

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области

Щемелев А.Н.¹, Семенов А.В.², Останкова Ю.В.¹, Найденова Е.В.³, Зуева Е.Б.¹, Валутите Д.Э.¹, Чурина М.А.⁴, Виролайнен П.А.¹, Тотолян Арег А.¹

¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, г. Санкт-Петербург, Россия;

²Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 620030, г. Екатеринбург, Россия;

³ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, г. Саратов, Россия;

⁴СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина», 191167, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Как известно на сегодняшний день, эпидемия ВИЧ-инфекции в Калининградской области преимущественно была связана с распространением рекомбинантной формы вируса (CRF03_AB), однако регулярные заносы ВИЧ из других стран и частей света создали благоприятные условия для формирования и распространения его разнообразных рекомбинантных форм.

Наиболее полная информация о разнообразии рекомбинантных форм в регионе необходима для понимания структуры лекарственной устойчивости (ЛУ), так как влияние ассоциированных с ней мутаций на приспособленность вируса может быть неодинаковым для разных субтипов, причём рекомбинантные формы могут сочетать в своём геноме наиболее удачные паттерны мутаций, что позволит ВИЧ с большей эффективностью противостоять антиретровирусной терапии.

Цель работы. Изучение генетического разнообразия ВИЧ-1 в Калининградской области.

Материалы и методы. Исследованы 162 образца плазмы крови, полученные от пациентов из Калининградской области как с подтверждённой вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии, так и с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. Для обратной транскрипции и амплификации ВИЧ использовали диагностический набор «АмплиСенс HIVResist-Seq» (ЦНИИЭ, Россия).

Результаты и обсуждение. Доминирующими в группе являлись различные рекомбинанты между субтипами А и В (74%), в том числе CRF03_AB и субтипом А (33,95%) и рекомбинантная форма, схожая с CRF03_AB (CRF03_AB-like (13,58%). Среди «чистых» субтипов вируса доминирует характерный для территории Российской Федерации суб-субтип – А6 (16,67%), одновременно с ним циркулируют субтипы В (3,70%) и G (1,23%).

Были выявлены 96 пациентов (59,26%) хотя бы с одной мутацией, ассоциированной с ЛУ к антиретровирусным препаратам.

Заключение. Выявленное разнообразие субтипов и рекомбинантных форм вируса указывает на то, что в исследуемом регионе продолжается активный процесс формирования новых рекомбинантов, причём между как уже существующими рекомбинантными формами и «чистыми» субтипами, так и между «чистыми» субтипами.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека; ВИЧ; рекомбинантные формы ВИЧ; лекарственная устойчивость ВИЧ; лабораторная диагностика

Для цитирования: Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Чурина М.А., Виролайнен П.А., Тотолян Арег А. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 310-321. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

Для корреспонденции: Щемелев Александр Николаевич, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: tvil-dorm@gmail.com

Участие авторов: Щемелев А.Н. – проведение исследований, подбор литературы, статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи; Останкова Ю.В. – проведение исследований, подбор литературы, статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи; Семенов А.В. – организация исследований, написание текста статьи; Найденова Е.В. – проведение исследований, написание текста статьи; Валутите Д.Э. – проведение исследований; Зуева Е.Б. – проведение исследований; Тотолян Арег А. – общее руководство, написание текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протоколы исследования № 3 от 07.04.2010 и № 47 от 25.12.2018 одобрены Этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Поступила 26.05.2022
Принята в печать 21.07.2022
Опубликована 31.08.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region

Alexander N. Shchemelev¹, Aleksandr V. Semenov², Yulia V. Ostankova¹, Ekaterina V. Naidenova³, Elena B. Zueva¹, Diana E. Valutite¹, Mariia A. Churina⁴, Pavel A. Virolainen¹, Areg A. Totolian¹

¹FBSI «Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 197101, St. Petersburg, Russia;

²Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the Federal Research Institute, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector” of the Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 620030 Ekaterinburg, Russia;

³FSSI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 410005, Saratov, Russia;

⁴St. Petersburg GBUZ «Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital», 191167, St. Petersburg, Russia

Introduction. As is currently known, the epidemic process in the Kaliningrad Region was mainly associated with the spread of the recombinant form of HIV-1 (CRF03_AB); however, regular HIV importations from other countries and continents has created favorable conditions for emergence and spread of various recombinant forms of the virus.

The most complete information on the diversity of recombinant forms in the region is also necessary to understand the structure of drug resistance (DR).

The aim of the study was to explore the HIV-1 genetic diversity in the Kaliningrad Region.

Materials and methods. We studied 162 blood plasma samples obtained from patients from the Kaliningrad Region, both with confirmed virological failure of antiretroviral therapy (ART) and with newly diagnosed HIV infection. For reverse transcription and amplification of HIV genome fragments, diagnostic «AmpliSense HIVResist-Seq».

Results and discussion. The various recombinants between subtypes A and B (74%) were predominant in study group: recombinant was between CRF03_AB and subtype A (33.95%) and CRF03_AB-like (13.58%) were the most common. Among the “pure” subtypes of the virus, subtype A6 (16.67%). The circulation of subtypes B (3.70%) and G (1.23%) was also noted.

Ninety-six patients (59.26%) were identified with at least one mutation associated with antiretroviral (ARV) drug resistance.

Conclusion. The observed diversity of subtypes and recombinant forms of the virus implies that the new recombinants are actively emerging in the studied region, both between existing recombinant forms and “pure” subtypes, as well as between “pure” subtypes.

Keywords: *human immunodeficiency virus; HIV; recombinant forms of HIV; HIV drug resistance; laboratory diagnostics*

For citation: Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Churina M.A., Virolainen P.A., Totolian Areg A. Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(4): 310-321. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119>

For correspondence: Alexander Nikolaevich Shchemelev, Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 197101, Saint-Petersburg, Russia. E-mail: tvildorm@gmail.com

Information about the authors:

Shchemelev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Semenov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Ostankova Yu.V., <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Zueva E.B., <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Valutite D.E., <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Churina M.A., <https://orcid.org/0000-0003-0424-4654>

Virolainen P.A., <https://orcid.org/0000-0001-5918-9395>

Totolian A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Contribution: Shchemelev A.N. – spend research, selection of literature, statistical data processing, preparation of illustrative material, writing the text of the article; Ostankova Yu.V. – conducting research, selecting literature, statistical data processing, preparing illustrative material, writing the text of the article; Semenov A.V. – organization of research, writing the text of the article; Naydenova E.V. – conducting research, writing the text of the article; Valutite D.E. – researching; Zueva E.B. – researching; Churina M. A. – researching; Virolainen P.A. – researching; Totolyan Areg A. – general guidance, writing the text of the article.

