

## ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ. МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 616.9

*В. Б. Мусатов, А. А. Яковлев, Т. В. Тыргина, Н. Н. Ладная***ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ  
ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА,  
ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ  
В 2009 И 2011 ГОДАХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**

Внедрение в клиническую практику комбинированной антиретровирусной терапии (АРВТ) обеспечило снижение смертности, улучшение качества жизни людей, живущих с вирусом иммунодефицита человека (ЛЖВ), сокращение вероятности передачи вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и уменьшение экономического бремени эпидемии ВИЧ-инфекции [1]. При этом наличие первичной или вторичной резистентности вируса к АРВ препаратам резко снижает ее эффективность, что приводит к быстрой селекции высокорезистентных штаммов с последующей передачей их новым пациентам. Уровень резистентных штаммов, циркулирующих в популяции ЛЖВ, — серьезный фактор, определяющий выбор противовирусных средств первой линии, и обосновывает различные стратегии подбора эффективных схем АРВТ. В США и странах Западной Европы от 6 до 16% штаммов ВИЧ имеют резистентность как минимум к одному классу АРВ препаратов, в том числе 3–5% штаммов резистентны более чем к одному классу [2–5]. Таким образом, высокий уровень резистентности к основным АРВ препаратам обуславливает действующие в США клинические рекомендации по выполнению теста на резистентность каждому вновь выявленному ВИЧ-инфицированному пациенту [6]. До настоящего времени в Российской Федерации сохраняется низкий уровень первичной резистентности ВИЧ. В 2011 г. были опубликованы результаты двух исследований по изучению уровня резистентности среди ЛЖВ, не получавших АРВТ. Среди 56 образцов, проанализированных в Московском регионе, был выявлен один случай генотипической резистентности — мутация M184V, определяющая устойчивость к базовому препарату из группы нуклеозидных ингибиторов

*Мусатов Владимир Борисович* — канд. мед. наук, доцент, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail doctormusatov@gmail.com

*Яковлев Алексей Авенирович* — д-р мед. наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail iakovlevhome1956@yahoo.com

*Тыргина Татьяна Вячеславовна* — канд. мед. наук, ФГБУ «Клиническая больница № 1» Управления делами Президента Российской Федерации; e-mail: tatyana.tyrgina@gmail.com

*Ладная Наталья Николаевна* — канд. мед. наук, Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом; e-mail: nladnaia@hotmail.com

© В. Б. Мусатов, А. А. Яковлев, Т. В. Тыргина, Н. Н. Ладная, 2013

обратной транскриптазы (НИОТ) — ламивудину [7]. При изучении 111 образцов от пациентов Санкт-Петербурга не было выявлено ни одного случая мутации лекарственной устойчивости [8]. Для выработки наиболее оптимальной схемы комбинированной АРВТ необходима актуальная информация об уровне резистентности среди штаммов ВИЧ, циркулирующих в популяции в настоящее время. Эту задачу возможно решить, осуществляя генетический анализ вирусов, выделенных от больных первичной ВИЧ-инфекцией, при которой период от момента попадания ВИЧ в организм человека до начала клинических проявлений не превышает нескольких месяцев. При этом в настоящее время для оценки уровня резистентности, как правило, используются данные, полученные при анализе материала от пациентов, имеющих различные клинические проявления ВИЧ-инфекции. В этой ситуации не учитывается важнейшая особенность патогенеза ВИЧ-инфекции — длительный скрытый (латентный) период, который продолжается от 1 до 8 лет [1]. В связи с этим информация об уровне резистентности ВИЧ у впервые выявленного пациента, имеющего клиническую симптоматику, отражает характеристику вируса в момент его проникновения в организм человека, которое произошло некоторое время тому назад.

**Цель исследования** — оценить субтипы и определить генетический полиморфизм генома вирусов иммунодефицита человека, выделенных от больных на стадии первичных проявлений в 2009 и в 2011 гг.

