

А. М. Дрозд

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1

Научный руководитель д-р мед. наук, доц. В. Ф. Ерёмин

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

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).

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

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).

Keywords: HIV-1, phylogenetic analysis, genotyping, mutation resistance, HAART.

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 марта 2015 года в республике зарегистрировано 17868 случаев ВИЧ-инфекции, количество людей, живущих с ВИЧ – 13 781, показатель распространённости составил 145,4 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.

Материал и методы. Секвенирование по участку гена *pol* проводили на коммерческой тест-системе “ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.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 фрагментов ДНК ВИЧ-1 осуществляли на генетическом анализаторе ABI Prism 3100 Avant, США. Анализ полученных фрагментов проводили с использованием программ Sequencing Analysis v5.1.1., SeqScape v.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 – HIVdb v6.0.1 и программ EUResist v1, 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 – изолят, с циркулирующей рекомбинантной формой CRF_03AB. Пациент женского пола, возраст 41 год. Предполагаемый путь передачи – половой. Мутации, обнаруженные в определённых участках генома вируса(в структурном гене *pol*) :

1. Обратная транскриптаза: P9R K11T K20R V35T E36D T39N K102M K103N S105T K122P R172K V179T G190A Q207E V245K E248D T286A P313PS L325I I326V Q334S;

2. Протеаза: I13V E35D M36I N37D R41K Q61E H69K K70R T74S L89M.

Изучаемая 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 нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы: K103N, V179T, G190A. Основные мутации резистентности к ингибиторам протеазы: I13V, M36I, H69K, K20R.

Второй исследуемый образец – первично выявленная пациентка с подтипом G(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*.

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.

Заключение.

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

«Студенты и молодые учёные Белорусского государственного медицинского университета – медицинской науке и здравоохранению Республики Беларусь»

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.

Информация о внедрении результатов исследования. По результатам настоящего исследования опубликована 1 статья в сборнике материалов, 1 тезис доклада, получен 1 акт внедрения в образовательный процесс(кафедра микробиологии, вирусологии иммунологии, Белорусский государственный медицинский университет).

A. M. Drozd

***GENOTYPING AND DETERMINATION OF
RESISTANCE MUTATIONS OF HIV-1***

Tutor associate professor V. F. Eremin

*Department of Microbiology, Virology, Immunology,
Belarusian State Medical University, Minsk*

Литература

1. Покровский, В. В. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение / В.В. Покровский, 2003. – 185 с.
2. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoj 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.