

Генотипирование и определение мутаций резистентности ВИЧ-1

Дрозд Алина Михайловна

Студент (специалист)

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

E-mail: drozd.allina@gmail.com

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения общее число людей, живущих с ВИЧ, составляет 34,3 миллиона. Вирусом иммунодефицита человека ежедневно инфицируется около 7400 человек. Генотипирование и филогенетический анализ ВИЧ у ВИЧ-инфицированных пациентов позволяет определить направление заноса вируса, расследовать случаи умышленного инфицирования, а так же инфицирования через кровь и её препараты, расшифровывать вспышки ВИЧ-инфекции. Определение первичных и приобретенных мутаций резистентности ВИЧ необходимо для своевременного назначения адекватных схем высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ).

Цель: дать молекулярно-генетическую характеристику ВИЧ-1. Определить подтипы ВИЧ в исследуемых образцах.

Задачи:

1. Определить филогенетическое родство между изучаемыми изолятами и с ВИЧ, циркулирующим в странах СНГ и в мире;
2. Определить наличие / отсутствие мутаций резистентности в геноме исследуемых изолятов.

Материал и методы. Секвенирование по участку гена *pol* проводили на коммерческой тест-системе «ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.2.0, производства фирмы Abbott, США. ПЦР и последующее секвенирование по участкам генов *gag* и *env* проводили на тест-системах «Бел РНК/ДНК ВИЧ-1», производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Электрофоретическое разделение очищенных фрагментов ДНК ВИЧ-1 осуществляли на генетическом анализаторе ABI Prism 3100 Avant, США. Анализ полученных фрагментов проводили с использованием программ Sequencing Analysis v5.1.1., SeqScape v.2.6, BioEdit. Филогенетические деревья строили с применением программы MEGA4.1. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. Мутации резистентности определяли с применением базы данных Стэнфордского Университета - HIVdb v6.0.1 и программ EUResist v1, Geno2pheno v3.0.

Результаты и их обсуждение. Проведен филогенетический анализ шести изолятов ВИЧ, полученных от пяти первично-выявленных пациентов с ВИЧ-инфекцией и одного пациента, находящегося на ВААРТ. Установлены подтипы вирусов и их происхождение. По участку гена *pol* определено наличие мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам в одном образце.

Первый исследуемый образец - циркулирующая рекомбинантная форма CRF_03AB ВИЧ-1. Пациент женского пола, возраст 41 год. Предполагаемый путь передачи - половой. Мутации, обнаруженные в определённых участках генома вируса (в структурном гене *pol*) :

1. Обратная транскриптаза: P9R K11T K20R V35T E36D T39N K102M K103N S105T K122P R172K V179T G190A Q207E V245K E248D T286A P313PS L325I I326V Q334S;
2. Протеаза: I13V E35D M36I N37D R41K Q61E H69K K70R T74S L89M.

Исследуемая последовательность гена *pol* включает кодоны протеазы(1-99) и кодоны обратной транскриптазы (1-344). Мутации в виде инсерций и делеций отсутствуют. Наиболее родственным референтным изолятом является CRF_03AB, процент сходства составил 95%. В результате проведенного исследования были обнаружены мутации резистентности к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы: K70R. Также были идентифицированы мутации резистентности к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы: K103N, V179T, G190A. Основные мутации резистентности к ингибиторам протеазы: I13V, M36I, H69K, K20R.

Второй исследуемый образец - ВИЧ-1 подтипа G, изолированный от первично выявленной пациентки (завозной случай из Нигерии). Предполагаемый путь заражения - половой, от мужа-нигерийца. Секвенирование проводилось по трём структурным генам: *gag*, *pol* и *env*. Мутаций резистентности обнаружено не было. После проведения секвенирующей ПЦР был проведен филогенетический анализ, и с помощью программы MEGA было построено филогенетическое дерево по структурному гену *gag*.

Также были проанализированы 4 образца от первично выявленных пациентов. 3 образца были из города Бреста, 1 образец из Могилёва. Так как это были первично выявленные пациенты, не получавшие никакого лечения, мутаций резистентности у них обнаружено не было. После проведения секвенирующей ПЦР также был проведен филогенетический анализ, с построением филогенетического дерева.

Выводы:

1. Все шесть исследуемых образцов принадлежат к группе M ВИЧ-1. Четыре изолята относились к подтипу A, и по одному - к подтипу G и рекомбинантной форме CRF03_AB.

2. Образцы ВИЧ, относящиеся к подтипу A, филогенетически близки к изолятам, циркулирующим на территории Беларуси. Изолят ВИЧ подтипа G является завозным случаем (Нигерия), а рекомбинантная форма CRF03_AB близка к изоляту из Калининградской области России.

3. Мутации резистентности к антиретровирусным препаратам выявлено в одном из шести исследованных образцов у пациента, находящегося на ВААРТ.

Источники и литература

- 1) 1. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение / В.В. Покровский и др. М., 2003.
- 2) 2. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoj B, Butto S. HIV virology and pathogenic mechanisms of infection: a brief overview / Ann Ist Super Sanita. – 2010. – p. 5-14.
- 3) 3. Shafer, R.W. Genotyping testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance / Clin. Microbiol. – 2002. – p. 247-277.

Слова благодарности

Хочу выразить слова благодарности сотрудникам лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, за помощь в проведении исследования.