**Материалы и методы исследования.** Исследование выполнено двукратно в 2009 и 2011 гг. в СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С. П. Боткина». Проведено изучение образцов сыворотки крови больных с диагностированной острой ВИЧ-инфекцией (2-я стадия ВИЧ-инфекции в соответствии с классификацией В. И. Покровского). Диагноз выставлялся комиссионно при наличии клинической картины острого ретровирусного синдрома и результатов лабораторного обследования: двух положительных результатов антиген-антительного ИФА, определение р24 антигена ВИЧ в реакции ИФА и неопределенного результата иммунного блота. Всего было обследовано 78 больных (49 пациентов в 2009 г. и 29 — в 2011 г.). Определение субтипа ВИЧ выполнено в 2009 г. в 49 случаях, в 2011 г. — в 19. Анализ генотипической резистентности проведен у всех 78 больных. Исследование осуществлено совместно с лабораторией молекулярной диагностики ВИЧ ЦНИИ эпидемиологии, консультативно-диагностическим отделением Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИД (г. Москва) и лабораторией городского центра по профилактике и борьбе со СПИД (Санкт-Петербург). Образцы сыворотки были подвернуты секвенированию с использованием зарегистрированных в Российской Федерации коммерческих наборов ViroSeq HIV-1 Genotype и ViroSeq HIV-1 (Celera Diagnostics), производства компании Abbott. Для генотипирования использовались 7 праймеров для секвенирования всей области гена протеазы ВИЧ (кодоны 1–99) и двух третей гена обратной транскриптазы (кодоны 1–335). Детекция нуклеотидной последовательности осуществлялась на генетическом анализаторе 3100. Определение субтипа ВИЧ-1 проводилось с помощью программы REGA HIV-1 Subtyping Tool version 2.0 (<http://hivdb.stanford.edu>). Программное обеспечение системы генотипирования ViroSeq® HIV-1 использует данные о последовательности, полученные с 7 праймеров, для каждой пробы и комбинирует информацию в единый проект. Во время сборки последовательностей с праймеров создается консенсус последовательность, которая включает весь ген протеазы и до 335 кодона гена обратной транскриптазы. Эта консенсус последовательность

сравнивается с референс последовательностью известного штамма (HXB-2) для идентификации мест вариаций. Пользователь вручную подтверждает или модифицирует варианты места для гарантии правильных сигналов оснований. Затем программное обеспечение генотипирования ViroSeq предлагает пользователю отчет по лекарственной устойчивости к вирусным препаратам, показывающий, являются ли обнаруженные мутации генетическим свидетельством устойчивости вируса. Одновременно с помощью программы Стэнфордского университета осуществлялись интерпретация и клиническое значение выявленных генетических мутаций (<http://hivdb.stanford.edu>). Хотя при использовании набора ViroSeq производится определение последовательности относительно ограниченного участка генома, использование вышеуказанных программ позволяет определить субтип, получить информацию обо всех выявленных мутациях и получить шкалу устойчивости к АРВ препаратам конкретного вируса.

**Результаты и обсуждение.** В исследуемых группах было показано следующее распределение субтипов ВИЧ-1: в 2009 г. выявлено 87,7% (43) пациентов, имеющих субтип А, 10,2% (5) — субтип В, 2,1% (1) — субтип G; в 2011 г. — 94,7% (18) субтип А, 5,3% (1) — субтип В. В целом по результатам 2009 и 2011 гг. субтип А ВИЧ доминировал и был выявлен у 89,7% обследованных (61/69). В исследовании выявлен относительно высокий уровень образцов ВИЧ, геном региона *pol* которого оценен как рекомбинантный. Преобладающим рекомбинантным вариантом ВИЧ был А/АЕ рекомбинант (15/60), вторым вариантом был АЕ/А рекомбинант (6/60). АЕ/АЕ и А/В рекомбинанты выявлены не были.

