

Г.А. Воронцова¹, А.В. Кузнецова^{1,2}, О.В. Ушакова¹, Е.А. Лойфман¹, О.А. Сосновская¹,
О.Б. Алипченко¹, В.Ю. Каменская¹

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПЕРВИЧНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ

¹КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» министерства
здравоохранения Хабаровского края, 680031, пер. Пилотов, 2, тел. 8-(4212)-47-55-91;

²Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35,
тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск

Резюме

Проанализирована распространенность первичных мутаций резистентности в генах протеазы и обратной транскриптазы штаммов ВИЧ-1 к препаратам ВААРТ среди группы «наивных» ВИЧ-позитивных пациентов, выявленных в 2014–2015 гг.

Первичная резистентность вируса иммунодефицита человека изучалась у 58 пациентов, проживающих на территории Хабаровского края, у которых первый положительный результат теста на ВИЧ получен в течение последнего года. Полученные данные по частоте выявления мутаций у пациентов с длительностью заболевания до 3 месяцев – «сероконверты» и более 3 месяцев не вполне укладываются в концепцию восстановления «дикого» штамма, и, вероятно, могут быть объяснены недостаточной величиной выборки. Однако нельзя полностью исключить влияние интенсивных миграционных процессов в 2014 году.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, резистентность, мутации.

G.A. Vorontsova¹, A.V. Kuznetsova^{1,2}, O.B. Ushakova¹, E.A. Loifman¹, O.A. Sosnovskaya¹,
O.B. Alipchenko¹, V.U. Kamenskaya¹

PREVALENCE OF PRIMARY DRUG RESISTANCE MUTATIONS AMONG HIV TYPE 1 IN Khabarovsk REGION

¹Center of HIV/AIDS and other infection diseases prevention;

²Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Summary

In this study, we analyzed the prevalence of primary drug resistance – associated mutations of reverse transcriptase and protease genes in HIV type 1 among newly diagnosed in 2014–2015 treatment-naïve patients.

The primary drug resistance was analyzed in 58 people in Khabarovsk Region, Russia who had been initially HIV-positive tested in last year. The received data on the incidence of mutations in patients with disease duration up to three month with seroconversion and over this period are not consistent with the concept of wild stain restoration and may be explained by a limited number of selected cases. At the same time, the influence of intense migration process cannot be excluded.

Key words: HIV-infection, resistance, mutations.

Современная антиретровирусная терапия (АРВТ) не позволяет полностью элиминировать вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) из организма больного, но останавливает размножение вируса, что обеспечивает снижение смертности, улучшение качества жизни людей, живущих с ВИЧ и сокращение вероятности передачи вируса иммунодефицита [6].

Наличие как первичной, так и вторичной лекарственной устойчивости (ЛУ) вируса к специфическим противовирусным препаратам не только резко снижает эффективность АРВТ, но и приводит к быстрой селекции резистентных штаммов возбудителя с последующим распространением их в популяции [9, 10].

По литературным данным частота встречаемости первичной ЛУ ВИЧ в макрорегионе «Западная Европа и Северная Америка» составляет от 6,0 % до 16,0 %, при этом в 3-5 % случаев имеется ЛУ более чем к одному классу антиретровирусных препаратов [9].

В регионах, расположенных в европейской части Российской Федерации, уровень регистрации первичных мутаций ВИЧ составляет от 0,7 % до 3,1 %. Более

высокие значения выявления первичной резистентности возбудителя отмечены в Сибирском федеральном округе – 5,3 %, Амурской области 7,7 % [1, 2, 3, 4].

Таким образом, в настоящее время методы молекулярной генетики становятся необходимым этапом в индивидуальном подборе антиретровирусной терапии и дальнейшем мониторинге ее эффективности.

Цель данной работы – проанализировать распространенность первичных мутаций резистентности в генах протеазы и обратной транскриптазы штаммов ВИЧ-1 к препаратам высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) среди группы «наивных» ВИЧ-позитивных пациентов, выявленных в 2014–2015 гг.

