

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Антонова Анастасия Александровна

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ФОРМЫ ВИЧ-1 НА СОВРЕМЕННОМ
ЭТАПЕ ЭПИДЕМИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Бобкова Марина Ридовна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Характеристика пандемии ВИЧ/СПИД	14
1.1.1 История ВИЧ-инфекции	14
1.1.2 Пути и факторы передачи ВИЧ-инфекции	15
1.1.3 Особенности патогенеза ВИЧ-инфекции.....	16
1.1.4 Эпидемиология ВИЧ-инфекции в мире	18
1.2 Характеристика ВИЧ-1	19
1.2.1 Строение вириона ВИЧ-1	20
1.2.2 Жизненный цикл вируса.....	21
1.2.3 Организация генома ВИЧ-1.....	24
1.2.3.1 Гены, кодирующие неструктурные белки ВИЧ-1	24
1.2.3.2 Гены, кодирующие структурные белки ВИЧ-1	26
1.3 Антиретровирусная терапия.....	27
1.3.1 Краткий обзор антиретровирусных препаратов, используемых в настоящее время, и механизм их действия.....	28
1.4 Мутации лекарственной устойчивости	30
1.4.1 Механизмы действия мутаций лекарственной устойчивости.....	32
1.4.2 Мониторинг лекарственной устойчивости ВИЧ-1.....	33
1.5 Генетическое разнообразие ВИЧ	34
1.5.1 Группы, субтипы, варианты ВИЧ.....	35
1.6 Рекомбинантные формы ВИЧ	38
1.6.1 Механизм формирования рекомбинантных форм ВИЧ.....	38
1.6.2 Влияние рекомбинации на свойства ВИЧ-1 и течение заболевания.....	40
1.6.3 Рекомбинантные формы ВИЧ-1 и эффективность терапии	41
1.7 Молекулярно-генетическая характеристика эпидемии ВИЧ-1	46
1.7.1 Распространение генетических вариантов ВИЧ-1 в мире.....	46

1.7.2 Распространение генетических вариантов ВИЧ-1 на территории Российской Федерации	49
1.7.3 Рекомбинантные формы ВИЧ-1 на территории Российской Федерации ...	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
2.1 Объект исследования.....	53
2.2 Материал исследования	54
2.2.1 Сбор биоматериала.....	54
2.2.2 Получение лимфоцитов	54
2.2.3 Получение плазмы.....	55
2.3 Методы исследования	56
2.3.1 Экстракция вирусной РНК и провирусной ДНК.....	56
2.3.1.1 Экстракция РНК ВИЧ-1 из плазмы цельной крови.....	56
2.3.1.2 Экстракция провирусной ДНК из лимфоцитов	57
2.3.1.3 Экстракция провирусной ДНК в составе геномной ДНК человека из замороженной цельной крови.....	58
2.3.2 Амплификация фрагментов гена <i>pol</i> ВИЧ-1	58
2.3.3 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле и визуализация результатов.....	63
2.3.4 Очистка ПЦР-продукта.....	64
2.3.5 Секвенирование продуктов амплификации.....	64
2.4 Биоинформатические методы.....	67
2.4.1 Обработка нуклеотидных последовательностей.....	67
2.4.2 Определение генетических вариантов ВИЧ-1	67
2.4.3 Рекомбинационный анализ.....	68
2.4.4 Филогенетический анализ	70
2.4.5 Определение мутаций лекарственной устойчивости.....	71
2.5 Статистический анализ данных и их визуализация	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	73
3.1 Характеристика ВИЧ-инфицированных пациентов, включенных в исследование	73

3.2 Молекулярно-генетический анализ образцов ВИЧ-1.....	76
3.2.1 Анализ нуклеотидных последовательностей области гена <i>pol</i> исследуемых образцов ВИЧ-1	76
3.2.2 Субтипология принадлежности расшифрованных участков генома ВИЧ-1 ..	76
3.3 Анализ выявленных рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации	78
3.3.1 Филогенетический анализ рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных на территории Российской Федерации	79
3.3.2 Выявленные рекомбинантные формы ВИЧ-1 на территории Российской Федерации	87
3.3.3 Анализ уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных на территории Российской Федерации	88
3.3.4 Оценка распространенности ВИЧ-1 рекомбинантных форм на современном этапе эпидемии в Российской Федерации	100
3.4 Анализ мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в составе гена <i>pol</i> и их связь с генетическим вариантом вируса.....	103
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	115
ВЫВОДЫ	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	123
Приложение А Перечень антиретровирусных препаратов и обозначающих их сокращений.....	145
Приложение Б Регистрационные номера использованных в работе нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1.....	146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день ВИЧ-инфекция остается одной из ключевых проблем глобального общественного здравоохранения. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), по состоянию на конец 2021 года общемировое число людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВС), составило около 38,4 миллионов человек [5]. В Российской Федерации данный показатель составил 1 137 596 человек [15].

От момента регистрации первого случая ВИЧ-инфекции в 1981 году (США) и до настоящего времени данное заболевание перешло из разряда смертельных в хронические и контролируемые благодаря разработке и применению целого ряда антиретровирусных препаратов (АРВП), действие которых направлено на подавление размножения вируса и, как следствие, снижение вирусной нагрузки в организме инфицированного.

В 2014 году Объединенной программой Организации Объединенных Наций (ООН) по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС, UNAIDS) была принята стратегия «90-90-90» (ныне «95-95-95»), согласно которой 90% людей, живущих с ВИЧ, должны знать о своем статусе; 90% из них – получать антиретровирусную терапию (АРТ), и 90% из пациентов, находящихся на терапии, – достигнуть неопределяемых показателей вирусной нагрузки. Цель данной стратегии направлена на существенное сокращение возникновения и распространения новых случаев ВИЧ-инфекции в мире и в перспективе – на искоренение (то есть отсутствие новых случаев) СПИДа к 2030 году [18].

Одним из серьезных препятствий на пути достижения успеха лечения при применении антиретровирусной терапии является феномен лекарственной устойчивости ВИЧ-1, который характеризуется наличием в геноме вируса мутаций, оказывающих влияние на его чувствительность к лекарственным препаратам. Общность методологии позволяет считать слежение за лекарственной устойчивостью ВИЧ-1 частью работы по молекулярно-

генетическому мониторингу, предназначенному для определения генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на определенной территории или в пределах групп риска. Все это позволяет прогнозировать эпидемическую ситуацию и осуществлять своевременное вмешательство в ход эпидемического процесса. Таким образом, молекулярно-генетический мониторинг эпидемии ВИЧ-инфекции является приоритетной задачей мирового научного сообщества [2].

Степень разработанности темы исследования

Работы по молекулярно-генетическому мониторингу на территории Российской Федерации были начаты с момента регистрации первого случая ВИЧ-инфекции у гражданина Советского Союза (проживавшего на территории г. Москвы) в 1987 году. Уже в первые годы масштабной эпидемии ВИЧ-1 в России (1995–1998 гг.) был отмечен ее уникальный характер: она была вызвана единичными случаями заражения вирусом подтипа IDU-A (injecting drug use-A, в настоящее время – А6), распространившимся в короткие сроки по всем регионам страны и не испытавшим при этом почти никаких генетических преобразований [22]. В связи с этим эпидемия ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации долгое время характеризовалась низким генетическим разнообразием вирусных вариантов с преобладанием вирусов суб-субтипа А6. В настоящее время на территории России циркулирует более 10 генетических вариантов ВИЧ-1, в том числе рекомбинантных форм CRF02_AG, CRF03_AB, CRF63_02A6 и других, что создает благоприятные условия для формирования вирусов, новых уникальных рекомбинантных форм [9].

Вирусы рекомбинантных форм играют важную роль в пандемии ВИЧ-инфекции по целому ряду причин. Перестройка вирусного генома путем рекомбинации может оказывать влияние на биологические свойства вируса, способствовать формированию множественной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 за счет объединения целого ряда мутаций в пределах одного генома, а также выступать катализатором передачи и распространения устойчивых вариантов вируса среди пациентов, ранее не получающих АРТ. Такое сочетанное действие рекомбинационных и мутационных процессов является основой для

эволюции вируса иммунодефицита в целом и может значительно усложнить процессы диагностики, профилактики и лечения ВИЧ-инфекции, значительно снижая эффективность применяемой антиретровирусной терапии.

В связи со всем вышеизложенным, молекулярно-генетический мониторинг ВИЧ-1 является важной задачей мирового научного сообщества, позволяя определить основные генетические варианты вируса (включая его рекомбинантные формы), циркулирующие в пределах определенной территории, а также оценить их устойчивость к применяемой на данной территории антиретровирусной терапии.

Цель исследования – выявление и детальный анализ рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации в период с 2011 по 2020 год.

