

¹Еремин В. Ф., ¹Гасич Е. Л., ¹Сосинович С. В., ²Карпов И. А., ³Мигаль Т. Ф.

МУТАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ПАЦИЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ВААРТ

¹ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь;

² Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск;

³ Министерство здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск

Определение резистентности к антиретровирусным препаратам (АРП) является критическим моментом в оценке эффективности лечения пациентов с ВИЧ/СПИД. В соответствии с приказом Министра здравоохранения № 842 от 31.10.2007 г. «О порядке проведения исследований по определению резистентности ВИЧ к препаратам антиретровирусной терапии» в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, на базе лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций проводятся исследования по определению мутаций резистентности в геноме ВИЧ-1, изолированного от пациентов, принимающих разные схемы АРП.

В настоящее время известны принципиальные мутации в геноме ВИЧ, ведущие к устойчивости вируса к препаратам антиретровирусной терапии (табл. 1). Своевременное определение таких мутаций имеет критическое значение для своевременной смены схемы терапии и, следовательно, успешного лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Таблица 1

Принципиальные мутации, обеспечивающие резистентность к препаратам ВААРТ

Препарат	Ключевые мутации	Дополнительные мутации
резистентность к ингибиторам обратной транскриптазы		
НИОТ	41L; 70R; 215Y/F;	67N; 21W; 219Q/E
Зидовудин (AZT, Retrovir)	74V	(65R); (75T); 184V
Диданозин (ddI, Videx)	(65R) 69D;	(75T); 184V
Зальцитабин (ddC, Hivid)	(50T), 75T	
Ставудин (d4T, Zerit)	184V/I	
Ламивудин (3TC, Epivir)	184V	
Абаковир (Ziagen)		
ННИОТ		
Невирапин (Viramun)	106A; 181C/I; 188C	разнообразные
Делавирдин (Rescriptor)	103N/R/T; 181C	разнообразные
Эфавиренс (Sustiva)	103N; 188L; 190S	
резистентность к ингибиторам протеазы		
Саквинавир	48V; 90M	10I; 54V; 71V; 63P; 82A и другие
Индинавир	46I/L; 83A/F	10I; 20M; 54V/T; 63P; 71T/V; 84V; 90M и другие
Ритонавир	82A/F; 84V	10I; 20R; 36I; 46I; 54V/L; 63P; 71V/L; 90M и другие
Нелфинавир	30N	36I; 63P; 71V; 77I; 88D; 90M и другие
Ампренавир	50V; 46I/L; 47V	10I; 36I; 77I; 84L;
Лопинавир	84V; 46I	1F; 91S; 32V/I; 47V

В настоящих тезисах приводится краткий анализ результатов по определению резистентных вариантов ВИЧ, полученных за период с 2013 по август 2016 гг.

Кровь в объеме 3-5 мл от пациентов с ВИЧ/СПИД была взята из локтевой вены в пробирки с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). Плазма крови была собрана после центрифугирования при 1000 об/мин в течение 20 мин.

Вирусную РНК выделяли из 500 мкл плазмы высокоскоростным центрифугированием при 21000-25000 g и 4-8°C на высокоскоростной центрифуге Beckman CoulterJ-30i Avanti (США) с последующим лизированием осажденного вируса с использованием модуля для выделения РНК «ViroSeqTM HIV-1, HIV-1 genotyping system v.2.0» (Abbott, США).

ОТ-ПЦР, и полимеразную цепную реакцию и секвенирующую ПЦР проводили на амплификаторе Applied Biosystems 2700 (США) и Corbett Research (Австралия).

Определение мутаций резистентности проводили с использованием тест-системы ViroSeqTM HIV-1 genotyping (Abbott, США).

Секвенирование участка гена pol ДНК ВИЧ-1, кодирующего синтез протеазы и обратной транскриптазы (1800 п.н.), проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) с использованием коммерческого набора «ViroSeqTM HIV-1, HIV-1 genotyping system v.2.0» (Abbott, США) с аналитической чувствительностью 2×10^3 копий РНК/мл, согласно инструкции, прилагаемой к тест-системе.

Анализ полученных фрагментов и определение мутаций резистентности ВИЧ к препаратам антиретровирусной терапии проводили с использованием коммерческой базы данных «ViroSeq HIV-1 genotyping system software v2.6 analysis» (Abbott, США) и базы данных Стэнфордского университета, а также с применением программных продуктов «Sequencing Analysis Software v.5.1.1», «BioEdit», «SeqScape».