Conflict of interest. The authors confirm that there is no conflict of financial/non-financial interests associated with writing the article.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol Research protocols No. 3 dated 04/07/2010 and No. 47 dated December 25, 2018 was approved by the Ethics Committee of the Saint-Petersburg Pasteur Institute

Received 26 May 2022

Accepted 21 July 2022

Published 31 August 2022

Введение

Вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), впервые выявленный в 1980-х гг., циркулирует в человеческой популяции около 100 лет. За это время сформировалась устойчивая филогенетическая структура, представленная тремя большими группами: N, O, M; последняя, в свою очередь, разделяется на 12 независимых ветвей-субтипов, включающих вирусные штаммы, более тесно связанные друг с другом, чем с другими субтипами [1, 2]. Первоначально классификация ВИЧ-1 была основана на последовательностях субгеномных областей или отдельных генов, однако совершенствование методов секвенирования дало возможность классифицировать ВИЧ-1 на основе полноразмерных геномов или последовательностей из нескольких субгеномных областей. Это позволило идентифицировать штаммы с характерными частями их геномов, соответствующих разным субтипам: подобные штаммы являются продуктами рекомбинации между родительскими штаммами, принадлежащими к разным субтипам. Когда ту или иную рекомбинантную форму идентифицируют у трёх или более человек без прямой эпидемиологической связи, её классифицируют как циркулирующую рекомбинантную форму (CRF). В настоящее время известно более 100 CRF [3], в совокупности их вклад в глобальную эпидемию ВИЧ составляет не менее 20% [4], в том числе потому, что рекомбинантные формы преобладают в нескольких регионах, таких как Западная и Центральная Африка (CRF02_AG) [5, 6] и Юго-Восточная Азия (CRF01_AE) [7, 8].

Рекомбинантные формы вируса являются результатом рекомбинации в ходе обратной транскрипции. В процессе синтеза антисмысловой цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) обратная транскриптаза (ОТ) с высокой частотой смещается с одной цепи рибонуклеиновой кислоты (РНК) на другую, и можно предположить, что, по крайней мере, обе копии геномной РНК альтернативно используются в качестве матриц. Частоту смены выбора копии у ВИЧ-1 между очень похожими матричными РНК оценивают в 3×10^{-4} – $1,4 \times 10^{-3}$ событий на нуклеотид, т.е. 3–12

переключений матрицы на репликацию генома [9–11]. Важно отметить, что образование вирионов, содержащих две разные геномные РНК, требует выполнения определённых условий: во-первых, два или более вируса с разными генотипами должны инфицировать одну и ту же клетку, во-вторых, геномные РНК разного происхождения должны быть впоследствии совместно упакованы. Подобная ситуация может быть связана либо с коинфекцией, либо с суперинфекцией пациента различными субтипами вируса.

Тот факт, что белки Nef и Vpr подавляют экспрессию CD4 и корецепторов во время инфекции ВИЧ-1, даёт основание предполагать крайне редкое возникновение суперинфекции [12]. Тем не менее гибридизация клеток пациентов *in situ* показала, что отдельные клетки могут содержать более четырёх различных провирусов [13, 14]. Кроме того, темпы образования новых рекомбинантных форм и их распространение, показанные в настоящее время, свидетельствуют о высокой частоте коинфекции *in vivo* [4, 15]. Таким образом, для активного образования рекомбинантных форм вируса необходимо выполнение важного условия – совместной циркуляции разных субтипов ВИЧ в регионе.

В Российской Федерации доминирующим суб-субтипом вируса является А6, также называемый IDU-A (Injecting Drug Users), или A-FSU (former Soviet Union countries). Данный суб-субтип ранее классифицировали как А1, но в связи со значимыми отличиями от других вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А1 в строении и распространении его выделили в отдельную сравнительно однородную группу [16, 17]. Тем не менее в некоторых регионах показана благоприятная обстановка для совместной циркуляции нескольких субтипов. В число таких регионов входит Калининградская область, так как её центр является крупным транспортным узлом с железными и шоссейными дорогами, морским и речным портами, международным аэропортом.

Как известно на сегодняшний день, эпидемический процесс в Калининградской области на начальном этапе был связан с распространением рекомбинантной формы вируса (CRF03_AB) в среде потребителей

инъекционных наркотиков. В дальнейшем ВИЧ-инфекция вышла за пределы уязвимых групп населения. Кроме того, регулярные заносы ВИЧ из других стран и частей света создали благоприятные условия для формирования новых разнообразных рекомбинантных форм вируса в регионе [18, 19].

Примечательно, что распространение субтипов и рекомбинантных форм в эпидемии ВИЧ-инфекции очень динамично: сейчас генетическое разнообразие вируса представлено смесью рекомбинантов, возникших на ранних этапах глобальной эпидемии, и других, более позднего происхождения, и все они способствуют созданию более сложных рекомбинантных форм, которые в дальнейшем внесут свой вклад в динамику глобальной популяции ВИЧ-1. Можно предположить, что подобный процесс образования всё более сложных рекомбинантных форм окажется основным направлением эволюционного развития вируса в Калининградской области.

Целью работы являлось изучение генетического разнообразия ВИЧ-1 в Калининградской области.

Материалы и методы

В ходе работы в 2014–2018 гг. был исследован клинический материал от 162 пациентов из Калининградской области как с подтверждённой вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии (АРТ), так и с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. Плазма крови для определения устойчивых штаммов ВИЧ была направлена в Северо-Западный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИДом (СЗО Центр СПИД) на базе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

В полученной плазме крови была определена вирусная нагрузка набором реагентов «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» (ЦНИИЭ, Россия) с порогом чувствительности 500 копий/мл. Образцы с определяемой вирусной нагрузкой в дальнейшем подвергали полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией РНК в ДНК (ОТ-ПЦР) и секвенированию по Сэнгеру. Для обратной транскрипции и амплификации ВИЧ использовали диагностические наборы «ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev» и «ПЦР-комплект-Pro/Rev» (ЦНИИЭ, Россия), секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору «АмплиСенс HIVResist-Seq» (ЦНИИЭ, Россия). Генотипирование ВИЧ-1 проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена *pol* протяженностью 1302 нт., кодирующего протеазу (PR) и часть обратной транскриптазы (RT/OT) в области 2253–3554 нт., координаты даны для представленного в международной базе данных GenBank ВИЧ HXB2 (K03455.1). Анализ продуктов секвенирующей реакции проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе дан-

ных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [20]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа применяли алгоритм Neighbor Joining, позволяющий оптимизировать деревья в соответствии с критерием сбалансированной минимальной эволюции. При оценке достоверности филогенетических связей использовали многократную генерацию выборок методом Bootstrap для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева.

Генотипирование исследуемых штаммов проводили параллельно в программе REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0 [21] и на основании анализа их филогенетических отношений с референсными последовательностями из международной базы данных GenBank. Для выявления и анализа рекомбинантных форм применяли программу REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0, используя параметры, предустановленные в программе (размер окна 400, шаг 20). Анализ генетических последовательностей ВИЧ-1 на наличие мутаций лекарственной устойчивости (ЛУ) проводили при помощи Стэнфордской базы данных (Stanford HIV DB) [22]. Анализ мутационных профилей проводили путём построения линейных диаграмм при помощи ПО Linear Diagram Generator [23].

Статистическую обработку данных производили с помощью пакетов программ MS Excel Professional Plus 2013 (Microsoft), Prizm v5.0 (GraphPad Software Inc.). При оценке статистической погрешности использовали точный интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представляли с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали (в зависимости от характеристик выборок) точный критерий Фишера или критерий χ^2 с поправкой Йейтса. В качестве порога достоверности отличий значение вероятности определили как $p < 0,05$.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Протоколы исследования № 3 от 07.04.2010 и № 47 от 25.12.2018 одобрены Этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Результаты и обсуждение

Получены последовательности 162 штаммов ВИЧ-1, которые были депонированы в GenBank под номерами ON367567 – ON367728. Для всех был определен их суб-субтип (**табл. 1**). При этом учитывали как данные, полученные при генотипировании при помощи инструментов REGA HIV Subtyping Tool 3.0 и jumping profile Hidden Markov Model (jpHMM) (Приложение А), так и результаты филогенетического исследования, проведенного в ПО Mega X (**рис. 1**).

