

На правах рукописи

БОГАЧЕВ
Владислав Викторович

**Молекулярно-эпидемиологические особенности
распространения ВИЧ-инфекции
в Новосибирской области в 2008–2012 гг.**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово
2014

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Научный руководитель:

Гашникова Наталья Матвеевна, кандидат биологических наук, ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Официальные оппоненты:

Шестопалов Александр Михайлович, доктор биологических наук, руководитель лаборатории экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН

Шульгина Наталья Ивановна, кандидат медицинских наук, заведующая организационно-методическим отделом ГБУЗ НСО «Центр СПИД»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии наук

Защита состоится «26» _____ сентября 2014 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской области, 630559, тел. 8(383) 336-74-28

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и на интернет-сайте <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор



Г.П. Трошкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

ВИЧ-инфекция – это хроническая и неизлечимая болезнь, этиологическим агентом которой является вирус иммунодефицита человека. На сегодняшний день вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) представляет серьезную проблему для многих стран мира, в том числе и для Российской Федерации. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире насчитывается порядка 35 млн ВИЧ-инфицированных лиц (WHO, 2013). В РФ, согласно данным официальной статистики, их число приближается к 0,8 млн. и ежегодно увеличивается примерно на 70 тысяч.

Эпидемия ВИЧ-инфекции на большей части территорий России, прежде всего, связана с циркуляцией вируса в среде потребителей инъекционных наркотиков. Однако в связи с тем что практика немедицинского введения наркотических препаратов распространена преимущественно среди молодого, сексуально активного населения, ВИЧ постепенно начал проникать и в другие слои общества; с 2008 г. в РФ все больше случаев заражения ВИЧ-инфекцией связано с незащищенными половыми контактами.

Уникальная степень генетической изменчивости ВИЧ способствует постоянному усложнению вирусной популяции, разнообразие которой в значительной степени варьируется в зависимости от географического положения территорий. Для большей части России и стран бывшего СССР лидирующее положение по распространенности занимает субтип А ВИЧ-1 (Thomson et al., 2009). В разных регионах РФ обнаруживаются и иные генетические варианты ВИЧ-1, в основном это варианты субтипа В – они выявляются повсеместно (4–8 %); CRF03_AB – в европейской части России (Thomson et al., 2009; Liitsola et al., 1998); F1 – в Санкт-Петербурге (Thomson et al., 2009); G – в Южном федеральном округе (Bobkov et al, 1994); CRF02_AG – в Сибирском и Дальневосточном федеральном округе (Колмеев и др., 2011 ; Bobkova, 2013); с низкой частотой на отдельных территориях регистрируются субтип С и CRF01_AE (Bobkova, 2013). Подобное генетическое разнообразие в пределах одной страны характерно для данного вируса.

Изучение специфики распространения и представленности ВИЧ в пределах конкретных территорий необходимо для принятия адекватных мер по диагностированию, терапии и противодействию дальнейшему увеличению числа ВИЧ-инфицированных лиц. На сегодняшний день в России таких исследований проводится недостаточно. Мониторинг молекулярно-эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции проводится лишь в некоторых субъектах федерации.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является исследование молекулярно-эпидемиологических особенностей распространения ВИЧ-инфекции в Новосибирской области в 2008–2012 гг. и анализ циркулирующих генетических вариантов вируса на территориях Кемеровской области и Забайкальского края.

Для достижения указанных целей были поставлены следующие **задачи**:

1. Создать банк образцов плазмы крови, полученной от инфицированных ВИЧ-1 пациентов.
2. Осуществить анализ эпидемиологических данных для собранных клинических образцов.
3. Исследовать генетическое разнообразие вариантов ВИЧ, выделенных из клинических образцов крови.
4. Оценить распространенность отдельных генетических вариантов ВИЧ-1 на территориях СФО (Новосибирской и Кемеровской областях, Забайкальском крае).
5. Изучить филогенетические взаимосвязи современных генетических вариантов ВИЧ-1, распространяющихся на территориях СФО.
6. Выявить мутации, характерные для отдельных генетических вариантов ВИЧ-1.
7. Провести комплексный анализ территориальных особенностей развития эпидемии и генетических характеристик распространяющихся в СФО вариантов ВИЧ.

Научная новизна работы

1. Впервые в России выявлено распространение новой рекомбинантной формы CRF63_02A1 ВИЧ-1.
2. Охарактеризована территориальная специфика распространения генетических вариантов ВИЧ на территориях СФО.
3. Впервые описан спектр и распространенность мутаций, связанных с развитием устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам, среди вариантов вируса, циркулирующих на территории СФО.
4. Исследован паттерн мутаций, свойственный области гена *pol* эпидемиологически значимых для СФО вариантов ВИЧ-1, впервые выявлены мутации вируса, обладающие субтипической и территориальной спецификой.

Практическая значимость работы

В работе расшифровано и депонировано в международной базе данных 337 фрагментов области гена *pol* ВИЧ-1, в том числе 139 нуклеотидных последовательностей, впервые выявленных ВИЧ-1 нового рекомбинантного варианта CRF63_02A1.

Расшифрованные нуклеотидные последовательности фрагментов генома вирусов, изученные в работе, вносят существенное дополнение в сумму знаний о генетических особенностях современных российских вирусов иммунодефицита человека. Полученные сведения необходимы для разработки актуализированных тест-систем и лекарственных средств, эффективных в отношении распространяющихся в нашей стране ВИЧ-1.

Выявленные мутации устойчивости ВИЧ к лекарственным препаратам и их распространенность являются основополагающими данными, учитываемыми в клинической практике при выборе наиболее эффективных схем антиретровирусной терапии.

Проведенный анализ генетического разнообразия области *pol* ВИЧ-1 является базовой информацией, необходимой не только для проведения эпидемических исследований, но и для разработки новых средств терапии ВИЧ-инфекции.

Положения, выносимые на защиту

1. Генетические варианты CRF02_AG, циркулирующие на территории СФО, гетерогенны и имеют разную степень распространенности.
2. С 2008 г. в Новосибирской области наблюдается смена доминирующего генетического варианта ВИЧ-1 с субтипа А на CRF63_02A1.
3. Генетические варианты субтипа А, циркулирующие в СФО, образуют однородную монофилетическую группу.
4. Генетические варианты субтипа В ВИЧ-1, циркулирующие в СФО, включают гетерогенную группу вирусов.
5. В популяции ВИЧ, циркулирующих в СФО, существуют мутации, специфичные для отдельно взятых генетических вариантов вируса и/или территорий.

Апробация работы и публикации

По результатам работы с 2008 по 2014 гг. опубликовано 19 статей, из них 8 в журналах из списка научных журналов рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, также материалы работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 27 тезисов.

Вклад автора

Основные результаты представленные в диссертационной работе получены лично автором.

Секвенирование и очистка продуктов секвенирования проводилась лично автором и совместно с сотрудниками отдела ретровирусов П.Б. Барышевым, Е.А. Чубаревой, А.Г. Казачинской. Депонирование нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев проводились лично автором и совместно сотрудниками отдела ретровирусов А.В. Тотмениным и П.Б. Барышевым. Поиск и анализ мутаций, содержащихся во фрагментах гена *pol*, проводились лично автором.

