациентов, составляющих исследованные группы, согласно датам получения образцов ВИЧ-1 варьировала от 21 года до 30 лет, однако значимых различий в данном показателе среди групп пациентов обнаружено не было ( $p > 0,05$ ) (см. табл. 1).

**Определение подтипа и филогенетический анализ.** В ходе анализа полученных нуклеотидных последовательностей была установлена принадлежность всех исследованных образцов (132/132, 100%) к подтипу A1 ВИЧ-1. Для выяснения принадлежности изучаемых последовательностей с генотипом A1 к генетическому варианту IDU-A ВИЧ-1 был проведен филогенетический анализ.

На представленном на рис. 1 фило-

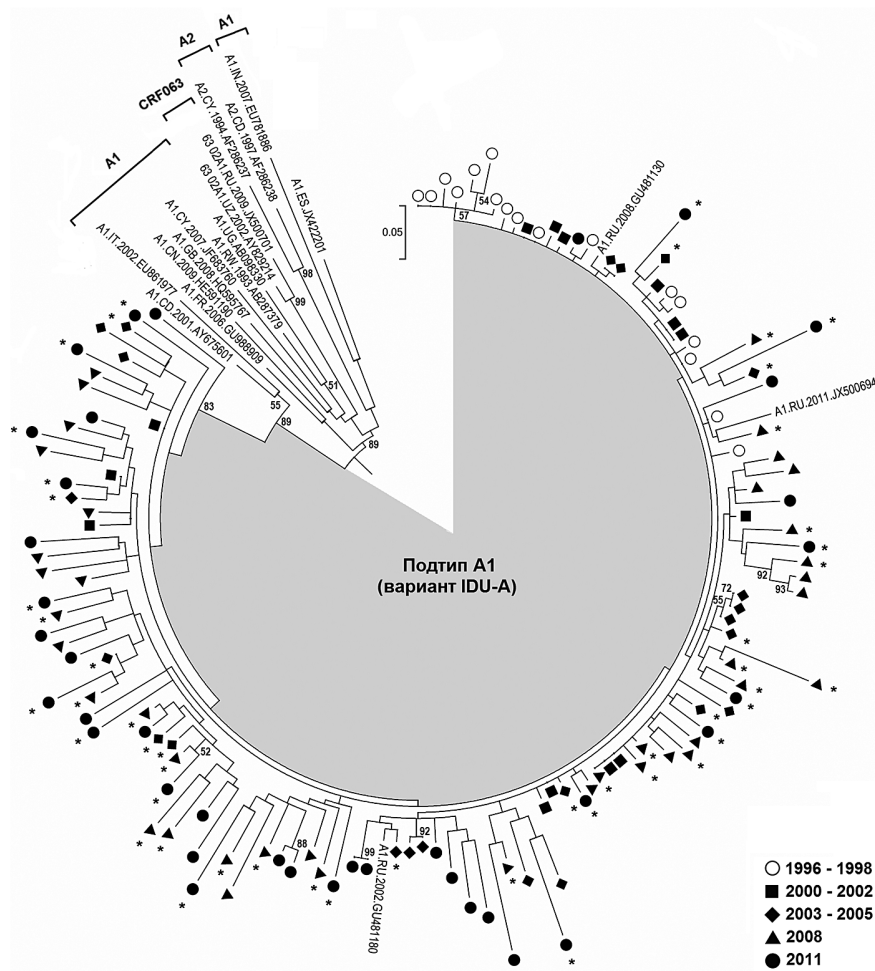


Рис. 1. Филогенетическое дерево 132 нуклеотидных последовательностей образцов ВИЧ-1 из Пермского края, референсных последовательностей подтипов A1, A2, CRF063\_02A1 (объединены квадратными скобками) и генетического варианта IDU-A ВИЧ-1, построенное с использованием метода максимального правдоподобия.

Область, выделенная серым цветом, соответствует последовательностям варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1. Символы  $\circ$   $\blacksquare$   $\blacklozenge$   $\blacktriangle$   $\bullet$  соответствуют времени получения образца; звездочкой отмечены образцы, полученные от гетеросексуалов. Цифрами у основания узлов ветвления указаны значения Bootstrap(BS)-поддержки, полученные при 1000 итераций (указаны значения  $\geq 50\%$ ).