Задачи исследования:

1. Выполнить анализ нуклеотидных последовательностей области гена *pol*, кодирующей ферменты вируса – протеазу и обратную транскриптазу, образцов ВИЧ-1, полученных на территории Российской Федерации в период 2011–2020 гг.
2. Охарактеризовать генетическое разнообразие рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных на территории Российской Федерации.
3. Изучить структуру генома уникальных рекомбинантов, выявленных на территории Российской Федерации.
4. Провести оценку распространенности рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации в период с 2011 по 2020 год.
5. Провести сравнительный анализ первичной лекарственной устойчивости к основным классам антиретровирусных препаратов для ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов, циркулирующих на территории России.
6. Оценить генетическое разнообразие и факторы риска передачи первично устойчивых вариантов ВИЧ-1 рекомбинантных форм.

Научная новизна

При выполнении данного исследования были проанализированы более 3000 нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, полученных в рамках молекулярно-генетического мониторинга эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации за десятилетний период (2011–2020 гг.); впервые показан вклад вирусов рекомбинантных форм в генетическое разнообразие ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии.

Впервые проведен детальный анализ структуры генома с определением точек рекомбинации для выявленных на территории России уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1.

Впервые осуществлен анализ первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов, и выявлены статистически значимые различия при сравнении их профилей резистентности, а также выявлены мутации лекарственной устойчивости (МЛУ), обладающие субтипической спецификой.

Впервые охарактеризована когорта пациентов, инфицированных первично устойчивыми вариантами ВИЧ-1 рекомбинантных форм.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты дополнили существующие на сегодняшний день представления об эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации, показав ее переход от генетически однородной – к эпидемии с высоким генетическим разнообразием вируса. Выявлена достоверная тенденция к увеличению частоты встречаемости ВИЧ-1 рекомбинантных форм на территории Российской Федерации с течением времени.

Выявленные статистически значимые различия распространенности лекарственной устойчивости среди ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов позволяют оценить и спрогнозировать эффективность применяемых в настоящее время схем антиретровирусной терапии.

Анализ когорты пациентов, инфицированных первично устойчивыми вариантами ВИЧ-1 рекомбинантных форм, позволяет определить наиболее

значимые в эпидемическом отношении категории лиц, способных оказывать значительное влияние на распространение данных вариантов вируса.

Результаты оценки распространенности и анализа первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов являются основополагающими данными при выборе наиболее эффективных схем антиретровирусной терапии на популяционном уровне.

Все полученные в ходе настоящего исследования нуклеотидные последовательности были депонированы в международную базу данных генотипов GenBank [90] (Приложение Б).

Внедрение полученных результатов в практику

Полученные результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры вирусологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России), а также в научно-практическую деятельность государственного казенного учреждения здравоохранения Московской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями» при работе с когортой потребителей инъекционных наркотиков (ГКУЗ МО ЦПБ СПИД ИЗ).

В ходе выполнения данной диссертационной работы также была разработана и внедрена в лабораторную практику стандартная операционная процедура (СОП): «Метод экстракции геномной ДНК человека с интегрированной ДНК ВИЧ-1 из биологического материала (замороженной цельной крови)».

Методология и методы исследования

Методологическая основа диссертационной работы спланирована согласно поставленной цели исследования. Для решения поставленных задач на всех этапах исследования применялись современные молекулярные и статистические методы: экстракции провирусной ДНК ВИЧ-1 из лимфоцитов и цельной

замороженной крови, РНК вируса – из плазмы крови; ПЦР-амплификация (Nested PCR) целевых фрагментов генома; очистка ПЦР-продуктов на магнитных частицах или колоночным методом; автоматическое секвенирование по Сэнгеру; а также современные биоинформатические методы: множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, определение их субтиповой принадлежности, филогенетический и рекомбинационный анализ и анализ лекарственной устойчивости ВИЧ-1. Для оценки полученных результатов использовали классические методы прикладной статистики; визуализацию полученных данных осуществляли с применением программного обеспечения RStudio.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Эпидемия ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации на современном этапе характеризуется высоким генетическим разнообразием ВИЧ-1.
2. Вирусы рекомбинантных форм распространяются как в результате единичных заносов на территорию Российской Федерации, так и множественных случаев передачи внутри страны.
3. Совместная циркуляция ВИЧ-1 разных генетических вариантов на территории Российской Федерации способствует формированию уникальных рекомбинантных форм, образованных, в первую очередь, между вирусами наиболее распространенных субтипов – А6 и В.
4. Наблюдается тенденция к росту частоты встречаемости рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации с течением времени.
5. Распространенность первичной резистентности и профиль мутаций лекарственной устойчивости у ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов имеют статистически значимые различия: распространенность первичной лекарственной устойчивости среди ВИЧ-1 рекомбинантных форм выше, чем у вирусов «чистых» субтипов; среди вирусов рекомбинантных форм преобладает мутация К103N, среди вирусов «чистых» субтипов – М184V.

6. В когорте пациентов, инфицированных первично устойчивыми вариантами ВИЧ-1 рекомбинантных форм, преобладают потребители инъекционных наркотиков.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена репрезентативным объемом выборки ($N = 3178$ нуклеотидных последовательностей) и применением адекватных поставленным задачам методов исследования. Модель замещения нуклеотидов при выполнении филогенетического анализа выбирали на основании информационного критерия Акаике. Оценка достоверности выведенных филогений проводилась с использованием статистических методов численного ресэмплинга (bootstrap) и критерия приблизительного отношения правдоподобия Шимодайры-Хасегавы (SH-aLRT) с 1000 послестартовых итераций. Кластеры с поддержкой SH-aLRT более 0,9 считались достоверно установленными.

Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в медико-биологических исследованиях 5%-ом уровне значимости ($p < 0,05$).

Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: 17-ая Европейская конференция по СПИДу (6–9 ноября 2019 г.; Базель, Швейцария) – постерный доклад; 18-ая Европейская встреча по ВИЧ и гепатиту (28–30 октября 2020 г.; Париж, Франция) – тезис и постерный доклад; IX Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (08–11 ноября 2022 г.; Сочи, Россия) – тезис и постерный доклад.

Декларация личного участия автора

Разработка методологии данного исследования проводилась автором самостоятельно. Сбор материалов для анализа с подробными клинико-эпидемиологическими данными осуществляли сотрудники федеральных и региональных Центров по профилактике и борьбе со СПИДом.

Выделение РНК ВИЧ-1 или провирусной ДНК, реакция обратной транскрипции, полимеразная цепная реакция (ПЦР), очистка продуктов

амплификации, секвенирование и очистка продуктов секвенирования проводились автором лично и совместно с сотрудниками лаборатории вирусов лейкозов подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России – к.б.н. Лебедевым А.В., к.б.н. Лагой В.Ю., Громовым К.Б., Ожмеговой Е.Н., Тумановым А.С., Ким К.В., д.б.н. Казенновой Е.В.

Все последующие этапы работы, включая филогенетический и рекомбинационный анализ, а также анализ лекарственной устойчивости ВИЧ-1 проведены автором лично.

Анализ и обсуждение полученных результатов также выполнены лично автором, самостоятельно или при непосредственном участии автора подготовлены публикации по материалам исследования. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее девяноста процентов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

1.5.10. «Вирусология»

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 4, п. 8 и п. 10 паспорта научной специальности 1.5.10. «Вирусология».

Публикации

По результатам диссертационной работы опубликовано 9 научных трудов, из них – 4 статьи в научных изданиях, рекомендованных ВАК, 3 статьи в зарубежных изданиях и 2 тезиса в сборниках материалов всероссийских и международных конференций, симпозиумов и съездов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и двух приложений. Работа иллюстрирована 17 рисунками и содержит 11 таблиц. Список литературы состоит из 200 источников, из них 14 отечественных и 186 зарубежных.

Благодарности

Автор приносит благодарность своим коллегам по лаборатории вирусов лейкозов и сотрудникам подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, а именно: д.б.н. Бобковой М.Р., д.б.н. Казенновой Е.В., д.б.н. Прилипову А.Г., к.б.н. Лебедеву А.В., к.б.н. Лаге В.Ю., Громову К.Б., Ожмеговой Е.Н., Туманову А.С., Ким К.В. Автор благодарен всем врачам и руководителям федеральных и региональных Центров по профилактике и борьбе со СПИДом за предоставление материалов для исследования и сопровождающих их клинико-эпидемиологических данных. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю д.б.н. Бобковой Марине Ридовне за поддержку и помощь при написании диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика пандемии ВИЧ/СПИД

1.1.1 История ВИЧ-инфекции

Синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) был впервые признан новым заболеванием в 1981 году после ряда сообщений о неизвестной ранее болезни иммунной системы, выявленной среди молодых гомосексуалистов в Лос-Анжелесе и Нью-Йорке и сопровождавшейся проявлением оппортунистической инфекции *Pneumocystis carinii pneumonia (PCP)* (пневмоцистная пневмония) и редким злокачественным новообразованием *Kaposi's Sarcoma* (саркома Капоши) [100; 185].

В 1982 году данное заболевание получило свое официальное название *Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)* – синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) (Центр по контролю и профилактике заболеваний США, CDC), так как данный синдром отмечался у ранее здоровых людей с иммунным статусом в пределах нормы [50].

