

¹Еремин В. Ф., ¹Гасич Е. Л., ¹Сосинович С. В., ¹Немира А. С., ²Грушко Т. П.

R5 (NSI/M) и X4 (SI/T) И ТРОПНЫЕ ВИРУСЫ В ПОПУЛЯЦИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

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

² *Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья, Республика Беларусь*

Как известно, именно с V3 участком гена env связаны такие свойства вируса, как репликативная активность и тропность к М - и Т-клеткам, а также взаимодействие с CCR5 и CXCR4 хемокиновыми ко-рецепторами [1, 2]. Показано, что изменение в двух позициях – 11 и 25 внутри V3 петли белка оболочки gp120 ведет к изменению фенотипических свойств ВИЧ, таких как. репликативной активности (slow/low – rapid/high изоляты), образование (syncytium-inducing – SI)/не образование синцитиев (non-syncytium-inducing – NSI), смена тропности с М (моноциты/макрофаги) на Т (лимфоциты) [3-6].

Изучение изменений в участке V3 петли белка оболочки вируса gp120 в настоящее время имеет важное значение и в связи с разработкой и применением для лечения пациентов с ВИЧ/СПИД нового класса лекарственных препаратов – ингибиторов CCR5 рецепторов, в частности Маравирок (Maraviroc, MVC) [7].

Цель исследования – определить частоту встречаемости R5- и X4-тропных вариантов ВИЧ-1 у пациентов с ВИЧ/СПИД.

Образцы сыворотки/плазмы крови в количестве 126 были получены из разных регионов республики: из г. Минска и области – 74 (58,8%), из Могилевской области – 18 (14,3%), из Гомельской – 13 (10,3%), из Брестской и Витебской – по 9 (7,1%), из Гродненской – 3 (2,4%).

55 образцов сыворотки/плазмы крови было получено от лиц женского пола и 71 – от пациентов мужчин. 90 пациентов являлись внутривенными потребителями наркотиков (ПИН), 33 заразились при гетеро-гомосексуальных контактах и 3 детей были рождены ВИЧ-инфицированными матерями.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили на коммерческой тест-системе ИФА «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ», производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово, АБК, Россия, позволяющей одновременно обнаруживать антигены ВИЧ-1/2 и антитела к вируспецифическим белкам.

Выделение РНК ВИЧ из образцов сыворотки/плазмы крови пациентов с ВИЧ/СПИД выполняли с помощью комплекта реагентов для выделения РНК из клинического материала «РИБО-сорб» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Выделение РНК для количественного определения копий РНК/мл проводили с использованием набора «Экстракция 1000», имеющегося в тест-системе для количественного определения РНК ВИЧ-1, производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Исследования проводили на амплификаторе CFX96 BioRad, США.

Обратную транскрипцию для получения кДНК ВИЧ по участкам генов gag/pol и env (петля V3 gp120) проводили в объеме 20 мкл по следующей прописи: 5x РТ-буфер – 4 мкл, обратный праймер (3'VNOT-для гена env) 0,5 мкл, смесь трифосфатов 1,0 мкл (10 mM), ингибитор РНКаз – 0,5 мкл, обратная транскриптаза – 1,0 мкл, РНК-10 мкл, бидистиллированная вода – 2,5 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводили в следующем режиме: 42°C – 60мин; 70°C – 15 мин.

Полимеразную цепную реакцию в гнездовом варианте выполняли на амплификаторах АВ 2700, США и «Corbett Research», Австралия в два этапа в объеме 25 (ген pol) и 50 мкл (гены gag/env). Для генотипирования по участкам генов gag/env использовали зарегистрированную на территории Республики Беларусь тест-систему «Бел РНК/ДНК-ВИЧ (gag/env)» (Регистрационное удостоверение № ИМ-7.95957/1601, годна до 04.01.2021).

Анализ продуктов ПЦР проводили в 0,8% и 2,0% агарозном геле.

Очистку продуктов ПЦР осуществляли с использованием колонок производства фирм Sigma и этанол/ацетатной преципитацией.

Электрофоретическую разгонку фрагментов ДНК проводили на анализаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США).

Анализ полученных фрагментов проводили с использованием программных продуктов «Sequencing Analysis Software v.5.1.1», BioEdit, SeqScape v.3.

Для определения R5 и/или X4 тропных вариантов ВИЧ, использовали программу geno2pheno v.3. Значение FPR (false positive rate) – величине, определяющей вероятность, с которой R5 тропный вирус будет ложно определен как X4-тропный. R5-тропным считался образец при наличии показателя FPR равной

и более 20%. При величине FPR менее 20% образцы считались X4-тропными и/или R5/X4, т.е. с двойным тропизмом.