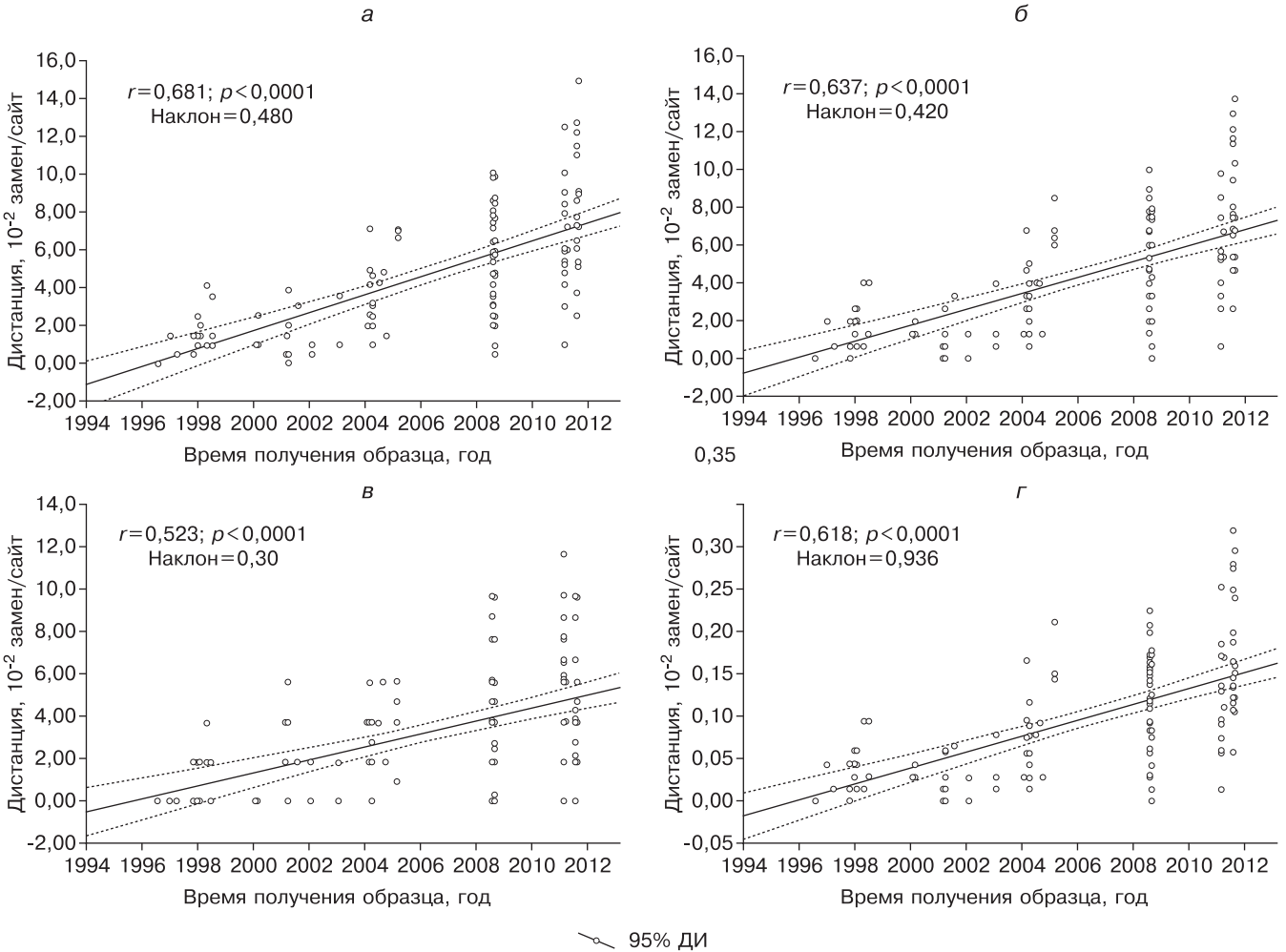


Рис. 2. Динамика эволюционных дистанций C2-V3-C3-области гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1.

Точки на графиках показывают нуклеотидные (а), несинонимичные (б), синонимичные (в) и аминокислотные (г) дистанции между индивидуальными последовательностями ( $n = 132$ ), полученными в разное время эпидемии, и их tMRCA. Приведена линия регрессии с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Коэффициенты корреляции, наклон и  $p$ -значения указаны на каждом графике.