Общее руководство работой осуществлялось Н.М. Гашниковой

Работа выполнена в 2008–2012 гг.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 129 страницах текста, содержит 15 рисунков и 14 таблиц. Список литературы содержит 225 ссылки на зарубежные и отечественные работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы образы плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, выявленных в Новосибирской области в 2002–2012 гг. (700 образцов), Кемеровской области (46 образцов), в Забайкальском крае (50 образцов) и в 2010 в Москве (16 образцов). Сбор образцов крови осуществляли на базе ГБУЗ Новосибирской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» (п. Кольцово), ГУЗ «Краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» (Чита), ГУЗ «Новокузнецкий центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» (Новокузнецк) в соответствии с положительным решением Этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Выделение суммарной РНК из плазмы крови проводили набором «Дельта-Маг ВГВ/ВГС/ВИЧ» и «Реалбест экстракция 1000» («Вектор БЕСТ», Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью M-MLV обратной транскриптазы (ОТ) «Promega» (США) с праймера rr1. Полученные фрагменты ДНК использовались для проведения ПЦР. Амплифицирование фрагментов генома ВИЧ-1 проводили методом двухраундовой полимеразной цепной реакции (ПЦР). В первом раунде амплификации использовались пары праймеров prf1 и rr1, во втором – prf2 и rr2. ПЦР осуществляли с помощью HotStart Taq ДНК-полимеразы «Сибэнзим» (Россия). Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием набора реагентов «BigDye Terminator™ v 3.1» на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, США). Филогенетический анализ выполняли с помощью программы «Mega» версии 4.1, путем построения филогенетических деревьев методом объединения ближайших соседей и методом максимального правдоподобия. Выявление мутаций устойчивости проводили с помощью онлайн-программы, представленной на сайте Стэнфордского университета (США, hivdb.stanford.edu).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В Новосибирской области с 2007 г. отмечается резкое увеличение новых случаев инфицирования ВИЧ. Поэтому важно было выяснить, чем это обусловле-

но, и наладить постоянный мониторинг за циркулирующими в НСО вариантами ВИЧ-1.

В ходе мониторинга в 2008–2012 гг. для 429 образцов плазмы крови, полученных от проживающих на территории НСО пациентов, в ОТ-ПЦР были амплифицированы ВИЧ-специфические фрагменты ДНК. Фрагменты представляли собой участок гена *pol* протяженностью 1300 п.н., включающий полноразмерную последовательность гена, кодирующего белок протеазы (*pol (pro)*) и частичную последовательность гена, кодирующего белок обратной транскриптазы (*pol (RT)*). Полученные нуклеотидные последовательности позволили определить принадлежность исследованных ВИЧ к генетическому варианту и выявить мутационные изменения, содержащиеся в указанном участке генома вариантов ВИЧ.

В ходе проведенного анализа была выявлена рекомбинантная форма ВИЧ-1 на основе CRF02_AG, отличная от описанного ранее классического варианта CRF02_AG ВИЧ, циркулирующего в Средней Азии. В последствие было выяснено, что выявленный в НСО генетический вариант ВИЧ-1 представляет собой новую циркулирующую рекомбинантную форму ВИЧ-1 – CRF63_02A1, и исследована ее распространенность в НСО.

Согласно полученным данным, в 2008–2012 гг. доля ВИЧ-положительных пациентов, инфицированных CRF63_02A1 увеличилась с 41,7 до 75,8 %, инфицированных субтипом А снизилась с 37,5 до 20,3 %, инфицированных субтипом В снизилась с 10 до 4 %. Таким образом, эпидемически значимыми для Новосибирской области являются три генетических варианта ВИЧ-1: субтипы А, В и циркулирующая рекомбинантная форма 63_02A1.

Одним из трех эпидемиологически значимых генетических вариантов как для НСО, так и для РФ в целом, является субтип В ВИЧ-1. Аналитический обзор эпидемиологических данных позволяет судить о том, что данный вирус циркулирует в различных группах риска. Не смотря на то что варианты субтипа В, циркулируют в разных группах риска, часто данный вариант связывают с группой риска MSM. Среди MSM в России (и по данным настоящего исследования) выявляется лишь один генетический вариант – субтип В ВИЧ-1.

За время проведения мониторинга было исследовано 26 генетических вариантов субтипа В ВИЧ-1, выделенных от лиц, проживающих в НСО. Согласно филогенетическому анализу, наблюдается кластеризация вирусов по географическому признаку и по давности инфицирования ВИЧ (рис. 1).

Исследованные варианты субтипа В ВИЧ-1, циркулирующие в НСО, образуют два кластера. В кластер I вошли вирусы, выделенные от пациентов, зараженных половым путем (07RU397, 07RU402, 08RU779, 10RU6581) и ПИН (07RU542, 08RU1262). Все пациенты были инфицированы в конце 1990-х и в начале 2000-х гг.