Филогенетический анализ и построение деревьев проводили с применением программы MEGA6

За период с 2013 по август 2016 гг. в лабораторию поступило 528 образцов крови от пациентов, находящихся на высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). 279/52,8% (190 от пациентов-мужчин и 89 – от женщин) поступила из г.Минска и г.Минской области, 103/19,5 % (54 – от пациентов-мужчин и 49 – от лиц женского пола) – из Гомеля и Гомельской области, 62/11,7% – из г. Витебска и Витебской области (41 – пациенты мужского пола и 21 – женщины), 49/9,3% – из г. Бреста и Брестской области (27 – пациенты женщины и 22 – мужчины), 30/5,7% – из г. Могилева и Могилевской области (17 – пациенты мужского пола и 13 – женщины), и из г. Гродно и Гродненской области поступило 5 проб от пациентов мужского пола. Из 528 ВИЧ-инфицированных 57 (30 мальчиков и 27 девочек) были дети в возрасте от 3-х месяцев до 16 лет.

После постановки ОТ-ПЦР в количественном варианте 242 пробы были отобраны для проведения секвенирующей ПЦР и последующего секвенирования. Проведенное секвенирование и последующий филогенетический анализ позволил определить, что из 242 секвенированных образцов, 225 (93%) относи-

лись к субтипу A1, 7 (2,9 %) – к B, 5 (2,1%) – к CRF02_AG, 3 (1,2%) – к CRF03_AB и по 1 образцу (0,4%) – субтипам G и C, что в целом согласуется с ранее полученными нами данными [1].

Из 242 секвенированных образцов в 135 (55,8%) были выявлены мутации резистентности высокого уровня к разным классам соединений

Чаще всего мутации резистентности высокого уровня определялись к нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (табл. 2).

Таблица 2

Частота встречаемости резистентности высокого уровня к НИОТ и ННИОТ

№ п/п	Класс и наименование препарата	Количество образцов с мутациями высокого уровня резистентности	В %, от всех секвенированных образцов
	Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы		
1.	Ламивудин (ЗТС)	99	40,91
2.	Абакавир (АВС)	51	21,1
3.	Зидовудин (АЗТ)	24	9,9
4.	Ставудин (d4Т)	27	11,2
5.	Диданозин (ДДИ)	48	19,8
6.	Эмприцитабин (FTC)	96	39,7
7.	Тенофовир (ТДФ)	33	13,6
	Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы		
1.	Эфавиренс (EFV)	108	44,6
2.	Этравирин (ЕТR)	15	6,2
3.	Невирапин (NVP)	118	48,8
4.	Рилпивирин (RPV)	21	8,7

Как видно из данных, представленных в табл. 2, чаще всего мутации резистентности высокого уровня выявлялись к ННИОТ невирапину (118/48,8%) и эфавиренсу (108/44,6%), а также к НИОТ ламивудину (99/40,91%) и эмприцитабину (96/39,7 %). К другим препаратам этих классов мутации резистентности высокого уровня определялись гораздо реже (табл. 2).

Как было показано ранее [2], чаще всего выявлялись мутации M184V и K103N, определяющие высокий уровень устойчивости к НИОТ и ННИОТ, соответственно (рис.).

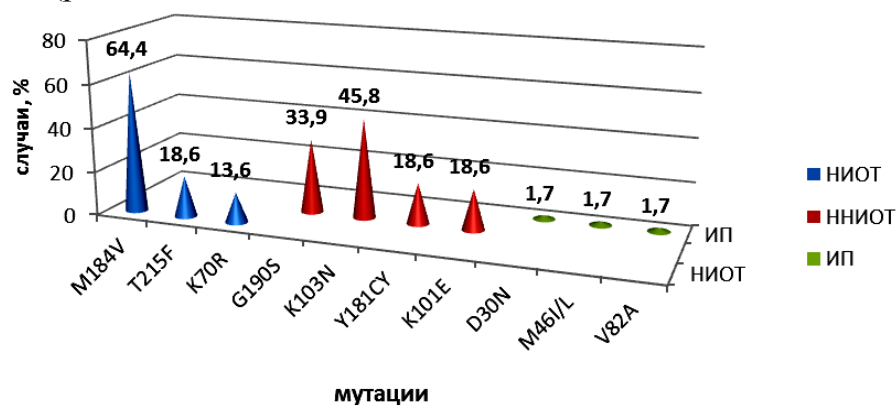


Рис. Частота встречаемости мутаций резистентности высокого уровня у пациентов, находящихся на ВААРТ (взрослые)

В единичных случаях были выявлены мутации резистентности высокого уровня к ингибиторам протеазы (табл. 3). Так, только у трех пациентов была выявлена устойчивость к фозампренавиру/г (FPV/г) и нельфинавир (NFV), а к дарунавиру/г (DRV/г), саквинавиру/г (SQV/г) и типранавиру/г (TPV/г) ни у одного пациента не было выявлено мутаций резистентности.