генетическом дереве видно, что все нуклеотидные последовательности C2-V3-C2-области гена *env* ВИЧ-1, полученные для образцов из Пермского края в период с 1996 по 2011 гг., формируют субкластер (BS = 84%) с тремя референс-последовательностями варианта IDU-A из других регионов России. Кроме того, данный субкластер находится в составе филогенетической группы (BS = 89%) с образцами ВИЧ-1 подтипа A1, выделенными от пациентов из Демократической Республики Конго и Италии (ранее прибывшего из Республики Гвинея-Бисау), являющимися, по данным литературы, наиболее вероятными родоначальниками варианта IDU-A [19, 20]. Таким образом, результаты анализа свидетельствуют о принадлежности исследованных в настоящей работе образцов ВИЧ-1 к генетическому варианту IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1.

В ходе раздельного филогенетического анализа последовательностей, полученных от ПИН и гетеросексуалов в 2003—2005, 2008 и 2011 гг., мы не наблюдали групповой кластеризации между ними, что указывает на взаимное проникновение вируса между группами риска инфицирования ВИЧ-1 (филогенетические деревья не приводятся).

*Анализ последовательностей.* Поскольку дата начала

эпидемии ВИЧ-инфекции, вызванной вариантом IDU-A среди ПИН в Пермском крае, известна [10], в качестве последнего общего предка был использован консенсус, реконструированный из последовательностей, полученных для вариантов вируса, циркулировавших в Пермском крае в 1996—1998 гг. [7, 8].

Эволюционные дистанции между индивидуальными C2-V3-C3-последовательностями гена *env* ( $n = 132$ ), полученными от вирусов варианта IDU-A, циркулировавших в разное время, и их tMRCA были проанализированы с помощью регрессионного анализа. В ходе анализа выявлена положительная корреляция между датой получения образцов и их эволюционными дистанциями до tMRCA (рис. 2). На рис. 2 видно, что дистанции между индивидуальными последовательностями и их общим предком значительно варьируют, и близкие к предку последовательности выявлены в разное время от начала эпидемии. Тем не менее средние значения эволюционных дистанций, полученные для вирусов, циркулирующих в тот или иной период эпидемии, в целом со временем увеличиваются (табл. 2), и за 15-летний период (1996—2011) данный показатель вырос в 4,3 раза ( $p < 0,001$ ).