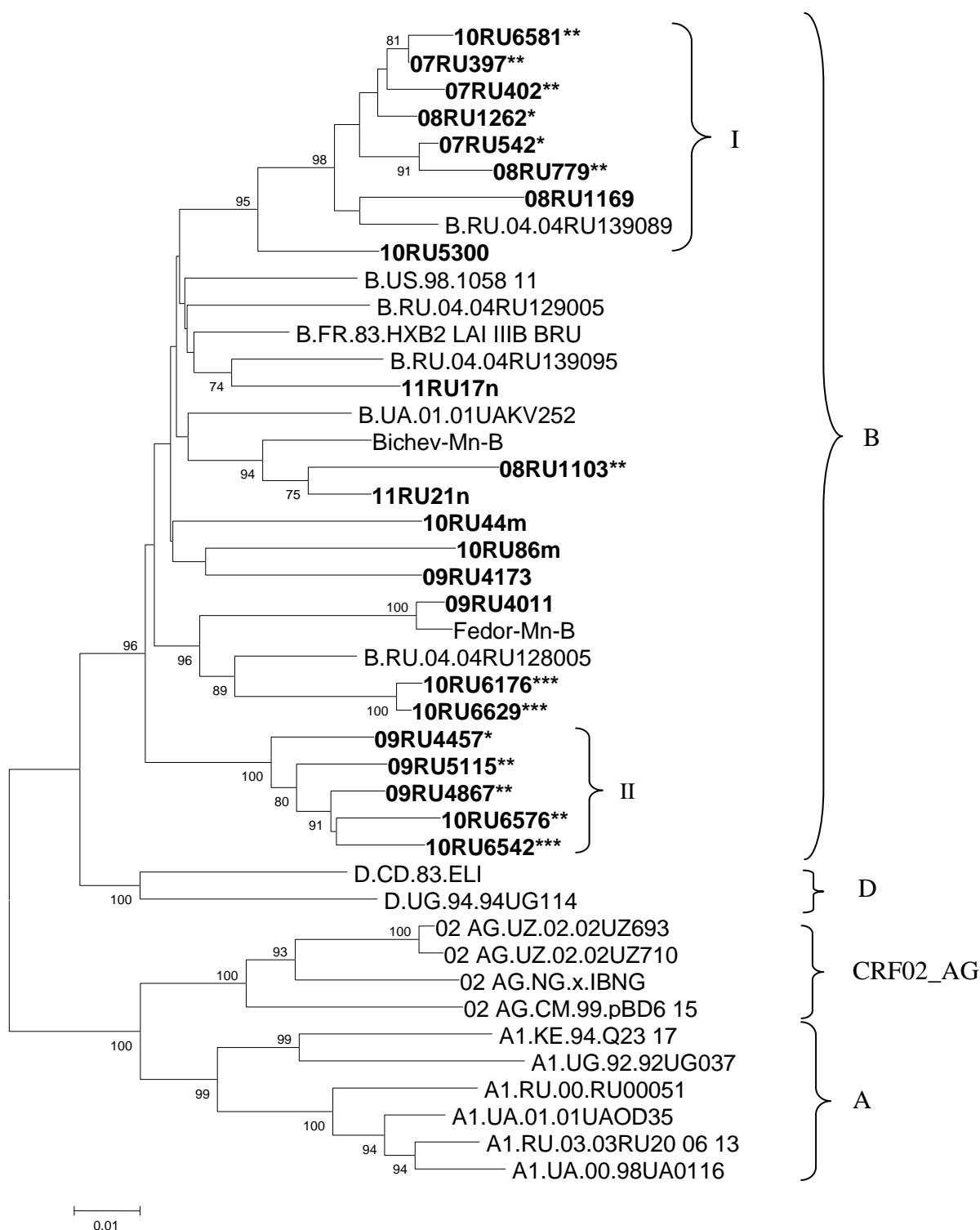


Рис. 1. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol* вариантов ВИЧ-1 субтипа В, выделенных от пациентов, проживающих на территории НСО. Последовательности ВИЧ-1, изученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Звездочками отмечены варианты ВИЧ-1, выделенные у пациентов из групп риска (* – потребители инъекционных наркотиков; ** – лица, инфицированные половым путем; *** – мужчины, имеющие связь с мужчинами). Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70. Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей

Вариант 10RU5300 выделен от пациента, инфицированного при рождении в 1991 г., данный изолят ВИЧ имеет меньшую степень гомологии с представителями кластера I. Кластер II образован вариантами ВИЧ-1, выделенными от пациентов, инфицированных в Новосибирской области после 2006 г. при гомосексуальных (10RU6542), гетеросексуальных контактах (09RU5115, 09RU4867, 10RU6576) и у ПИН (09RU4457). Данная группа ВИЧ-1 формирует отдельную ветвь филогенетического дерева, наиболее близкие по идентичности последовательности ВИЧ-1 для этих изолятов, найденные в GenBank, имеют максимальную степень идентичности не более 93–94 % и происходят в подавляющем большинстве случаев из США, Канады, Австралии.

В свою очередь вирусы, выделенные от пациентов, проживающих на других территориях, отличаются от таковых, проживающих в Новосибирской области. Различий между ВИЧ-1 субтипа В, выделенных от пациентов из разных групп риска, выявлено не было.

Таким образом, можно заключить, что генетические варианты субтипа В ВИЧ-1 имеют очаговый характер изменчивости, который зависит от места и давности инфицирования ими пациентов. При проникновении одного из вариантов ВИЧ-1 субтипа В на какую-либо территорию в определенный момент времени происходит его обособление и распространение среди узкого круга лиц, что приводит к появлению отличных друг от друга генетических вариантов субтипа В ВИЧ-1.

Другим эпидемиологически значимым для Новосибирской области и для РФ генетическим вариантом является субтип А ВИЧ-1. Нами было исследовано 112 генетических вариантов ВИЧ-1 субтипа А, выделенных от лиц, проживающих в НСО.

В ходе анализа эпидемиологических данных было выяснено, что пять пациентов, проживающих в НСО, были инфицированы на других территориях: 10RU6825 – в Заире, Демократическая Республика Конго; 10RU6617s – в Самаре, РФ; 09RU4873 и 10RU6820 – в Красноярске, РФ; 10RU6841 – в Алтайском крае, РФ.

С целью определения степени гетерогенности популяции ВИЧ-1 данного субтипа были проанализированы 11 образцов плазмы крови, полученные от пациентов из Москвы, инфицированных в 2010 г.

Для исследованных образцов ВИЧ-1 был проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *pol* (рис. 2). Как уже отмечалось выше, субтип А ВИЧ-1 играет определяющую роль в развитии ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации. В силу широкого распространения среди группы риска ПИН он обладает в высокой степени генетической однородностью (Rumyantseva et al., 2009; Kazennova et al., 2011).