Полученные данные о преобладании в структуре ВИЧ на территории Санкт-Петербурга субтипа А полностью соответствуют результатам, полученным при анализе ВИЧ от больных, наблюдающихся в Санкт-Петербургском городском центре по профилактике и борьбе со СПИДом. В работе, опубликованной в 2011 г., показано, что доля субтипа А составляет 86,7% среди всех субтипов. При этом авторы отмечают, что половой путь доминирует при передаче не-А субтипов вируса [8]. При анализе механизма передачи среди 513 больных острой ВИЧ-инфекцией, выявленных в Санкт-Петербурге в 2007–2010 гг., отмечено стабильное преобладание полового пути передачи, который установлен более чем у 60% пациентов [9]. Можно считать, что сохранение доминирующего субтипа А ВИЧ в Санкт-Петербурге как в период преобладания парентерального пути передачи (1999 — середина 2000-х), так и в период нарастания сексуального пути передачи (середина 2000-х — 2011 г.) свидетельствует о последовательном вовлечении в эпидемический процесс потребителей инъекционных наркотиков, их половых партнеров, а затем и популяции в целом.

При анализе 78 образцов сывороток методом циклического секвенирования были получены результаты по частоте выявления мутаций в исследуемых образцах. Проведен отдельный анализ мутаций устойчивости к АРВ препаратам и мутаций полиморфизма. Эти исследования свидетельствуют, что в 2009 г. мутаций резистентности выявлено не было. В 2011 г. впервые был диагностирован один случай первичной резистентности — выявление мутации G190S среди штаммов ВИЧ, в настоящее время циркулирующих в Санкт-Петербурге. Высоко резистентный к группе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) штамм вируса был выделен от больной с диагностированной острой ВИЧ-инфекцией 2В стадии, клиническими проявлениями которой были орофарингеальный кандидоз и моноклеозоподобный синдром. Заражение произошло половым путем от ВИЧ-инфицированного сексуального

партнера, заразившегося из-за употребления инъекционных наркотиков. Пациент состоит на диспансерном учете, получает антиретровирусную терапию, включая нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы. Передача первично резистентного вируса от пациента, находящегося на АРВТ, свидетельствует о ее вирусологической неэффективности и недостаточной приверженности больного проводимому лечению. В данной ситуации назначение больной с резистентным вирусом АРВТ с использованием препаратов первой линии из группы ННИОТ приведет к клинической и вирусологической неэффективности и формированию мультирезистентных штаммов ВИЧ.

В Российской Федерации широкое применение АРВТ началось в 2005 г. В соответствии с действующими клиническими рекомендациями по АРВТ первая линия сформирована на основе препарата из группы ННИОТ — эфавиренца [10]. Однако в настоящее время наблюдается увеличение доли резистентных штаммов ВИЧ. Вызывает серьезную озабоченность крайне высокий уровень резистентности к ННИОТ среди штаммов вирусов, выделенных от ЛЖВ на территории Сибирского федерального округа [11]. При обследовании 179 больных, получающих АРВТ, в 37,4% (67) выявлена резистентность к эфавиренцу, в том числе резистентность «высокого» уровня у 55 больных. Вероятно, обследование проводилось среди больных с вирусологической неэффективностью.

Появление в 2011 г. в штамме ВИЧ, выделенном в Санкт-Петербурге от больной острой ВИЧ-инфекцией, мутации первичной резистентности к ННИОТ требует проведения ряда мероприятий. К ним относятся усиление комплексной работы с пациентами, находящимися на АРВТ, с целью поддержания оптимального уровня приверженности, проведение дозорных исследований уровня резистентности среди недавно инфицированных ЛЖВ и назначение индивидуализированных схем АРВТ с включением уже в терапию первой линии препаратов с высоким генетическим барьером резистентности.

Всего среди 78 образцов ВИЧ, полученных от больных острой ВИЧ-инфекцией в 2009 и 2011 гг., были выявлены 33 значимые мутации резистентности (табл. 1).