В 1983 году, благодаря двум независимым исследованиям (Люк Монтанье (Франция) и Роберт Галло (США)), была установлена вирусная этиология заболевания [27; 83].

В 1986 году Международный комитет по таксономии вирусов присвоил инфекционному агенту, вызывающему СПИД, официальное название – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (англ. Human Immunodeficiency Virus (HIV)) [49].

Также в 1986 году группой ученых был открыт новый вирус, получивший название ВИЧ-2 (HIV-2) [55].

Вирусы иммунодефицита первого и второго типа тесно связаны между собой и являются представителями одного рода – *Lentivirus*, однако ВИЧ-1 распространен повсеместно и играет большую роль в глобальном эпидемическом процессе [108].

Сравнительные исследования ВИЧ-1 и ВИЧ-2 показали, что вирусы обоих типов имеют одинаковые пути передачи, а также могут быть ассоциированы с аналогичными оппортунистическими инфекциями и приводят к СПИДу. При этом ВИЧ-2 характеризуется более низким уровнем трансмиссивности, низким или неопределяемым уровнем вирусной нагрузки (ВН), более длительным латентным периодом, а также более медленным прогрессированием заболевания до стадии СПИДа, чем ВИЧ-1 [188].

1.1.2 Пути и факторы передачи ВИЧ-инфекции

ВИЧ-инфекция представляет собой зооноз, то есть первичным хозяином вируса являлись животные. Среди теорий о передаче вируса от животного в популяцию человека преобладает «теория охотника», согласно которой вирус был передан человеку через поврежденные участки кожи при обработке и употреблении в пищу сырого мяса зараженных шимпанзе [167].

В 1985 году было установлено, что основными факторами передачи ВИЧ являются жидкие среды организма человека, такие как кровь и ее компоненты, предсеменная жидкость, сперма, вагинальный секрет и грудное молоко, а также исключались способы передачи вируса посредством бытовых контактов, через пищу, воду, воздух и поверхности [34].

Основными путями передачи ВИЧ-инфекции являются [5]:

1. половой путь (как при гетеро- (ГТСК), так и при гомосексуальных контактах);
2. парентеральное заражение;
3. вертикальный путь передачи от матери к ребенку.

Половой и вертикальный пути передачи относятся к естественному механизму передачи ВИЧ-инфекции. В случае полового пути передачи вирус, содержащийся в крови и половых секретах инфицированного человека, может проникнуть через микроповреждения на слизистых оболочках здорового партнера. Риск заражения ВИЧ при половом пути передачи зависит от типа

контакта (вагинальный, анальный, оральный) и роли партнера (вводящий/принимающий партнер), а также от стадии ВИЧ-инфекции инфицированного партнера и наличия оппортунистических заболеваний, передающихся половым путем, которые в значительной степени увеличивают данный риск [5].

Вертикальный путь передачи обуславливает заражение здорового ребенка от ВИЧ-инфицированной матери как внутриутробно, так и при прохождении ребенка через родовые пути, а также заражение в процессе грудного вскармливания [121].

Парентеральный путь представляет собой искусственный механизм передачи ВИЧ-инфекции при использовании нестерильных шприцов и игл потребителями инъекционных наркотиков (ПИН), а также нестерильного контаминированного инструментария (шприцы, катетеры) в медицинской практике [5].

Также существует вероятность заражения ВИЧ при переливании инфицированной крови или ее компонентов (гемотрансфузионный путь) и в результате пересадки инфицированных органов (трансплантационный) [5].

1.1.3 Особенности патогенеза ВИЧ-инфекции

Инфицирование человека вирусом иммунодефицита происходит при попадании вирусосодержащего материала непосредственно в кровь и/или на слизистые оболочки организма человека. На поверхности клеток-мишеней расположены CD4-рецепторы и/или корецепторы CCR5, которые вирус использует для своего проникновения. Данные рецепторы содержатся на поверхности преимущественно Т-лимфоцитов (хелперов), а также моноцитов, макрофагов и дендритных клеток; небольшое количество CD4-рецепторов отмечается у В-лимфоцитов, естественных киллеров, клеток сосудистого эндотелия, эпителия слизистой оболочки кишечника и клеток центральной нервной системы (ЦНС) – нейронов и клеток микроглии [110]. Основной

мишенью ВИЧ-1 являются активированные CD4+ Т-клетки иммунной системы и макрофаги [58].

Основным феноменом патогенеза ВИЧ-инфекции является снижение CD4+ Т-лимфоцитов, приводящее в итоге к угнетению всех звеньев иммунной системы [148] (Рисунок 1).

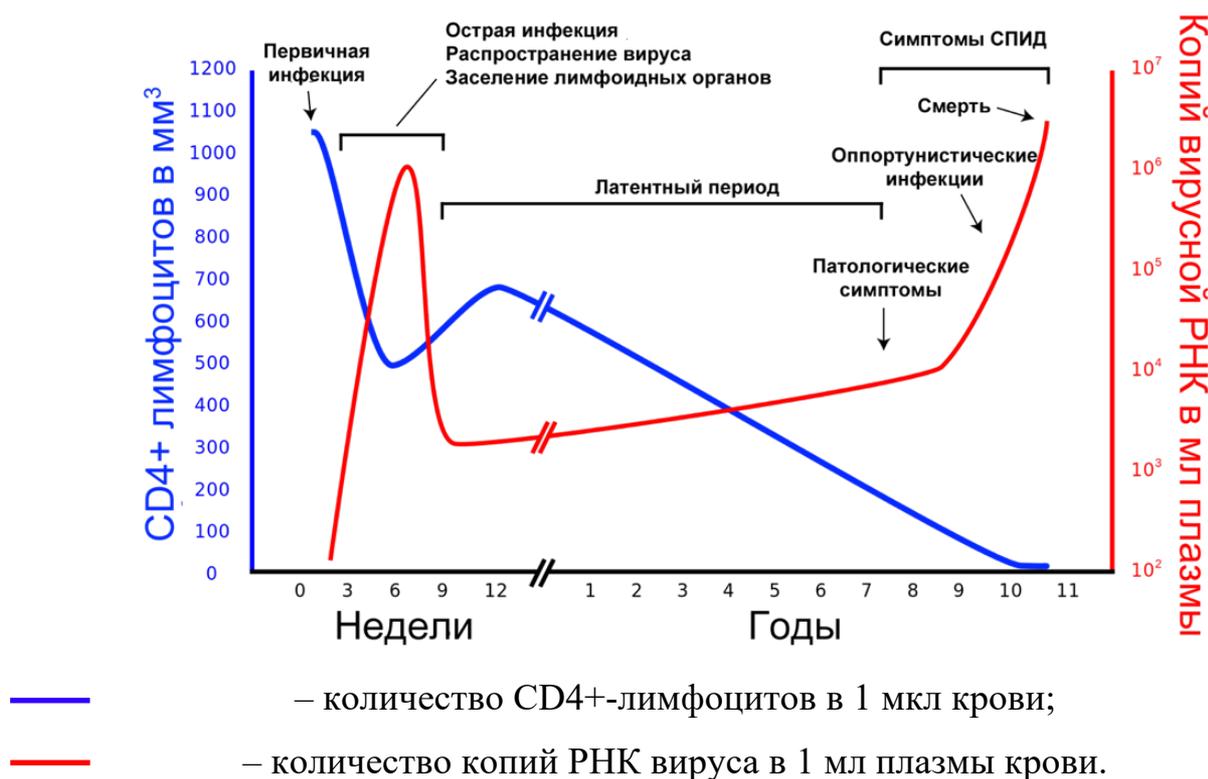


Рисунок 1 – Динамика количества CD4+-лимфоцитов и копий РНК вируса в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции [148]

Ход естественного течения ВИЧ-инфекции в отсутствие терапии (или при отсутствии приверженности к терапии) характеризуется стадийностью [13]:

1 стадия – стадия инкубации: данная стадия инициируется проникновением вируса в клетки-мишени и лимфоидный аппарат человека, где затем вирус начинает свою активную репликацию. Процесс продолжается до появления первых клинических проявлений острой инфекции и/или выработки антител и занимает в среднем 3 месяца.

2 стадия – стадия первичных проявлений: развивается вiremия – вирус выходит в кровоток, но также сохраняется и в лимфатической ткани. На фоне

временного снижения CD4-лимфоцитов может начаться развитие таких вторичных заболеваний как ангина, бактериальная пневмония, кандидоз, однако все они быстро поддаются лечению (в среднем продолжительность клинических проявлений составляет 2–3 недели).

3 стадия – субклиническая стадия: отмечается постепенное снижение уровня CD4-лимфоцитов (50–70 кл/мкл в год) без каких-либо клинических проявлений (средняя продолжительность стадии занимает 6–7 лет).

4 стадия – стадия вторичных заболеваний: происходит реактивация вируса, в результате которой наступает вторичная неконтролируемая репликация с большой вирусной нагрузкой. Снижение уровня CD4-лимфоцитов (до 500 кл/мкл и ниже) приводит к развитию вторичных (оппортунистических) заболеваний инфекционного и онкологического характера.