Доминирующими в группе являлись различные рекомбинанты между субтипами А и В (74%;

Таблица 1. Распределение исследованных штаммов по субтипам ВИЧ-1

Table 1. Distribution of isolates by HIV-1 subtypes

Субтип Subtype	Количество штаммов Number of isolates	Доля в выборке, % Sample Share, %	95% ДИ, % 95% CI, %	
			–	+
HIV-1 Subtype A3	2	1,23	0,15	4,39
HIV-1 Subtype A6	27	16,67	11,28	23,31
HIV-1 Subtype B	6	3,70	1,37	7,89
HIV-1 Subtype G	2	1,23	0,15	4,39
HIV-1 CRF03_AB	41	25,31	18,81	32,73
HIV-1 CRF03_AB-like	22	13,58	8,71	19,84
Recombinant of 03_AB, A	55	33,95	26,71	41,79
HIV-1 CRF02_AG	4	2,47	0,68	6,20
Recombinant of A1, B	2	1,23	0,15	4,39
Recombinant of K, J	2	1,23	0,15	4,39

95% ДИ 66,61–80,63%), наиболее часто встречали рекомбинант между CRF03_AB и субтипом А (33,95%; 95% ДИ 26,71–41,79%). Кроме того, значительную долю (13,58%; 95% ДИ 8,71–19,84%) составляла рекомбинантная форма, схожая с CRF03_AB (CRF03_AB-like), но вклад «чистых» субтипов в формирование данной рекомбинантной формы не до конца ясен.

Доминирование в регионе рекомбинантов между субтипами А и В, в том числе CRF03_AB, согласуется с описанным в литературе генетическим разнообразием вируса в Калининградской области [16, 18, 19]. Тем не менее обращает на себя внимание неоднородность внутри клады рекомбинантов на филогенетическом дереве, что может быть связано как с особенностями эпидемиологических связей, так и с формированием в регионе новых циркулирующих рекомбинантных форм. Данный вопрос требует изучения полных геномов штаммов вируса из Калининградской области.

Среди рекомбинантов между субтипами А и В особого внимания заслуживают три штамма, отмеченные на филогенетическом дереве (рис. 1). На дендрограмме рекомбинанты между субтипами А и В образуют крупный гетерогенный кластер, а данные штаммы отделены от них, несмотря на то что в составе их гена *pol* присутствуют фрагменты, соответствующие субтипам А и В, что было подтверждено сравнительным рекомбинационным анализом в различном ПО (рис. 2). При этом их субтипирование в различных инструментах (REGA, Geno2Pheno, NCBI, Stanford HIV DB, RIP) не позволяет сделать окончательный вывод о генотипической принадлежности данных штаммов. Необходимо отметить, что все три образца имеют различное расположение на дендрограмме: штамм HIV1_2014_24_KG наиболее приближен к другим рекомбинантным формам между субтипами А и В; штамм HIV1_2014_19_KG кластеризуется со штаммами субтипа В; а штамм HIV1_2014_25_KG образует наиболее раннее ответвление – на уровне расхождения А-, В-рекомбинан-

тов и других субтипов ВИЧ-1. Пациенты, от которых были получены все три штамма, инфицированы относительно недавно (срок инфекции менее одного года) и не получали АРТ. При анализе генетических последовательностей на хроматограммах были выявлены многочисленные вырожденные фрагменты, т.е. присутствие нескольких различных нуклеотидов в одних и тех же позициях генома. Наблюдаемая ситуация, как известно, может свидетельствовать о разнообразии вирусной популяции в организме пациента, в том числе о коинфекции разными субтипами ВИЧ [24]. Отмечая вышесказанное, можно предположить, что обозначенные выше штаммы находятся в начале процесса рекомбинации ретровирусов, т.е. представлены преимущественно не рекомбинантными формами, а вариантами вируса с совместно упакованными в капсиде геномами А- и В-штаммов.

Кроме рекомбинантов между субтипами А и В, были встречены более редкие для европейской части России CRF02_AG, а также рекомбинанты между субтипами К и J [26].

Среди «чистых» субтипов вируса доминирует характерный для территории Российской Федерации субтип А, представленный двумя суб-субтипами – А6 (16,67%; 95% ДИ 11,28–23,31%) и А3 (1,23%; 95% ДИ 0,15–4,39%); одновременно с ним циркулируют субтипы В (3,70%; 95% ДИ 1,37–7,89%) и G (1,23%; 95% ДИ 0,15–4,39%).

Исследуемый регион демонстрирует распределение субтипов ВИЧ-1, отличное от других регионов России в целом и Северо-Западного федерального округа в частности [27–29]. Для сравнения значимости различий генетического разнообразия между регионами Северо-Западного федерального округа были выбраны суб-субтип А6, субтип В и рекомбинантные формы между субтипами А и В, поскольку именно они встречаются не только среди изученных нами образцов, но также и в штаммах из Архангельской [28] и Ленинградской области [29]. Для оценки