Таблица 1. Частота выявления мутаций ВИЧ, имеющих клиническое значение в формировании резистентности к АРВТ

Год/обследовано	Ген протеазы				Ген обратной транскриптазы						
	L10I/V/ F/R/Y	L33F	F53Y	T74S	A62V	T69N/ S/A/I	L100F	V108I	V118I	V179D/E	G 190S
2009, n = 49	5	1	1	1	4	3	–	1	1	1	–
2011, n = 29	4	–	–	2	4	1	1	–	2	–	1
Всего: абс. %	9 11,5	1 1,3	1 1,3	3 3,9	8 10,3	4 5,1	1 1,3	1 1,3	3 3,9	1 1,3	1 1,3

Мутации в гене протеазы были представлены только минорными (второстепенными) мутациями, которые характеризуются тем, что не затрагивают активного центра фермента и часто обнаруживаются в полиморфных участках не-В субтипа ВИЧ.

Наиболее часто выявлялась мутация L10I/V/F/R/Y — 11,5% случаев. Эта мутация встречается у 5–10% ранее нелеченных АРВТ пациентов и вызывает резистентность к препаратам из группы ингибиторов протеазы (ИП) только в присутствии других мутаций резистентности в гене протеазы. В нашем наблюдении мутация носила изолированный характер, следовательно, штаммы вируса сохраняли свою чувствительность ко всем препаратам из группы ИП. В пяти случаях выявлены иные изолированные мнорные мутации в гене протеазы, в том числе в трех случаях T74S мутация и по одному случаю мутации F53Y и L33F. Эти мутации могут приводить к снижению эффекта двух препаратов из группы ИП — нельфинавира и фосампренавира. При этом указанные АРВ средства имеют ограниченное применение в клинической практике, а другие ИП, такие как лопинавир, атазанавир, дарунавир, эффективны даже при наличии этих изолированных мутаций.

В исследованных образцах было установлено 19 мутаций в гене обратной транскриптазы. В одном случае была выделена мутация резистентности высокого уровня — G190S. Эта мутация относится к мутациям первичной устойчивости к АРВ препаратам из класса ННИОТ. Она вызывает устойчивость высокого уровня к эфавиренцу и невирапину и снижает чувствительность к делавердину. В описываемом случае имеется изолированная мутация G190S, которая может быть преодолена при использовании нового препарата из группы ННИОТ — этравирина. Однако сочетание указанной мутации с иными мутациями резистентности группы ННИОТ (например, Y181) приводит к высокой устойчивости и к этому лекарственному средству, обеспечивая таким образом кросс-резистентность ко всему классу ННИОТ.

Среди мутаций в гене обратной транскриптазы наиболее часто выявлялась мутация A62V (8 случаев). Клиническое значение этой мутации состоит в увеличении резистентности вируса к препаратам группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) при условии ее сочетания с мутацией Q151M. В изучаемых образцах мутация A62V носила изолированный характер и не обеспечивала формирования фармакологической резистентности ВИЧ. Мутация T69N/S/A/I отмечена в 4 образцах. Является мутацией резистентности к НИОТ, однако ее эффект в клинической практике в настоящее время определен недостаточно. В 3-х случаях установлена мутация V118I, которая выявляется у 2% нелеченных ЛЖВ, ее частота повышается среди популяции больных, находящихся на АРВТ. Клинический эффект ее проявляется в синергетическом действии с тимидин-ассоциированными мутациями в виде снижения чувствительности вируса к препаратам из группы НИОТ. Важное клиническое значение имеет выявление мутаций резистентности V179D/E и V108I, которые потенциально могут снижать чувствительность ВИЧ к невирапину и эфавиренцу в 2 раза. Мутация V179D в сочетании с мутацией K103N снижает чувствительность к невирапину и эфавиренцу в 10 раз, таким образом обеспечивая полное сохранение репликативной активности ВИЧ в присутствии АРВТ. Однократно была детектирована мутация L100F. При этом наиболее частым вариантом изменений в кодоне 100 вируса стала L100I мутация, которая в комбинации с мутацией K103N обеспечивает резистентность высокого уровня к препаратам «первой линии» из группы ННИОТ — невирапину и эфавиренцу — и резистентность среднего уровня (снижение чувствительности вируса более чем в 5 раз) к новым ННИОТ — этравирину и рилпивирину. Выявленная мутация L100F — редкий вариант мутации с сохранением чувствительности к АРВ препаратам.

