

ДИНАМИКА ПОЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ В ГЕНЕ POL ВИЧ-1 У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ/СПИД В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАЖА ЗАБОЛЕВАНИЯ И СХЕМ ЛЕЧЕНИЯ

Дрозд А.М., Ерёмин В.Ф.

*Белорусский государственный медицинский университет
Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии
РНПЦ Эпидемиологии и микробиологии, г.Минск*

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

Резюме. В статье приведены результаты анализа двадцати изолятов ВИЧ, полученных от пациентов с ВИЧ-инфекцией. Установлены подтипы вирусов и их происхождение. По участку гена pol определено наличие мутаций резистентности у одиннадцати образцов.

Resume. The results of the analysis of twenty HIV isolates obtained from patients with HIV infection. Installed subtypes and their origin. According portion of the pol gene defined by the presence of resistance mutations in the eleven samples.

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения общее число людей, живущих с ВИЧ, составляет 34,8 миллиона. Вирусом иммунодефицита человека ежедневно инфицируется около 7400 человек. Эпидемиологическая ситуация в Республике Беларусь на сегодняшний день остается напряженной. По состоянию на 1 августа 2015 года в Республике зарегистрировано 18864 случая ВИЧ-инфекции, количество людей, живущих с ВИЧ – 13781, показатель распространенности составил 145,4 на 100 тысяч населения. Появление мутаций резистентности в геноме ВИЧ в процессе лечения антиретровирусными препаратами - это серьезная проблема для людей, живущих с ВИЧ-инфекцией[1]. Формирование мутантных штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам, происходит у 30-40% пациентов, получающих антиретровирусную терапию[2]. Данное явление накладывает серьезные ограничения на проведение антиретровирусного лечения, которые очень сложно преодолевать. Определение первичных и приобретенных мутаций резистентности ВИЧ необходимо для своевременного назначения адекватных схем высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ)[3].

Цель: Определить наличие/отсутствие мутаций резистентности у пациентов с различными схемами лечения ВИЧ, а так же с различным стажем заболевания.

Задачи:

1. Определить влияние антиретровирусных препаратов на возникновение мутаций резистентности у исследуемых пациентов.
2. Выявить закономерность возникновения мутаций резистентности в зависимости от стажа приема антиретровирусных препаратов, а так же от различных схем лечения.

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. В ходе проделанной работы были проанализированы 20 образцов на наличие мутаций резистентности. Все образцы крови были взяты у пациентов с ВИЧ-инфекцией, со стажем терапии не менее одного года. Все исследуемые пациенты находятся на различных стадиях ВИЧ-инфекции, включая и четвертую стадию, к которой относится синдром приобретенного иммунодефицита (далее – СПИД).

У девяти образцов не было найдено вторичных мутаций резистентности.

В таблице 1 указаны оставшиеся 11 образцов, расположенные под определенными номерами, в которых были идентифицированы вторичные мутации резистентности.

Таблица 1. Исследуемые образцы

№ изолята	Обнаруженные мутации	Терапия ВААРТ	Продолжительность терапии
№ 17	M184V	AZT+3TC+EFV	1 год
№ 82	K103N	AZT+3TC+NVP	3 года
№ 486	M184V+K103N	AZT+EFV+NVP	4 года
№ 47	M184V	AZT+3TC+EFV	1 год
№ 498	M184V+K103N	ABC+3TC+NVP	4 года
№ 418	K103N	TDF+EFV+NVP	3 года
№ 553	M184V+K103N	ABC+3TC+NVP	4 года
№ 569	K103N	AZT+EFV+NVP	3 года
№ 577	M184V+K103N	AZT+3TC+EFV	4 года
№ 578	M184V+K103N	ABC+FTC+NVP	4 года
№ 493	K103N	AZT+3TC+EFV	3 года

У семи пациентов определена мутация в положении M184V, ведущая к высокому уровню резистентности к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. В девяти случаях определялась мутация K103N, ведущая к высокому уровню устойчивости ВИЧ к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ). У пяти пациентов обнаружена комбинация мутаций резистентности K103N+M184V.

После проведения секвенирующей ПЦР, был проведен филогенетический анализ, с построением филогенетического дерева, изображенного на рисунке 1. Исследуемые образцы обозначены на рисунке черными треугольниками. Как видно из рисунка, все исследуемые образцы относятся к подтипу А, ВИЧ-1.



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

Выводы:

1. Идентификация мутаций резистентности через год терапии препаратами первой линии – показатель низкой приверженности пациентов к лечению.
2. Комбинация мутаций M184V+K103N селектирована у пациентов с наиболее продолжительным стажем заболевания.
3. Возникновение мономутации M184V происходит чаще при следующей схеме лечения : AZT+3TC+NVP. Однако это не является показанием для отмены AZT.
4. Замена препаратов первой линии на препараты второй линии необходимо проводить через 3-4 года терапии.

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.