

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1

Дрозд А.М.

Белорусский государственный медицинский университет,
Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, г. Минск

Ключевые слова: вич-1, филогенетический анализ, генотипирование, мутации резистентности, ВААРТ.

Резюме: В статье приведены результаты филогенетического анализа шести изолятов ВИЧ, полученных от пяти первично-выявленных пациентов с ВИЧ-инфекцией и одного пациента, находящегося на высокоактивной антиретровирусной терапии (далее - ВААРТ). Установлены подтипы вируса и их происхождение. Определено наличие мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам в одном образце.

Resume: The article presents the results of phylogenetic analysis of six HIV isolates obtained from five primary diagnosed patients with HIV infection and one patient on highly active antiretroviral therapy (hereinafter HAART). Installed virus subtypes and their origin. Determined the presence of resistance mutations to antiretroviral drugs in a single sample.

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения общее число людей, живущих с ВИЧ, составляет 34,3 миллиона. Вирусом иммунодефицита человека ежедневно инфицируется около 7400 человек [1]. Эпидемиологическая ситуация в Республике Беларусь на сегодняшний день остаётся напряжённой. По состоянию на 1 сентября 2014 года в республике зарегистрировано 16 859 случаев ВИЧ-инфекции, количество людей, живущих с ВИЧ – 13 042, показатель распространённости составил 137,8 на 100 тысяч населения. Генотипирование и филогенетический анализ ВИЧ у ВИЧ-инфицированных пациентов позволяет определить направление заноса вируса, расследовать случаи умышленного инфицирования, а так же инфицирования через кровь и её препараты, расшифровывать вспышки ВИЧ-инфекции [2]. Определение первичных и приобретенных мутаций резистентности ВИЧ необходимо для своевременного назначения адекватных схем высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) [3].

Цель: дать молекулярно-генетическую характеристику ВИЧ-1. Определить подтипы ВИЧ в исследуемых образцах.

Задачи:

1. Определить филогенетическое родство между изучаемыми изолятами и с ВИЧ, циркулирующим в странах СНГ и в мире;
2. Определить наличие / отсутствие мутаций резистентности в геноме исследуемых изолятов.

Материал и методы. Секвенирование по участку гена *pol* проводили на коммерческой тест-системе “ViroSeqHIV-1 GenotypingSystemv.2.0, производства фирмы Abbott, США. ПЦР и последующее секвенирование по участкам генов *gag* и *env* проводили на тест-системах «Бел РНК/ДНК ВИЧ-1», производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Электрофоретическое разделение очищенных фрагмен-

тов ДНК ВИЧ-1 осуществляли на генетическом анализаторе ABI Prism 3100 Avant, США. Анализ полученных фрагментов проводили с использованием программ Sequencing Analysis v5.1.1., SeqScapev.2.6, BioEdit. Филогенетические деревья строили с применением программы MEGA4.1. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. Мутации резистентности определяли с применением базы данных Стэнфордского Университета – HIVdbv6.0.1 и программ EUResistv1, Geno2pheno v3.0.

Результаты и их обсуждение. Проведен филогенетический анализ шести изолятов ВИЧ, полученных от пяти первично-выявленных пациентов с ВИЧ-инфекцией и одного пациента, находящегося на ВААРТ. Установлены подтипы вирусов и их происхождение. По участку гена *pol* определено наличие мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам в одном образце.

Первый исследуемый образец – циркулирующая рекомбинантная форма CRF_03AB ВИЧ-1. Пациент женского пола, возраст 41 год. Предполагаемый путь передачи – половой. Мутации, обнаруженные в определённых участках генома вируса (в структурном гене *pol*) :

1. Обратная транскриптаза: P9RK11TK20RV35TE36DT39NK102MK103NS105TK122PR172KV179TG190AQ207EV245KE248DT286AP313PSL325II326VQ334S;
2. Протеаза: I13V E35D M36I N37D R41K Q61E H69K K70R T74S L89M.

Исследуемая последовательность гена *pol* включает кодоны протеазы (1-99) и кодоны обратной транскриптазы (1-344). Мутации в виде инсерций и делеций отсутствуют. Наиболее родственным референтным изолятом является CRF_03AB, процент сходства составил 95%. В результате проведённого исследования были обнаружены мутации резистентности к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы: K70R. Также были идентифицированы мутации резистентности к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы: K103N, V179T, G190A. Основные мутации резистентности к ингибиторам протеазы: I13V, M36I, H69K, K20R.

Второй исследуемый образец – ВИЧ-1 подтипа G, изолированный от первично выявленной пациентки (завозной случай из Нигерии). Предполагаемый путь заражения – половой, от мужа-нигерийца. Секвенирование проводилось по трём структурным генам: *gag*, *pol* и *env*. Мутаций резистентности обнаружено не было. После проведения секвенирующей ПЦР был проведён филогенетический анализ, и с помощью программы MEGA было построено филогенетическое дерево по структурному гену *gag* (рис.1).