1.1.4 Эпидемиология ВИЧ-инфекции в мире

По оценке UNAIDS, общемировое число людей, живущих с ВИЧ/СПИД, в 2021 году составило 38,4 [33,9–43,8] миллионов человек [17].

Согласно региональным данным, страны *Восточной и Южной Африки* остаются наиболее пораженным регионом в мире: в 2021 году здесь проживало 20,6 [18,9–23,0] млн человек с ВИЧ-инфекцией, что составило 53,6% от общемирового числа ЛЖВС, при этом доля смертности вследствие СПИДа в данном регионе была равна 43,1% от общего мирового числа [17].

Число людей, живущих с ВИЧ, в других крупных регионах мира, таких как *Западная и Центральная Европа и Северная Америка* и *Восточная Европа и Центральная Азия* (по классификации UNAIDS) составило 2,3 [1,9–2,6] и 1,8 [1,7–2,0] млн человек, соответственно [17].

По данным ВОЗ, в последние годы в целом наблюдается стабилизация пандемии ВИЧ-инфекции, что является закономерным следствием ряда факторов: общим увеличением масштабов применяемой АРТ, разработкой и внедрением антиретровирусных препаратов нового поколения, а также разработкой стратегий и

программ по борьбе и профилактике ВИЧ-инфекции, отходом от стигматизации ЛЖВС. Однако, вопреки общемировой тенденции в настоящее время эпидемия ВИЧ-инфекции продолжает стремительно развиваться в регионе *Восточной Европы и Центральной Азии*, при этом абсолютное лидерство по числу новых зарегистрированных случаев заражения ВИЧ принадлежит Российской Федерации, – общее число ЛЖВС в регионе составило 1,8 [1,7–2,0] млн человек, из них около 160 тысяч новых случаев заражения ВИЧ были зарегистрированы в 2021 году [5; 17].

1.2 Характеристика ВИЧ-1

Вирус иммунодефицита человека относится к роду лентивирусов – *Lentivirus* семейства ретровирусов *Retroviridae* (от лат. – *retro* – обратный). Характерной особенностью представителей данного семейства является осуществление синтеза в направлении РНК→ДНК с использованием вирусного фермента – РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы, ОТ) [77; 108].

1.2.1 Структура вириона ВИЧ-1

Вирион ВИЧ-1 представляет собой частицу сферической формы диаметром около 100–180 нм, обладающую трехслойной структурой (Рисунок 2).

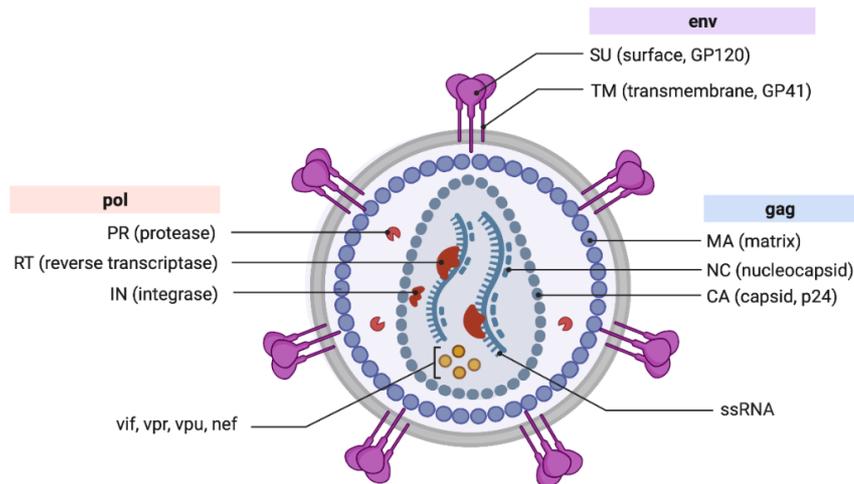


Рисунок 2 – Структура вириона ВИЧ-1 (Адаптировано “Genome and Structure” в BioRender.com (2022); <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

Внешний слой вириона представлен билипидной оболочкой клеточного происхождения и пронизываемыми ее гликопротеиновыми тримерными комплексами, образованными трансмембранным (ТМ, gp41) и наружным (SU, gp120) гликопротеинами [43; 108; 122; 145]. Данные комплексы участвуют в процессах прикрепления вирусной частицы к поверхности клетки-мишени и их дальнейшего слияния [33; 123; 194].

Под липидной оболочкой в зрелом вирионе последовательно расположены: матриксный слой, образованный тримерами матриксного белка (МА, p17), и капсид вируса, имеющий форму усеченного конуса и образованный капсидным белком (СА, p24) [84; 108].

Внутри капсида расположены две идентичные «позитивные» молекулы линейной одноцепочечной вирусной РНК, прочно связанные с белком

нуклеокапсида (NC, p7), и ферменты вируса: обратная транскриптаза (RT) и интеграз (IN) [77; 84; 108].

Кроме вышеуказанных компонентов, внутри зрелого вириона также заключены неструктурный белок Vpr, участвующий в процессах размножения и сборки вирионов ВИЧ-1 и препятствующий действию противовирусных систем, а также вирусная протеаза (PR) и молекулы клеточных белков (актин, циклофилин А (СурА)). Циклофилин А участвует в процессах прикрепления матричного белка p17 и его укладки в составе капсида [84; 105; 126; 154].

1.2.2 Жизненный цикл вируса

Жизненным циклом вируса называется период от его проникновения в клетку-мишень до образования новых вирусных частиц, способных осуществлять дальнейшее инфицирование новых клеток. Жизненный цикл ВИЧ-1 можно разделить на несколько следующих друг за другом этапов (Рисунок 3):

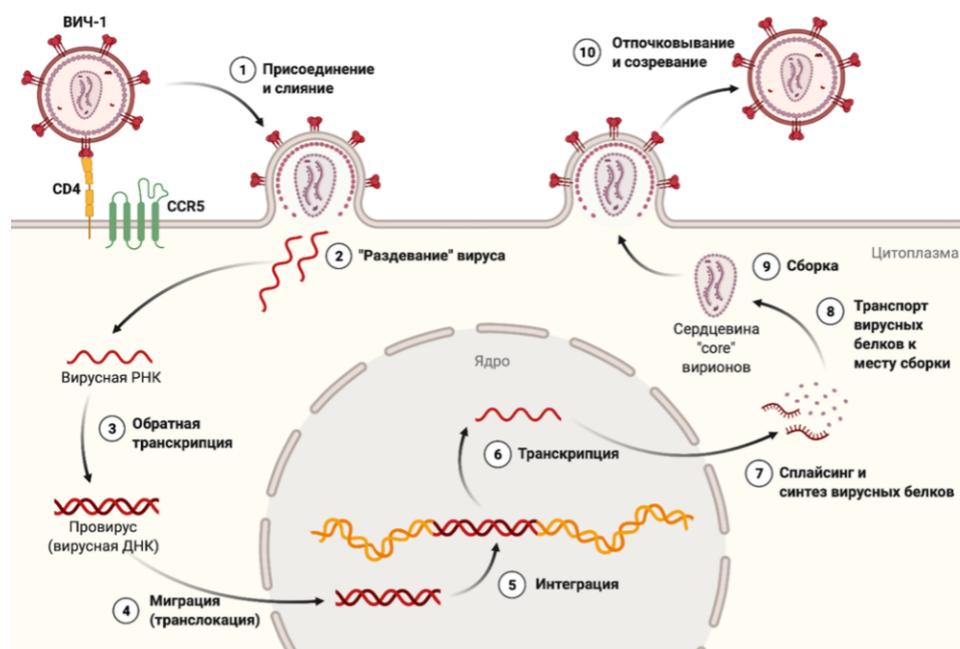


Рисунок 3 – Жизненный цикл ВИЧ-1 (Адаптировано “HIV Replication Cycle” в BioRender.com (2022); <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

1. **Присоединение вируса** к рецепторам клеток-мишеней и последующее **слияние** их мембран. Основным рецептором для прикрепления ВИЧ-1 к поверхности клеток-мишеней является CD4, с ним первоначально связывается поверхностный гликопротеин вируса gp120, затем происходит его связывание с корецептором CCR5 или CXCR4, что активирует конформационные изменения gp41 и в результате приводит к слиянию мембран вируса и клетки [48; 130].

Существует классификация ВИЧ-1 в зависимости от его способности связываться с определенными корецепторами:

- R5-тропные вирусы связывают исключительно корецептор CCR5;
- X4-тропные – только CXCR4-рецептор;
- R5X4-тропные – способны ко взаимодействию с обоими корецепторами [58; 194]. Наиболее преобладающими являются R5- и R5X4-тропные варианты ВИЧ [97].

2. **«Раздевание»** вируса – после того, как мембраны вируса и клетки-мишени слились, начинается процесс освобождения вирусной РНК от белков нуклеокапсида и капсида под действием протеолитических ферментов клетки [2].

