

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ R5 (NSI/M) И X4 (SI/T)-ТРОПНЫХ ВИРУСОВ В ПОПУЛЯЦИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», г. Минск¹,
ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», г. Гомель²

В статье представлены данные по характеристике ВИЧ по участку гена *env*, изолированного от пациентов из разных регионов республики. Показано, что из 126 последовательностей изолятов вируса 96 (76,2%) были отнесены к R5-тропным, а 30 (23,8%) к X4-тропным вариантам вируса. Определено, что среди R5-тропных вариантов 80 (83,3%) относились к субтипу A1, 5 (5,2%) – к B, 4 (4,2%) – к G, по 3 (3,1%) – к CRF02_AG и CRF03_AB и 1 (1,0%) – к CRF06_cpx, а среди X4-тропных 25 (83,3%) – к A1 субтипу, 3 (10%) – к CRF03_AB и по 1 (3,3%) – к субтипу B и к уникальной рекомбинантной форме (URF). Определено, что все из 25 проанализированных аминокислотных последовательностей R5-тропных вариантов ВИЧ относились к несинциеобразующим M-тропным, а из 13 X4-тропных, 6 (46,2%) были отнесены к SI T-тропным изолятам. Определение тропности изолятов ВИЧ имеет не только важное значение при назначении ингибиторов слияния, но и прогностическое.

Ключевые слова: ПЦР, генотипирование, ВИЧ, субтипы, секвенирование, NSI- SI-варианты.

**V. F. Eremin, E. L. Gasich, S. V. Sosinovich,
A. S. Nemira, T. P. Grushko**

PREVALENCE R5 (SI/M) AND X4 (SI/T)-TROPIC VIRUSES IN A POPULATION OF HIV-INFECTED PATIENTS IN BELARUS

Data on HIV V3 loop region gene *env*, isolated from patients from different regions of the Republic of Belarus characteristics are presented. It was shown that of the 126 sequences of HIV isolates 96 (76.2%) were classified as R5-tropic, and 30 (23.8%) to the X4-tropic virus variants. It determined that among R5-tropic variants 80 (83.3%) belonged to the A1 subtype, 5 (5.2%) – to B, 4 (4.2%) – to G, 3 (3.1%) – to CRF02_AG and CRF03_AB, 1 (1.0%) – to CRF06_cpx, and among X4-tropic 25 (83.3%) – to A1 subtype, 3 (10%) – to CRF03_AB and 1 (3.3%) – to subtype B and unique to recombinant form (URF). It was determined that all of the 25 analyzed amino acid sequences of R5-tropic HIV variants treated to NSI, M-tropic and of 13 X4-tropic, 6 (46.2%) were assigned as SI T-tropic isolates. Determination HIV isolates tropism is not only important in the appointment of fusion inhibitors, but also prognostic.

Key words: PCR, genotyping, HIV subtypes, sequencing, X4- R5-tropic, NSI- SI-variants

Как известно, по современной классификации выделяют ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Пандемия ВИЧ-инфекции связана с ВИЧ-1, который выделяют в 4 группы M, N, O и P. Группа M (major) включает в себя 9 субтипов и циркулирующие рекомбинантные формы [1–3]. Для ВИЧ свойственен высокий уровень генетической ва-

риабельности, связанный в основном, с участком V3 петли gp120 гена *env*. V3 участок гена *env* является иммунодоминантным и служит основной мишенью для специфических нейтрализующих антител [4].

Именно с V3 участком гена *env* связаны такие свойства вируса, как репликативная активность и троп-

ность к М- и Т-клеткам, а также взаимодействие с CCR5 и CXCR4 хемокиновыми ко-рецепторами [5, 6]. Показано, что изменение в двух позициях – 11 и 25 внутри V3 петли 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 к М (моноциты/макрофаги) на Т (лимфоциты) [7–10].

Изучение изменений в участке V3 петли 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) [11].

Цель исследования: определить распространенность R5 и X4 тропных вариантов ВИЧ-1 у первично выявленных пациентов с ВИЧ/СПИД на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы. Образцы сыворотки/плазмы крови в количестве 126 были получены из разных регионов республики: из 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 гетерогомосексуальных 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 вирусспецифическим 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: 5х 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 °С – 60 мин; 70 °С – 15 мин.

Полимеразную цепную реакцию в гнездовом варианте выполняли на амплификаторах AB2700, США и «Corbett Research», Австралия в два этапа в объеме 25 (ген pol) и 50мкл (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 года).

ПЦР по участку гена env проводили по следующей прописи:

первый раунд: MgCl₂ – 4 мкл (25 mM), смесь трифосфатов – 1,0 мкл (10 mM), праймеры по 0,5 мкл; 10х ПЦР буфер – 2,5 мкл, Taq-полимераза – 0,4 мкл; бидистиллированная вода – 33,6 мкл; кДНК – 5 мкл.