Таблица 3

Частота встречаемости резистентности высокого уровня к ИП

№ п/п	Класс и наименование препарата	Количество образцов с мутациями высокого уровня резистентности	В %, от всех секвенированных образцов
	Ингибиторы протеазы		
1.	Атазанавир/г (ATV/г)	2	0,8
2.	Дарунавир/г (DRV/г)	нет	нет
3.	Фозампренавир/г (FPV/г)	3	1,2
4.	Индинавир/г (IDV/г)	2	0,8
5.	Лопинавир/г (LPV/г)	2	0,8
6.	Нельфинавир (NFV)	3	1,2
7.	Саквинавир/г (SQV/г)	нет	нет
8.	Типранавир/г (TPV/г)	нет	нет

В 2010-2011 гг. нами за счет средств Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) были проведены исследования по определению первичных мутаций резистентности к АРП [3]. Пять (6,1%) последовательностей ДНК ВИЧ-1 имели мутации, ассоциированные с устойчивостью ВИЧ к АРП. Две (2,4%) мутации были в положении Т69I и определяли устойчивость ВИЧ НИОТ и три (3,7%) М46L/I мутации, ведущие к устойчивости к ИП. Таким образом, в соответствии с методом оценки ВОЗ, определяющим первичные мутации резистентности ВИЧ отдельно к каждому классу препаратов, было определено, что распространенность первичных мутаций резистентности вируса к АРП является низкой (<5%) для всех классов антиретровирусных препаратов.

Шесть (7,3%) образцов имели мутации, включенные в перечень ВОЗ и базу данных Стэнфордского Университета и относящиеся к так называемым «минорным» мутациям, не ведущим к значительному изменению чувствительности вируса к АРП: L10V – минорная мутация, связанная с резистентностью ВИЧ к ИП; L33F – минорная мутация, появляющаяся при использовании FPV/г, DRV/г, LPV/г, ATV/г, и TPV/г, ведущая к вместе с другими мутациями к снижению чувствительности вируса к ИП; V118I – мутация вместе с другим мутация к ТАМ ведет к снижению чувствительности ВИЧ к НИОТ: ЗТС и FTC; T74S – мутация, ассоциированная со снижением чувствительности к NFV; V108I – определяет low-level устойчивость к NVP и EFV.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ подобные исследования, в случае с низкой распространенностью первичных мутаций резистентности у наивных пациентов, должны быть повторены через 2 года, при этом смены схем АРВ терапии не требуется. Прошло уже больше двух лет после проведенных пилотных исследований и для решения вопроса о проверке всех ВИЧ-инфицированных пациентов перед началом ВААРТ на наличие первичных мутаций резистентности, необходимо провести такие исследования повторно. В настоящее время в нашей

стране зарегистрирована отечественная тест-система для определения мутаций резистентности, использование которой позволяет провести исследования с минимальными финансовыми затратами.

Для более глубокого анализа ситуации с появлением мутаций резистентности высокого уровня к отдельным классам препаратов необходимо наличие следующих данных:

- время инфицирования пациента;
- дата начала АРТ;
- схема АРТ;
- данные по CD4+ клеткам и вирусной нагрузке перед началом терапии;
- если схема менялась, то какова причина(ы) и данные новой схемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Молекулярная* эпидемиология ВИЧ/СПИД в Беларуси (2008-2011) / В. Ф. Еремин [и др.] // *Здравоохранение*. 2012. № 1. С. 25-34.
2. *Мутации* резистентности вируса ВИЧ у пациентов с ВИЧ/СПИДом, находящихся на ВААРТ и не получавших АРП / В.Ф. Еремин [и др.] // *Здравоохранение*. 2014. № 10. С. 24-30.
3. *Transmitted HIV drug resistance (tHIVDR) in treatment naïve patients in Belarus* [Electronic resource] / V. Pyenkova [et al.] // *Abstr. 10th Eur. Meet. HIV & Hep. Treat. Strateg. & Antiviral Drug Resist.*, 28-30 March 2012, Barcelona, Spain. *Rev. Antiviral Ther. Infect. Dis.* 2012. Vol. 2. P. 42-43 (Abstr. P_17). Mode of access: http://regist2.virology-education.com/abstractbook/2012_2.pdf. Date of access: 13.09.2016.