3. **Обратная транскрипция** вирусной РНК представляет собой процесс синтеза двуцепочечной ДНК-копии вирусного генома с использованием РНК ВИЧ-1 в качестве матрицы и происходит при участии вирусного фермента обратной транскриптазы (ОТ, RT). Данный этап характеризуется частым возникновением мутаций, которые незамедлительно закрепляются в потомстве вируса [54; 77; 108].

4. **Миграция (транслокация)** полученной ДНК-копии в ядро клетки хозяина происходит в составе преинтеграционного комплекса (PIC), который включает в себя ферменты вируса – обратную транскриптазу и интегразу, – а также матриксный и нуклеокапсидный белки и вспомогательный белок Vpr [2; 77; 108].

5. **Интеграция** вирусной ДНК в хромосомную ДНК клетки осуществляется с помощью фермента ВИЧ-1 – интегразы. Интегрированная ДНК получает название провирусной [61; 77; 108].

6. **Транскрипция** провирусной ДНК происходит в ядре инфицированной клетки с участием клеточного фермента – РНК-полимеразы [2; 77; 108].

7. **Сплайсинг РНК.** Сплайсированные варианты мРНК необходимы для синтеза регуляторных и вспомогательных белков ВИЧ-1 и структурного белка Env, для синтеза других структурных белков (Gag и Pol) требуется несплайсированная мРНК [69].

8. **Синтез** вирусных белков осуществляется в цитоплазме клетки. Структурные белки ВИЧ-1 синтезируются в виде длинных молекул-предшественников Gag, Gag-Pol и Env, которые в дальнейшем «нарезаются» вирусной протеазой (для Gag, Gag-Pol) и протеазой клетки (для Env) до отдельных вирусных белков [2; 69; 108].

Финальными этапами жизненного цикла ВИЧ-1 являются [2; 81]:

9. **Транспорт** синтезированных вирусных белков к месту сборки новых вирионов, их **упаковка и сборка**;

10. **Отпочковывание и созревание** новых вирусных частиц.

1.2.3 Организация генома ВИЧ-1

Каждая из двух молекул РНК, образующих геном ВИЧ-1, состоит из 9719 нуклеотидных оснований (н. о.) и включает 9 генов (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat*, *env*, *nef*), которые, в свою очередь, кодируют 15 вирусных белков (p17 MA, p24 CA, p7 NC, p6; p10 PR, p66, p51 RT, p32 IN; gp120 SU, gp41 TM; p23 Vif; p15 Vpr; p16 Vpu; p19 Rev; p14 Tat, p27 Nef) [108] (Рисунок 4).

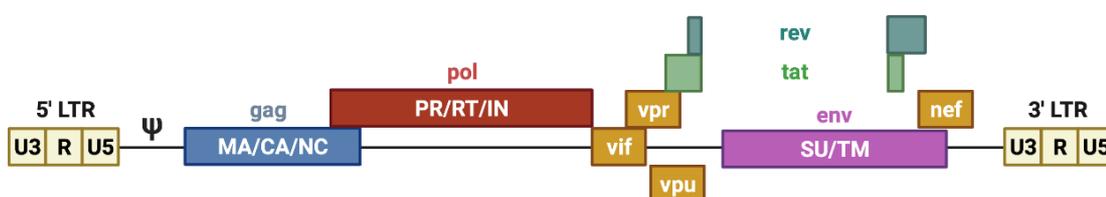


Рисунок 4 – Структура генома ВИЧ-1 (Адаптировано “Genome and Structure” в BioRender.com (2022); <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

Три основных гена *gag*, *pol* и *env* кодируют белки, необходимые для формирования новых вирионов, – структурные белки. Остальные шесть генов кодируют регуляторные (Rev и Tat) и вспомогательные белки (Vif, Vpr, Vpu и Nef) [2; 108].

На обоих концах геномных РНК расположены нетранслируемые области – «длинные концевые повторы» (LTR) [2; 108].

1.2.3.1 Гены, кодирующие неструктурные белки ВИЧ-1

Неструктурные белки ВИЧ-1 можно классифицировать на регуляторные и вспомогательные в зависимости от выполняемых ими функций [2].

К регуляторным белкам относятся Tat и Rev, основной их функцией является регуляция процессов экспрессии вирусного генома. За синтез регуляторных белков ответственны одноименные гены *tat* и *rev*. Белок Tat (трансактиватор транскрипции ВИЧ-1) играет решающую роль в процессе

вирусной транскрипции с 5'-LTR, повышая процессивность РНК-полимеразы. Белок Rev (регулятор вирусной экспрессии) регулирует процесс быстрого переноса несплайсированных или частично сплайсированных мРНК из ядра в цитоплазму, что позволяет осуществить синтез остальных белков вируса [103; 159].

Гены *vif*, *vpr*, *vri* и *nef* кодируют одноименные вспомогательные белки, которые играют важную роль в патогенезе ВИЧ и его уходе от иммунного ответа организма [2; 108].

Белок Vif участвует в стабилизации нуклеопротеинового комплекса, ускоряет транспорт РИС в клеточное ядро, а также блокирует клеточный белок APOBEC3G, обладающий дезаминазной активностью, приводящей к гипермутациям (при множественной замене G на A) и гибели вирусного генома [31; 177].

Основной функцией белка Vpr является подготовка ядерной мембраны к транслокации РИС. Также Vpr, наряду с другими вирусными и клеточными белками, участвует в активации LTR [192].

Белки Vri и Nef называют главными факторами патогенности ВИЧ-1. Экспрессия Vri способствует деградации молекул CD4-рецепторов в эндоплазматическом ретикулуме при образовании убиквитин-лигазных комплексов, что создает благоприятные условия для беспрепятственной миграции gp160 к поверхности клетки; Vri стимулирует высвобождение новых вирусных частиц путем инактивации клеточного белка CD317/BST-2 (tetherin), способного к удержанию дочерних вирионов на поверхности клетки [107; 161].

Роль Nef также связана со снижением поверхностных концентраций CD4 и HLA классов I и II, но уже посредством эндоцитоза и последующей деградации в лизосомах [131].

1.2.3.2 Гены, кодирующие структурные белки ВИЧ-1

Ген *gag* кодирует белки ВИЧ-1 в виде общего предшественника Gag размером 55 кДа (p55). В ходе созревания вирусных частиц, в процессе протеолиза, p55 нарезается на следующие белки, более мелкого размера: p6, p7, p24 и p17, формирующие сердцевину, капсид и матрикс вириона, соответственно [2; 81].

За геном *gag* в общей структуре генома ВИЧ-1 следует ген *pol*, продуктами которого являются три фермента вируса – протеаза, обратная транскриптаза и интеграз. Все они считываются в виде общего предшественника Gag-Pol (p160) в результате рибосомального сдвига рамки считывания *gag* → *pol* примерно в 5% случаев [153].

Протеаза (PR) представляет собой гомодимерный белок, активность которого обеспечивает «нарезание» предшественников p55 и p160 при созревании вирусных частиц [2; 108].

Обратная транскриптаза (RT) – гетеродимерный белок, состоящий из двух субъединиц (p66 и p51) и обладающий тремя ферментативными активностями: РНК-зависимой-ДНК-полимеразой при создании комплементарной «минус»-цепи ДНК на матрице РНК; активностью РНКазы Н для расщепления РНК-матрицы в составе образованного дуплекса ДНК/РНК и ДНК-зависимой-ДНК-полимеразой – при достраивании «плюс»-цепи ДНК по принципу комплементарности (кДНК) [77; 108; 169].

Фермент интегразы играет решающую роль в процессе встраивания синтезируемой ранее двуцепочечной провирусной ДНК в геном инфицированной клетки и также обладает тремя видами активностей: экзонуклеазной – для формирования специальных участков для связывания с хромосомной ДНК клетки («липких концов») у кДНК вируса, эндонуклеазной – для «надрезания» хромосомной ДНК и лигазной – для ковалентного «сшивания» вирусной кДНК и хромосомной ДНК [53; 77; 108].

Третьим геном, кодирующим структурные белки ВИЧ-1, является ген *env*. Одноименный белок синтезируется в виде предшественника gp160, который впоследствии «разрезается» клеточными протеазами на гликопротеины gp120 (поверхностный белок SU) и gp41 (трансмембранный белок TM), ответственные за связывание вирусной частицы с рецепторами клетки-мишени и дальнейшее слияние их мембран [51; 194].

Именно вирусные ферменты до сих пор остаются основными мишенями антиретровирусной терапии при лечении ВИЧ-инфекции [2; 13].

1.3 Антиретровирусная терапия

Антиретровирусная терапия представляет собой этиотропную терапию ВИЧ-инфекции, основанную на одновременном применении нескольких антиретровирусных препаратов, действие которых направлено на подавление репликации вируса на разных этапах его жизненного цикла; антиретровирусная терапия позволяет добиться контролируемого течения заболевания и назначается пожизненно [5; 13].

Первым антиретровирусным препаратом после ряда клинических испытаний в конце 80-х годов XX века стал Зидовудин (Азидотимидин), относящийся к классу ингибиторов обратной транскриптазы. Позднее, в 1995–1996 гг., появились первые ингибиторы вирусного фермента протеазы [56].

