

УДК: 616.98:578.828HIV-07(571.6)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОПИЗМА ВИЧ-1 У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В.О. Котова¹, Л.А. Балахонцева¹, О.А. Янович², Н.А. Липская³,
Е.А. Ломакина⁴, А.Г. Герец⁵, И.В. Давудова⁶, Е.В. Кузьменко⁷,
А.А. Кожевников⁸, О.Е. Троценко¹

¹ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск;

²ОГУЗ "Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Еврейской автономной области", г. Биробиджан;

³ГАУЗ АО «Амурский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Благовещенск;

⁴ГБУЗ «Сахалинский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Южно-Сахалинск;

⁵ГБУЗ "Краевая клиническая больница № 2", г. Владивосток;

⁶ГБУЗ «Камчатский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и

инфекционными заболеваниями», г. Петропавловск-Камчатский;

⁷ГБУЗ «Магаданский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Магадан;

⁸ГБУ «Якутский республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Якутск

Представлены результаты изучения тропизма ВИЧ к корецепторам методом генотипирования на основе анализа нуклеотидной последовательности V3-петли гена белка оболочки (env) у ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Дальневосточного федерального округа, не получавших препараты класса CCR5-антагонисты. Проведен сравнительный анализ показателей распространенности R5 и X4-тропных вариантов ВИЧ среди пациентов, получавших и не получавших антиретровирусную терапию. Выявлена возможная зависимость соотношения R5 и X4-тропных вариантов ВИЧ от длительности инфицирования, значения CD4-лимфоцитов и количества вирусной нагрузки.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, генотипическая методика, тропизм, CCR-5, CXCR4, антиретровирусная терапия (АРВТ), антагонисты CCR5 корецепторов

RESULTS OF INVESTIGATION OF HIV-1 TROPISM IN HIV-INFECTED PATIENTS ON THE TERRITORY OF FAR EASTERN FEDERAL DISTRICT

V.O. Kotova¹, L.A. Balahotseva¹, O.Ya. Yanovich², N.A. Lipskaya³, E.A. Lomakina⁴, A.G. Gerets⁵, I.V. Davudova⁶, E.V. Kuz'menko⁷, A.A. Kozhevnikov⁸, O.E. Trotsenko¹

¹Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of Federal service on consumer's rights protection and human well-being surveillance (Rosbotrebnadzor),

²Centre for AIDS prevention and control of Jewish Autonomous Oblast, Birobidzhan

³Centre for AIDS prevention and control of Amur Oblast, Blagoveshchensk,

⁴Sakhalin regional centre for AIDS prevention and control, Yuzhno-Sakhalinsk,

⁵Regional clinical hospital №2, Vladivostok,

⁶Kamchatka regional centre for AIDS prevention and control, Petropavlovsk-Kamchatsky

⁷Centre for AIDS prevention and control of Magadan Oblast, Magadan

⁸Yakut Republican centre for AIDS prevention and control, Yakutsk

The results of investigation of HIV tropism to coreceptor, by genotyping based on analysis of nucleotide sequence of env V3-loop, in HIV-infected patients of the Far Eastern Federal District, who did not receive CCR5 antagonist, are presented in this study. A comparative analysis of R5 and X4 tropic HIV viruses spread among treated and untreated patient with antiretroviral therapy was performed. Possible relations of R5 and X-4tropic variants of HIV infection, duration of infection, CD4 rate and total load were found.

Key words: HIV infection, genotyping method, tropism, CCR-5, CXCR4, antiretroviral therapy, antagonists of CCR5 coreceptors

ВИЧ инфекция - антропонозная ретровирусная инфекция, которая характеризуется эпидемическим распространением. В связи с тем, что возбудители ВИЧ-инфекции являются внутриклеточными патогенами, каждый их представитель имеет тропность к определенному типу клеток. Тропизм вируса определяется наличием на клетке-мишени рецептора для данного вируса, а также возможностью генома вируса встраиваться в геном клетки хозяина.