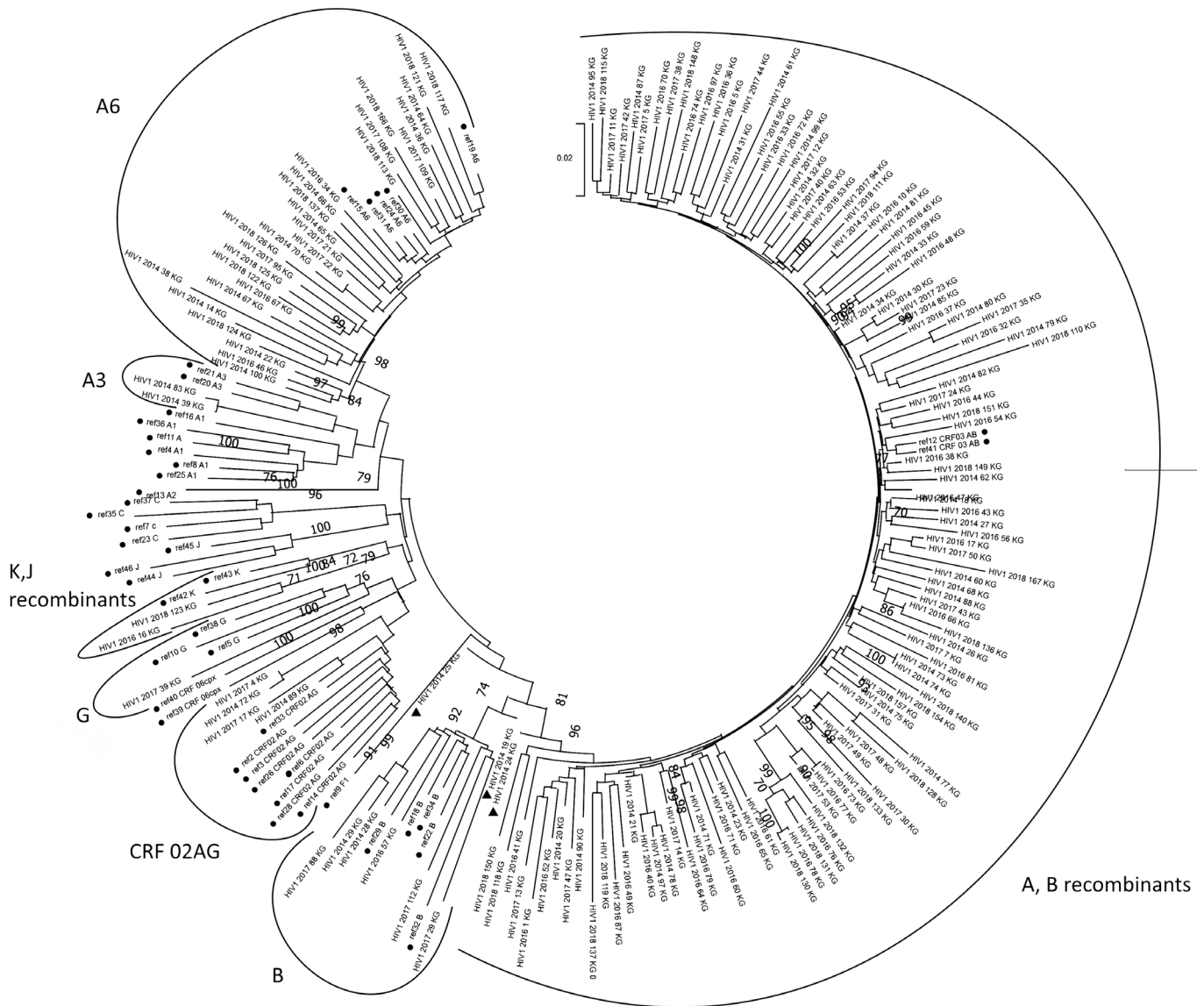


Рис. 1. Результаты филогенетического анализа при помощи алгоритма Neighbor Joining.

- – референсные последовательности (табл. 2);
- ▲ – рекомбинантные формы между субтипами A и B, не кластеризующиеся с другими рекомбинантами этой группы.

Fig. 1. Results of phylogenetic analysis using the Neighbor Joining algorithm.

- – reference sequences (table 2);
- ▲ – recombinant forms between subtypes A and B, not clustered with other recombinants of this group.

достоверности различий был использован критерий χ^2 с поправкой Йейтса. При этом достоверных различий между встречаемостью субтипов ВИЧ-1 в Архангельской и Ленинградской областях не выявлено, но наблюдается статистически значимое различие генетического разнообразия между ними и Калининградской областью (χ^2 составляет 254,277; критическое значение χ^2 при уровне значимости $p = 0,01$ составляет 13,277).

Такие различия в генетическом разнообразии объясняются доминированием рекомбинантных форм ВИЧ-1 в Калининградской области, в то время как в Архангельской и Ленинградской областях они бы-

ли встречены в единичных случаях. Одновременно с этим разнообразие «чистых» субтипов ВИЧ-1 соотносится с описанным в литературе [27–29], среди них также наблюдается преобладание субтипа A, преимущественно суб-субтипа A6.

Факт того, что в регионе преобладают варианты вируса, представляющие собой рекомбинант между CRF03_AB и субтипом A, а также рекомбинантная форма, схожая с CRF03_AB, но имеющая от неё ряд отличий (CRF03_AB-like), соотносится с представлением о том, что при длительной совместной циркуляции в популяции рекомбинантных форм и «чистых» субтипов вируса формируются новые, более сложные

Таблица 2. Наименование референсных последовательностей из GenBank, использованных в филогенетическом анализе
Table 2. Names of reference sequences from GenBank used in phylogenetic analysis

Суб-субтип Sub-subtype	Номер последовательности на филогенетическом дереве Number sequence in phylogenetic tree	Номер последовательности из GenBank Number sequence in GenBank	Регион происхождения Region of origin	Суб-субтип Sub-subtype	Номер последовательности на филогенетическом дереве Number sequence in phylogenetic tree	Номер последовательности из GenBank Number sequence in GenBank	Регион происхождения Region of origin
A1	ref4	AF069670	Сомали Somali	C	ref37	AY772699	Африка Africa
A1	ref8	AB287376	Руанда Ruanda	F1	ref9	AF075703	Финляндия Finland
A1	ref16	U51190	Уганда Uganda	G	ref5	AF061641	Финляндия Finland
A1	ref25	EU110087	Кения Kenia	G	ref10	U88826	Нигерия Nigeria
A1	ref27	AF484509	Уганда Uganda	G	ref38	AF084936	Конго Congo
A1	ref36	AF107771	Швеция Sweden	J	ref44	EF614151	Конго Congo
A2	ref13	AF286237	Кипр Cyprus	J	ref45	GU237072	Камерун Cameron
A3	ref1	AY521631	Сенегал Senegal	J	ref46	AF082394	Швеция Sweden
A3	ref20	AY521629	Швеция Sweden	K	ref42	AJ249235	Камерун Cameron
A6	ref15	HQ449397	Россия, Краснодар Russia, Krasnodar	K	ref43	AJ249239	Камерун Cameron
A6	ref19	HQ161930	Россия, Смоленск Russia, Smolensk	CRF02_AG	ref2	AF063224	Джибути Djibouti
A6	ref24	EF589043	Казахстан Kazakhstan	CRF02_AG	ref3	GU201514	Камерун Cameron
A6	ref30	AY500393	Россия, Москва Russia, Moscow	CRF02_AG	ref6	KT124792	Германия Germany
A6	ref31	AF413987	Украина Ukraine	CRF02_AG	ref14	AB231898	Гана Ghana
B	ref18	M17449	США USA	CRF02_AG	ref17	EU786671	Испания Spain
B	ref22	KJ771697	Германия Germany	CRF02_AG	ref26	AB231896	Гана Ghana
B	ref29	HM586190	Великобритания Great Britain	CRF02_AG	ref28	AY151001	Эквадор Ecuador
B	ref32	AY713409	США USA	CRF02_AG	ref33	AF377954	Камерун Cameron
B	ref34	AY173951	Таиланд Thailand	CRF06_cpx	ref39	HQ529257.1	Гана Ghana
C	ref7	AF067155	Индия India	CRF03_AB	ref12	AF193276	Россия, Калининград Russia, Kaliningrad
C	ref23	U52953	Бразилия Brazil	CRF03_AB	ref41	AF414006.1	Беларусь Belarus
C	ref35	U46016	Эфиопия Ethiopia	CRF06_cpx	ref40	MN605500.1	Гвинея-Бисау Guinea-Bissau

рекомбинантные формы с включением в геном новых фрагментов [4].

Помимо генотипического анализа, было проведено исследование встречаемости в данном регионе мутаций, ассоциированных с ЛУ. При этом были исследованы штаммы, полученные как от пациентов с неэффективностью АРТ ($n = 107$), так и с впервые выявленной инфекцией ($n = 55$). Первичная ЛУ была

выявлена всего в двух случаях (3,64%; 95% ДИ 0,44–12,53%), поэтому дальнейший анализ объединяет всех пациентов с выявленными мутациями ЛУ.