Однако, применение моно- и битерапии не давало устойчивой эффективности и длительных положительных результатов. В связи с этим уже в середине 90-х годов прошлого века был разработан принцип высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ, в большинстве современной литературы – АРТ), основанный на одновременном приеме не менее трех препаратов, действие которых направлено на разные мишени ВИЧ-1 [13].

1.3.1 Краткий обзор антиретровирусных препаратов, используемых в настоящее время, и механизм их действия

В настоящее время в мире разработаны и внедрены в лечебную практику антиретровирусные препараты следующих классов (Приложение А):

1. **Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ).**

Препараты данного класса являются самыми первыми в практике лечения ВИЧ-инфекции. Молекулы действующего вещества НИОТ представляют собой модифицированные аналоги природных нуклеозидов, принимающих участие в построении ДНК-копии на матрице РНК на стадии обратной транскрипции, встраивание данных аналогов в синтезируемую цепь ДНК при участии фермента обратной транскриптазы приводит к остановке процесса синтеза из-за неспособности данных соединений образовывать фосфодиэфирную связь и детерминирует процесс синтеза провирусной ДНК [13].

В зависимости от того, аналогом какого природного нуклеозида являются молекулы действующего вещества, применяемые в настоящее время лекарственные препараты класса НИОТ, объединены в следующие подгруппы [13]:

- аналоги аденина – тенофовир (ТДФ), тенофовира алафенамид (ТАФ);
- аналоги гуанина – абакавир (АВС);
- аналоги тимидина – зидовудин (АЗТ); фосфазид (Ф-АЗТ);
- аналоги цитидина – ламивудин (ЗТС), эмтрицитабин (ФТС);
- комбинированные препараты – комбивир СВВ:АЗТ/ЗТС, кивекса КВХ: АВС/ЗТС, тризивир ТЗВ: АЗТ/ЗТС/АВС, трувада ТВД: ТДФ/ФТС, фосфаладин: ЗТС/Ф-АЗТ, “Descovy”: ТАФ/ФТС.

2. **Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ)**

действуют непосредственно на активный центр фермента ОТ, тем самым подавляя его активность [35]. В настоящее время в арсенале врачей имеется шесть препаратов данного класса: эфавиренз (ЕФВ), элсульфавирин (ЕСВ), этравирин (ЕТР), невирапин (NVP), рилпивирин (RPV) и доравирин (DOR) [13].

3. **Ингибиторы интегразы (ИИ)**, связываясь с кофакторами (ионами металла) в активном центре фермента, делают невозможным процесс интеграции синтезируемой на этапе обратной транскрипции провирусной ДНК в хромосомную ДНК клетки-хозяина [133].

Представители ИИ: ралтегравир (RAL), долутегравир (DTG); элвитегравир, усиленный кобицистатом (EVG/COBI – на территории РФ зарегистрирован только в виде комбинированного препарата EVG/COBI/TAF/FTC (“Genvoya”)) и биктегравир (BIC – на территории РФ зарегистрирован только в виде комбинированного препарата BIC/FTC/TAF (“Biktarvy”)) [13; 133].

4. **Ингибиторы протеазы (ИП)** действуют по сходному механизму, блокируя активный центр фермента протеазы, участвующего в процессах «нарезания» белков-предшественников при созревании вирусных частиц [70].

Представители ИП: атазанавир (ATV), дарунавир (DRV), ритонавир (RTV), саквинавир (SQV), типранавир (TPV), фосампренавир (FPV); лопинавир + ритонавир (LPV/r); на территории России зарегистрированы следующие комбинированные ИП: лопинавир + ритонавир (LPV/r), атазанавир + ритонавир (ATV/r) [13].

5. **Ингибитор проникновения** маравирок (MVC) препятствует проникновению вируса в клетку путем связывания с корцептором CCR5 на ее поверхности [67].

Различают схемы АРТ первой, второй и третьей линий, а также схемы резерва (спасения). Схема первой линии терапии назначается пациентам, никогда ранее не получавшим АРТ, или пациентам, по каким-либо причинам прервавшим предыдущую эффективную схему терапии. Схема второй линии терапии назначается в случае неэффективности первой, а схема третьей линии терапии – в случае неэффективности второй. Все последующие линии АРТ являются схемами резерва (спасения) и подбираются строго индивидуально [13].

В настоящее время стандартной схемой терапии первой линии является схема, включающая два препарата класса НИОТ в сочетании с третьим

препаратом, относящимся к ННИОТ, либо бустированный ритонавиром ИП, либо препарат класса ИИ [5; 13].

Всемирная организация здравоохранения рекомендует применение схемы TDF (или TAF) + FTC (или ЗТС) + DTG в качестве предпочтительной терапии первой линии. Данная схема АРТ позволяет достичь более высокой вирусологической супрессии при более низком риске развития резистентности ВИЧ к лекарственным препаратам по сравнению со схемами на основе EFV, рекомендованными в качестве первой линии терапии в РФ [5; 13; 41; 125].

Альтернативой схемой терапии первой линии служит [13]:

f-AZT (или AZT) + FTC		ННИОТ: EFV/DOR/ESV/RPV/NVP
или ЗТС, TAF/FTC	+	ИИ: EVG/COBI или RAL
		ИП: ATV/r или DRV/r или LPV/r, ATV

Одним из препятствий на пути достижения успеха лечения при применении АРВП и полного подавления репликации ВИЧ-1 является его высокая мутационная активность, которая может приводить к возникновению в геноме вируса разного рода мутаций, в том числе и способствующих его резистентности к лекарственным препаратам [57].

1.4 Мутации лекарственной устойчивости

Способность ВИЧ-1 продолжать свою активную репликацию в присутствии сильного селективного фактора – антиретровирусной терапии – обусловлена, в первую очередь, наличием в его геноме мутаций лекарственной устойчивости [57]. Последствиями возникновения МЛУ служат неэффективность применяемого лечения, увеличение прямых и косвенных медицинских расходов в связи с необходимостью перехода к схемам второй линии терапии, а также формирование и распространение лекарственно устойчивых вариантов вируса и, как следствие, необходимость в пересмотре и изменении подходов к назначению

и применению АРТ, а также в разработке новых, более эффективных, лекарственных препаратов.

Большинство МЛУ расположено в активном центре ферментов ВИЧ-1, нарушение качества работы которых также приводит к снижению его жизнеспособности (фитнеса) [2]. Для компенсации данного явления в процессе микроэволюции вируса накапливаются дополнительные мутации, и чаще всего вирусы, устойчивые к действию АРВП, имеют несколько мутаций в составе своего генома. Мутации, обуславливающие непосредственно лекарственную устойчивость (ЛУ) вируса, носят название первичные. Вторичные (компенсаторные) мутации практически не связаны с лекарственной устойчивостью, их основной задачей является компенсация сниженного фитнеса вируса; они могут возникать как в активном центре ферментов ВИЧ-1, восстанавливая при этом их энзиматическую активность, так и за пределами гена *pol*, в любом другом участке генома [57].

Мутации лекарственной устойчивости могут стать причиной множественной или перекрестной резистентности. Первый тип ЛУ обусловлен наличием в геноме вируса нескольких мутаций, сообщающих устойчивость к нескольким АРВП (часто разных классов), с которыми вирус встречался ранее. Перекрестная резистентность всегда ограничена одним классом препаратов, с которым вирус никогда ранее не встречался [134].

Номенклатура МЛУ основана на аминокислотном коде, и обозначается в следующем формате: например, M184V,

где первая буква обозначает аминокислоту в определенном положении аминокислотной цепи «дикого» (чувствительного) ВИЧ-1,

следующее за ней число – указывает определенное положение (номер) данной аминокислоты,

последняя буква обозначает аминокислоту в данном положении у мутантного варианта вируса [2].

1.4.1 Механизмы действия мутаций лекарственной устойчивости

Существует два механизма устойчивости к препаратам класса НИОТ: первый – за счет мутаций, затрагивающих активный центр фермента и создающих таким образом помехи для вхождения в него молекул лекарственного препарата; второй – за счет мутаций, которые усиливают способность ОТ к реакции пирофосфоролиза (восстановления трифосфатной группы), что позволяет «вырезать» встроенные молекулы НИОТ из кДНК. Наиболее значимыми мутациями, отвечающими за первый механизм устойчивости, являются M184V, K65R, K70E, L74VI и Y115F [175]. За второй механизм устойчивости отвечают тимидин-аналоговые мутации (TAMs), так как они формируются под действием аналогов тимидина, – азидотимидина (AZT) и ставудина (d4T) [10].

Механизм ЛУ к препаратам класса ННИОТ основан на изменении конформации активного центра фермента ОТ, в результате этого присоединение молекулы ингибитора становится сильно затруднено или вовсе невозможно. Чаще всего к препаратам данного класса возникает перекрестная резистентность, так как основной мишенью для большинства из них служит один и тот же участок фермента ВИЧ-1 [102; 134; 170]. К значимым мутациям устойчивости к ННИОТ относятся L100I, K101P, K103N, V106A, Y181C/I/V, Y188L, G190A/S/E, F227C и M230L [175].