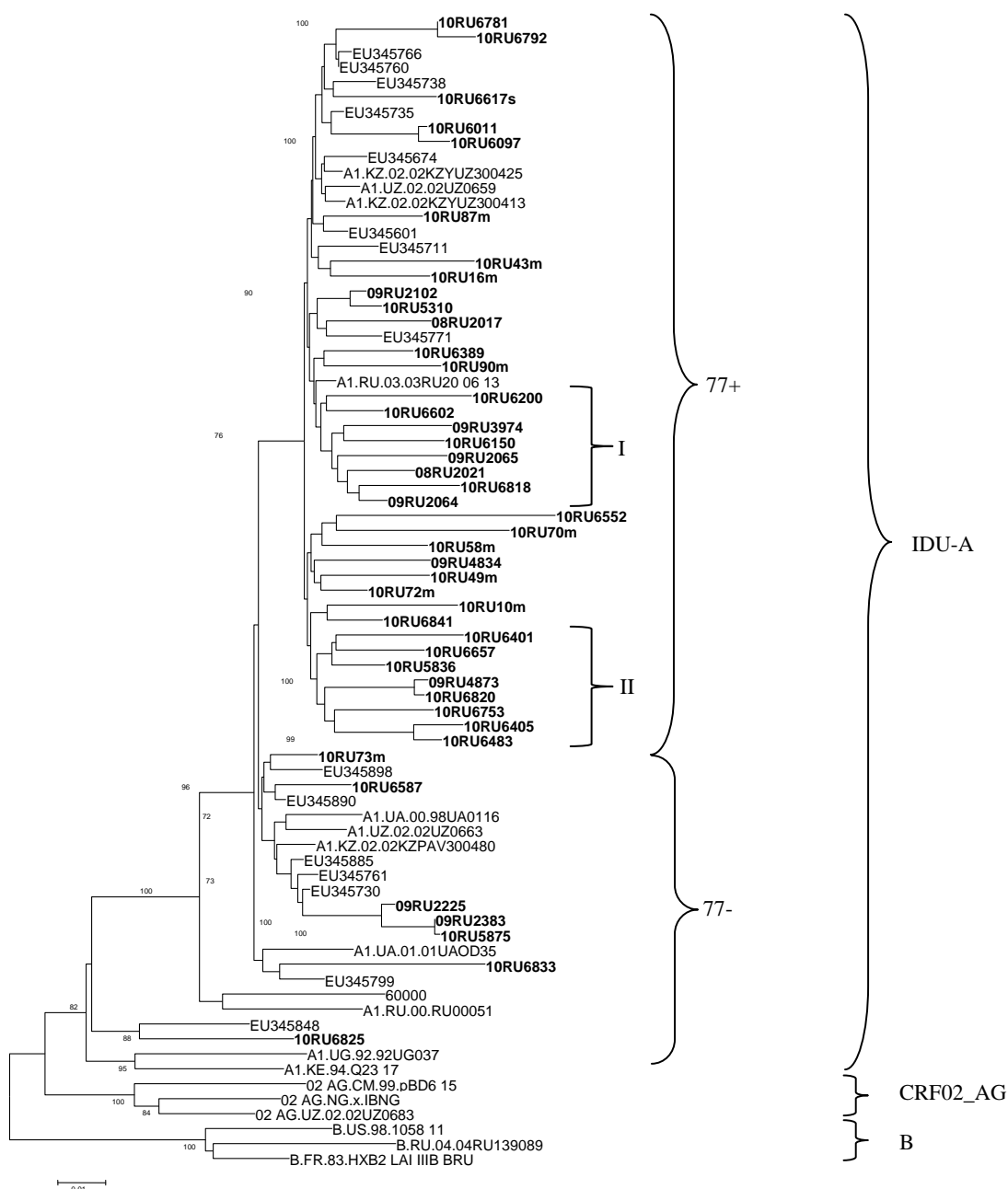


Рис. 2. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol* генетических вариантов субтипа А ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих на территории НСО. Последовательности ВИЧ-1, изученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70. Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей

Эти данные подтверждаются и в наших исследованиях. По результатам филогенетического анализа (см. рис. 2) можно судить о монофилетичности циркулирующих в НСО вариантов субтипа А ВИЧ-1.

Однако наблюдается тенденция к кластеризации вариантов ВИЧ-1 в зависимости от давности инфицирования пациентов, которая основана на незначительных различиях в нуклеотидной последовательности генома вируса.

Сибирские варианты образуют две подгруппы, которые разделяются по наличию в геноме вируса мутаций A62V и V77I. Основная подгруппа образована вирусами, содержащими данные мутации (обозначена на рисунке 77+). В ней также выделяются два кластера. В кластер I входят образцы, выделенные от пациентов, из разных групп риска – инфицированных половым (10RU6150), парентеральным путем (09RU2065, 10RU6602, 10RU6818), перинатальной трансмиссией (10RU6200). В кластер II входят образцы, полученные от пациентов, инфицированных половым (10RU4873, 10RU5836, 10RU6657, 10RU6753, 10RU6820) и парентеральным (10RU6405, 10RU6483) путями в 2003–2006 гг.

Отмечается территориальная специфика гетерогенности вирусов субтипа А, но в значительно меньшей степени, чем для генетических вариантов субтипа В ВИЧ-1.

Варианты ВИЧ, выделенные от пациентов, инфицированных в Москве, образовали несколько групп. Первая группа представлена вариантами – 10RU16m, 10RU43m, 10RU87m, они наиболее близки к вариантам ВИЧ, циркулирующим в европейской части России. Вторая группа образована вариантами – 10RU10m, 10RU49m, 10RU58m, 10RU70m, 10RU72m, они близки к новосибирским изолятам ВИЧ. Генетический вариант ВИЧ-1 10RU73m наиболее близок к варианту 10RU6587, выделенному в 2000 г. в Новосибирске. В отличие от вариантов ВИЧ-1 субтипа А российского происхождения, последовательность 10RU6825с субтипа А ВИЧ-1, выделенного от пациента, инфицированного в 2005 г. в Конго, лежит на отдельной ветви филогенетического дерева, расположенной между ВИЧ субтипа А, выделенными в 1990-х гг. в Африке и изолятами ВИЧ, выделенными на территории России, что подтверждает факт того, что в дивергенции субтипа А ВИЧ-1 важны перечисленные выше факторы.

При филогенетическом анализе вариантов ВИЧ-1, выделенных от пациентов из группы риска ПИН и лиц, инфицированных при половых контактах, не было выявлено специфических особенностей групповой кластеризации вирусов.

Вирус иммунодефицита человека первого типа до 2002 г. в НСО циркулировал в основном среди мужчин из группы риска потребителей инъекционных наркотиков и представлял собой генетический вариант субтипа А ВИЧ-1. С 2002 по 2005 гг. инфекция распространилась среди женщин, инфицированных половым путем. Именно в это время в НСО отмечаются первые случаи заражения обнаруженным нами новым генетическим вариантом ВИЧ-1 – CRF63_02A1.

Данная форма вируса проникла сразу в несколько групп риска (ПИН и их сексуальных партнеров). С 2006 г. в НСО вновь регистрируется значительный рост наркомании. К 2008 г. CRF63_02A1 заняла по распространению в НСО до-

минирующую роль, постепенно вытеснив лидировавший ранее генетический вариант субтипа А ВИЧ-1.

Отмечаются случаи обнаружения CRF02_AG на территории России (Сибирского и Дальневосточного федеральных округов) (Коломеец и др., 2011 ; Bobkova, 2013) и стран СНГ – Киргизии (Laga et al., 2012), Казахстана (Eyzaguirre et al., 2007).

CRF02_AG является прямым прародителем CRF63_02A1 , но данный вариант ВИЧ выявляется в НСО лишь эпизодически. Было изучено 294 отличающихся варианта циркулирующей рекомбинантной формы 02_AG ВИЧ-1, выделенных от лиц из НСО. Для всех генетических вариантов CRF02_AG ВИЧ-1 был проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области гена *pol* (рис. 3). Генетические варианты ВИЧ-1 распределились на филограмме в три группы. К первой группе относится первый выявленный в НСО вариант CRF02_AG – 08RU1693, выделенный от мужчины, инфицированного ВИЧ до 2007 г. Этот вирус оказался наиболее близким к классической референс-последовательности варианта 02_AG.CM.99.pBD6_15, выделенного в 1999 г. в Камеруне. Вторая группа образована изолятами, выделенными от пациентов, инфицированных в Узбекистане (11RU6939), Таджикистане (11RU6900) и Новосибирской области (09RU2204, 10RU6509, 11RU9654, 11RU11982), которые наиболее близки к генетическим вариантам CRF02_AG ВИЧ-1, циркулирующим на территориях Калмыкии, Узбекистана и Киргизии. Все эти образцы выделены от пациентов, инфицированных до 2008 г. Наиболее многочисленной является третья группа – 280 вариантов ВИЧ, которые образуют отдельную ветвь, формируя монофилетическую группу. Все они являются впервые описанной новой циркулирующей рекомбинантной формой CRF63_02A1 ВИЧ-1. Новый генетический вариант ВИЧ представляет собой продукт рекомбинации субтипа А и CRF02_AG ВИЧ-1, циркулирующих на территориях России и Средней Азии (Baryshev, 2012).