Основным условием проникновения ВИЧ-1 в клетку-мишень является наличие на ее мембране двух рецепторов: рецептора CD4 и специфического ко-рецептора, который бывает двух типов – CCR5 и CXCR4 [6, 7, 11, 12, 13]. В зависимости от того, какой именно корецептор (CCR5 или CXCR4) использует вирусный штамм (иными словами, к какому корецептору он проявляет тропность), его относят либо к CCR5-тропным, либо CXCR4-тропным. Штаммы вируса, которые используют оба корецептора, называют штаммами с двойным тропизмом. Поскольку тесты на тропизм не способны отличить вирусные штаммы с двойным тропизмом от смеси R5- и X4-тропных штаммов, их объединили общим термином «штаммы с двойным/смешанным тропизмом» [10].

До недавнего времени международные исследования по тропизму ВИЧ проводились, в основном, на штаммах, относящихся к субтипам В и С. Вместе с тем, ранее было показано существование ряда отличий нуклеотидных последовательностей в области петли V3 региона env вирусов субтипа А от вирусов других субтипов. В Российской Федерации субтип А ВИЧ-1 является доминирующим, и, по некоторым данным, составляет около 80% среди всех вновь выявленных случаев ВИЧ-инфекции [10]. Таким образом, на территории Российской Федерации было интересно изучить особенности ВИЧ-1 субтипа А, связанные с тропностью.

В последние годы большие надежды в увеличении эффективности лечения ВИЧ-инфекции возлагают на новые классы препаратов, к которым относятся антагонисты корецептора CCR5. Меха-

низм действия препаратов данного класса заключается в избирательном связывании с корецептором CCR5, что приводит к предотвращению проникновения ВИЧ в клетку. Основным представителем класса антагонистов ко-рецепторов является препарат Маравирок, который зарегистрирован в России в 2011 г. и был рекомендован для ВИЧ-инфицированных пациентов, которые ранее получали АРВТ и имели CCR5-тропный вирус [2]. Однако активность данных препаратов ограничивается только R5-тропными вирусами; препараты этой группы неэффективны против X4-тропных, а также R5X4-тропных вирусов. Поскольку смена тропизма к корецептору происходит в неопределенный момент, необходимо определять тропизм вируса к нему до начала лечения этими препаратами [8, 9].

Для определения тропизма ВИЧ, так же, как и для определения резистентности, используют фенотипические и генотипические методы исследования. Фенотипические методы являются «золотым стандартом» определения тропизма ВИЧ с максимальной чувствительностью, но имеют свои недостатки: длительность исследования, высокая стоимость, возможность исследовать образцы с вирусной нагрузкой не менее 1000 коп/мл. Это позволяет использовать данную методику в рутинной лабораторной практике.

В основе генотипической методики определения тропизма ВИЧ-1 лежит секвенирование области гена *env*, кодирующей петлю V3, основную детерминанту клеточного тропизма, от строения которой и зависит тропность вируса к корецепторам [2].

К преимуществам определения тропизма методом генотипирования относятся широкая доступность и быстрое получение результатов. Аналитические данные о корреляции результатов определения тропизма вируса методами генотипирования и фенотипирования с вирусологическим ответом на терапию CCR5-блокатором показали, что эти два метода можно считать эквивалентными [5].

В 2012 году в России была зарегистрирована генотипическая методика определения тропизма с помощью диагностического набора реагентов «АмплиСенс ВИЧ-Resist-Seq, который может быть использован в клинической практике [4].

Цели исследования

1. Изучить распространенность CCR5-, CXCR4-, а также R5X4-тропных вариантов ВИЧ-1 среди ВИЧ-инфицированных Дальневосточного федерального округа, не получавших препараты класса CCR5-антагонисты.

2. Выявить возможную связь соотношения R5- и X4-тропных вариантов ВИЧ с длительностью инфицирования, значениями CD4-лимфоцитов и количеством вирусной нагрузки, а также сравнить показатели распространенности R5- и X4-тропных вариантов ВИЧ среди пациентов, получавших и не получавших антиретровирусную терапию.

Материалы и методы

Данное исследование было проведено в рамках научного проекта «Тропизм 900». Координационным центром исследования являлся ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при финансовой поддержке представительства компании ViiV Healthcare в России. В проекте приняли участие 12 Центров СПИД из 10 городов по всей России.