Высокая степень перекрестной резистентности также часто встречается для представителей класса ингибиторов протеазы, однако стоит отметить, что ИП второго поколения (DRV и TPV) продолжают эффективно работать даже при наличии у ВИЧ-1 нескольких МЛУ к другим препаратам данного класса [136; 178].

Механизм устойчивости к ингибиторам интегразы основан на предотвращении реакции хелатирования, то есть связывания ионов металлов, в данном случае ионов магния, находящихся в активном центре фермента, что блокирует реакцию переноса цепи. Возникновение ЛУ к препаратам данного класса обычно связано с возникновением одного из трех устойчивых сочетаний

мутаций (профилей резистентности) – одной первичной (Q148K/R/H, N155H или Y143C/R/H) и нескольких вторичных [155; 175].

1.4.2 Мониторинг лекарственной устойчивости ВИЧ-1

Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 может проявляться у человека при заражении устойчивыми вариантами вируса – передающаяся (первичная) ЛУ, или развиться в процессе приема терапии – приобретенная ЛУ. В случае инфицирования человека первично устойчивыми вариантами вируса целый ряд препаратов может быть неэффективным еще до назначения ему АРТ. Приобретенная ЛУ чаще всего возникает при приеме пациентом субоптимальных доз препарата, а также при уровне приверженности (степени соблюдения врачебных рекомендаций в отношении АРТ) в пределах от 70 до 95% (более низкие или, наоборот, высокие показатели приверженности не создают благоприятных условий для селекции мутантных вариантов вируса) [2; 171].

Оба вида лекарственной устойчивости ВИЧ-1 являются главными объектами мониторинга, осуществляемого совместно ВОЗ и Международным обществом СПИД (International AIDS Society). Центральное место в стратегии мониторинга занимает слежение за первичной лекарственной устойчивостью ВИЧ-1, выявляемой среди нелеченых (наивных) пациентов. Согласно рекомендациям ВОЗ, при распространенности первичной ЛУ более 10% анализ на генотипическую резистентность до начала терапии является обязательным во избежание неуспеха лечения [6]. Интерактивную оценку передающейся лекарственной устойчивости ВИЧ-1 можно осуществить быстрым и удобным способом с использованием специального инструмента – Calibrated Population Resistance (CPR) [85]. Данная программа позволяет рассчитать суммарную распространенность мутаций к препаратам разных классов, исключив при этом естественные мутации полиморфизма ВИЧ-1, являющиеся следствием естественного мутационного процесса и никак не сказывающиеся на устойчивости вируса к АРВП.

Антиретровирусная терапия может быть неодинаково эффективной для ВИЧ-1 разных генетических вариантов. Важную роль в формировании лекарственной устойчивости играет рекомбинация, результатом которой может стать объединение целого ряда мутаций в пределах одного генома, и, как следствие, формирование множественной лекарственной устойчивости, а также активное распространение первично устойчивых вариантов вируса, что, в свою очередь, может поставить под угрозу эффективность большинства применяемых в настоящее время антиретровирусных препаратов.

1.5 Генетическое разнообразие ВИЧ

Генетическое разнообразие ВИЧ обусловлено высокой скоростью его эволюции как внутри каждого отдельно взятого ВИЧ-инфицированного индивидуума, так и на уровне целой популяции ЛЖВС. Генетической диверсификации ВИЧ-1 способствуют различные процессы, характерные как для самого вируса (микроэволюция), так и происходящие под давлением селективных факторов (естественный отбор) [2].

Молекулярной основой генетического разнообразия ВИЧ-1 является повышенная склонность фермента ОТ к совершению ошибок на стадии обратной транскрипции. По результатам исследований, обратная транскриптаза *in vitro* имеет высокую частоту ошибок ($5,9 \times 10^{-4}$ до $5,3 \times 10^{-5}$ мутаций/пару н. о./цикл) при инкорпорации нуклеотидных оснований, что приводит к включению в вирусный геном как точечных мутаций, так и вставок и/или делеций [20].

Вклад в процесс генетической диверсификации ВИЧ-1 также может вносить клеточная дезаминаза APOBEC3G, индуцирующая мутацию гуанозина к аденозину (G→A) в составе минус-цепи ДНК ВИЧ-1 на этапе обратной транскрипции [104]. Однако, по данным исследований, ее вклад не является столь значительным, так как в большинстве случаев гипермутация G→A обуславливает потерю вирусом своей инфекционности [25; 64].

Результатом высокой скорости репликации ВИЧ-1 в сочетании с повышенной частотой возникновения мутаций является образование и накопление в организме каждого отдельного ВИЧ-инфицируемого индивидуума множества генетически близких вариантов вируса, называемых квазивидами [2].

При развитии инфекционного процесса ВИЧ-1 подвергается селекционному давлению со стороны иммунной системы человека, а также под действием лекарственных препаратов в случае назначения АРТ. В результате естественного отбора популяция ВИЧ-1 в организме инфицированного человека обогащается вариантами, обладающими преимуществами в присутствии данных факторов [2].

Одним из результатов эволюции ВИЧ-1 стало возникновение новых генетических вариантов вируса [52].

1.5.1 Группы, субтипы, варианты ВИЧ

Филогенетический анализ, включающий в себя нуклеотидные последовательности (н. п.) ВИЧ-1 разных генетических вариантов и последовательности вируса иммунодефицита обезьян (ВИО), продемонстрировал наибольшее сходство ВИЧ-1 с ВИО шимпанзе, в частности, с *CPZ P.t.t.* – *Pan troglodytes troglodytes*. Полагают, что он несколько раз преодолевал видовой барьер, в результате чего были образованы независимые группы ВИЧ-1 – М, N и О; в настоящее время идентифицирована группа Р. Вирус иммунодефицита второго типа является результатом зоонозного переноса ВИО от серых мангобеев к людям на территории Западной Африки [74; 167; 193].

В основе пандемии ВИЧ-инфекции лежит глобальная циркуляция ВИЧ-1 группы М, на долю которых приходится более 90% всех случаев инфицирования в мире. До недавнего времени группа М включала в себя 9 самостоятельных субтипов: А, В, С, D, F, G, H, J и К, а также ряд рекомбинантных форм. В 2019 году с применением методов секвенирования нового поколения (NGS) был идентифицирован новый субтип L, образцы которого были получены еще в 1980–1990 гг. и в 2001 году [197]. Субтипы различаются между собой в среднем

на 25–30 % нуклеотидов генома в зависимости от области сравнения, – гены *gag* и *pol* более консервативны по сравнению с геном *env* [19; 198]. Некоторые субтипы ВИЧ-1 дополнительно разделены суб-субтипы: A1–A8 и F1–F2. В 2022 году на территории Нидерландов был обнаружен новый, близкий к субтипу В, вариант ВИЧ-1 – VB, характеризующийся высокой вирулентностью [196]. Нуклеотидные последовательности, относящиеся к вирусам разных суб-субтипов, различаются не более чем на 20% нуклеотидов и формируют отчетливые ветви на филогенетических деревьях [2].

Генетическое разнообразие ВИЧ-2 представлено 7 субтипами: А, В, С, D, F, G и H, при этом генетические варианты С–H представляют собой вирусы уникальных форм, выделенные одновременно только от одного пациента. Также у ВИЧ-2 выявлена рекомбинантная форма CRF01_AB [189].

У вируса иммунодефицита первого типа выявлено и описано значительное число рекомбинантных форм. Геном ВИЧ-1 рекомбинантных форм включает в себя фрагменты, относящиеся к разным генетическим вариантам вируса. Различают рекомбинантные формы ВИЧ-1:

-циркулирующие (circulating recombinant forms, CRFs) – они циркулируют в большом количестве в разных популяциях и на разных территориях и по определению должны быть выделены не менее чем у трех эпидемиологически не связанных индивидуумов,

-уникальные (unique recombinant forms, URFs) – обнаруживаемые однократно у одного ВИЧ-инфицированного индивидуума [2].

К настоящему времени идентифицирована 121 циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ-1 [90] (Рисунок 5).