Филогенетический анализ полученных фрагментов осуществляли с помощью программы MegaB (деревья с корнем построены методом присоединения соседей – neighbor-joining method анализа с количеством повторов 1050, моделью Kimura-2, статистическую обработку осуществляли с помощью бутстреп метода).

Все пробы, взятые в работу, были исследованы методами ИФА и количественной ОТ-ПЦР. Положительные в ОТ-ПЦР образцы взяты в работу по секвенированию. Из всех отобранных проб были выделены РНК, поставлена ПЦР, секвенирующая ПЦР, электрофорез и анализ полученных фрагментов ДНК.

Как показали результаты филогенетического анализа, проведенного по участкам генов gag, pol и env, из 126 секвенированных образцов ДНК ВИЧ 105 (83,2%) относились к субтипу А1, 6 (4,8%) – к В, 4 (3,2%) – к G, 6 (4,8%) – к CRF03_AB, 3 (2,4%) – к CRF02_AG и по одному образцу (0,8%) к CRF06_crx и URF.

Для определения R5 и X4 тропных вариантов ВИЧ использовали секвенированные по участку V3 петли белка gp120 гена env фрагменты длиной 247 п.о.

В результате проведенных исследований было установлено, что 96 образцов имели R5 (76,2%) тропные варианты ВИЧ, а 30 (23,8%) X4 тропные варианты вируса. Среди X4 тропных доминировал А1 субтип ВИЧ – 25 (83,3%), CRF03_AB – 3 (10%), В и URF – по 1 (3,3%) (рис. 1).

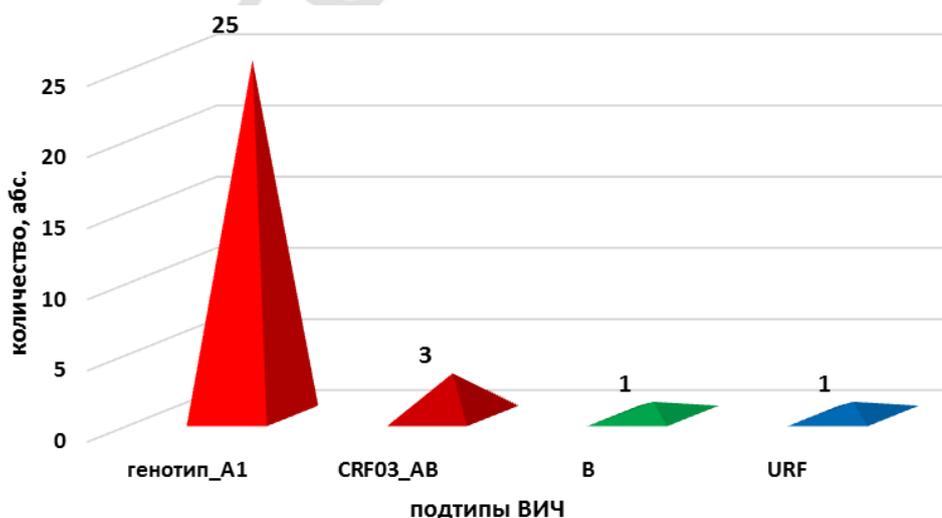


Рис. 1. Распределение субтипов ВИЧ-1 среди X4 тропных вариантов вируса

Из 96 R5 тропных вариантов ВИЧ-1, 80 (83,3%) относились к А1 субтипу, 5 (5,2%) – к В, 4 (4,2%) – к G, по 3 (3,1%) – к CRF02_AG и CRF03_AB, 1 (1,0%) – к CRF06_crx (рис. 2).

По значениям FPR 17 (13,5%) X4 тропных образцов находились в пределах от 0 до 10%, 13 (10,3%) – 10-20%, т. е. данная группа вирусов является Т-тропными или Т- и М-тропными и могут использовать CXCR4 и/или CXCR4/CCR5 корецепторы для проникновения в чувствительные клетки (табл.). Среди R5 тропных вариантов ВИЧ, 18 (14,3%) находились в пограничных значениях FPR – 20-30%, а 78 изолятов в пределах от 30 и до >60%, что определяло их как «чистые» CCR5 тропные вирусы, чувствительные к маровируку (табл.).