Материалы и методы

Первичная резистентность вируса иммунодефицита человека изучалась у 58 пациентов, проживающих на территории Хабаровского края, у которых первый положительный результат теста на ВИЧ получен в течение последнего года. Из них у 9 человек с положительной сероконверсией по ВИЧ, длитель-

ность заболевания не превышала 3 месяцев. Уровень С04-лимфоцитов 500 и более клеток в мкл. Вирусная нагрузка ВИЧ в исследуемых образцах составила от 750 до 21 000 копий/мл. У пациентов отсутствовали признаки СПИД, оппортунистические инфекции и вторичные заболевания.

Для проведения исследования использовали образцы плазмы крови, которые собирали при плановых осмотрах пациентов.

Мутации резистентности выявляли методом секвенирования участка протеазы и обратной транскриптазы с помощью тест-системы «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»). Секвенирование фрагментов проводилось с помощью генетического анализатора AB 3 500 (Applied Biosystems, США). Для сбора нуклеотидных последовательностей использовалось программное обеспечение «Деона» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Полученную консенсусную последовательность сравнивали с референсной последовательностью ВИЧ-1 Стэнфордской базы данных [5, 7, 8].

Полученные результаты были сопоставлены с данными проведенного в 2013 году совместно с ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Иванковского» исследования молекулярно-эпидемиологического анализа эпидемии ВИЧ-инфекции на Дальнем Востоке России, в котором принимали участие 88 пациентов, которым диагноз ВИЧ-инфекция был установлен в период 2002–2012 годов.

Результаты и обсуждение

Среди пациентов, включенных в исследование, 51,7 % составляли женщины (30/58). Доминирующим был половой путь передачи при гетеросексуальных контактах (43/58; 74,1 %). Возраст пациентов варьировал от 20 до 57 лет.

В анализируемой группе у 40 человек (68,97±6,1 %) в общей сложности было выявлено 54 случая мутаций, имеющих различное клиническое значение, из них 51 (87,9±4,3 %) в гене обратной транскриптазы (табл. 1).

Таблица 1

Мутации резистентности ВИЧ в гене ОТ (n=58)

Мутации	Абс. (%)	Снижение чувствительности к АРВТ
A62V	37 (63 %)	нет
M41L	2 (3,4 %)	ко всем НИОТ
D67N (сочетанная)	5 (8,6 %)	ко всем НИОТ
K103N	1 (1,7 %)	делавердин (DLV) невирапин (NVP) эфавиренз (EFV)
M230L	1 (1,7 %)	делавердин (DLV) невирапин (NVP) эфавиренз (EFV)
E138A	2 (3,4 %)	этраверин (ETR) рилпивирин (RPV)
V90I	1 (1,7 %)	этраверин (ETR)
A98G	1 (1,7 %)	этраверин (ETR) невирапин (NVP)
Y188F	1 (1,7 %)	эфавиренз (EFV) рилпивирин (RPV) невирапин (NVP)

Наиболее часто встречалась мутация A62V (37/58; 63±6,3 %): в 27 случаях она носила изолированный характер и не обуславливала фармакологической резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам; сочетание с мутациями M41L и D67N приводило к развитию резистентности низкого уровня ко всем НИОТ.

Наибольшее клиническое значение имели 3 мутации (5,2±2,9 %): K103N (выявлена в сочетании с мутацией A98G) у 1 (1,7 %) пациента, связана с высоким уровнем резистентности к препаратам группы ННИОТ (DLV, NVP, EFV); M230L (1/5 8; 1,7 %), обуславливающая резистентность высокого уровня к DLV, NVP, промежуточного уровня к EFV и, в сочетании с другими мутациями резистентности, снижающая чувствительность вируса к ETR; Y188F (1/58; 1,7 %) определяющая высокий уровень устойчивости к EFV, средний уровень устойчивости к RPV и NVP. Мутация Y188F сочеталась с M41L (резистентность низкого уровня к препаратам группы НИОТ).

