

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИЧ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В СИСТЕМЕ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.17

УДК 575.22:578.522:616-036.2-022.1-098

Поступила 5.08.2019 г.



О.Ю. Пекшева, врач клинической лабораторной диагностики Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД¹;

О.В. Парфенова, к.б.н., биолог Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД¹;

Н.М. Скачков, студент²;

Н.Н. Зайцева, д.м.н., руководитель Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД¹

¹Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ул. Малая Ямская, 71, Н. Новгород, 603950;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005

Цель исследования — оценить возможности и эффективность использования современных молекулярно-генетических технологий в определении источника инфицирования и установлении причинно-следственных связей в эпидемическом очаге ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы. Проведено генотипирование 2 образцов плазмы крови от ВИЧ-положительных лиц исследуемой группы и 18 образцов — от инфицированных пациентов группы сравнения. В работе использовано также 13 генетически близких нуклеотидных последовательностей генома ВИЧ из международной базы GenBank.

Генотипирование выполнялось на генетических анализаторах ABI Prism 3100 и ABI 3500XL (Applied Biosystems, США) с использованием тест-системы ViroSeq HIV-1 (Abbott, США) и «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Субтипирование выполнено онлайн в программах COMET HIV-1/2 and HCV и REGA HIV-1 Subtyping Tool v. 3.0. Филогенетический анализ и расчет генетической дистанции осуществляли с помощью программы MEGA 5.2, статистического метода Maximum Likelihood analysis и модели Kimura (bootstrap level 1000).

Результаты. Генетическое типирование установило, что изучаемые вирусные изоляты относятся к субтипу А (А6) ВИЧ-1. Проведенный филогенетический анализ показал, что образцы исследуемой группы не собираются в отдельный кластер, для каждого из них обнаружены генетически близкие образцы из группы сравнения. Дистанция между нуклеотидными последовательностями двух образцов исследуемой группы составила 0,050; между нуклеотидными последовательностями двух образцов исследуемой группы и образцов группы сравнения (с учетом данных базы GenBank) варьировала от 0,007 до 0,058 (в среднем — 0,032). Установлено, что дистанция, равная 0,007, между нуклеотидными последовательностями образца №1048 исследуемой группы и образца №1051 из группы сравнения свидетельствует о высокой степени их генетической близости, подтверждая наличие эпидемиологической связи между ними.

Заключение. Результаты молекулярно-генетической экспертизы не подтвердили генетического родства между образцами исследуемой группы. Полученные результаты явились основанием для отказа в постановке диагноза профессионального инфицирования ВИЧ.

Применение современных технологий в мониторинге ВИЧ-инфекции показало их практическую значимость и эффективность.

Ключевые слова: ВИЧ-1; молекулярно-генетический мониторинг; ВИЧ-генотипирование; филогенетический анализ; нуклеотидные последовательности; профессиональные инфекции.

Как цитировать: Peksheva O.Yu., Parfenova O.V., Skachkov N.M., Zaitseva N.N. HIV genotyping and phylogenetic analysis in the system of virological monitoring of HIV infection. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 146–150, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.17>

Для контактов: Зайцева Наталья Николаевна, e-mail: vtashca@mail.ru

English

HIV Genotyping and Phylogenetic Analysis in the System of Virological Monitoring of HIV Infection

O.Yu. Peksheva, Clinical Laboratory Physician, Privolzhsky District Center for AIDS Prevention and Control¹;

O.V. Parfenova, PhD, Biologist, Privolzhsky District Center for AIDS Prevention and Control¹;

N.M. Skachkov, Student²;

N.N. Zaitseva, MD, DSc, Head of Privolzhsky District Center for AIDS Prevention and Control¹

¹Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

The aim of the study was to assess the possibility and effectiveness of using modern molecular-genetic technologies in determining the source of infection and cause-effect relationships in the epidemic focus of HIV infection.

Materials and Methods. Two samples of blood plasma from HIV-positive persons of the tested group and 18 samples from the infected patients of the comparison group have been genotyped. 13 genetically close nucleotide sequences of HIV genome from the GenBank sequence database were also used in our work.