В свою очередь средняя скорость эволюции C2-V3-

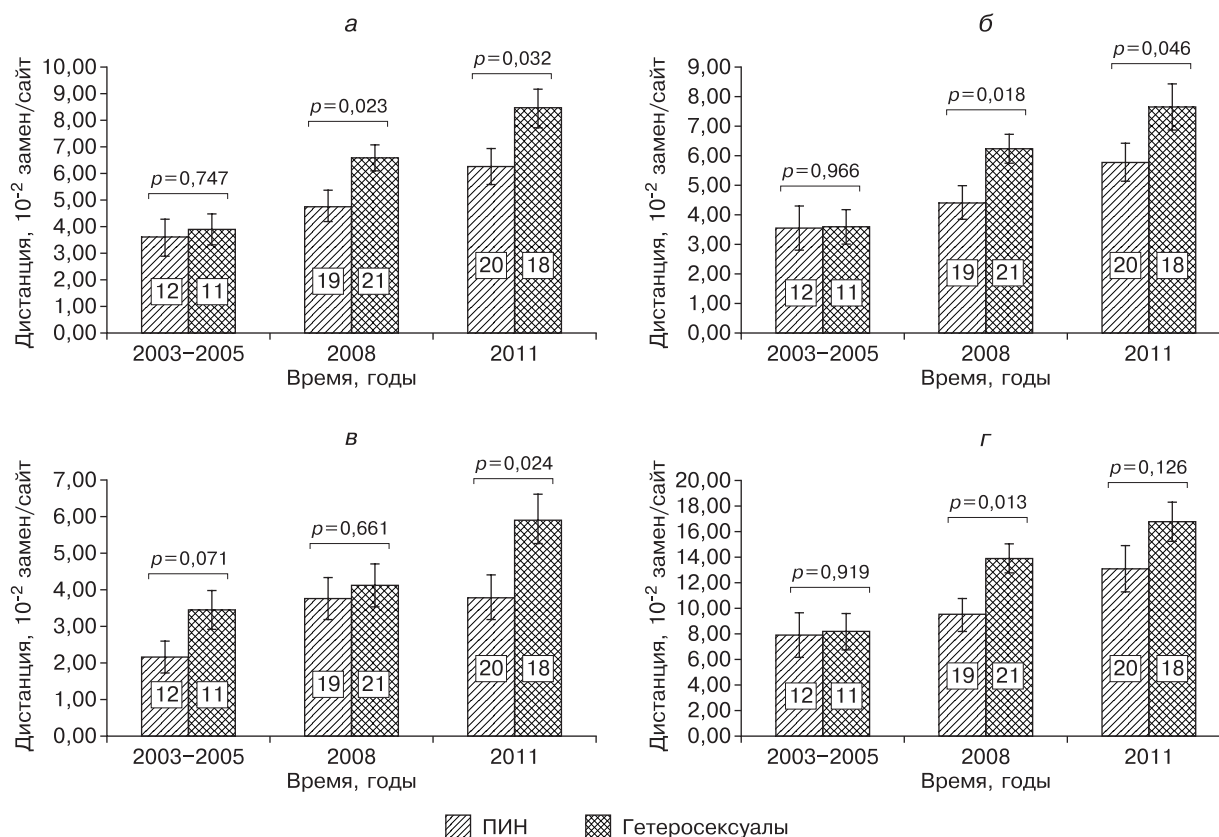


Рис. 3. Средние эволюционные дистанции участка гена *env* последовательностей варианта IDU-A ВИЧ-1, рассчитанные для вирусов, циркулировавших среди ПИН и гетеросексуалов в разные периоды эпидемии. Столбики соответствуют средним значениям нуклеотидных (а), несинонимичных (б), синонимичных (в) и аминокислотных (г) дистанций между последовательностями и их tMRCA с указанием стандартной ошибки среднего. Сверху приведены *p*-значения для разницы между группами; цифрами внутри столбиков указано количество использованных последовательностей.

С3-области гена *env* для варианта IDU-A составила  $4,80 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год. Средняя скорость аминокислотных, синонимичных и несинонимичных замен составила  $9,36 \cdot 10^{-3}$ ,  $4,20 \cdot 10^{-3}$  и  $3,00 \cdot 10^{-3}$  замен на сайт в год соответственно.

В связи с имеющимися в литературе данными о различии в скорости дивергенции вариантов вирусов на уровне популяции ПИН и гетеросексуалов [3] мы провели сравнительный анализ образцов ВИЧ-1, полученных от пациентов из данных групп риска в периоды эпидемии 2003—2005, 2008 и 2011 гг.

В ходе анализа установлено, что средние эволюционные дистанции между вариантами ВИЧ-1, циркулирующими в данных группах риска, различаются, и начиная с 2008 г. эти различия носят статистически значимый характер ( $p < 0,05$ ). Среди вирусов, выделенных в 2008 г. от пациентов из группы риска ПИН, средние значения нуклеотидных и несинонимичных дистанций меньше таковых у гетеросексуалов в 1,24 ( $p = 0,023$ ) и 1,31 ( $p = 0,018$ ) раза соответственно. В 2011 г. аналогичные показатели также были меньше для вирусов, распространяющихся среди ПИН, чем для вирусов, циркулирующих в среде гетеросексуалов, и различались в 1,33 ( $p = 0,032$ ) и 1,28 ( $p = 0,046$ ) раза соответственно (рис. 3). В среднем же степень дивергенции вирусов, циркулировавших в 2003—2011 гг. среди гетеросексуалов, выше таковой у ПИН в 1,3 раза ( $p = 0,008$ ). Средняя скорость эволюции анализируемой области гена *env* была выше в 1,7 раза

( $p < 0,001$ ) для вирусов, распространяющихся среди гетеросексуалов, и составила  $6,60 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных за-

Таблица 2

Средние эволюционные дистанции последовательностей C2-V3-C3-области гена *env* образцов ВИЧ-1 варианта IDU-A, выделенных в разное время на территории Пермского края, от их tMRCA

Время получения образца, год	Дистанция, 10 <sup>-2</sup> замен/сайт*			
	нуклеотидная	аминокислотная	dN**	dS***
1996—1998 (n = 17)	1,48 ± 0,25	3,64 ± 0,68	1,62 ± 0,29	0,85 ± 0,27
2000—2002 (n = 14)	1,42 ± 0,30 [ <i>p</i> = 0,869]	2,69 ± 0,59 [ <i>p</i> = 0,311]	1,26 ± 0,28 [ <i>p</i> = 0,384]	1,32 ± 0,49 [ <i>p</i> = 0,499]
2003—2005 (n = 23)	3,74 ± 0,44 [ <i>p</i> < 0,001]	8,04 ± 1,11 [ <i>p</i> < 0,001]	3,58 ± 0,46 [ <i>p</i> < 0,001]	2,77 ± 0,36 [ <i>p</i> = 0,041]
2008 (n = 41)	5,72 ± 0,39 [ <i>p</i> = 0,002]	11,81 ± 0,90 [ <i>p</i> = 0,012]	5,38 ± 0,39 [ <i>p</i> = 0,005]	3,75 ± 0,39 [ <i>p</i> = 0,058]
2011 (n = 38)	7,31 ± 0,51 [ <i>p</i> = 0,016]	14,83 ± 1,19 [ <i>p</i> = 0,051]	6,66 ± 0,50 [ <i>p</i> = 0,047]	4,79 ± 0,47 [ <i>p</i> = 0,170]