ПЦР по участку гена env проводили в следующем режиме:

- | | |
|---------------------|-------------|
| 1. 95 °С 3' | } 35 циклов |
| 2. 95 °С 30" | |
| 3. 55 °С 30" | |
| 4. 72 °С 2' | |
| 5. 72 °С 10' | |
| 6. 4 °С – хранение; | |

второй раунд: MgCl₂ – 5,0 мкл; смесь трифосфатов – 2,0 мкл; праймеры по 1 мкл; 10х ПЦР буфер – 5,0 мкл; Taq-полимераза – 0,4 мкл; бидистиллированная вода – 34,6 мкл; кДНК – 2 мкл. Для проведения 2 раунда ПЦР использовали следующие праймеры:

Праймеры:	env
Прямой праймер 5'	A0627-1 5' KSI
Обратный праймер 3'	A0624-1 3' KSI

ПЦР выполняли в следующем режиме:

- | | |
|---------------------|-------------|
| 1. 95 °С 3' | } 25 циклов |
| 2. 95 °С 30" | |
| 3. 55 °С 30" | |
| 4. 72 °С 2' | |
| 5. 72 °С 10' | |
| 6. 4 °С – хранение; | |

ПЦР по участку гена pol проводили в один раунд в следующем режиме:

MgCl₂ – 2 мкл (25 mM); смесь трифосфатов – 0,2 мкл (10 mM); праймеры по 0,6 мкл; 10х ПЦР буфер – 2,5 мкл; Taq-полимераза – 0,2 мкл; бидистиллированная вода – 16,1 мкл; кДНК – 3 мкл.

- | | |
|---------------------|-------------|
| 1. 95 °С 5' | } 40 циклов |
| 2. 95 °С 30" | |
| 3. 60 °С 30" | |
| 4. 72 °С 1' | |
| 5. 72 °С 7' | |
| 6. 4 °С – хранение. | |

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

Оригинальные научные публикации

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 бутстреп анализа с количеством повторов 1050, моделью Kimura-2, статистическую обработку осуществляли с помощью метода присоединения соседей – neighbor-joining method).

Результаты и обсуждение. Все пробы, взятые в работу, были исследованы методами ИФА и количественной ОТ-ПЦР. Положительные в ОТ-ПЦР образцы были 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 мы использовали секвенированные по участку V3 петли гена *env* фрагменты длиной 247 п. о.

В результате проведенных исследований было установлено, что 96 образцов (76,2%) имели R5-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%) (рисунок 1).

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 (рисунок 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-троп-

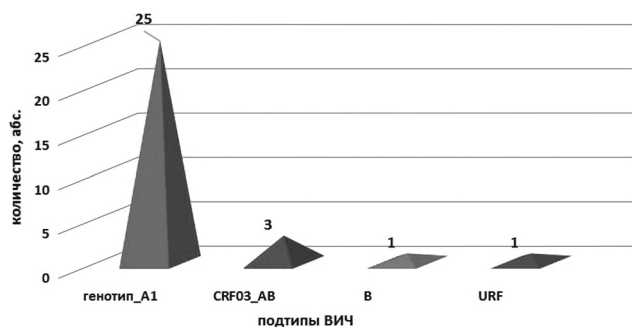


Рисунок 1. Распределение субтипов ВИЧ-1 среди X4-тропных вариантов вируса

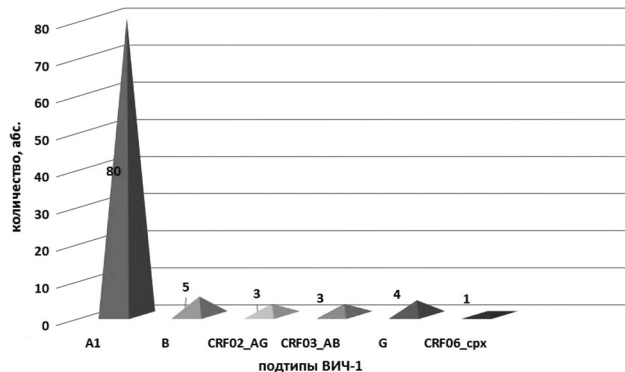


Рисунок 2. Распределение субтипов ВИЧ-1 среди R5-тропных вариантов вируса.

ными или Т- и М-тропными и могут использовать CXCR4 и/или CXCR4/CCR5 корецепторы для проникновения в чувствительные клетки (таблица). 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, таблица.

