

Анализ распространения изолятов ВИЧ-1, обладающих лекарственной устойчивостью, установил волнообразный характер выявляемости резистентных к антиретровирусным ингибиторам вариантов ВИЧ-1. Так в 2006-2007 гг. количество резистентных к препаратам ВИЧ-1, выделенных от пациентов, более 1 года принимавших терапию, превышало 30%. В 2008-2009 гг. выявляемость ВИЧ, несущих мутации лекарственной устойчивости, снизилась до 14%. В 2010 г. вновь зарегистрировано значительное увеличение числа ВИЧ-1, обладающих устойчивостью к ингибиторам ревертазы.

Выводы. В России распространяется не характерный ранее для данной территории CRF02_AG ВИЧ-1. Учитывая темпы распространения данного генетического варианта в Сибири, можно предположить, что в ближайшее время молекулярно-генетические характеристики эпидемического процесса по распространению ВИЧ в РФ значительно изменятся. Увеличение процента выявляемости устойчивых к лекарственным препаратам ВИЧ среди принимающих терапию пациентов подчеркивает значимость проведения таких исследований в клинической практике.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СУБТИПОВ ВИЧ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Богословская Е.В., Волошина П.В., Браславская С.И., Мызникова А.И., Шипулин Г.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Изучение разнообразия субтипов ВИЧ позволяет выявлять закономерности развития эпидемии ВИЧ-инфекции на определенных территориях, проводить разработки вакцинных, терапевтических и диагностических препаратов.

В середине 90-х в СССР циркулировали варианты 8 подтипов ВИЧ-1 (от А до Н) с доминированием подтипа В. В Российской Федерации быстрое распространение инфекции началось во второй половине 1996 года, когда произошла вспышка ВИЧ-инфекции среди внутривенных потребителей наркотиков в гг. Калининграде, Твери, Новороссийске, Саратове и Н.Новгороде. Вспышка была вызвана ВИЧ подтипа А, который быстро распространился в группе лиц, употребляющих наркотики, а затем и среди их половых партнеров. При этом последние масштабные исследования в области изучения распростра-

ненности различных субтипов ВИЧ в России проводились в 2003 году (Бобков А.Ф. и соавт.).

С целью проведения постоянного надзора за распространением различных субтипов ВИЧ на территории РФ нами была разработана методика типирования ВИЧ, основанная на секвенировании ДНК, и проведено типирование ВИЧ в образцах крови от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы. В 2003 году нами было проанализировано 207 образцов крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из 12 регионов России: Московская, Брянская, Самарская, Нижегородская, Иркутская, Волгоградская, Тульская области, Алтайский, Краснодарский, Хабаровский, Красноярский края и Якутия. Отбор пациентов проводили по такому принципу, чтобы пути инфицирования у них были максимально разнообразными. В 2007 году было проанализировано 154 образца крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из 6 регионов РФ: Ульяновская, Волгоградская, Саратовская, Иркутская, Ленинградская области и Алтайский край. Отбор пациентов проводили по двум категориям: пациенты, инфицированные ВИЧ в течение 2005-2007 гг., и молодые беременные женщины, у которых впервые ВИЧ-инфекция была выявлена в 2006-2007 гг.

Для определения субтипа ВИЧ нами были выбраны праймеры, позволяющие получить фрагменты 4 генов ВИЧ: gag, pro, rev и env. Для амплификации фрагмента gag были выбраны праймеры, фланкирующие область p24-антигена, размером 530 п.н. Для амплификации фрагмента env были использованы праймеры, фланкирующие область gp120, размером либо 1100 п.н., либо 410 п.н. Для анализа генов pro и rev были выбраны праймеры, позволяющие амплифицировать целиком ген протеазы (297 п.н.) и фрагмент гена обратной транскриптазы размером 760 п.н.

Для проведения реакции циклического секвенирования были использованы наборы реагентов фирмы «Applied Biosystems»: Big Dye @ Terminator v1.1 Sequencing Standard Kit. Детекцию продуктов реакции секвенирования осуществляли с помощью автоматического анализатора 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). Для определения субтипа ВИЧ использовали программы RIP 3.0 (www.hiv.lanl.gov) и NCBI Genotyping (www.ncbi.nlm.nih.gov). Данные программы позволяют определять не только субтипы ВИЧ, но и рекомбинантные формы.

Результаты. В результате секвенирования образцов, полученных от пациентов в 2003 году, было показано, что доминирующим субтипом ВИЧ является субтип А (на него приходится более 92% всех случаев ВИЧ-инфекции). Второй по распространенности субтип

является субтип В (более 5%). Приблизительно с одинаковой частотой встречались субтипы G, С и рекомбинантная форма А/В (1,6; 0,5 и 1% соответственно).