Также регистрировались: мутация E138A (2/58; 3,4 %) – приводящая к низкому уровню устойчивости к RPV и этравирину ETR; мутации V90I, A98G, которые в сочетании с другими снижают чувствительность к ETR. A98G дополнительно приводит к минимальному снижению чувствительности к NVP.

Существенно реже (3/58; 5,2 %) встречались мутации лекарственной устойчивости в гене протеаз (табл. 2).

Таблица 2

Мутации резистентности ВИЧ в гене протеазы (n=58)

Мутации	Абс/ (%)	Снижение чувствительности к АРВТ
K20I	2 (3,4 %)	нет
I50V	1 (1,7 %)	ритонавир (RTV) лопинавир (LPV) фосампренавир (FPV)

В 2 случаях выявлена мутация K20I (3,4 %), которая является дополнительной (полиморфизм), но может способствовать снижению чувствительности к ИП при наличии других мутаций резистентности в гене протеазы. У одного пациента выявлена мутация I50V, которая обеспечивает резистентность к RTV и LPV от низкого до промежуточного уровня и, при наличии других мутаций, повышает резистентность к DRV. Указанная мутация сочеталась с M41L и A62V (средний и низкий уровень устойчивости к препаратам группы НИОТ), M230L (высокий уровень устойчивости к ННИОТ).

Всего в группе наблюдения было обнаружено 5 первичных мутаций ЛУ, которые привели к формированию высокого, среднего и низкого уровня устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам у 10 человек (17,2±4,9 %), в том числе выраженной резистентности у 3 человек (5,2±2,9 %).

Данные, полученные в настоящем исследовании, достоверно не отличаются от результатов 2013 года, по частоте выявления первичных мутаций ЛУ высокого уровня (5,2±2,9 % против 3,8±2,0 %, p>0,05). Несмотря на то, что в данном исследовании отмечен более широкий спектр мутаций (K103N, M230L, Y188F) все они, как и в 2013 году, локализовались в гене обратной

транскриптазы и приводили к резистентности к ННИОТ.

Отдельно был проведен анализ встречаемости первичных мутаций ЛУ у пациентов с сероконверсией. В этой подгруппе у 3 пациентов (30,0 %) было выявлено 5 мутаций (9,3 % от общего числа), из которых 4 были локализованы в гене обратной транскриптазы.

Мутации K20I в гене протеазы; D67A (выявлялась изолировано) и A62V в гене ОТ были клинически не значимы. В одном образце определена мутация M41L, снижающая чувствительность ко всем препаратам группы НИОТ, кроме ламивудина.

Мутация E138A, к группе препаратов ННИОТ, вызывала низкий уровень устойчивости к RPV и ETR (табл. 3).

Таблица 3

Частота выявления мутаций ЛУ при сероконверсии (n=9)

Мутации	Абс. (%)	Снижение чувствительности к АРВТ
K20I	1 (11,1 %)	нет
A62V	1 (11,1 %)	нет
D67N (изолированная)	1 (11,1 %)	нет
M41L	1 (11,1 %)	ко всем НИОТ
E138A	1 (11,1 %)	этраверин (ETR) рилпивирин (RPV)

При раздельном анализе результатов полученных в группе пациентов относящихся и не относящихся к «сероконвертам» установлено, что среди пациентов с сероконверсией мутации встречались в 30±15,2 % случаев, что достоверно ($p<0,05$) реже, чем у пациентов с более длительным течением заболевания (72,5±6,3 %). Мутации, приводящие к формированию лекарственной устойчивости высокого уровня, в группе сероконвертов не отмечались.

По литературным данным основной причиной циркуляции мутантных штаммов вируса является селекция на фоне недостаточно эффективной антиретровирусной терапии с последующим распространением в

популяции. Известно, что при длительной (более года) персистенции в организме хозяина происходит восстановление «дикого» штамма вируса.