Для изучения распространенности CCR5-, CXCR4-, а также R5X4-тропных вариантов ВИЧ-1 на территории Дальневосточного федерального округа было исследовано 96 образцов крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, старше 18 лет, проживающих на этой территории, с подтвержденным диагнозом «ВИЧ-инфекция» и не получавших ранее препараты класса CCR5-антагонисты (Амурская область – 4, Еврейская автономная область – 4, Приморский край – 13, Сахалинская область – 16, Камчатский край – 10, Республика Саха (Якутия) – 22 и Магаданская область – 27 образцов крови). Среди обследованных было 49 мужчин (51,04%) и 47 женщин (48,96%). Анализ эпидемиологических данных показал, что основными путями заражения ВИЧ-1 были гетеросексуальные контакты – 62 (64,6%) и употребление инъекционных наркотиков – 30 (31,3 %) человек. В 4-х случаях путь заражения не установлен. Все пациенты, включенные в исследование, были разбиты на когорты, представленные в табл. 1.

Таблица 1.

Распределение ВИЧ-инфицированных пациентов ДВФО, включенных в исследование по когортам

Пациенты без опыта АРВ-терапии		Пациенты, получающие АРВ-терапию	
	Кол-во	Кол-во	
Уровень CD4- лимфоцитов более 500 (А)	19	13	Находятся на АРВ-терапии менее 6 месяцев (D)
Уровень CD4-лимфоцитов от 350 до 500 (В)	17	20	Находятся на АРВ-терапии от 6 месяцев до 3 лет (Е)
Уровень CD4-лимфоцитов менее 350 (С)	14	13	Находятся на АРВ-терапии более 3 лет (F)

Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Определение тропизма ВИЧ было проведено с помощью генотипического метода с использованием диагностического набора «АмплиСенс ВИЧ-Resist-Seq» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (Россия). Каждый образец анализировался в трех повторях.

На первом этапе для выделения РНК ВИЧ из плазмы крови использовали комплект реагентов «Рибо-золь-Е», производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (Россия). Экстракция ДНК ВИЧ из лейкоцитарного кольца проводилась с помощью комплекта реагентов «Рибо-преп» с предварительной отмывкой лейкоцитов с помощью реагента «Гемолитик» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (Россия).

При анализе РНК ВИЧ, выделенного из плазмы крови, получение специфического фрагмента ДНК гена белка оболочки ВИЧ проводили с помощью «гнездовой» ОТ-ПЦР. В случае анализа ДНК ВИЧ, выделенной из клеточной фракции крови, получение специфического фрагмента ДНК гена белка оболочки ВИЧ проводили с помощью одностадийной ПЦР. В результате амплификации получили специфические фрагменты ДНК гена оболочки (gp 120), которые содержали всю петлю V3. Далее проводилась очистка продуктов амплификации и их секвенирование. Нуклеотидную последовательность каждого специфического фрагмента ДНК определяли по двум цепям с помощью прямого и обратного секвенирующего праймера.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на ДНК-анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Редактирование нуклеотидных последовательностей и получение консенсусной нуклеотидной последовательности проводили с помощью программного обеспечения ДЕОНА (МедАйТи Групп, Россия). Определение тропизма ВИЧ путем анализа нуклеотидной последовательности производилось на сайте <http://geno2pheno.org/> Института информатики Макса Планка (Max Planck Institute Informatik, Германия) в соответствии с европейскими рекомендациями.

Результаты исследования

Определение тропизма ВИЧ было проведено для всех пациентов, участвующих в исследовании. Среди 96 проанализированных проб тропизм успешно был определен в 70 пробах. Общая эффективность составила 72,92%. Эффективность тестирования тропизма ВИЧ в зависимости от уровня вирусной нагрузки на момент участия в исследовании, представлена на рис. 1.