Всего было встречено 80 различных мутаций, ассоциированных с ЛУ. Из них большая часть – мутации ЛУ к ингибиторам ОТ, в том числе к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ) – 31 замена (38,75%; 95% ДИ 28,06–50,30%) и к нуну-

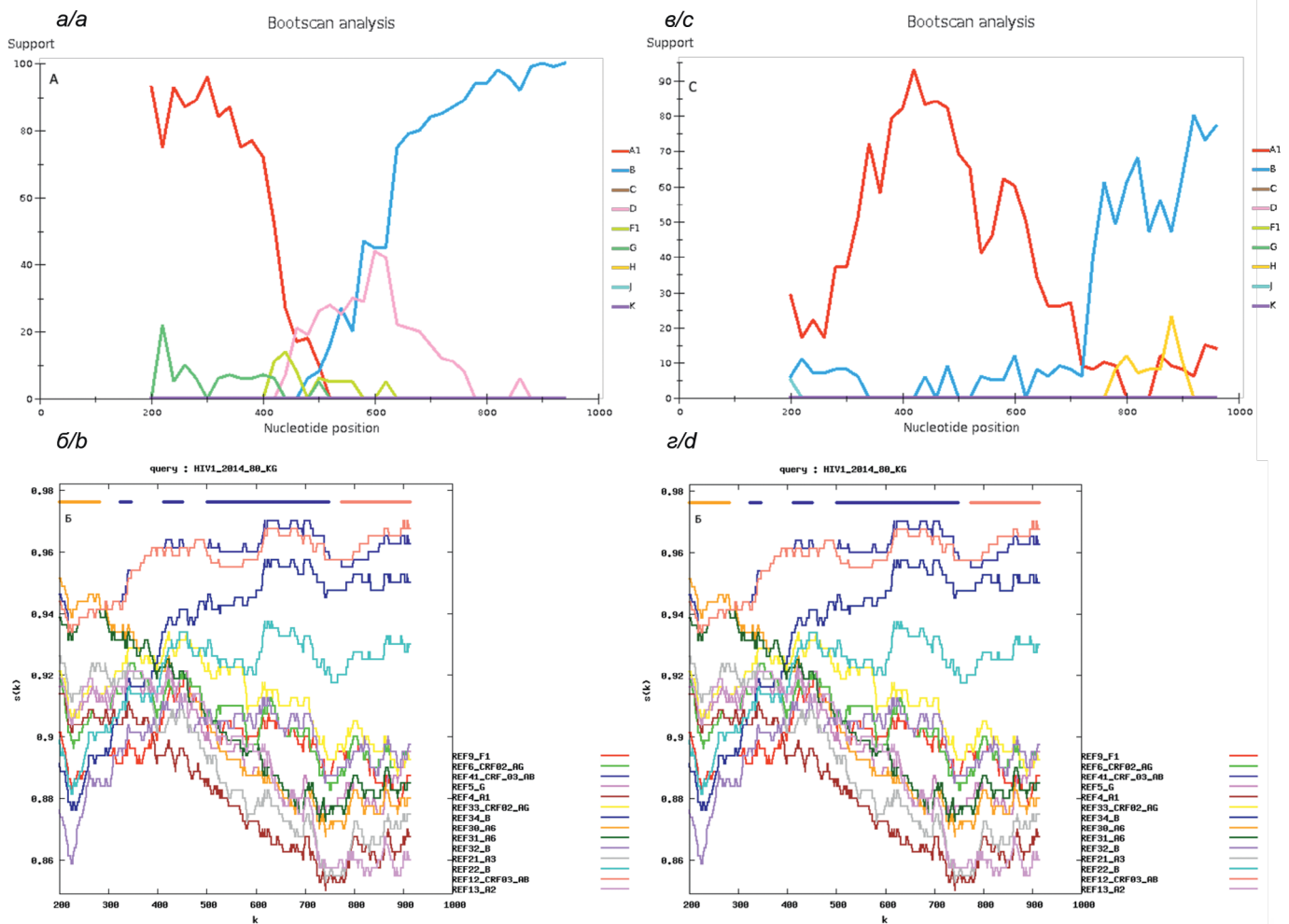


Рис. 2. Сравнительный рекомбинационный анализ образцов 2014_80 (CRF03_AB) и 2014_19 (A + B recombinant) в Rega HIV Subtyping Tool v3.0 [21] и Recombinant Identification Program [25].

a – образец 2014_80 в Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *б* – образец 2014_80 в Recombinant Identification Program; *в* – образец 2014_19 в Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *г* – образец 2014_19 в Recombinant Identification Program [25].

Fig. 2. Comparative recombination analysis of samples 2014_80 (CRF03_AB) and 2014_19 (A + B recombinant) in Rega HIV Subtyping Tool v3.0 [21] and Recombinant Identification Program (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>)

a – sample 2014_80 in Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *b* – sample 2014_80 in the Recombinant Identification Program; *c* – sample 2014_19 in Rega HIV Subtyping Tool v3.0; *d* – sample 2014_19 in the Recombinant Identification Program [25].

клеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) – 35 мутаций (43,75%; 95% ДИ 32,68–55,30%); меньшая доля разнообразия мутаций приходится на замены, ассоциированные с ЛУ к ингибиторам протеазы (ИП) – 14 (17,50%; 95% ДИ 9,91–27,62%).

У 96 пациентов (59,26%; 95% ДИ 51,27–66,90%) были выявлены штаммы ВИЧ-1 хотя бы с одной мутацией, ассоциированной с ЛУ к антиретровирусным препаратам. Наиболее часто встречались мутации ЛУ к ингибиторам ОТ. В 13 случаях были встречены мутации ЛУ к НИОТ, в 4 – ННИОТ, в 66 – НИОТ + ННИОТ. Кроме того, у 13 пациентов были встречены мутации ЛУ к ИП: у 10 – ИП + НИОТ, у 3 – ИП + НИОТ + ННИОТ.

Среди мутаций ЛУ к НИОТ наиболее часто показаны мутации M184V [30] (65,63%; 95% ДИ 55,23–

75,02%), L74V [31] (19,79%; 95% ДИ 12,36–29,17%), Y115F [32] (14,58%; 95% ДИ 8,21–23,26%), остальные замены встречались в 10% случаев и реже. При анализе множества мутационных профилей путём построения линейных диаграмм можно проследить образующиеся устойчивые паттерны мутаций ЛУ (**рис. 3 а**). Подробно описанные в литературе сочетания мутаций, ассоциированные с ЛУ к тимидиновым аналогам (thymidine analog mutations – TAM), встречены в полученных профилях в единичных случаях. Существует два основных пути формирования паттернов TAM: мутации, возникающие вместе с T215Y (включая M41L, L210W и иногда D67N), составляют кластер TAM-1; мутации, возникающие вместе с K70R (включая D67N, T215F и K219Q), составляют кластер TAM-2. Тем не менее в данном случае оба кластера мутаций ассоциированы с заме-