Наряду с первичными мутациями у больных острой ВИЧ-инфекцией выявлены вторичные мутации (табл. 2, 3).

**Таблица 2. Частота выявления мутаций в гене обратной транскриптазы ВИЧ, выделенных от больных первичной инфекцией в 2009 и 2011 гг.**

Год	Величина измерения	Мутации					
		V90I	A98S	G115D	E138A	V179I	G333D/E
2009	Абс.	4	2	–	4	2	5
	%	8,2	4,1		8,2	4,1	10,2
2011	Абс.	2	–	4	2	1	4
	%	6,9		13,8	6,9	3,4	13,8
Всего	Абс.	6	2	4	6	3	9
	%	7,6	2,6	5,1	7,6	3,8	11,5

**Таблица 3. Частота выявления мутаций в гене протеазы ВИЧ, выделенных от больных первичной инфекцией в 2009 и 2011 гг.**

Год	Величина измерения	Мутации										
		I13V	I15VI	G16E	K20R	M36I	I62V	L63P	V77I	V82I	L89M	I93L
2009	Абс.	21	–	5	8	45	3	6	8	1	44	45
	%	42,9		10,2	16,3	91,8	6,1	2,2	16,3	2,0	89,8	91,8
2011	Абс.	12	11	2	4	29	2	5	3	–	27	29
	%	41,4	37,9	6,9	13,8	100,0	6,9	17,2	10,3		93,1	100,0
Всего	Абс.	33	11	7	12	74	5	11	11	1	71	74
	%	42,3	14,1	9,0	15,4	94,8	6,4	14,1	14,1	1,3	91,0	94,8

Такие мутации, также обозначаемые как мутации полиморфизма, появляются в геноме ВИЧ спонтанно, более того, у части генетических вариантов ВИЧ они регистрируются постоянно и отражают генетическое разнообразие популяции вируса. Эти мутации не оказывают выраженного действия на устойчивость ВИЧ к АРВ препаратам, однако возможно, что наличие мутаций полиморфизма может оказывать потенциальное действие по снижению эффективности АРВТ. Клиническая необходимость осуществления мониторинга мутаций полиморфизма ВИЧ определяется следующим положением. Несмотря на то что каждая из мутаций полиморфизма не оказывает прямого влияния на формирование резистентности, может происходить синергетическое усиление действия двух и более мутаций. Соответственно наличие изолированной мутации резистентности может не приводить к вирусологической неэффективности, а наличие той же мутации в сочетании с мутациями полиморфизма может формировать резистентность вируса к АРВТ.

Среди обследованных образцов выявлено 6 мутаций, отнесенных к мутациям полиморфизма в гене ОТ. Частота их выявлена была относительно невысокой и состав-

ляла от 2,6 до 11,5%. Наиболее часто были диагностированы мутации G333D/E, E138A и V90I. Мутация E138A, будучи мутацией полиморфизма, может оказывать влияние на увеличение резистентности к препаратам из группы ННИОТ второго ряда (этравирин и рилпивирин) при ее сочетании с иными мутациями резистентности к группе ННИОТ.