Таблица. 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, рисунок 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 – А1, 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 – А1, в положении 25 D на V, у изолята Mn_21 – URF, в положении 25 D на G и, наконец, у изолята HIV_250 – А1, 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

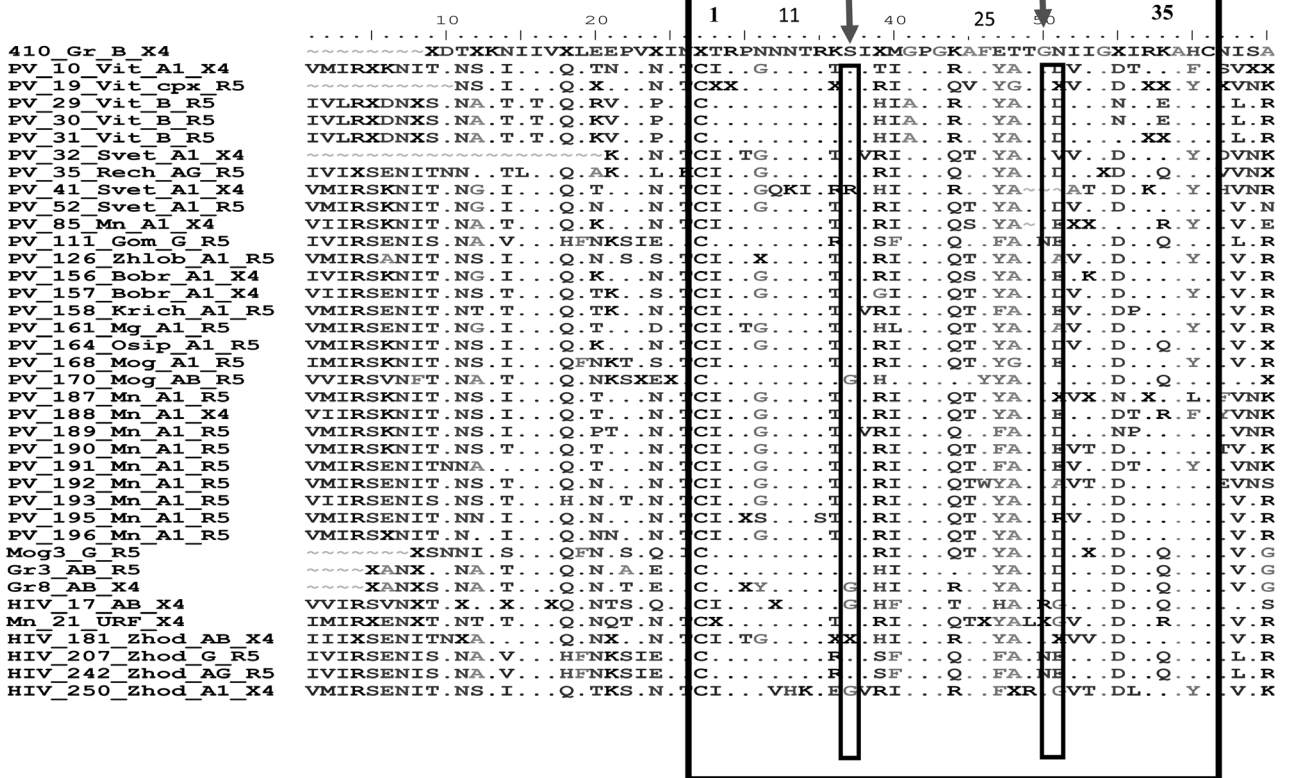


Рисунок 3. Аминокислотные последовательности R5- и X4-тропных вариантов ВИЧ, рамкой ограничен участок V3 петли gp120 ВИЧ-1

активностью, M-тропными, что характерно для ВИЧ, изолированного от пациентов с ранними сроками инфицирования.

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. Robertson, D. L., Anderson J. P., Bradac J. A. et al. HIV-1 nomenclature proposal // Science – 2000. – Vol. 288. – P. 55–60.
2. Plantier, J. C., Leoz M., Dickerson J. E. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas // Nat Med. – 2009. – Vol. 8. – P. 871–872.
3. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.hmt>.

4. Labrijn, A. and Parren P. W. H. I. Neutralizing epitopes of HIV-1 // <http://hiv-web.lanl.gov>, 2001/.
5. Deng, H., Liu R., Ellmeler W. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 // Nature. – 1996. – Vol. 381. – P. 662–666.
6. Moor, J. P., Trkola A., Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry // Cur Opi Immunol. – 1997. – Vol. 9. – P. 551–562.
7. Fouchier, R. A. M., Groenink M., Kootstra N. A. et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule // J. Virology. – 1992. – Vol. 66. – P. 3183–3187.
8. De Jong, J.-J., de Ronde A., Keulen W. et al. / Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution // J. Virology. – 1992. – Vol. 66. – P. 6777–6780.
9. De Wolf, F., Hogervorst E., Goudsmit J. et al. Syncytium-inducing and non-Syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics // AIDS Res & Hum Ret. – 1994. – Vol. 10. – P. 1387–1399.
10. Cornelissen, M., Mulder-Kampinga G., Veenstra J. et al. Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population // J. Virology. – 1995. – Vol. 69. – P. 1810–1818.
11. Pessoa, R., Sanabani S. S. / 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 // Data in brief. – 2016. – Vol. 6. – P. 267–274.

Поступила 14.07.2016 г.