Примечание. \* — среднее ± стандартная ошибка; \*\* — несинонимичная дистанция; \*\*\* — синонимичная дистанция. В квадратных скобках указаны *p*-значения для разницы между показателями, соответствующими разным временным периодам, т. е. полученные при сравнении значения дистанции между вирусами, выделенными в данный период, с предыдущим.

Таблица 3

Позиции, находящиеся под действием позитивного отбора, в областях V3 и C3 gp120 *env* ВИЧ-1 среди вариантов, распространяющихся в группах риска ПИН и гетеросексуалов

Группа риска	Область гена <i>env</i>	НХВ2 <i>env</i> , позиция *	Norm. dN-dS	<i>p</i>	Кодируемые аминокислоты, %**
ПИН ( <i>n</i> = 82)	V3	322	2,14	0,008	D(72), A(12), E(9)↑
		323	1,16	0,084	I(85), T(13)↓
	C3	336***	1,66	0,014	A(73)↓, E(6)↑, T(17)↑
		337	1,74	0,057	A(77),E/D(12) ↑
		339	0,87	0,086	N(93)↓,E(4)↑
		344***	1,36	0,046	K(76)↓, E(6)↑, N(12)
		347***	3,09	0,019	T(70)↓, A(18)↑
	354	1,24	0,046	N(87), K(2)	
Гетеросексуалы ( <i>n</i> = 50)	V3	300	0,61	0,085	G(82)↓, S(10)↑,N(6)↑
	C3	326	1,13	0,042	T(67)↓, P(12), T(10)↑
		330	1,07	0,028	H(60)↑, Y(40)↓
		335	1,05	0,092	R(58)↓, K(18)↑
		336***	1,25	0,086	A(52)↓, T(32), E(8)
		340	1,36	0,053	S(48)↓, N(20), K/R(24)
		344***	1,84	0,005	K(50)↑, E(20)↓, N(18)
	347***	1,95	0,042	T(58), A/I(18), K/R(16)	

Примечание. \* — координаты даны относительно области gp120 варианта НХВ2 ВИЧ-1 (номер в GenBank K03455); \*\* — указана частота встречаемости наиболее распространенных аминокислот в данном положении; \*\*\* — положения, находящиеся под действием позитивной селекции, общие для двух групп риска; ↓↑ — увеличение или снижение частоты встречаемости конкретной аминокислоты в данном положении по мере развития эпидемического процесса.

мен на сайт в год против аналогичного показателя для ПИН, равного  $3,84 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год. Скорость несинонимичных замен в указанной области генома в данных группах риска также различалась в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ) и составила  $3,36 \cdot 10^{-3}$  и  $5,88 \cdot 10^{-3}$  замен на сайт в год для ПИН и гетеросексуалов соответственно.

Помимо различий в степени дивергенции и скорости эволюции вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в группах риска ПИН и лиц с половым путем инфицирования, в ранних работах было отмечено наличие определенных позиций в геноме вируса, ассоциированных с той или иной группой риска [10]. В настоящем исследовании мы не обнаружили значимых различий в частоте встречаемости тех или иных нуклеотидов и/или аминокислот в C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1, связанных с изучаемыми группами риска. Однако анализ отбора, действующего на уровне анализируемой области гена *env* среди вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в группах риска ПИН и гетеросексуалов, показал некоторые различия.

Суммарно на уровне C2-V3-C3-области гена *env* значения dN/dS для вирусов, циркулировавших среди ПИН в 2003—2005, 2008 и 2011 гг., составили: 1,21; 1,32 и 1,16 соответственно. Аналогичный показатель для вирусов, выделенных от гетеросексуалов, составил 1,07; 1,38 и 0,90 для 2003—2005, 2008 и 2011 гг. соответственно. Средний показатель dN/dS, полученных на основе анализа вирусов, выделенных от пациентов в 2003—2011 гг., равнялся 1,23 для ПИН и 1,12 для гетеросексуалов соответственно, что в целом говорит о наличии позитивного

отбора в C2-V3-C3-области гена *env* ВИЧ-1. При анализе позитивной селекции на уровне единичных кодонов было обнаружено, что отбору подвергаются различные положения кодонов в зависимости от принадлежности вирусов к той или иной группе риска (табл. 3). В пределах анализируемого участка гена *env* ВИЧ-1 только в C2-области не было обнаружено позиций, находящихся под действием позитивного отбора.