Результаты секвенирования образцов, полученных от пациентов в 2007 году, показали, что доминирующее положение субтипа А сохраняется в Российской популяции: более 90% всех случаев. Вторым по распространенности оказался рекомбинант А/С (более 7%), однако данный вариант вируса встречался в основном в Алтайском регионе. Субтип В был обнаружен только в 2% случаев, а рекомбинант А/В – в 0,7%.

Обсуждение. До последнего времени в России для генотипирования ВИЧ использовали метод гетеродуплексного анализа по двум генам: самому вариабельному фрагменту генома (*env*) и по гену *gag*. Такой подход в большинстве случаев позволяет выявлять основные подтипы ВИЧ, включая рекомбинантные формы. Однако в ряде случаев желательно проводить анализ 3–4 фрагментов генома ВИЧ для более точной идентификации некоторых рекомбинантов, например, АС, ВС, ВГ и многих мозаичных форм. Поэтому нами была разработана методика генотипирования ВИЧ, которая предполагает изучение 4 генов: *gag*, *pro*, *pol*, *env*. Кроме того, метод гетеродуплексного анализа обладает рядом существенных недостатков, в частности длительность и трудоемкость. В тоже время активное внедрение молекулярных методов диагностики в различные отрасли медицины в нашей стране позволило увеличить возможности многих лабораторий. Так, автоматическое секвенирование ДНК стало рутинным исследованием для них. Поэтому на сегодняшний день «золотым» стандартом в генотипировании можно назвать метод секвенирования выбранных фрагментов генома.

Таким образом, разработанная нами методика типирования ВИЧ, основанная на секвенировании 4 фрагментов ВИЧ, с высокой степенью достоверности позволяет определять большинство вариантов ВИЧ, обладая при этом высокой производительностью и простотой.

Результаты, полученные нами в ходе типирования ВИЧ в образцах, полученных от пациентов в разные годы, практически не меняются с 1997 года, когда субтип А стал доминировать в популяции наркоманов. В 2003 году распространенность субтипа А среди пациентов с разными путями передачи ВИЧ была сходной с данными, полученными в 1997–2003 гг. при анализе пациентов из группы наркоманов (Бобков А.Ф. и соавт.). Это косвенно может свидетельствовать о том, что данный субтип вируса стал распространяться и половым путем. Рекомбинантная форма АВ, обнаруженная впервые у наркоманов, в общей популяции пациентов стала составлять небольшой процент.

Анализ, проведенный для образцов от ВИЧ-инфицированных пациентов в 2007 году, не выявил ни одного субтипа G (характерного в

частности для Волгоградской области), а рекомбинантная форма А/В была обнаружена только в 1 образце, что составляет менее 1%. Это говорит о том, что активного распространения этих вариантов ВИЧ не происходит. В тоже время Калининградская область (в которой циркулировал рекомбинант А/В) не входила в число проанализированных нами регионов.

Новая находка была обнаружена в Алтайском крае, где с высокой частотой встречалась рекомбинантная форма А/С (более 42%). Существует вероятность того, что данный вариант ВИЧ был привнесен из Казахстана, где по данным 2001–2003 гг. рекомбинант А/С встречался с частотой 4,7%. Весной 2006 года в одном из городов Казахстана (Шымкент) произошла вспышка ВИЧ-инфекции среди детей, которая была вызвана также рекомбинантной формой А/С. Данный вариант ВИЧ доминирует в основном в западной Африке, но также с высокой частотой встречается в Центральной Азии. Так, в Узбекистане вариант А/С встречался в 9,2% случаев в 2002–2003 гг. Хотелось бы отметить, что в 2003 году была проанализирована группа пациентов из Алтайского края, но ни одного случая, вызванного рекомбинантной формой ВИЧ, обнаружено не было.

Заключение. Нами была разработана простая методика генотипирования ВИЧ, основанная на секвенировании 4 фрагментов генома, позволяющая идентифицировать с высокой достоверностью большинство известных подтипов ВИЧ, включая рекомбинантные формы. Изучение распространенности различных вариантов ВИЧ в России в 2003 и 2007 годах показало, что ВИЧ подтипа А сохраняет доминирующее положение в популяции ВИЧ-инфицированных пациентов. При этом наблюдается появление новых вариантов ВИЧ, которое требует дальнейшего детального изучения с целью выяснения их роли в общем эпидемическом процессе.