Можно предположить, что резкий скачок числа новых случаев инфицирования, начиная с 2007 г., связан с активным распространением CRF63_02A1 ВИЧ-1. Вероятно, ситуация по ВИЧ-инфекции в НСО, если не будут предприняты усилия по специфической профилактике в группах риска, будет только усугубляться.

Однако постепенное увеличение доли полового пути передачи инфекции и доли женщин среди ВИЧ-инфицированных свидетельствует о вовлеченности различных слоев населения в развитие ВИЧ-инфекции и приводит к росту рождаемости ВИЧ-инфицированных детей. Это, в свою очередь, может увеличить риск передачи резистентных вариантов ВИЧ-1 не только горизонтально, но и вертикально.

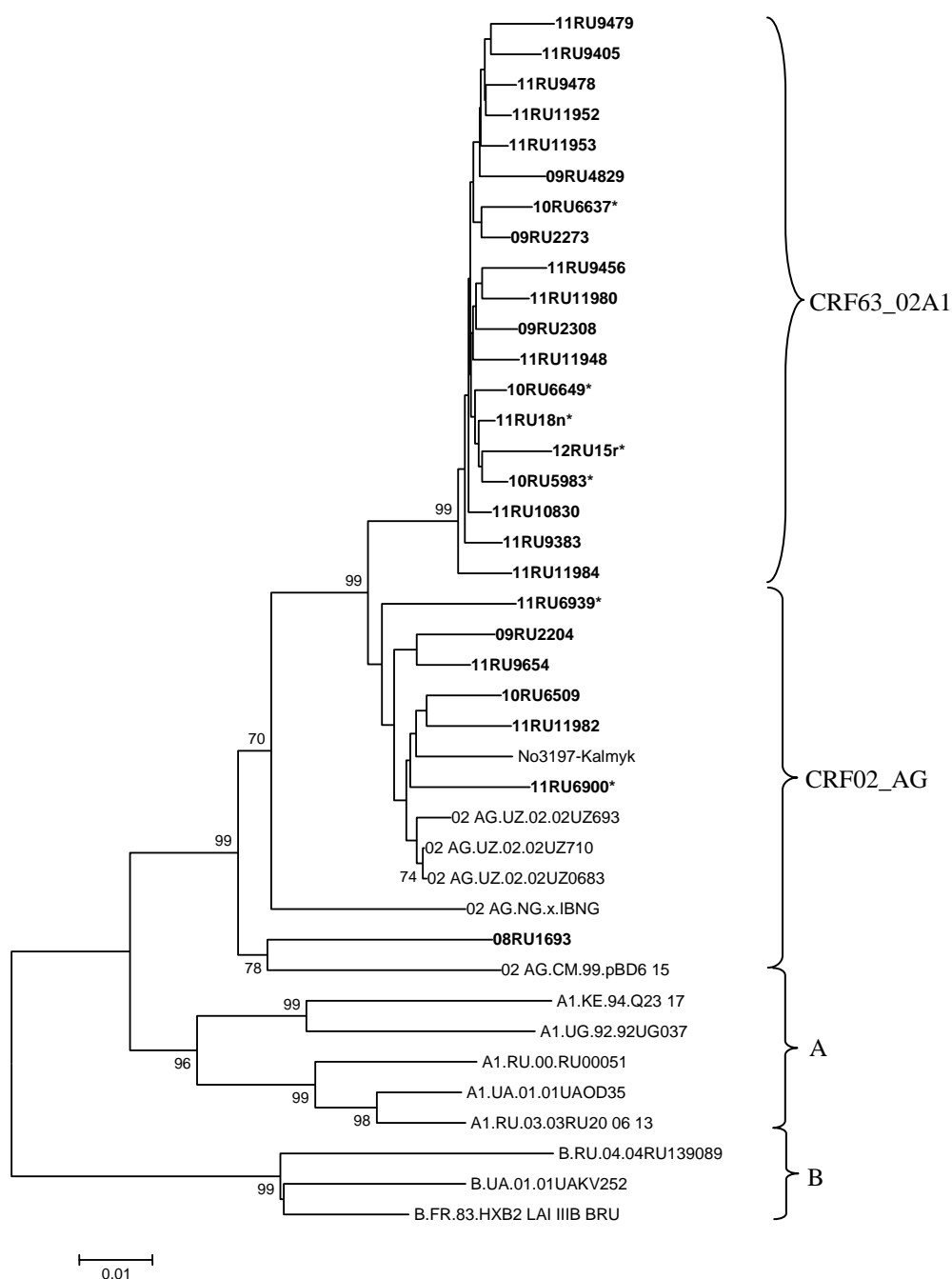


Рис. 3. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol* вариантов ВИЧ-1 субтипов CRF02_AG и CRF63_02A1, циркулирующих на территории Новосибирской области. Последовательности ВИЧ-1, изученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. * — варианты ВИЧ-1, с известной полной последовательностью генома. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70.

Одной из задач данной работы являлось определение генетического разнообразия ВИЧ-1, циркулирующих на территориях Новосибирской области, Кемеровской области и Забайкальского края и выявление наличия у данных вирусов мутаций, приводящих к изменению эффективности действия препаратов антиретровирусной терапии. Для всех полученных нуклеотидных последовательностей

стей был проведен мутационный анализ, в ходе которого последовательности были разделены на группы по месту инфицирования пациентов.

В ходе анализа были выявлены особенности в нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1, циркулирующих в СФО. Согласно полученным данным можно выделить две группы мутаций – мутации, вызывающие изменение эффективности действия препаратов АРВТ; мутации, специфичные для отдельных генетических вариантов вируса и/или для отдельных территорий.

Наиболее распространенной мутацией устойчивости среди генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской области была мутация M184V (табл. 1).

Таблица 1. Представленность мутаций устойчивости к лекарственным препаратам среди ВИЧ, выделенных у пациентов, принимавших АРВП, проживающих на территории Новосибирской области, обследованных в 2011–2012 гг.

Мутация устойчивости	Частота встречаемости мутации в вариантах CRF63_02A1 ВИЧ-1, выделенных у пациентов, для которых нет данных о приеме АРВП/принимавших АРВП (%)	Частота встречаемости мутации в вариантах субтипа А ВИЧ-1, выделенных у пациентов, для которых нет данных о приеме АРВП /принимавших АРВП (%)
K70R	1,1/1,1	0/0
L74V	1,1/2,2	0/3,2
A98G	1,1/1,1	0/0
K101E	0/1,1	0/0
K103N**	5,3/12	0/3,2
Y115F*	1,1/0	0/9,7
Y181C**	2,9/9,3	0/0
M184V	5,3/9,8	0/19,4
Y188L	0/1,1	0/0
G190A/S	0/1,1	0/3,2
L210W	0/1,1	0/0
T215Y/F	1,1/2,2	0/3,2
K219EN*	2,2/1,1	0/9,7
P225H	0/1,1	0/0
M230L	0/0	0/3,2

* Мутации, наиболее часто встречающиеся в генетических вариантах субтипа А ВИЧ-1.