Как видно из табл. 3, общими относительно действия позитивного отбора для вирусов, циркулирующих среди ПИН и гетеросексуалов, являются кодоны в положениях 336, 344 и 347. Другие 5 положений, находящихся под действием позитивной селекции, различаются между вирусами из данных групп. Кроме того, были отмечены различия в частоте встречаемости тех или иных аминокислот в данных положениях. Так, в положении 344 для вирусов, распространяющихся среди ПИН, со временем наблюдалось снижение частоты встречаемости аминокислоты лизина (K) и увеличение доли глутаминовой кислоты (E) ( $p < 0,05$ ). В то же время среди вирусов, выделенных от гетеросексуалов, наблюдалась обратная картина: доля K увеличивалась, а доля E уменьшалась ( $p < 0,05$ ). Стоит отметить, что действие позитивного отбора на уровне кодонов в положениях 336 и 344 независимо от принадлежности вирусов к группе риска было характерным на протяжении всех исследуемых периодов эпидемии с 2003 по 2011 г.

### Обсуждение

В ходе исследования был проведен анализ изменчивости участка гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1 на примере вирусов, выделенных от пациентов из Пермского края в период 1996—2011 гг. Ретроспективный эпидемиологический анализ показывает, что основными группами риска инфицирования на территории края являются ПИН и гетеросексуалы. По мере развития эпидемического процесса в регионе происходили изменения в структуре путей передачи вируса, характеризующиеся постепенным увеличением доли гетеросексуального пути с 6,3% в 1996—2001 гг. до 36,1% в 2011 г. Превалирование женщин в гендерной структуре гетеросексуального пути передачи (см. табл. 1) характерно для развития эпидемического процесса в Пермском крае начиная с 2003 г., когда инфицирование в результате гетеросексуальных контактов стало ведущим путем передачи вируса среди женщин.

Анализ эволюционных дистанций между вирусами, циркулировавшими в разное время на территории региона, и их tMRCA продемонстрировал наличие временной модели (молекулярных часов) в эволюции варианта IDU-A ВИЧ-1, ранее описанной на примере вирусов других подтипов [7, 8]. Вирусы, выделенные в более поздние периоды эпидемии, в целом характеризуются большими значениями эволюционных дистанций от их общего предка, чем варианты, циркулировавшие в предшествующие периоды. При этом, как было показано, со временем степень дивергенции вирусов от их общего предка значительно возрастает (см. табл. 2, рис. 2). Наличие образцов вирусов, полученных за длительный период эпидемии ВИЧ-инфекции в регионе, позволило также оценить среднюю скорость эволюции исследуе-

мого участка гена *env* ВИЧ-1, составившую  $4,80 \cdot 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год, что согласуется с ранее приведенными данными [3, 21].

Согласно эпидемиологическим исследованиям, выход варианта IDU-A за пределы группы риска ПИН и их половых партнеров и проникновение в среду гетеросексуалов отмечается в начале 2000-х годов. При этом половые партнеры ПИН могут рассматриваться в качестве так называемой проводниковой группы, служащей звеном в цепи передачи вируса между данными группами риска.