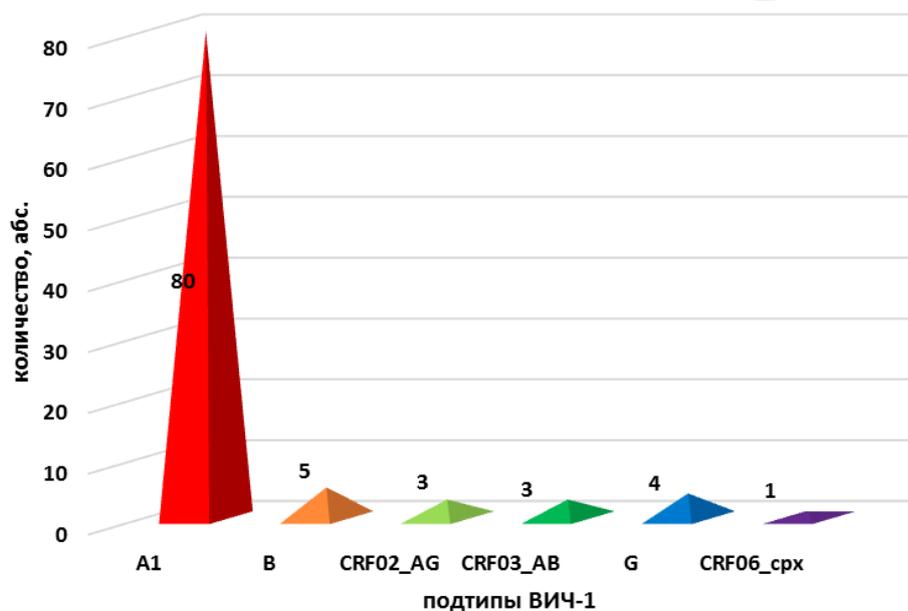


Рис. 2. Распределение субтипов ВИЧ-1 среди R5 тропных вариантов вируса

Распределение изолятов ВИЧ-1 по значению FPR

№ п/п	Значение FPR	Количество	%, от всех исследованных проб
1.	0 – 10 (X4 тропный)	17	13,5
2.	10 – 20 (X4 тропный)	13	10,3
3.	20-30 (R5 тропный)	18	14,3
4.	30-50 (R5 тропный)	34	27
5.	50-60 (R5 тропный)	14	11,1
6.	>60 (R5 тропный)	30	23,8

Известно, что V3 регион белка gp120 гена env определяет не только тропность ВИЧ к Т- и/или М-клеткам, но и позволяет предсказать биологические свойства вируса: синцитиеобразующий (SI) или не образующий синцитии (NSI) вариант. Для определения вариантов ВИЧ с разными биологическими свойствами мы отобрали 38 аминокислотных последовательностей X4 тропных (13) и R5 тропных (25) изолятов ВИЧ (рис. 3).

Как показали проведенные исследования, у 6 (46,2%) из 13 проанализированных последовательностей X4 тропных вирусов, в положении 11 и 25 V3 петли gp120 имелись аминокислотные замены, определяющие вирусы, как образующие синцитии (SI) с высоким уровнем репликативной активности, Т-тропными: у изолята 410Gr, подтип В, в положении 25 D на N, у PV_41–A1, в положении 11 S на R, у изолята HIV 17_AB–CRF03_AB, в положении 11 S на G и в 25 D на G, у изолята PV_32–A1, в положении 25 D на V, у изолята Mn_21–URF, в положении 25 D на G и, наконец, у изолята HIV_250–A1, в положении 25 D на G. Остальные X4 тропные вирусы оказались не синцитиеобразующими (NSI) с низкой репликативной активностью, Т-тропными.

Среди R5 тропных вирусов все изоляты оказались не синцитиеобразующими с низкой репликативной активностью, М тропными, что характерно для ВИЧ, изолированного от пациентов с ранними сроками инфицирования.