Также были проанализированы 4 образца от первично выявленных пациентов. 3 образца были из города Бреста, 1 образец из Могилёва. Так как это были первично выявленные пациенты, не получавшие никакого лечения, мутаций резистентности у них обнаружено не было. После проведения секвенирующей ПЦР также был проведён филогенетический анализ, с построением филогенетического дерева (рис.2). Исследуемые образцы обозначены на рисунке синим цветом. Как видно на рисунке, данные 4 образца относятся к подтипу A.

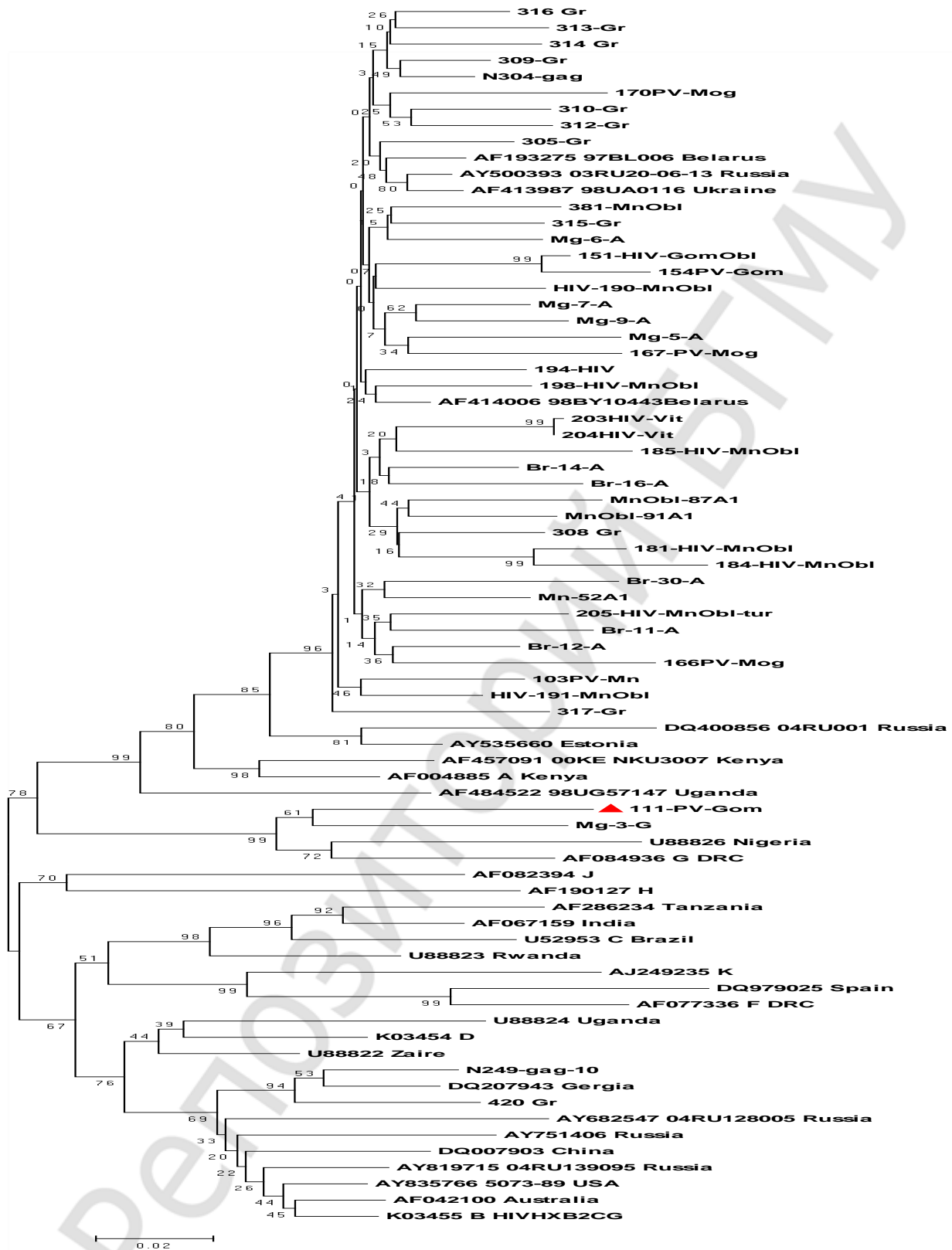


Рис. 1 - Филогенетическое дерево, построенное в результате секвенирования по гену gag.