** Мутации, наиболее часто встречающиеся в генетических вариантах CRF63_02A1.

Мутации устойчивости (см. табл. 1) с большей частотой были обнаружены у пациентов, принимавших АРВТ. Доля вирусных вариантов субтипа А ВИЧ-1, выделенных у пациентов, проживающих в НСО и не принимавших АРВТ, содержащих в своем геноме мутации устойчивости к лекарственным препаратам, незначительна (<1 %). Однако среди вариантов CRF63_02A1, выделенных от пациентов из НСО не принимавших АРВТ, были выявлены мутации устойчивости с частотой

той встречаемости 5-6 % (см. табл. 1; K103N, M184V), что свидетельствует о распространенности резистентных вариантов ВИЧ в НСО.

Регистрируется специфичность возникновения мутаций в зависимости от генетического варианта вируса. В геноме вариантов субтипа А ВИЧ-1, циркулирующих в СФО, с большей частотой встречаются мутации устойчивости к лекарственным препаратам из класса НИОТ (Y115F, K219EN). Среди генетических вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1 выявляются мутации устойчивости преимущественно к ННИОТ (K103N, Y181C).

Следующей группой мутаций являются субтип-специфические вторичные мутации. Анализируемые последовательности сравнивались с референсной последовательностью субтипа В (HXB2).

Как упоминалось выше, генетические варианты субтипа В ВИЧ-1, циркулирующие на территории Сибири, обладают очаговым характером изменчивости, который зависит от места и давности инфицирования пациентов. Согласно проведенному анализу нуклеотидных последовательностей для вариантов субтипа В ВИЧ-1 было выявлено три мутации, характерные для данного субтипа вируса (табл. 2).

Таблица 2. Генетический полиморфизм, свойственный генетическим вариантам субтипа В ВИЧ-1, циркулирующим в СФО в 2008–2012 гг.

Мутация	Частота встречаемости мутации в популяции ВИЧ субтипа В в СФО, %
Мутации в участке гена <i>pol</i> (<i>pro</i>)	
R57K	44,3
L63S	40,0
Мутации в участке гена <i>pol</i> (<i>rev</i>)	
R211K	63,2

Среди циркулирующих в Сибири ВИЧ-1 субтипа А зафиксированы как характерные, выявляемые ранее мутации для российских вариантов данного субтипа ВИЧ (табл. 3), так и впервые описанные – V35I (48,6 %), D123S (32,8 %), D123N (45,8 %), R211S (64,2 %).

В силу своего недавнего происхождения генетический вариант CRF63_02A1 ВИЧ-1 сходен по структуре с своими прародителями – CRF02_AG и субтипом А ВИЧ-1. Среди вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1, циркулирующих в СФО, распространены две мутации (K20I и M36I), характерные для CRF02_AG, и пять мутаций (E35D, M36I, R41K, H69K, L89M), свойственных для российских вариантов субтипа А ВИЧ-1.

Таблица 3. Мутации, свойственные генетическим вариантам субтипа А ВИЧ-1, циркулирующим в СФО в 2008–2012 гг.

Мутация	Частота встречаемости мутации в популяции ВИЧ в СФО, %
Мутации в участке гена <i>pol</i> (<i>pro</i>), характерные для российских вариантов субтипа А ВИЧ-1	
V77I	70,6
Мутации в участке гена <i>pol</i> (<i>RT</i>), характерные для российских вариантов субтипа А ВИЧ-1	
K11T	77,5
T39K	68,1
A62V	68,4
A158S	53,5
K173L	48,5
Мутации в участке гена <i>pol</i> (<i>RT</i>), характерные для сибирских вариантов субтипа А ВИЧ-1	
V35I	48,6
D123S	32,8
D123N	45,8
R211S	64,2

Для вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1, циркулирующих в СФО, выявлено 10 специфичных мутаций (табл. 4).

Таблица 4. Мутации, свойственные генетическим вариантам CRF63_02A1 ВИЧ-1, циркулирующим в СФО в 2008–2012 гг.

Мутация	Частота встречаемости мутации в популяции ВИЧ в СФО, %
Мутации в участке гена <i>pol</i> (<i>pro</i>), характерные для вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1	
K20I*	100,0
M36I	97,2
N37D	91,0
I64M	91,0
C67Y*	44,2
Мутации в участке гена <i>pol</i> (<i>RT</i>), характерные для вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1	
D121Y*	83,0
I135V	38,7
S162A*	90,8
K173R	56,7
R211N	52,4
V245Q*	74,5

* Мутации, которые встречаются только в данном варианте ВИЧ-1.

Наибольшая частота встречаемости выявлена для трех мутаций – D121Y, S162A и V245Q. В нуклеотидных последовательностях геномов ВИЧ, выделенных от пациентов из СФО, данные мутации обнаруживались только в вариантах CRF63_02A1 и не встречались в вариантах субтипа А и В. В будущем эти сведения могут быть использованы для разработки методик и средств диагностики для выявления новой рекомбинантной формы ВИЧ-1. Мутация K20I, как упоминалось выше, встречается и в других вариантах ВИЧ, в образовании которых были вовлечены варианты субтипа G ВИЧ-1, поэтому она не может считаться строго специфичной для вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1. Оставшиеся шесть мутаций встречаются также и в других вариантах ВИЧ, но с более низкой частотой (5–20 %).

Мутации, свойственные ВИЧ, циркулирующим на определенных территориях, были определены для вариантов субтипа А ВИЧ-1, так как данный вариант является наиболее распространенным в РФ и выявляется на всех территориях СФО (табл. 5).

Таблица 5. Территориальная специфика распространенности генетического полиморфизма среди вариантов субтипа А, циркулирующих на территориях НСО, Читы и Новокузнецка в 2008–2012 гг.

Генетический полиморфизм	Частота встречаемости мутации в вирусных вариантах, выделенных у пациентов, не принимавших АРВТ, из НСО в 2008–2010 гг. (%)	Частота встречаемости мутации в вирусных вариантах, выделенных у пациентов, не принимавших АРВТ, из НСО в 2011–2012 гг. (%)	Частота встречаемости мутации в вирусных вариантах, выделенных у пациентов, принимавших АРВТ, из НСО в 2008–2012 гг. (%)	Частота встречаемости мутации в вирусных вариантах, выделенных у пациентов, из Новокузнецка (%)	Частота встречаемости мутации в вирусных вариантах, выделенных у пациентов, из Читы (%)
K14R	61-80	21-40	21-40	21-40	21-40
G16E	21-40	1-20	1-20	1-20	21-40
E35D	81-100	81-100	81-100	0	81-100
K11T	1-20	81-100	61-80	41-60	0
V35T	1-20	41-60	21-40	21-40	21-40
T39K	21-40	41-60	41-60	41-60	61-80
D123S	41-60	21-40	21-40	1-20	21-40
K173L	0	41-60	41-60	41-60	21-40
T200A	1-20	1-20	1-20	21-40	1-20
K277R	0	0	0	41-60	1-20
V292I	0	61-80	41-60	41-60	41-60
P294T	21-40	21-40	41-60	21-40	21-40

* Серым цветом выделены мутации, для которых обнаружена территориальная специфика выявления.