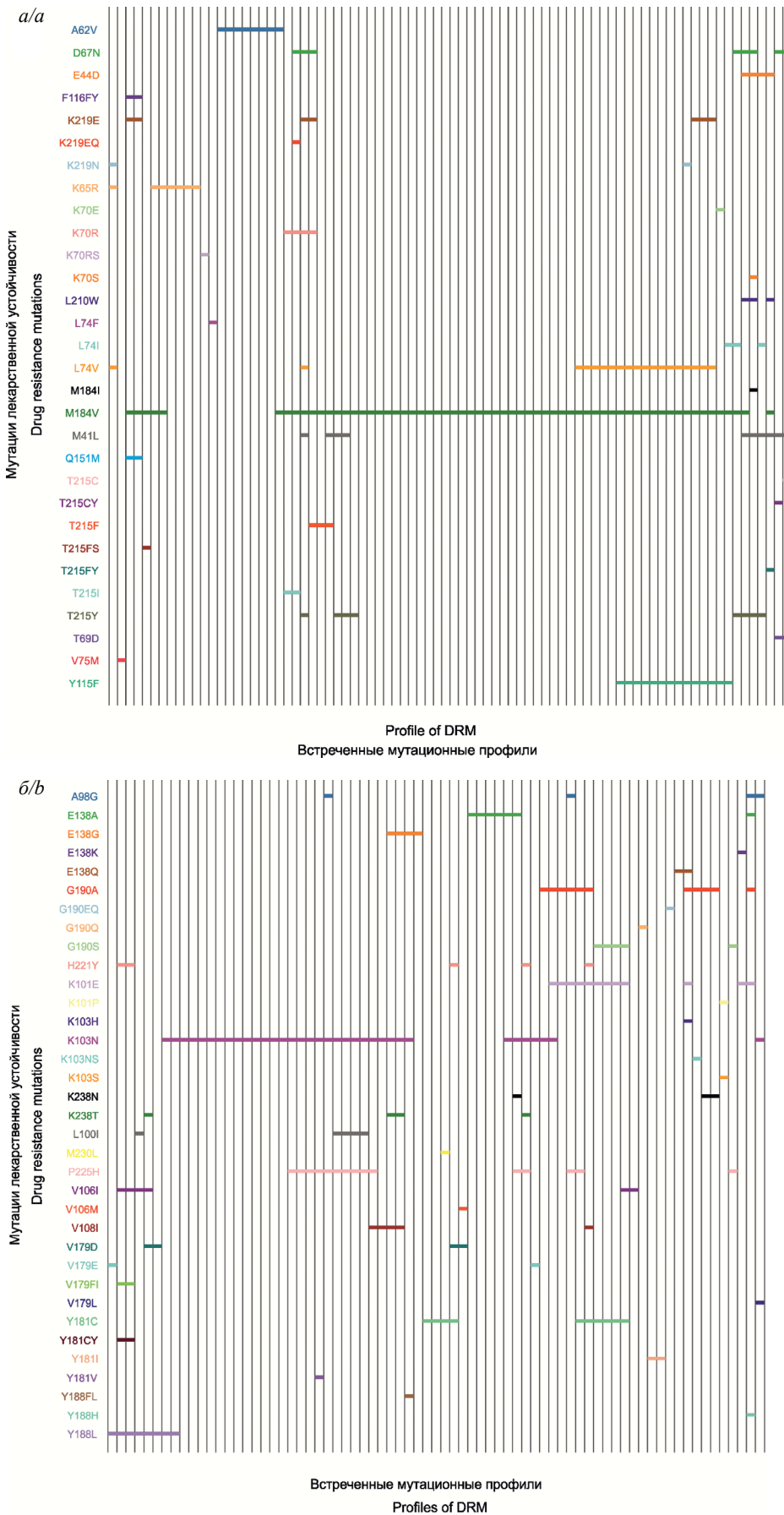


Рис. 3. Результаты исследования множества мутационных профилей путём построения линейных диаграмм: *a* – для мутаций устойчивости к НИОТ; *b* – для мутаций устойчивости к ННИОТ.

Fig. 3. Results of the study of multiple mutational profiles by constructing line diagrams: *a* – for NRTI resistance mutations; *b* – for NNRTI resistance mutations.

ной T215Y, в то время как известно, что формирование паттерна по пути TAM-2 обладает наибольшими преимуществами с заменой T215F, которая также показана в изученных мутационных профилях, но не в составе паттернов TAM [33]. Доминирующими являлись профили, несущие не-TAM мутации, среди них обнаружена устойчивая связь замен L74V + Y115F. Данные мутации связаны преимущественно с ЛУ к абакавиру и диданозину, но существуют сведения об их ассоциации с ЛУ к тенофовиру [31, 32], который, в свою очередь, входит в большинство современных схем антиретровирусной терапии. Кроме того, во всех случаях данное сочетание встречено вместе с заменой M184V, что, скорее всего, связано с присутствием данной замены у большинства штаммов, обладающих ЛУ.

Анализ встречаемости мутаций ЛУ к ННИОТ показал, что наиболее распространены замены K103N [34] (36,46%; 95% ДИ 26,87–46,91%), K101E [35] (12,50%; 95% ДИ 6,63–20,82%), G190A [36] (11,46%; 95% ДИ 5,86–19,58%), P225H (15,63%; 95% ДИ 9,02–24,46%), Y18C [37] (12,50%; 95% ДИ 6,63–20,82%); остальные мутации встречались менее чем в 10% случаев. Изучение профилей мутаций ЛУ в полученных штаммах (рис. 3 б) позволило обнаружить связь между заменами K101E + G190A/S, причём данное сочетание встречается преимущественно без наиболее распространённой мутации K103N. Также выявлена зависимость замены в 190-й позиции на аланин (A) или серин (S) от субтипа вируса. Замена 190A встречалась только в рекомбинантах между субтипами A и B, а мутация 190S – преимущественно в штаммах субсубтипа A6 (в пяти из шести случаев). В литературе также описана распространённость замены в 190-й позиции ОТ на серин для субтипа A [38–40] и аланин для не-A субтипов [38, 41, 42].

Заключение

Полученные в исследовании результаты указывают на значительное разнообразие рекомбинантных форм в Калининградской области. При этом преобладание рекомбинантов между CRF03_AB и A указывает на то, что основным источником рекомбинации является совместная циркуляция варианта, характерного для исследуемого региона – CRF03_AB, и суб-субтипа A6, распространённого на остальной территории России. Вклад совместной циркуляции с субтипом B не выявлен.

Выявленное разнообразие субтипов и рекомбинантных форм вируса указывает на то, что в исследуемом регионе продолжается активный процесс формирования новых рекомбинантов, причём между как уже существующими рекомбинантными формами и «чистыми» субтипами, так и «чистыми» субтипами. Подобная активность вируса указывает на необходимость изучения полных геномов штаммов, полученных в Калининградской области, для описания всех рекомбинантных форм, циркулирующих там на сегодняшний день.