Мутации полиморфизма в гене протезы отмечались чаще. Всего было выявлено 11 различных мутаций, встречаемых с различной частотой. Мутации L89M, I93L, M36I, отражая генетическое разнообразие вируса, наблюдались практически во всех образцах (91,0–94,8%). При этом мутация M36I может иметь слабое влияние на резистентность к ИП среди субтипа В ВИЧ. Мутации L63P, V77I, V82I, встречаемые с частотой от 1,3 до 14,0%, типичные мутации полиморфизма, при этом считается, что их селекция может обуславливаться воздействием препаратов из группы ИП. В 15,4% случаев была выявлена мутация K20R, которая, будучи мутацией полиморфизма, тем не менее может оказывать незначительно влияние на снижение чувствительности вируса к препаратам из группы ИП. В случаях выявления иного варианта этой мутации — K20I/M/T/V — может происходить потенциальное снижение чувствительности к нелфинавиру, при селективном давлении которого, возможно, и формируется указанная мутация. Клиническое значение мутаций I13V, I15IV, G16E, I62V, выявленных у пациентов первичной ВИЧ-инфекцией, в настоящее время не установлено.

Таким образом, впервые в Санкт-Петербурге документирована передача первично резистентного штамма ВИЧ от пациента, находящегося на неэффективной антиретровирусной терапии. Уровень резистентных штаммов, выделенных от больных первичной ВИЧ-инфекцией, — низкий (0/49 в 2009 г. и 1/29 в 2011 г.).

Антиретровирусная терапия на основе препаратов из группы нуклеозидных и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы сохраняет свое значение в качестве эффективной схемы первой линии для ранее нелеченных пациентов. Наиболее часто выявлялись мутации в гене обратной транскриптазы A62V (10,3%) и в гене протезы L10I/V/F/R/Y (11,5%). Отмечается тенденция к нарастанию числа мутаций в гене обратной транскриптазы. Несмотря на преобладание в Санкт-Петербурге с середины 2000-х годов полового пути передачи ВИЧ-инфекции, отмечается сохранение доминирующего значения субтипа А вируса иммунодефицита человека.

## Литература

1. Вирус иммунодефицита человека — медицина: руководство для врачей / под ред. Н. А. Белякова и А. Г. Рахмановой. СПб., 2011. 656 с.
2. Little S. J., Holte S., Routy J. P. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV // *N. Engl. J. Med.* 2002. Vol. 347(6). P. 385–394.
3. Weinstock H. S., Zaidi I., Heneine W. et al. The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV-1-infected persons in 10 US cities // *J. Infect. Dis.* 2004. Vol. 189(12). P. 2174–2180.
4. Wensing A. M., van de Vijver D. A., Angarano G. et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management // *J. Infect. Dis.* 2005. Vol. 192(6). P. 958–966.
5. Cane P., Chrystie L., Dunn D. et al. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study // *BMJ.* 2005. Vol. 331(7529). P. 1368.
6. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents Downloaded from <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines> on 8/6/2012.
7. Nosik M., Ryzhov R., Kravtchenko A. et al. Genotypic analyses of HIV in antiretroviral-naïve patients from Moscow and Moscow region, Russia // 6<sup>th</sup> IAS Conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention — Rome, 2011, abstract CDA002.

8. Дементьева Н. Е., Сизова Н. В., Лисицина З. Н. и др. Анализ субтипов и фармрезистентность вариантов ВИЧ, циркулирующих среди ВИЧ-инфицированных пациентов Санкт-Петербурга // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011. Т. 3. С. 34–42.

9. Мусатов В. Б., Семенова М. Е., Карнаухов Е. В. Эпидемиологическая и демографическая характеристика взрослых больных с острой ВИЧ-инфекцией // Инфекционные болезни — 2012: альманах / под общ. ред. А. В. Королева, В. Е. Жолобова и др. СПб.: Изд-во ФХ СПбГУ, 2012. С. 189–191.

10. Покровский В. В., Юрин О. Г., Кравченко А. В. и др. Протоколы лечения больных ВИЧ-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2011. Приложение № 3. 24 с.

11. Колomeец А. Н., Сергеева И. В. Анализ распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Сибирского федерального округа // Здоровье населения и среда обитания. 2012. № 1 (226). С. 22–24.

Статья поступила в редакцию 5 декабря 2012 г.