ABI Prism 3100 and ABI 3500XL genetic analyzers (Applied Biosystems, USA), ViroSeq HIV-1 genotyping system (Abbott, USA), and AmpliSense HIV-Resist-Seq reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор, Russia) were used for genotyping. Subtyping is done online using COMET HIV-1/2 and HCV software and REGA HIV-1 Sybtyping Tool program (v. 3.0). Phylogenetic analysis and calculation of genetic distance were carried out using MEGA 5.2 program, Maximum Likelihood Estimation method, and the Kimura model (bootstrap level 1000).

Results. All examined viral isolates were found to belong to HIV-1 subtype A (A6). The conducted phylogenetic analysis showed that the samples of the tested group were not collected in a separate cluster, for each of them genetically close samples from the comparison group were found. The distance between the nucleotide sequences of the tested group samples was 0.050; but it varied from 0.007 to 0.058 (average 0.032) between the nucleotide sequences of the 2 samples from the tested group and the samples from the comparison group. The distance equal to 0.007 has been found to be between the nucleotide sequences of sample No.1048 of the tested group and sample No.1051 from the comparison group which indicated a high degree of their genetic proximity, confirming the presence of the epidemiological link between them.

Conclusion. The molecular genetic examination did not confirm the genetic relationship between the samples of the tested group. The results obtained were grounds for refusal to make a diagnosis of occupational HIV infection.

The application of modern technologies in the monitoring of HIV infection has demonstrated their practical significance and efficacy.

Key words: HIV-1; molecular genetic monitoring; HIV genotyping; phylogenetic analysis; nucleotide sequences; occupational infections.

Введение

Длительный период развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции с высоким уровнем пораженности населения на значительной части территорий Российской Федерации, рост числа вторичных заболеваний у ВИЧ-инфицированных предопределили появление значительного количества лиц с ВИЧ, нуждающихся в амбулаторном и стационарном лечении [1].

Указанные обстоятельства, а также рост числа случаев ВИЧ-инфекции среди доноров и медицинских работников актуализируют проблему заражения ВИЧ-инфекцией пациентов при оказании им медицинской помощи в учреждениях здравоохранения, а также медицинских работников при выполнении ими профессиональных обязанностей [2].

Современные особенности течения эпидемии

ВИЧ-инфекции и рост числа случаев заражения ВИЧ с неоднозначной трактовкой причин и условий инфицирования обусловили острую необходимость проведения молекулярно-генетического мониторинга ВИЧ-инфекции, который стал возможен при развитии современных лабораторных технологий [3, 4].

Генотипирование ВИЧ и последующий филогенетический анализ являются методами высокой чувствительности и специфичности, позволяющими получить корректные и в значительной степени достоверные результаты с установлением генетического сходства или различия между нуклеотидными последовательностями образцов в очагах инфицирования ВИЧ внутри одного субтипа, обеспечить доказательную базу наличия/отсутствия эпидемиологической связи между ними [5, 6].

Использование современных молекулярно-генетических технологий в системе вирусологического

мониторинга ВИЧ-инфекции расширяет научные знания о биолого-генетических характеристиках возбудителя, его взаимодействии с организмом человека, раскрывает особенности развития механизма заболевания, увеличивает возможности лабораторной и эпидемиологической диагностики инфекции, вызванной ВИЧ.

Цель исследования — оценить возможности и эффективность использования современных молекулярно-генетических технологий в определении источника инфицирования и установлении причинно-следственных связей в эпидемическом очаге ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы

Молекулярно-генетическая экспертиза проводилась в лаборатории молекулярно-генетических и серологических методов исследования Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. В исследуемую группу были включены два образца плазмы крови: медицинской сестры М. (№1048) и предполагаемого источника инфекции — пациентки П. (№1049). В группу сравнения вошли 18 образцов плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов из региона проживания исследуемой группы (№№1051–1058, 1060–1068, 1070). В работе также использованы 13 нуклеотидных последовательностей генома вируса из международной базы GenBank. Построение филогенетического дерева и расчет генетической дистанции проводили путем анализа 33 образцов.