Мутации E35D и D123S обнаруживались только среди вариантов субтипа А ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих в Новосибирской области и Чите. Для вариантов субтипа А ВИЧ-1 циркулирующих на территории Новокузнецка, также были выявлены специфические мутации – T200A и K277R.

Таким образом, генетические варианты субтипа А ВИЧ-1, циркулирующие на территории Новокузнецка, отличаются от таковых из Новосибирска и Читы, что подтверждается и филогенетическим анализом.

Эпидемиологически значимым вариантом ВИЧ-1 для Новокузнецка и Читы является субтип А ВИЧ-1. Было исследовано 50 образцов плазмы крови, выделенных от пациентов, проживающих в Чите и 46 образцов – в Новокузнецке. В ОТ-ПЦР были наработаны вирус-специфические фрагменты гена *pol*, и определена принадлежность вируса к генетическому варианту для 19 образцов (100 % субтипа А), выделенных от пациентов из Читы и 24 (87,5 % субтипа А, 12,5 % CRF63_02A1) – из Новокузнецка.

Для полученных последовательностей фрагмента гена *pol* проведен филогенетический анализ (рис. 4). Генетические варианты субтипа А ВИЧ-1, в целом образуют гомогенную группу, в которой прослеживаются тенденции к субкластеризации (подгруппы К, 31 и 32).

Согласно полученным в ходе анализа данным можно заключить, что варианты субтипа А, выделенные на данной территории, образуют монофилетическую группу, в которой прослеживается образование подгрупп, выделяющихся по географическому признаку.

Так в подгруппу К входят вирусы, циркулирующие в Новокузнецке, выделенные от пациентов, инфицированных в 2002–2012 г., что позволяет сделать вывод о несущественности фактора давности инфицированности пациента в распределении изолятов ВИЧ из Новокузнецка на филогенетическом древе. Эпидемиологические данные для образцов из Забайкальского края неизвестны, однако в подгруппы 31 и 32 входят вирусы, выделенные от пациентов из НСО, инфицированных в 2001–2011 гг., из чего можно сделать аналогичный предыдущему вывод и для Читы.

Таким образом, в Новокузнецке и Чите, циркулируют генетически однородные варианты субтипа А, что свойственно подавляющему большинству субъектов РФ. Однако в популяции субтипа А ВИЧ-1 наблюдается тенденция к кластеризации, основанная на географическом признаке.

Необходимо отметить, что в Сибири впервые зарегистрировано увеличение генетического разнообразия ВИЧ за счет распространения нового генетического варианта CRF63_02A1.

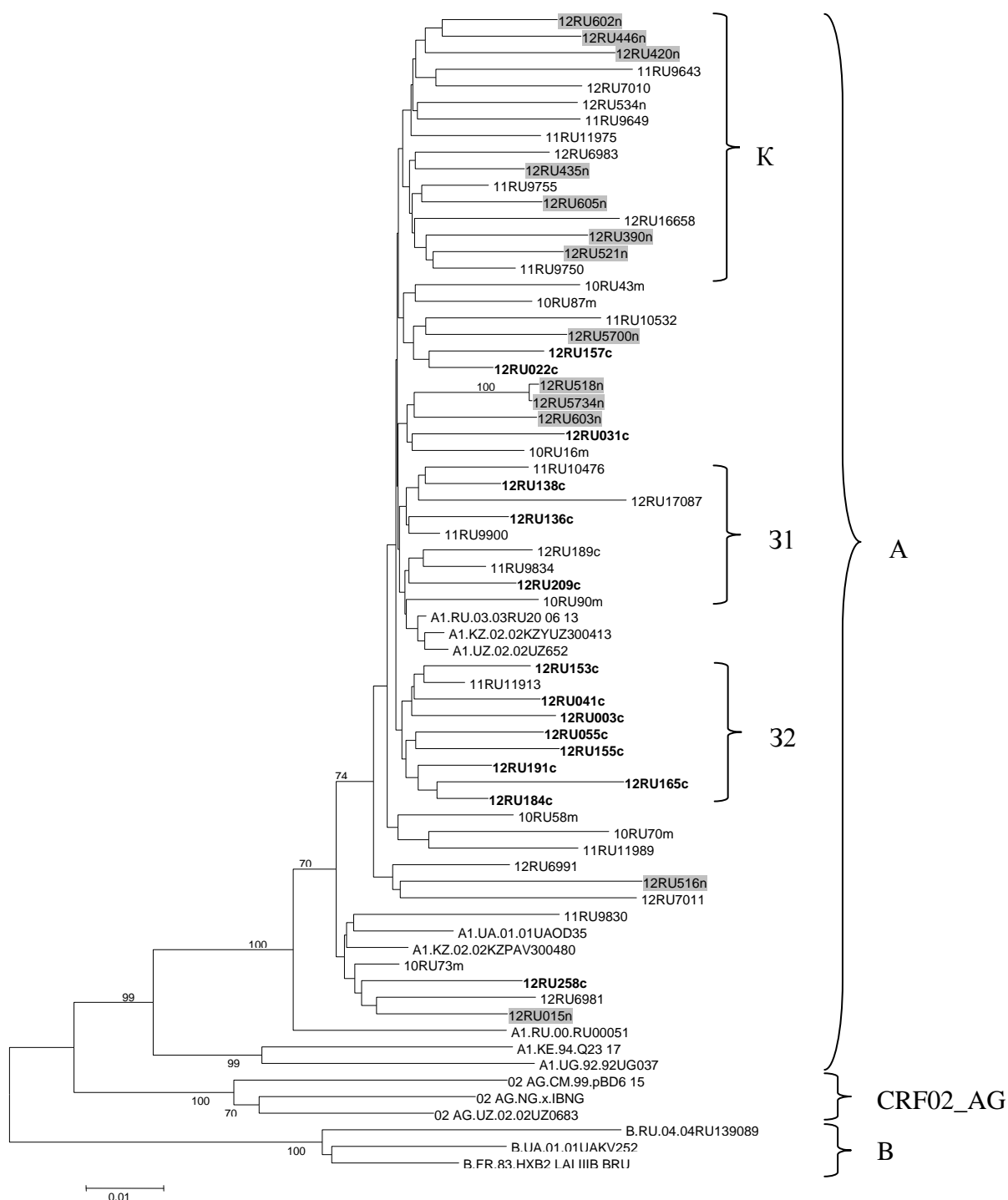


Рис. 4. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol* генетических вариантов субтипа А ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих в Кемеровской области (выделены серым цветом) и Забайкальском крае (выделены жирным шрифтом). Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70. Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей

ВЫВОДЫ

1. Впервые в мире показано, что на отдельной территории Российской Федерации, в Новосибирской области, распространена гетерогенная популяция циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ-1 на основе CRF02_AG, в составе которой субпопуляция новой рекомбинантной формы ВИЧ-1 CRF63_02A1 занимает более 95 %. Генетические варианты CRF63_02A1 образуют монофилетическую группу, обладают высокой степенью генетической гомогенности.
2. Впервые показано, что эпидемия ВИЧ в Новосибирской области характеризуется не только значительным увеличением числа новых случаев инфицирования в 2008–2012 гг., но и сменой доминирующего варианта ВИЧ с российского субтипа А ВИЧ-1 на CRF63_02A1 ВИЧ-1. С 2009 г. в Новосибирской области более чем в 60 % новых случаев инфицирования ВИЧ заражение происходило именно вариантом CRF63_02A1 ВИЧ-1.
3. Варианты субтипа А ВИЧ-1, циркулирующие в СФО, образуют генетически однородную группу, в которой наблюдается тенденция к кластеризации, основанной по территориальному принципу.
4. Впервые обнаружена специфика нуклеотидных последовательностей области *pol* геномов ВИЧ-1 субтипа А, циркулирующих на отдельных территориях. Генетическим вариантам субтипа А ВИЧ-1, циркулирующим в НСО и Забайкальском крае, свойственны E35D (92,5 %) и D123S (35,8 %); в Новокузнецке – T200A (37,5 %), K277R (41,6 %).
5. Показано, что в Сибирском регионе происходит циркуляция генетически отдаленных вариантов субтипа В ВИЧ-1, проникших на территорию в результате множественных независимых заносов и продолжающих своё распространение в ограниченных эпидемических сетях.
6. Впервые выявлена специфичность возникновения мутаций устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам в зависимости от генетического варианта вируса. В вариантах субтипа А ВИЧ-1 чаще встречаются мутации устойчивости к НИОТ, в вариантах CRF63_02A1 – к ННИОТ.
7. В популяции ВИЧ, циркулирующих в СФО, выявлены специфичные мутации в области гена *pol* для отдельно взятых генетических вариантов вируса:
 - для вариантов ВИЧ субтипа В – R57K (44,3 %), L63S (40 %), R211K (63,2 %);
 - для вариантов ВИЧ субтипа А – V35I (48,6 %), D123S (32,8 %), D123N (45,8 %), R211S (64,2 %);
 - для вариантов ВИЧ CRF63_02A1 – N37D (91,0 %), I64M (91,0 %), C67Y (44,2 %), D121Y (83,0 %), I135V (38,7 %), S162A (90,8 %), K173R (56,7 %), R211N (52,4 %), V245Q (74,5 %).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные статьи:

1. Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Сафронов П.Ф., **Богачев В.В.**, Барышев П.Б., Букин Е.К., Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я. Особенности молекулярно-эпидемиологической ситуации по распространению ВИЧ-1 на территории Сибирского региона // Материалы рабочего совещания по вакцинопрофилактике ВИЧ, Новосибирск, 17–19 ноября 2010 г. Рабочее совещание по рассмотрению итогов выполнения распоряжения правительства Российской Федерации от 25 декабря 2007 г. № 1905–р. – С. 186–194.
2. Гашникова Н.М., Сафронов П.Ф., Тотменин А.В., Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А., **Богачев В.В.**, Барышев П.Б., Букин Е.К., Казаева Е.В., Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я., Ставский Е.А. Создание национальной панели изолятов ВИЧ-1 для оценки вируснейтрализующих свойств кандидатных вакцин. // Материалы рабочего совещания по вакцинопрофилактике ВИЧ, Новосибирск, 17–19 ноября 2010 г. Рабочее совещание по рассмотрению итогов выполнения распоряжения правительства Российской Федерации от 25 декабря 2007 г. № 1905–р. – С. 145–151.
3. Гашникова Н.М., Сафронов П.Ф., Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А., **Богачев В.В.**, Барышев П.Б., Тотменин А.В., Букин Е.К., Бочаров Е.Ф., Черноусова Н.Я., Ставский Е.А. Свойства изолятов CRF02_AG ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области. // ЖМЭИ. – 2011. – Вып. 3. – С. 38–43.
4. Михеев В.Н., **Богачев В.В.**, Барышев П.Б., Черноусова Н.Я., Топчин Ю.А., Соколов Ю.В., Савочкина Е.Б., Мирджамалова Ф.О., Мещерякова Ю.В., Тотменин А.В., Шиповалов А.В., Чубарева Е.А., Гашникова Н.М. Распространение нового генетического варианта 02_AG ВИЧ-1 в Новосибирской области // Сборник материалов научно-практической конференции руководителей и специалистов «Центров по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» сибирского федерального округа «Актуальные проблемы ВИЧ-инфекции в Сибирском федеральном округе», Омск. – 2012. – С. 67–72.
5. **Богачев В.В.**, Тотменин А.В., Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я., Гашникова Н.М. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1 субтипов А и В, выделенных на территории Новосибирской области // ЖМЭИ. – 2012. – №6. – С. 45–52.
6. Гашникова Н.М., **Богачев В.В.**, Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В., Савочкина Е.Б., Черноусова Н.Я. Распространенность мутаций, ответственных за рези-

стентность к антиретровирусным препаратам, среди вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской области// ЖМЭИ. – 2012. – №6. – С. 56–60.

7. Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., **Богачев В.В.**, Барышев П.Б, Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я., Гашникова Н.М. Исследование биологических свойств вариантов ВИЧ-1, резистентных к антиретровирусным препаратам// ЖМЭИ. – 2012. – №6. – С.52–56.

8. Мирджамалова Ф.О., Мещерякова Ю.В., Казаева Е.В., Савочкина Е.Б., **Богачев В.В.**, Барышев П.Б., Никонорова Ю.В., Топчин Ю.А., Черноусова Н.Я., Михеев В.Н., Гашникова Н.М. Случаи развития множественной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 у детей в Новосибирской области // Бюллетень СО РАМН. – 2012. – №6. – С. 46–54.

9. Baryshev P.B., **Bogachev V.V.**, Gashnikova N.M.. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia // Arch. Virol. – 2012. – V. 157. – P. 2335–2341.

10. Казачинская А. Г., **Богачев В.В.**, Барышев П. Б., Тотменин А. В., Чубарева Е. А., Ачигечева П. Ю., Золотарева И. В., Мирджамалова Ф. О., Топчин Ю. А., Черноусова Н. Я., Чичамкина Н. В., Абрамов В. А., Гашникова Н. М. Территориальные особенности распространения генетических вариантов ВИЧ-1 в Сибирском Федеральном округе // Медицина и образование в Сибири. – 2013. – №3.

11. Baryshev P.B., **Bogachev V.V.**, Gashnikova N.M. HIV-1 Genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia // AIDS Res Hum Retroviruses. – 2014. – V. 30. – P. 592–597.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АРВТ	антиретровирусная терапия
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
МСМ	мужчины, имеющие секс с мужчинами
ПИН	потребители инъекционных наркотиков
РНК	рибонуклеиновая кислота
CRF	circulating recombinant forms (циркулирующая рекомбинантная форма)
IDU	injection drug user (потребитель инъекционных наркотиков)
pol	polymerase gene (ген полимеразы)