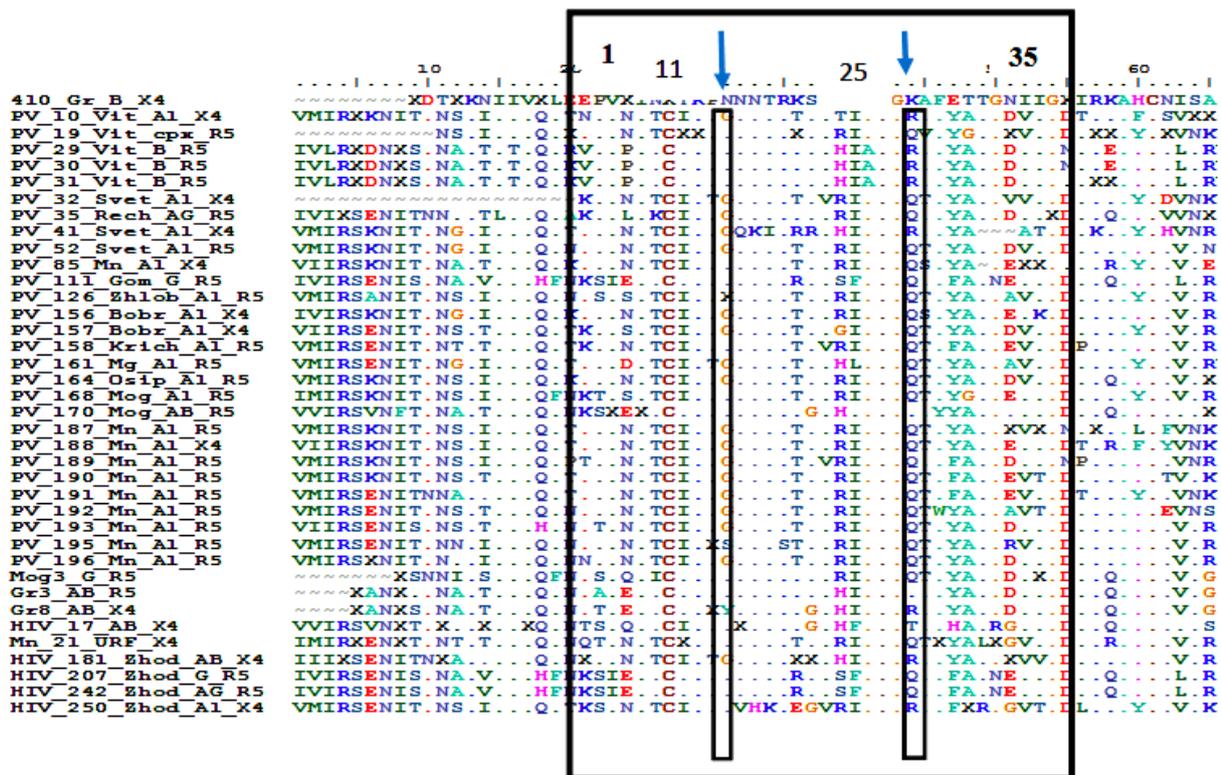


Рис. 3. Аминокислотные последовательности R5 и X4 тропных вариантов ВИЧ, рамкой ограничен участок V3 петли gp120 ВИЧ-1

Определение вирусов с SI и NSI фенотипом, соответственно M- и T-тропных вариантов ВИЧ имеет большое значение не только для назначения лекарственных препаратов-ингибиторов ко-рецепторов, но и прогностическое, поскольку у пациентов с SI свойствами ВИЧ наблюдается быстрый прогресс заболевания с плохим прогнозом.

Таким образом, нами впервые осуществлены исследования по определению X4 и R5 тропных вариантов с SI и NSI фенотипом, M- и T-тропностью ВИЧ. Проведение такого рода работы имеет не только чисто научное, но и прикладное значение, поскольку позволяет предсказывать прогноз течения заболевания у ВИЧ-инфицированных, назначать адекватные схемы терапии и своевременно их менять в случае появления изменений в геноме ВИЧ и, следовательно, тропности вируса у пациента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1* / H. Deng [et al.] // *Nature*. 1996. Vol. 381. P. 662-666.
2. *Moor, J. P. Co-receptors for HIV-1 entry* / J. P. Moor, A. Trkola, T. Dragic // *Cur. Opin. Immunol.* 1997. Vol. 9. P. 551-562.
3. *Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule* / R. A. M. Fouchier [et al.] // *J. Virol.* 1992. V.66. P. 3183-3187.
4. *Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution* / J-J. De Jong [et al.] // *J. Virol.* 1992. Vol. 66. P. 6777-6780.

5. *Syncytium-inducing* and non-*Syncytium-inducing* capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics / F. de Wolf [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1994. Vol. 10. P. 1387-1399.

6. *Syncytium-inducing* (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-*syncytium-inducing*/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population / M. Cornelissen [et al.] // J. Virol. 1995. Vol. 69. P. 1810-1818.

7. *Pessoa, R.* Frequent detection of CXCR4-using viruses among Brazilian blood donors with HIV-1 long-standing infection and unknown clinical stage: analysis of massive parallel sequencing data / R. Pessoa, S.S. Sanabani // Data Brief. 2015. Vol. 6. P. 267-274.