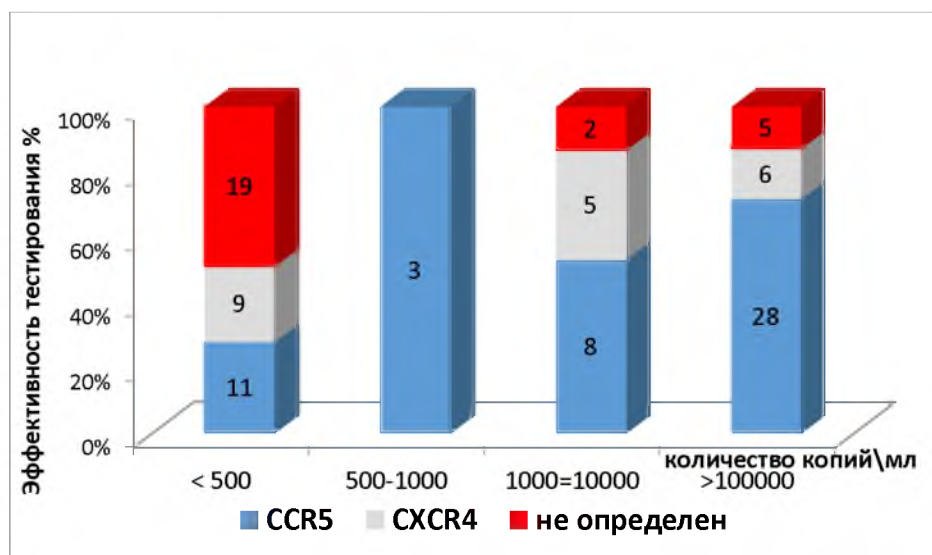


Рис. 1. Эффективность тестирования тропизма ВИЧ в зависимости от количества вирусной нагрузки

Наибольшая эффективность генотипической методики определения тропизма ВИЧ-1 отмечена в группе пациентов с количеством вирусной нагрузки на момент участия в исследовании более 10000 копий/мл.

Среди успешно проанализированных образцов соотношение R5/X4-тропных штаммов ВИЧ-1 было 50/20 (71,43% / 28,57%).

Соотношение R5/X4-тропных вирусов в зависимости от опыта лечения антиретровирусными препаратами представлено в таблице 2.

Таблица 2.

**Влияние опыта лечения антиретровирусными препаратами
на тропизм ВИЧ**

Тропизм	Опыт лечения			
	Пациенты без опыта АРВ-терапии		Пациенты, получающие АРВ-терапию	
	Кол-во	%	Кол-во	%
R5	30	76,9	18	58,1
X4	9	23,1	13	41,9

Результаты исследования показали, что соотношение R5/X4-тропных вирусов в группе пациентов, получающих антиретровирусную терапию, несколько отличаются от группы пациентов без опыта лечения, что подтверждает ранние исследования о том, что у наивных пациентов в 80-85% случаев выявляются только R-5 вирусы, а у леченых пациентов такой вирус встречается только в 50-56% случаев [1].

Зависимость соотношения CCR5/CXCR4-тропных вирусов от уровня CD4 лимфоцитов в группах пациентов с опытом лечения и без показана в таблице 3.

Таблица 3.

**Зависимость соотношения CCR5/CXCR4-тропных вирусов от уровня
CD4 лимфоцитов**

	<350		350-500		>500	
	Пациенты без опыта АРВ-терапии					
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
R5	10	83,3 %	8	66,7 %	12	80,0 %
X4	2	16,7 %	4	33,3 %	3	20,0 %
	Пациенты, получающие АРВ-терапию					
R5	14	70,0 %	1	20,0 %	3	50,0 %
X4	6	30,0 %	4	80,0%	3	50,0 %

Исследование подтвердило преобладание R5-тропных вирусов в группе пациентов без опыта лечения антиретровирусными препаратами, независимо от уровня CD4 лимфоцитов. Некоторые отличия были замечены в группе наивных пациентов. Так, в исследуемой когорте с уровнем CD4 лимфоцитов 350-500 преобладал X4-тропный вирус. Небольшой размер данной когорты не позволяет сделать какие-либо выводы из данных результатов.

Таким образом, в результате проведенного исследования какой-либо зависимости между вирусным тропизмом и длительностью инфицирования у ВИЧ-инфицированных пациентов Дальневосточного федерального округа Российской Федерации не выявлено.

Выводы

1. Проведенное исследование тропизма ВИЧ-1 среди ВИЧ-инфицированных пациентов Дальневосточного федерального округа, не получавших препараты класса CCR5-антагонисты, показало преобладание CCR5-тропных вариантов ВИЧ-1.