Идентификацию нуклеотидных последовательностей генома ВИЧ проводили при помощи коммерческих тест-систем ViroSeq HIV-1 (Abbott, США) и «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) методом секвенирования амплифицированных фрагментов гена *pol* с использованием праймеров, включенных в комплект с терминатором сиквенсовой реакции BigDye (Sequencing Module — BigDye v. 3.1), на генетических анализаторах ABI Prism 3100 и ABI 3500XL (Applied Biosystems, США). Исследования проводились с использованием нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 участка гена протеазы (*pro*) и обратной транскриптазы (*rev*).

Анализ данных секвенирования осуществляли с помощью программного обеспечения ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software v. 2.8 (Celera Diagnostic, США) и «ДЕОНА» («МедАйТи Групп», Россия).

Генотипирование ВИЧ проводили путем интеграции с базой данных Стэнфордского университета в режиме реального времени (<https://hivdb.stanford.edu>).

Для определения субтипов ВИЧ-1 изучаемых образцов применяли программное обеспечение COMET HIV-1/2 and HCV (<https://comet.retrovirology.lu>) и REGA HIV-1 Subtyping Tool v. 3.0 (<http://RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool>).

Для выявления существующих гомологов штаммов ВИЧ в базах данных использовали программу BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Филогенетический анализ и расчет генетических дистанций выполняли при помощи программы MEGA 5.2 с использованием статистического метода Maximum Likelihood analysis, двухпараметрической модели Kimura (Bootstrap level 1000).