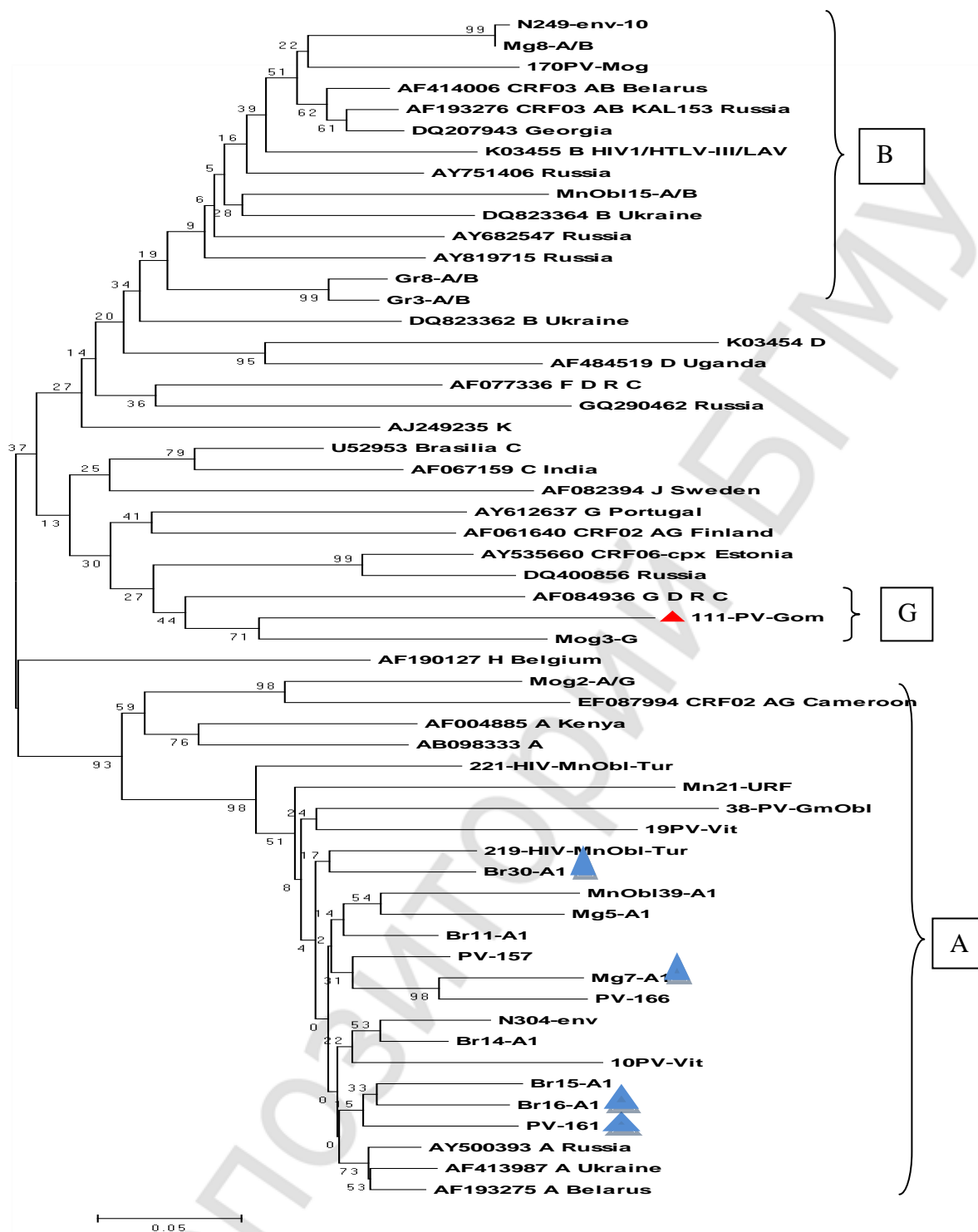


Рис.2 - Филогенетическое дерево, построенное в результате секвенирования по гену env.

Выводы:

1. Все шесть исследуемых образцов принадлежат к группе М ВИЧ-1. Четыре изолята относились к подтипу А, и по одному – к подтипу G и рекомбинантной форме CRF03_AB.

2. Образцы ВИЧ, относящиеся к подтипу А, филогенетически близки к изолятам, циркулирующим на территории Беларуси. Изолят ВИЧ подтипа G является завозным случаем (Нигерия), а рекомбинантная форма CRF03_AB близка к изоляту из Калининградской области России.

3. Мутации резистентности к антиретровирусным препаратам выявлено в одном из шести исследованных образцов у пациента, находящегося на ВААРТ.

Литература

1. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение / В.В. Покровский и др. М., 2003.
2. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenic mechanisms of infection: a brief overview / Ann Ist Super Sanita. – 2010. – p. 5-14.
3. Shafer, R.W. Genotyping testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance / Clin. Microbiol. – 2002. – p. 247-277.