Полученные данные по частоте выявления мутаций у пациентов с длительностью заболевания до 3 месяцев – «сероконверты» и более 3 месяцев не вполне укладываются в концепцию восстановления «дикого» штамма, и, вероятно, могут быть объяснены недостаточной величиной выборки. Однако нельзя полностью исключить влияние интенсивных миграционных процессов в 2014 году.

Выводы

1. Мутации ВИЧ, имеющие разное клиническое значение были выявлены у 68,97 % пациентов; в среднем у каждого пациента имелось 1,35 мутации. Наиболее часто встречалась мутация A62V (37/58; 63±6,3 %) изолировано не приводящая к фармакологической резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам

2. Обнаружено 5 первичных мутаций ЛУ, которые привели к формированию высокого, среднего и низкого уровня устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам у 10 человек (17,2 %), среди которых преобладали мутации M41L и D67N приводящие к развитию резистентности низкого уровня ко всем НИОТ.

3. Мутации, связанные с выраженной резистентностью обнаружены у 3 человек (5,2±2,9 %), что, с учетом погрешности, соответствует среднероссийским значениям. Сравнение данных, полученных в настоящем исследовании, с результатами 2013 года не выявлено достоверных отличий по частоте выявления первичных мутаций ЛУ высокого уровня (5,2±2,9 % против 3,8±2,0 %, $p>0,05$).

4. Первичные мутации, выраженной лекарственной устойчивости локализовались в гене обратной транскриптазы (K103N, M230L, Y188F) и приводили к резистентности к ННИОТ.

5. У одного пациента выявлена мутация I50V, которая обеспечивает резистентность к RTV и LPV от низкого до промежуточного уровня.

Литература

1. Богачев В.В., Тотменин А.В., Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1 субтипов А и В, выделенных на территории Новосибирской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2012. – № 6. – С. 45-52.
2. Казеннова Е.В., Нешумаев Д.А., Рукавицин Д.В., Лаповок И.А. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии ВИЧ-инфекции в Благовещенске и Хабаровске (Дальний Восток России) // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59, № 4. – С. 31-36.
3. Коломеев А.Н., Сергеева И.В., Довгополук Е.С. Анализ распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Сибирского федерального округа // Здоровье населения и среда обитания. – 2012. – № 1 (226). – С. 22-24.
4. Ладная Н.Н. Первичная резистентность ВИЧ в России. Отчет о научно-исследовательской работе по теме: Пороговое исследование по резистентности к антиретровирусным препаратам в регионах РФ, ФНМЦ

СПИД РФ, ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии. – 2010. – Режим доступа: <http://hivresist.pcr.ru>.

5. Методические рекомендации Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 6 августа 2007 г. № 5956-РХ «Определение чувствительности вируса иммунодефицита человека к лекарственным препаратам».

6. Методические рекомендации Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 20 августа 2013 г. № МР 3.1.1.0075/1-13 «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам» // Официальный сайт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Режим доступа: http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1405&phrase_id=402946.

7. Методические рекомендации по анализу и интерпретации результатов исследования, проведенного с использованием набора реагентов для определения

тропизма и выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «АмплиСенс HIV-Resist-Seq». Список мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ. – М.: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», 2015. – С. 14-20.

8. Мусатов В.Б., Яковлев А.А., Тыргина Т.В., Ладная Н.Н. Прогностическое значение результатов генотипирования вирусов иммунодефицита человека,

выделенных от больных первичной ВИЧ-инфекцией в 2009 и 2011 годах в Санкт-Петербурге // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2013. – № 1. – С. 171-178.

9. David A.M.C. van de Vijver, Annemarie M.J. Wensing, Charles A.B. Boucher. The Epidemiology of Transmission of drug Resistant HIV-1. – 2007. – Режим доступа: http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/2006_7/VAN/van.html, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/reviews.html>.