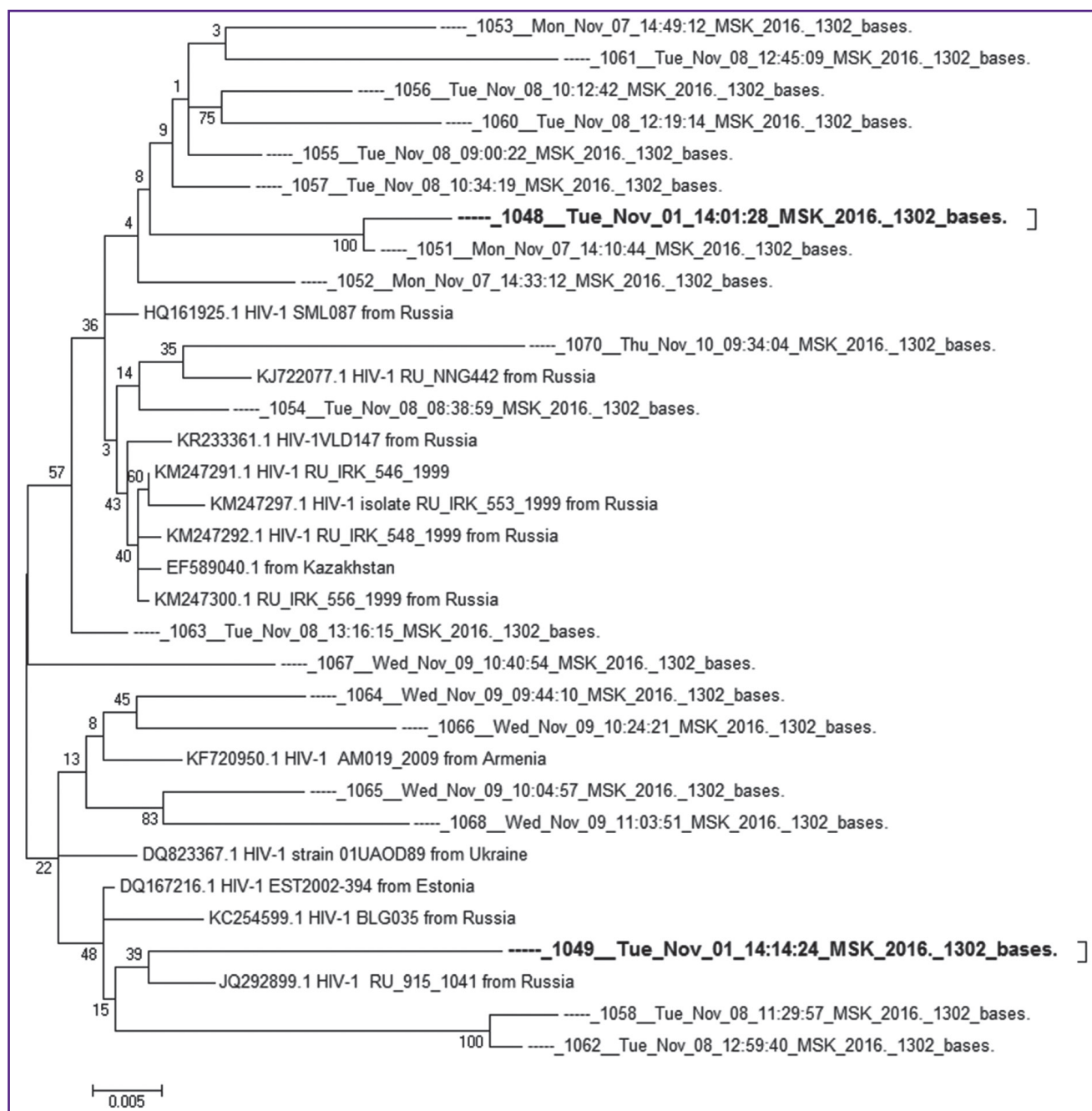
Результаты и обсуждение

Генотипирование ВИЧ и последующий филогенетический анализ являются важным дополнением, а иногда и единственным объективным доказательством наличия или отсутствия эпидемиологической связи между исследуемыми образцами. Они позволяют разобратся в сложных случаях при установлении причин и источника инфицирования ВИЧ. В нашем исследовании эффективность использования этих методов рассмотрена на конкретном случае.

Так, согласно сведениям, предоставленным сотрудниками Центра по профилактике и борьбе со СПИД (Центр СПИД) — одного из субъектов Приволжского федерального округа, 30.07.2016 г. при разборе системы для внутривенного введения, используемой для пациентки П. с ранее известным положительным ВИЧ-статусом, у медицинской сестры М. с ее слов (на момент аварии М. находилась одна в процедурном кабинете) произошла аварийная ситуация — укол дистальной фаланги указательного пальца правой верхней конечности. Экстренные мероприятия и пост-контактная химиопрофилактика проведены в полном объеме, экспресс-тестирование на ВИЧ-инфекцию на рабочем месте в момент аварии не выполнялось. Результаты предыдущего тестирования М. на маркеры ВИЧ-инфекции (апрель 2016 г.) были отрицательными. Иммуноблоттинг от 17.08.2016 г. показал сомнительный результат, от 06.09.2016 г. — положительный, поставлен диагноз «ВИЧ-инфекция, профессиональное инфицирование?».

С целью лабораторного подтверждения/опровержения данного факта в лаборатории Приволжского окружного центра СПИД выполнены генотипирование и последующий филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генома вирусов, выделенных из образцов плазмы крови исследуемой группы (медсестры М. и пациентки П.) и группы сравнения, а также образцов из базы GenBank.

Генетическое типирование установило, что все используемые вирусные изоляты, в том числе образцы исследуемой группы (№№1048 и №1049), относятся к субтипу А (А6) ВИЧ-1. Данная ситуация обусловила необходимость филогенетического анализа, который показал, что образцы №1048 и №1049 не группируются в отдельный кластер, для каждого из них обнаружены генетически более близкие образцы из группы сравнения (см. рисунок). Дистанция, рассчитанная между нуклеотидными последовательностями



Филогенетическое дерево образцов исследуемой группы (№№1048, 1049) и группы сравнения, построенное с использованием нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ-1

образцов исследуемой группы, составила 0,050, а между нуклеотидными последовательностями данных образцов и образцов из группы сравнения варьировала от 0,007 до 0,058 (среднее — 0,032). Таким образом, генетическая близость между образцами исследуемой группы не выше, чем между образцами этой группы и группы сравнения. Данный факт может свидетельствовать о низкой вероятности наличия эпидемиологической связи между медицинской сестрой М. и пациенткой П.