Примечательно, что продемонстрированные в настоящем исследовании значимые различия в степени дивергенции между вирусами, циркулирующими среди ПИН и гетеросексуалов, еще не обнаруживаются для вирусов, полученных в 2003—2005 гг. Данный факт скорее всего обусловлен недостаточным количеством времени, прошедшего с момента проникновения вируса в новую группу риска. Со временем различия в уровне дивергенции между вирусами, циркулирующими в данных группах риска, приобретают более заметный характер и свидетельствуют о более высоком уровне гетерогенности вариантов ВИЧ-1, распространяющихся среди гетеросексуалов. Кроме того, при сравнении средней скорости эволюции C2-V3-C3-участка гена *env* было установлено, что данный показатель выше для вирусов, распространяющихся среди гетеросексуалов. Согласно предположению, выдвинутому I. Veegu и соавт. [3], полученные результаты могут быть обусловлены различием в темпах распространения вируса в конкретных группах риска и влиянием со стороны иммунной системы организма хозяина на популяцию вируса [3]. В среде ПИН распространение вариантов ВИЧ-1 происходит быстро и, как правило, в начальной стадии инфекции до того, как со стороны иммунной системы будет оказано селективное давление на его популяцию. Это приводит к передаче вариантов ВИЧ-1, генетически близких друг другу, обуславливая тем самым высокую степень гомогенности вирусов, циркулирующих в данной группе риска. В противоположность этому распространение ВИЧ-1 среди гетеросексуалов происходит намного медленнее и определяется временем, необходимым для формирования новых социальных контактов, а также более низкой частотой инфицирования вирусом в результате полового акта, чем при парентеральном пути заражения. В результате передача вируса в ряду донор—реципиент происходит в более поздних стадиях инфекции, когда вирус в пределах организма ВИЧ-инфицированного лица уже успевает претерпеть генетические изменения, что приводит к увеличению гетерогенности популяции вирусов, циркулирующих среди гетеросексуалов.

Выявленные в данной работе расхождения в положениях 5 кодонов, находящихся под действием позитивного отбора (см. табл. 3), среди вирусов, циркулирующих в группах риска ПИН и гетеросексуалов, вероятно, также могут быть следствием различий в скорости распространения вируса в данных группах риска. Тем не менее позитивная селекция тех или иных аминокислот в данных положениях среди вирусов, циркулирующих в среде ПИН и гетеросексуалов, может быть следствием адаптивной эволюции ВИЧ-1 к распространению в этих группах риска.

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют значительное увеличение со временем дивергенции между вариантами IDU-A ВИЧ-1, циркулирующими на территории Пермского края, и неоди-

наковый темп эволюции вируса в группах риска ПИН и гетеросексуалов. Данный факт наряду с позитивным отбором, действующим на уровне различных позиций в составе указанной области генома ВИЧ-1, свидетельствует об особенностях эволюции вируса в зависимости от его распространения в конкретной группе риска — ПИН или гетеросексуалов.

Полученные в нашем исследовании нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами KR493349—KR493380, KR817642—KR817673 и KT737386—KT737424.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—10, 14—21 см. REFERENCES)

11. Бобков А.Ф., Зверев С.Я., Бобкова М.Р., Осташова В.Л., Красникова Л.А., Зубриков В.В. и др. Эпидемиологическая и генетическая характеристика первых 40 случаев ВИЧ-инфекции на территории Пермской области. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(4): 18—21.
12. Фельдблом И.В., Зверев С.Я., Остапович А.В., Аликина Ю.И., Суханова А.Л., Казеннова Е.В. и др. Молекулярно-эпидемиологические аспекты распространения ВИЧ-инфекции в Пермском крае. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; (2): 18—24.
13. Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Исмаилова А., Бейшеева Н. и др. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(5): 26—32.

#### REFERENCES

1. Joos B., Fischer M., Schweizer A., Kuster H., Böni J., Wong J.K. et al. Positive in vivo selection of the HIV-1 envelope protein gp120 occurs at surface-exposed regions. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(2): 313—20.
2. Lythgoe K.A., Fraser C. New insights into the evolutionary rate of HIV-1 at the within-host and epidemiological levels. *Proc. Biol. Sci.* 2012; 279(1741): 3367—75.
3. Berry I.M., 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): 10625—35.
4. Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*. 2000; 288(5472): 1789—96.
5. Frost S.D., Wrin T., Smith D.M., Kosakovsky Pond S.L., Liu Y., Paxinos E. et al. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(51): 18514—9.
6. Barroso H., Borrego P., Bartolo I., Marcelino J.M., Familia C., Quintas A. et al. Evolutionary and structural features of the C2, V3 and C3 envelope regions underlying the differences in HIV-1 and HIV-2 biology and infection. *PLoS One*. 2011; 6(1): e14548.
7. Abebe A., Lukashov V.V., Rinke De Wit TF, Fisseha B., Tegbaru B., Kliphuis A. et al. Timing of the introduction into Ethiopia of subcluster C of HIV type 1 subtype C. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2001; 17(7): 657—61.
8. Lukashov V.V., Goudsmit J. Recent evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1 subtypes B: reconstruction of epidemic onset based on sequence distances to the common ancestor. *J. Mol. Evol.* 2002; 54(5): 680—91.
9. Kuiken C., Thakallapalli R., Esklid A., de Ronde A. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am. J. Epidemiol.* 2000; 152(9): 814—22.
10. Dukhovlina E., Masharsky A., Tousseva O., Verevchkin S., Solovyeva T., Meringof M. et al. Two Independent HIV Epidemics in Saint Petersburg, Russia Revealed by Molecular Epidemiology. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015; 31(6): 608—14.
11. Bobkov A.F., Zverev S.Ya., Bobkova M.R., Ostashova V.L., Krasnikova L.A., Zubrikov V.V. et al. Epidemiological and genetical characteristics of first 40 cases of HIV infection in Perm region. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(4): 18—21. (in Russian)