ЛИТЕРАТУРА

- 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. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1789>
- Kuiken C., Foley B., Hahn B., Marx P., McCutchan F., Mellors J.W., et al. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos: 1999.
- Los Alamos National Laboratory. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- Simon-Loriere E., Rossilillo P., Negroni M. RNA structures, genomic organization and selection of recombinant HIV. *RNA Biol*. 2011; 8(2): 280–6. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15193>
- McCutchan F.E., Carr J.K., Bajani M., Sanders-Buell E., Harry T.O., Stoeckli T.C., et al. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology*. 1999; 254(2): 226–34. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9505>
- Montavon C., Toure-Kane C., Liegeois F., Mpoudi E., Bourgeois A., Vergne L., et al. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*. 2000; 23(5): 363–74. <https://doi.org/10.1097/00126334-200004150-00001>
- Menu E., Truong T.X., Lafon M.E., Nguyen T.H., Müller-Trutwin M.C., Nguyen T.T., et al. HIV type 1 Thai subtype E is predominant in South Vietnam. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996; 12(7): 629–33. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.629>
- Piyasirisilp S., McCutchan F.E., Carr J.K., Sanders-Buell E., Liu W., Chen J., et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J. Virol*. 2000; 74(23): 11286–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.11286-11295.2000>
- Galetto R., Mouton A., Giacomoni V., Veron M., Charneau P., Negroni M. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene determines a recombination hot spot in vivo. *J. Biol. Chem*. 2004; 279(35): 36625–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.m405476200>
- Zhuang J., Jetzt A.E., Sun G., Yu H., Klarmann G., Ron Y., et al. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity and putative hot spots. *J. Virol*. 2002; 76(22): 11273–82. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11273-11282.2002>
- Jetzt A.E., Yu H., Klarmann G.J., Ron Y., Preston B.D., Dougherty J.P. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol*. 2000; 74(3): 1234–40. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1234-1240.2000>
- Piantadosi A., Chohan B., Chohan V., McClelland R.S., Overbaugh J. Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog* 2007; 3(11): 177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030177>
- Gratton S., Cheynier R., Dumaurier M.J., Oksenhendler E., Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(26): 14566–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14566>
- Jung A., Maier R., Vartanian J.P., Bocharov G., Jung V., Fischer U., et al. Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*. 2002; 418(6894): 144. <https://doi.org/10.1038/418144a>
- Chen J., Dang Q., Unutmaz D., Pathak V.K., Maldarelli F., Powell D., et al. Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: preference in virus entry is important but is not the sole factor. *J. Virol* 2005; 79(7): 4140–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.7.4140-4149.2005>
- Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ryabov G.S., Bobkova M.R., et al. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol*. 2004; 74(2): 191–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20177>
- Schlösser M., Kartashev V.V., Mikkola V.H., Shemshura A., Saukhat S., Kolpakov D., et al. HIV-1 sub-subtype A6: Settings for normalised identification and molecular epidemiology in the Southern Federal District, Russia. *Viruses*. 2020; 12(4): 475. <https://doi.org/10.3390/v12040475>
- Liitsola K., Tashkinova I., Laukkanen T., Korovina G., Smolskaja T., Momot O., et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombi-

- nant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS*. 1998; 12(14): 1907–19. <https://doi.org/10.1097/00002030-199814000-00023>
19. Lebedev A., Pasechnik O., Ozhmegova E., Antonova A., Blokh A., Grezina L., et al. Prevalence and spatiotemporal dynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Form 03_AB (CRF03_AB) in the Former Soviet Union countries. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0241269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241269>
 20. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 21. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0. Available at: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>
 22. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. HIVdb Program: Mutations Analysis. Available at: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>
 23. Gottfried B. A comparative study on linear and region based diagrams. *J. Spat. Inf. Sci.* 2015; (10): 3–20.
 24. Лаповок И.А., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е. Исследование частоты встречаемости двойной ВИЧ-инфекции в России. *Инфекционные болезни*. 2020; 18(4): 138–48. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-4-138-148>
 25. Los Alamos National Laboratory. RIP: Recombinant Identification Program. Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>
 26. Пасечник О.А., Блох А.И. Распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 в регионах Российской Федерации и стран СНГ: систематический обзор и метаанализ. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(2): 127–38. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-127-138>
 27. Федеральный центр по борьбе со СПИД. Российская база данных. ЛУ ВИЧ у наивных пациентов; 2020. Available at: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/12/2020-Rossijskaya-baza-dannyh-LU-VICH-u-naivnyh-patsientov.pdf>
 28. Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. *ВИЧ инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90>
 29. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Семенова Д.А. и др. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022; 99(1): 28–37. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-216>
 30. Hung M., Tokarsky E.J., Lagpacan L., Zhang L., Suo Z., Lansdon E.B. Elucidating molecular interactions of L-nucleotides with HIV-1 reverse transcriptase and mechanism of M184V-caused drug resistance. *Commun. Biol.* 2019; 2: 469. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0706-x>
 31. De Luca A., Giambenedetto S.D., Trotta M.P., Colafigli M., Properi M., Ruiz L., et al. Improved interpretation of genotypic changes in the HIV-1 reverse transcriptase coding region that determine the virological response to didanosine. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(11): 1645–53. <https://doi.org/10.1086/522231>
 32. Lanier E.R., Givens N., Stone C., Griffin P., Gibb D., Walker S., et al. Effect of concurrent zidovudine use on the resistance pathway selected by abacavir-containing regimens. *HIV Med.* 2004; 5(6): 394–9. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2004.00243.x>
 33. Hu Z., Giguel F., Hatano H., Reid P., Lu J., Kuritzkes D.R. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2006; 80(14): 7020–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.02747-05>
 34. Ibe S., Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse-transcriptase inhibitor-resistance mutations. *Future Microbiol.* 2011; 6(3): 295–315. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.7>
 35. Xu H.T., Colby-Germinario S.P., Huang W., Oliveira M., Han Y., Quan Y., et al. Role of the K101E substitution in HIV-1 reverse transcriptase in resistance to rilpivirine and other nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(11): 5649–57. <https://doi.org/10.1128/aac.01536-13>
 36. Madrugá J.V., Cahn P., Grinsztejn B., Haubrich R., Lalezari J., Mills A., et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2007; 370(9581): 29–38. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61047-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61047-2)
 37. Archer R.H., Wisniewski M., Bambara R.A., Demeter L.M. The Y181C mutant of HIV-1 reverse transcriptase resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors alters the size distribution of RNase H cleavages. *Biochemistry*. 2001; 40(13): 4087–95. <https://doi.org/10.1021/bi002328a>
 38. 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. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000485>
 39. Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Чурина М.А., Валутите Д.Э., Семенов А.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области. *ВИЧ инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90>
 40. Чурина М.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Никитина Н.А., Росоловский А.П., Гребенкина Е.В. и др. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ-1 у пациентов с неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2017; 9(1): 82–92. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2017-9-1-82-92>
 41. Chen M., Zhu Q., Xing H., Chen H., Jin X., Dong L., et al. The characteristics of pretreatment HIV-1 drug resistance in western Yunnan, China. *Epidemiol. Infect.* 2020; 148: e102. <https://doi.org/10.1017/s095026882000093x>
 42. Cheung K.W., Peng Q., He L., Cai K., Jiang Q., Zhou B., et al. Rapid and simultaneous detection of major drug resistance mutations in reverse transcriptase gene for HIV-1 CRF01_AE, CRF07_BC and subtype B in China using sequenom MassARRAY® system. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0153641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153641>

REFERENCES

1. 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. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1789>
2. Kuiken C., Foley B., Hahn B., Marx P., McCutchan F., Mellors J.W., et al. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos; 1999.
3. Los Alamos National Laboratory. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
4. Simon-Loriere E., Rossolillo P., Negroni M. RNA structures, genomic organization and selection of recombinant HIV. *RNA Biol.* 2011; 8(2): 280–6. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15193>
5. McCutchan F.E., Carr J.K., Bajani M., Sanders-Buell E., Harry T.O., Stoeckli T.C., et al. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology*. 1999; 254(2): 226–34. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9505>
6. Montavon C., Toure-Kane C., Liegeois F., Mpoudi E., Bourgeois A., Vergne L., et al. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2000; 23(5): 363–74. <https://doi.org/10.1097/00126334-200004150-00001>
7. Menu E., Truong T.X., Lafon M.E., Nguyen T.H., Müller-Trutwin M.C., Nguyen T.T., et al. HIV type 1 Thai subtype E is predominant in South Vietnam. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996; 12(7): 629–33. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.629>
8. Piyasirisilp S., McCutchan F.E., Carr J.K., Sanders-Buell E., Liu W., Chen J., et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J. Virol.* 2000; 74(23): 11286–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.11286-11295.2000>
9. Galetto R., Moumen A., Giacomoni V., Veron M., Charneau P., Negroni M. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene

- determines a recombination hot spot in vivo. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(35): 36625–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.m405476200>
10. Zhuang J., Jetzt A.E., Sun G., Yu H., Klarmann G., Ron Y., et al. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity and putative hot spots. *J. Virol.* 2002; 76(22): 11273–82. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11273-11282.2002>
 11. Jetzt A.E., Yu H., Klarmann G.J., Ron Y., Preston B.D., Dougherty J.P. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* 2000; 74(3): 1234–40. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1234-1240.2000>
 12. Piantadosi A., Chohan B., Chohan V., McClelland R.S., Overbaugh J. Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog* 2007; 3(11): 177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030177>
 13. Gratten S., Cheyner R., Dumaurier M.J., Oksenhendler E., Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(26): 14566–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14566>
 14. Jung A., Maier R., Vartanian J.P., Bocharov G., Jung V., Fischer U., et al. Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature.* 2002; 418(6894): 144. <https://doi.org/10.1038/418144a>
 15. Chen J., Dang Q., Unutmaz D., Pathak V.K., Maldarelli F., Powell D., et al. Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: preference in virus entry is important but is not the sole factor. *J. Virol* 2005; 79(7): 4140–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.7.4140-4149.2005>
 16. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ryabov G.S., Bobkova M.R., et al. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol.* 2004; 74(2): 191–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20177>
 17. Schlösser M., Kartashev V.V., Mikkola V.H., Shemshura A., Saukhat S., Kolpakov D., et al. HIV-1 sub-subtype A6: Settings for normalised identification and molecular epidemiology in the Southern Federal District, Russia. *Viruses.* 2020; 12(4): 475. <https://doi.org/10.3390/v12040475>
 18. Liitsola K., Tashkinova I., Laukkanen T., Korovina G., Smolskaja T., Momot O., et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS.* 1998; 12(14): 1907–19. <https://doi.org/10.1097/00002030-199814000-00023>
 19. Lebedev A., Pasechnik O., Ozhmegova E., Antonova A., Blokh A., Grezina L., et al. Prevalence and spatiotemporal dynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Form 03_AB (CRF03_AB) in the Former Soviet Union countries. *PLoS One.* 2020; 15(10): e0241269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241269>
 20. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 21. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0. Available at: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>
 22. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. HIVdb Program: Mutations Analysis. Available at: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>
 23. Gottfried B. A comparative study on linear and region based diagrams. *J. Spat. Inf. Sci.* 2015; (10): 3–20.
 24. Lapovok I.A., Saleeva D.V., Kirichenko A.A., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Kireev D.E. The study of dual HIV infection prevalence in Russia. *Infektsionnye bolezni.* 2020; 18(4): 138–48. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-4-138-148> (in Russian)
 25. Los Alamos National Laboratory. RIP: Recombinant Identification Program. Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>
 26. Pasechnik O.A., Blokh A.I. The prevalence of HIV recombinant forms in Russia and countries of the CIS: systematic review and metaanalysis. *Infektsiya i immunitet.* 2018; 8(2): 127–38. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-127-138> (in Russian)
 27. Federal AIDS Center. Russian database. HIVDR in naive patients; 2020. Available at: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/12/2020-Rossiyskaya-baza-dannyh-LU-VICH-u-navinyh-patsientov.pdf> (in Russian)
 28. Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. HIV molecular epidemiology and pharmaco-resistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district. *VICH infektsiya i immunosupressii.* 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90> (in Russian)
 29. Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Semenova D.A., et al. Genetic diversity and drug resistance mutations of HIV-1 in Leningrad region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2022; 99(1): 28–37. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-216> (in Russian)
 30. Hung M., Tokarsky E.J., Lagpagan L., Zhang L., Suo Z., Lansdon E.B. Elucidating molecular interactions of L-nucleotides with HIV-1 reverse transcriptase and mechanism of M184V-caused drug resistance. *Commun. Biol.* 2019; 2: 469. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0706-x>
 31. De Luca A., Giambenedetto S.D., Trotta M.P., Colafigli M., Prospero M., Ruiz L., et al. Improved interpretation of genotypic changes in the HIV-1 reverse transcriptase coding region that determine the virological response to didanosine. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(11): 1645–53. <https://doi.org/10.1086/522231>
 32. Lanier E.R., Givens N., Stone C., Griffin P., Gibb D., Walker S., et al. Effect of concurrent zidovudine use on the resistance pathway selected by abacavir-containing regimens. *HIV Med.* 2004; 5(6): 394–9. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2004.00243.x>
 33. Hu Z., Giguel F., Hatano H., Reid P., Lu J., Kuritzkes D.R. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2006; 80(14): 7020–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.02747-05>
 34. Ibe S., Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse-transcriptase inhibitor-resistance mutations. *Future Microbiol.* 2011; 6(3): 295–315. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.7>
 35. Xu H.T., Colby-Germinario S.P., Huang W., Oliveira M., Han Y., Quan Y., et al. Role of the K101E substitution in HIV-1 reverse transcriptase in resistance to rilpivirine and other nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(11): 5649–57. <https://doi.org/10.1128/aac.01536-13>
 36. Madruga J.V., Cahn P., Grinsztejn B., Haubrich R., Lalezari J., Mills A., et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2007; 370(9581): 29–38. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61047-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61047-2)
 37. Archer R.H., Wisniewski M., Bambara R.A., Demeter L.M. The Y181C mutant of HIV-1 reverse transcriptase resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors alters the size distribution of RNase H cleavages. *Biochemistry.* 2001; 40(13): 4087–95. <https://doi.org/10.1021/bi002328a>
 38. 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. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000485>
 39. Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Churina M.A., Valutite D.E., Semenov A.V. HIV molecular epidemiology and pharmaco-resistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district. *VICH infektsiya i immunosupressii.* 2019; 11(4): 65–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90> (in Russian)
 40. Churina M.A., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Nikitina N.A., Rosolovskiy A.P., Grebenkina E.V., et al. HIV-1 drug-resistance and molecular epidemiology in patients with art failure in Veliky Novgorod. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2017; 9(1): 82–92. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2017-9-1-82-92> (in Russian)
 41. Chen M., Zhu Q., Xing H., Chen H., Jin X., Dong L., et al. The characteristics of pretreatment HIV-1 drug resistance in western Yunnan, China. *Epidemiol. Infect.* 2020; 148: e102. <https://doi.org/10.1017/s095026882000093x>
 42. Cheung K.W., Peng Q., He L., Cai K., Jiang Q., Zhou B., et al. Rapid and simultaneous detection of major drug resistance mutations in reverse transcriptase gene for HIV-1 CRF01_AE, CRF07_BC and subtype B in China using sequenom MassARRAY® system. *PLoS One.* 2016; 11(4): e0153641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153641>