Вместе с тем, согласно данным, предоставленным также сотрудниками Центра СПИД, медицинская сестра М. могла иметь эпидемически значимые контакты с ВИЧ-инфицированным пациентом Н. (№1051 из группы сравнения), ранее состоявшим на диспансерном учете в Центре. Результаты проведенного филогенетического анализа позволили установить, что дистанция, рассчитанная между нуклеотидными последовательностями образца №1048 и образца №1051 — 0,007, свидетельствует о высокой степени

генетической близости данных изолятов. Они достоверно образовывали общий кластер на филогенетическом дереве (см. рисунок), что подтверждает наличие эпидемиологической связи между ними.

Таким образом, в данном конкретном случае проведенная молекулярно-генетическая экспертиза с использованием современных лабораторных технологий генотипирования и последующего филогенетического анализа позволила установить, что образец, полученный от медицинской сестры М. (№1048), генетически более близок с образцом из группы сравнения — пациентом Н. (№1051), чем с предполагаемым источником инфекции — пациенткой П. (№1049). Полученный вывод достоверно не подтверждает факта профессионального заражения ВИЧ-инфекцией.

Заключение

Генотипирование и последующий филогенетический анализ, используемые для молекулярно-генетической экспертизы, проводимой при подозрении на профессиональное инфицирование ВИЧ, не подтвердили генетического родства между образцами исследуемой группы и обнаружили генетически более близкие образцы из группы сравнения. Полученные результаты явились основанием для отказа в постановке диагноза профессионального инфицирования ВИЧ.

Применение данных современных молекулярно-генетических методов показало их практическую значимость и эффективность.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Шахгильдян В.И., Ядрихинская М.С., Сафонова А.П., Домонова Э.А., Шипулина О.Ю., Альварес-Фигероа М.В., Долгова Е.А., Тишкевич О.А. Структура вторичных заболеваний и современные подходы к их лабораторной диагностике у больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы* 2015; 1:

24–30. Shakhgildyan V.I., Yadrkhinskaya M.S., Safonova A.P., Domonova E.A., Shipulina O.Yu., Alvares-Figeroa M.V., Dolgova E.A., Tishkevich O.A. Pattern of secondary diseases and current approaches to their laboratory diagnosis in patients with HIV infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy* 2015; 1: 24–30.

2. Письмо Роспотребнадзора от 25.11.2014 г. №01/13850-14-27 «О мерах по предупреждению инфицирования ВИЧ при оказании медицинской помощи». *Pis'mo Rosпотреbnadzora ot 25.11.2014 g. No.01/13850-14-27 "O merakh po preduprezhdeniyu infitsirovaniya VICH pri okazanii meditsinskoy pomoshchi"* [Letter of the Rosпотреbnadzora dated November 25, 2014 No.01/13850-14-27 "On measures to prevent HIV infection in the provision of medical care"].

3. 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. *Журнал МедиАль* 2014; 2(12): 122–134. Zaytseva N.N., Efimov E.I., Nosov N.N., Parfenova O.V., Peksheva O.Yu. Modern molecular genetics research methods in epidemiological surveillance of HIV infection. *Medial'* 2014; 2(12): 122–134.

4. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Методические указания МУ 3.1.3342-16 «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией». М; 2016. Federal Service for Supervision of the Consumer Rights and Human Well-Being. *Metodicheskie ukazaniya MU 3.1.3342-16 "Epidemiologicheskii nadzor za VICH-infektsiy"* [Methodical instructions MU 3.1.3342-16 "Epidemiological surveillance of HIV infection"]. Moscow; 2016. URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71263114/>.

5. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство. Под ред. В.В. Покровского. М: ГЭОТАР-Медиа; 2013; 608 с. *VICH-infektsiya i SPID: natsional'noe rukovodstvo* [HIV infection and AIDS: a national guide]. Pod red. V.V. Pokrovskogo [Pokrovskiy V.V. (editor)]. Moscow: GEOTAR-Media; 2013; 608 p.

6. Сандырева Т.П., Герасимова Н.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Кувевда Д.А., Шипулин Г.А., Подымова А.С. Филогенетический анализ в эпидемиологических исследованиях случаев ВИЧ-инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2014; 19(1): 17–21. Sandyreva T.P., Gerasimova N.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kuevda D.A., Shipulin G.A., Podymova A.S. Phylogenetic analysis in epidemiological investigations of cases of HIV infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni* 2014; 19(1): 17–21.