12. Fel'dblyum I.V., Zverev S.Ya., Ostapovich A.V., Alikina Yu.I., Sukhanova A.L., Kazennova E.V. et al. The molecular epidemiological aspects of HIV-infection spreading in Perm region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2007; (2): 18—24. (in Russian)
13. 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)
14. Delwart E., Shpaer E.G., Louwagie J., McCutchan F.E., Grez M., R@tbsamen-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.
15. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12): 2725—9.
16. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8): 772.
17. Yang W., Bielawski J.P., Yang Z. Widespread adaptive evolution in the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Mol. Evol.* 2003, 57(2): 212—21.
18. Delpont W., Poon A.F., Frost S.D., Kosakovsky P., Pond S.L. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*. 2010; 26(19): 2455—7.
19. Thomson M.M., de Parga E.V., Vinogradova A., Sierra M., Yakovlev A., Rakhmanova A. et al. New insights into the origin of the HIV type 1 subtype A epidemic in former Soviet Union's countries derived from sequence analyses of preepidemic transmitted viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2007; 23(12): 1599—604.
20. 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.
21. Lemey P., Rambaut A., Pybus O.G. HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Rev*. 2006; 8(3): 125—40.

Поступила 12.10.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.833.26.083.2

*Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И.*

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ И УТОЧНЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОГО ПЕЙЗАЖА

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск

Иркутская область является уникальной территорией, на которой зафиксирована циркуляция вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) всех известных в настоящее время субтипов. В последние годы в некоторых областях Российской Федерации описан феномен смены субтипов ВКЭ с замещением дальневосточного субтипа сибирским. В настоящей работе представлены результаты индивидуального исследования 11 522 экземпляров иксодовых клещей и проб мозга 81 мелкого млекопитающего, собранных в природных очагах КЭ на территории Иркутской области с 2006 по 2014 г. Выделено и исследовано вирусологическими методами более 60 штаммов ВКЭ, 68 изолятов типированы по фрагменту гена E (1193 п. н.). Большинство штаммов независимо от субтипа продемонстрировали высокую вирулентность для лабораторных мышей (ЛМ) как при внутримозговом, так и при периферическом пути введения вируса. Все штаммы, выделенные от теплокровных (мелких млекопитающих и человека), обладали высокой степенью вирулентности для ЛМ, но на филогенетическом древе попадали в один кластер с изолятами от клещей, собранных в том же районе. «Клещевые» штаммы разной степени вирулентности также не образовывали отдельных кластеров на древе. Филогенетический анализ показал, что генотипический пейзаж ВКЭ на обследованной территории в настоящее время претерпевает изменения, характеризующиеся абсолютным преобладанием сибирского субтипа (94,1%), представленного двумя группами с прототипными штаммами Заусаев и Васильченко. Группа штаммов Васильченко распространена на всей обследованной территории, штаммы группы Заусаев изолированы в основном в ближайших пригородах Иркутска. В природных очагах Прибайкалья постоянно циркулирует ВКЭ европейского субтипа (не менее 5% выборки), и его штаммы обладают высокой вирулентностью для беспородных белых мышей. ВКЭ дальневосточного субтипа в группе изолятов 2006—2014 гг. не обнаружен. Филогенетическое родство исследованных штаммов больше связано с местом, чем с годом и источником выделения изолята.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; субтипы; штаммы; вирулентность для лабораторных мышей.

Для цитирования: Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И. Характеристика изолятов вируса клещевого энцефалита из природных очагов в Иркутской области и уточнение генотипического пейзажа. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 229-234.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-229-234

*Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I.*

### TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATES FROM NATURAL FOCI OF THE IRKUTSK REGION: CLARIFICATION OF THE GENOTYPE LANDSCAPE

Irkutsk Antiplague Research Institute, Irkutsk, 664047, Russian Federation

Для корреспонденции: Мельникова Ольга Витальевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. природно-очаговых вирусных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск. E-mail: melnikovaovit@gmail.com