2. Эффективность генотипической методики определения тропизма ВИЧ-1 отмечена в группе пациентов с количеством вирусной нагрузки более 10000 копий/мл.

3. Проведенное исследование показало более частое выявление R5-тропных вирусов в группе пациентов без опыта лечения антиретровирусными препаратами.

4. Необходимо проведение дальнейшего углубленного изучения особенностей циркуляции CXCR4/ CCR5-тропных вариантов ВИЧ-1 с целью прогнозирования ситуации и управления эпидемией ВИЧ-инфекции.

Литература

1. Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ. – М.: Человек, 2014. – 164 с.
2. Зайцева Н.Н., Ефимов Е.И., Носов Н.Н., Парфенова О.В., Пекшева О.Ю. Современные молекулярно-генетические методы исследования в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией (Аналитический обзор) // Электронный «Журнал МедиАль» (www.mediall-journal.ru), 2014. - № 2 (12). – С.128.
3. Кравченко А.В. Применение препарата маравирик - первого антагониста рецепторов CCR5 - в схемах терапии ВИЧ-инфекции // Тер. архив. - 2013. - №85(11). – С.125.
4. Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Поляков А.Н., Букин Е.К., Kaiser R., Luebke N., Куевда Д.А., Шипулин Г.А. Первый опыт применения стандартизированной генотипической методики определения тропизма ВИЧ // Клин. лаб. диагн. – 2013. - №6. –С.46-48.
5. Хоффман К., Рокштро Ю.К. Лечение ВИЧ-инфекции. — М.: Р. Валент, 2012. — С. 330-331.
6. Bennetts B.H., Teutsch S.M., Buhler M.M., Heard R.N., Stewart G.J. The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis // Human Immunology.- 1997. - V. 58. - P. 52-59.
7. Berger E.A., Murphy P.M., Farber J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease // Annu. Rev. Immunol. - 1999. - V.17. - P. 657-700.
8. Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., Goedert J.J., Buchbinder S.P., Vittinghoff E., Gomperts E., Donfield S., Vlahov D., Kaslow R., Saah A., Rinaldo C., Detels R., O'Brien S.J.. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene // Science. - 1996. - V. 273. - P. 1856-1862.
9. Dragic T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function // J. of Gen. Virol. - 2001. - V. 82. - P. 1807-1814.
10. Michael M. Thomson, Elena Vázquez de Parga, Anna Vinogradova, María Sierra, Aleksey Yakovlev, Aza Rakhmanova, Elena Delgado, Gema Casado, Mercedes Muñoz, Rocío Carmona, Yolanda Vega, Lucía Pérez-Álvarez, Gerardo Contreras, Leandro Medrano, Saladin Osmanov, Rafael Nájera. New Insights into the Origin of the HIV Type 1 Subtype A Epidemic in Former Soviet Union's Countries Derived from Sequence Analyses of Preepidemic Transmitted Viruses // AIDS Research and Human Retroviruses. - December 2007. – V. 23(12). – P. 1599. -1604.
11. Jenkins C., Robalino D.A. HIV/AIDS in the Middle East and North Africa: The Costs of Inaction. - Washington: World Bank, 2003.
12. Jiang C., Parrish N.F., Wilen C.B., Li H., Chen Y, Pavlicek J.W., Berg A., Lu X., Song H., Tilton J.C., Pfaff J.M., Henning E.A., Decker J.M., Moody M.A., Drinker M.S., Schutte R., Freel S., Tomaras G.D., Nedellec R., Mosier D.E., Haynes B.F., Shaw G.M., Hahn B.H., Doms R.W., Gao F. Infection by a Human Immunodeficiency Virus with Atypical Coreceptor Tropism // J Virol. - 2011. - V. 10. - P.10669-10681.
13. Wang Z.X., Berson J.F., Zhang T.Y., Cen Y.H., Sun Y., Sharron M., Lu Z.H., Peiper S.C. CXCR4 sequences involved in coreceptor determination of human immunodeficiency virus type-1 tropism. Unmasking of activity with M-tropic Env glycoproteins // J. Biol. Chem.- 1998. - V. 273. - P. 15007-15015.

Сведения об авторах

Котова Валерия Олеговна – и.о. заведующего лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, E-mail: dvaid@mail.ru.