10. Turner D., Wainberg M.A. HIV transmission and primary drug resistance // AIDS Rev. – 2006. – № 8. – P. 17-23.

Literature

1. Bogachev V.V., Totmenin A.V., Barishev P.B., Mesheryakova Yu.V. Molecular-genetic characteristics of HIV-1 subtype A and B isolated on the territory of Novosibirsk region // Journal of microbiology, epidemiology and immunology. – 2012. – № 6. – P. 45-52.

2. Kazennova E.V., Neshumayev D.A., Rukavitsin D.V., Lapovok I.A., et al. Molecular-epidemiologic analysis of HIV epidemics in Blagoveshchensk and Khabarovsk (Russian Far East region) // Issues of virology. – 2014. – Vol. 59, № 4. – P. 31-36.

3. Kolomeets A.N., Sergeeva I.V., Dovgopolyuk E.S. Analysis of HIV-1 drug resistance prevalence in Siberian federal district // health and environment of people. – 2012. – № 1 (226). – P. 22-24.

4. Ladnaya N.N. Primary resistance of HIV in Russia. Report on the research work dedicated to the theme: threshold research on the resistance to antiretroviral drugs in Russian regions. Federal scientific-methodical center AIDS Russian Federation Federal State Institution of Science Central research institute of epidemiology. – 2010. – <http://hivresist.pcr.ru>.

5. Guidelines of Ministry of Health Care and Social Development of the Russian Federation dated August 6th 2007, № 5956-PX «HIV sensitivity determination to pharmaceutical drugs».

6. Guidelines of the Federal Agency for Supervision in Education and Science dated August 20, 2013, № MP 3.1.1.0075/1-13 «Supervision over prevalence of drug

resistant HIV isolates» // Official web-site of the Federal Agency for Supervision in Education and Science. – http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1405&sphrase_id=402946.

7. Guidelines for analysis and interpretation of the laboratory tests results conducted with HIV-1 tropism and drug-resistance mutations detection kit in clinical practice using the PCR approach followed by sequencing the amplified products with the «AmpliSence HIV-Resist-Seq» kit. List of HIV drug-resistance mutations. – М.: Science Federal State-Funded Institution «Central research institute of epidemiology», 2015. – P. 14-20.

8. Musatov B.V., Yakovlev A.A., Tirgina T.V., Ladnaya N.N. Prognostic value of the genotyping results of HIV-virus isolated from patients suffering of primary HIV-infection in 2009 and 2011 in Saint-Petersburg // Saint-Petersburg university journal. Lot 11 // Medicine. – 2013. – № 1. – P. 171-178.

9. David A.M.C. van de Vijver, Annemarie M.J. Wensing, Charles A.B. Boucher. The Epidemiology of Transmission of drug Resistant HIV-1. – 2007. – http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/2006_7/VAN/van.html, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/reviews.html>.

10. Turner D., Wainberg M.A. HIV transmission and primary drug resistance // AIDS Rev. – 2006. – № 8. – P. 17-23.

Координаты для связи с авторами: Воронцова Галина Александровна – врач клинической лабораторной диагностики КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», тел. 8-(4212)-47-55-84; Кузнецова Анна Валерьевна – канд. мед. наук, главный врач КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», доцент кафедры терапии педиатрического и стоматологического факультетов ДВГМУ; Ушакова Виктория Борисовна – врач клинической лабораторной диагностики КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», тел. 8-(4212)-47-55-84; Лойфман Екатерина Анатольевна – зав. клинко-диагностическим отделением № 1, врач-терапевт КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», тел. 8-(4212)-47-55-90; Сосновская Ольга Александровна – врач-инфекционист КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», тел. 8-(4212)-47-55-90; Алипченко Ольга Борисовна – врач клинической лабораторной диагностики КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», тел. 8-(4212)-47-55-90; Каменская Виктория Юрьевна – врач-педиатр КГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», тел. 8-(4212)-47-55-90.