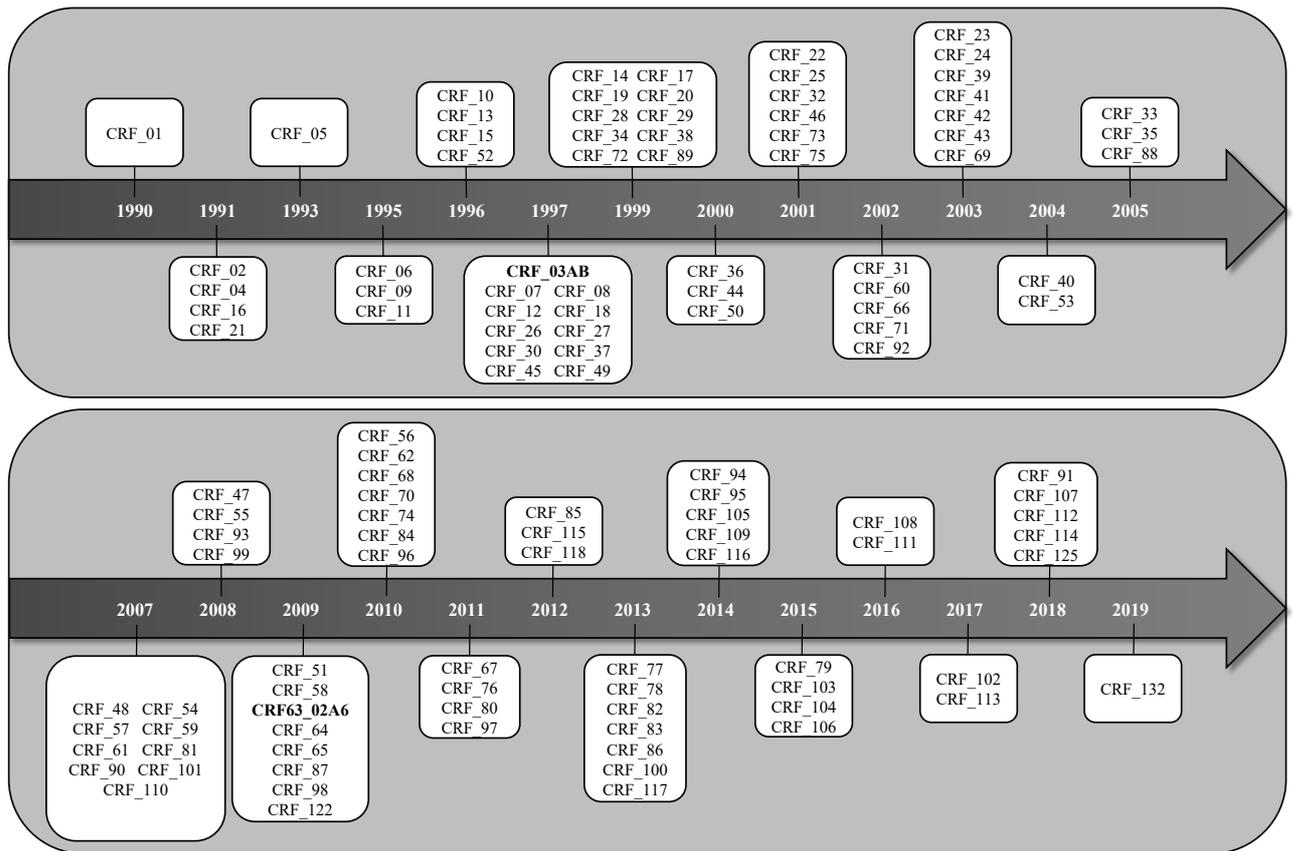


Рисунок 5 – Хронология открытия рекомбинантных форм ВИЧ-1 до настоящего времени

Примечание – Жирным шрифтом выделены рекомбинантные формы ВИЧ-1, впервые выявленные на территории РФ

Ежегодное обнаружение новых рекомбинантных форм ВИЧ-1 свидетельствует об активном протекании данного процесса в общей популяции вируса.

Перестройка вирусного генома путем рекомбинации может способствовать изменению биологических свойств вируса, включая его патогенность, а также усложнять процессы профилактики и лечения ВИЧ-инфекции, способствуя объединению нескольких мутаций в пределах одного генома и тем самым снижая эффективность применяемой АРТ [2; 118].

1.6 Рекомбинантные формы ВИЧ

Рекомбинация представляет собой процесс обмена участками генома вирусов разных генетических вариантов [24; 108].

1.6.1 Механизм формирования рекомбинантных форм ВИЧ

В основе рекомбинационного процесса лежит возможность одновременного инфицирования одной клетки вирусом разных генетических вариантов (коинфекция) или суперинфекция, когда повторное заражение вирусом другого варианта происходит последовательно с небольшим интервалом [87].

Рекомбинация происходит на этапе обратной транскрипции геномной РНК гетерозиготного вируса в результате «скачков» вирусного фермента ОТ с одной матрицы РНК на другую. В результате синтезируемая кДНК будет включать в себя два (или более – при условии многократной смены матрицы) фрагмента, относящиеся к разным генетическим вариантам ВИЧ-1 [24; 98].

Данный механизм рекомбинации известен как “template-switching mechanism” или “copy-choice model”, он происходит в несколько этапов (Рисунок 6).

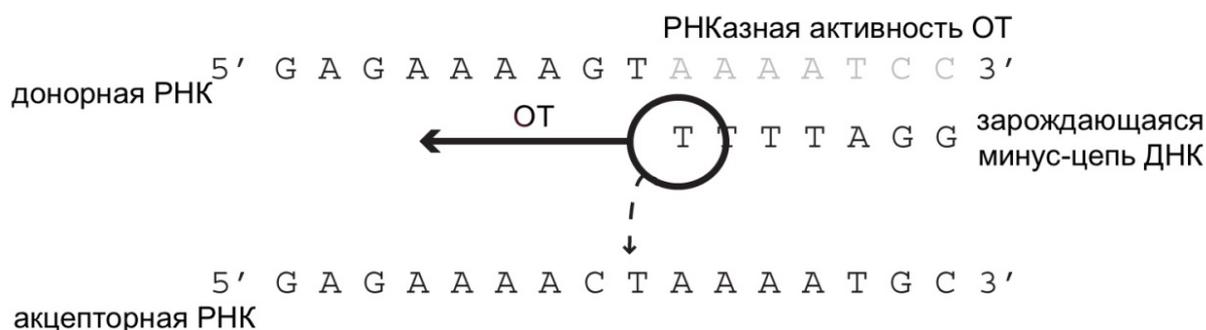


Рисунок 6 – Схема механизма рекомбинации ВИЧ-1 на стадии обратной транскрипции (Адаптировано из [24])

На первом этапе происходит синтез минус-цепи ДНК на матрице донорной РНК с последующей остановкой РНК-зависимой ДНК-полимеразы (ОТ) и диссоциацией репликативного комплекса от матрицы; на данном этапе ОТ также проявляет активность РНКазы Н. На втором этапе комплекс кДНК-ОТ связывается с матрицей-акцептором с образованием нового репликативного комплекса, таким образом, происходит переключение матрицы: донорная→акцепторная РНК – без высвобождения синтезируемой цепи кДНК [24].

Существует ряд факторов, способствующих переключению матрицы РНК, к ним относятся идентичность матричных последовательностей и вторичная структура РНК. Было установлено, что локальная идентичность последовательностей донорной и акцепторной РНК способствует эффективному переключению между ними [26; 199]. Наличие стабильной шпильки в структуре матричной РНК в значительной степени повышает вероятность переноса цепи, способствуя пространственной близости донорной и акцепторной РНК [82; 137].

Области нуклеотидных последовательностей, где происходит переключение матрицы, называются точками рекомбинации [24].

Процесс рекомбинации может происходить как между вирусами разных субтипов, так и между квазивидами. Формирование межквизивидовых рекомбинантов вируса служит основой для микроэволюции ВИЧ-1 и дальнейшего естественного отбора наиболее жизнеспособных вариантов под воздействием иммунной системы человека, а также АРВП. Также известны случаи рекомбинации между вирусами групп М и О [141; 144; 149]. Возможная рекомбинация между вирусами разных рекомбинантных форм приводит к формированию вторичных рекомбинантов.

Для ВИЧ эффективный механизм рекомбинации обеспечивает ряд преимуществ. Генетическая рекомбинация ВИЧ-1 способствует эволюции вируса за счет увеличения его генетического разнообразия. Было показано, что рекомбинация может регенерировать наиболее приспособленные варианты вируса [75]. Рекомбинация может способствовать отдельной эволюции

отдельных частей генома вируса за счет нарушения связей между мутациями. Так, если в геноме ВИЧ-1 имеются две физически связанные мутации, одна из которых является вредной для вируса, явление рекомбинации гарантирует нарушение их ассоциации с сохранением лишь одной, полезной, мутации. В случае наличия полезных мутаций в геномах вирусов разных генетических вариантов рекомбинация будет способствовать их объединению в геноме нового вируса [42].

1.6.2 Влияние рекомбинации на свойства ВИЧ-1 и течение заболевания

Трансмиссивность. Сравнение трансмиссивных свойств ВИЧ-1 разных генетических вариантов затруднено наличием целого ряда обстоятельств: неодинаковостью этнического состава сравниваемых групп людей, их культурными особенностями, доступностью к высокоэффективной антиретровирусной терапии, приверженностью к ней, а также индивидуальными особенностями иммунного ответа каждого отдельно рассматриваемого пациента. Однако, в ряде исследований все же удалось сравнить близкие по большинству показателей группы лиц, проживающих в одном регионе и инфицированных вирусами разных генетических вариантов.

Эпидемия ВИЧ-инфекции в Бельгии, в первую очередь, вызвана передачей вируса в когорте мужчин, практикующих секс с мужчинами (МСМ), для которой характерно преобладание вирусов субтипа В. Исследование данных сетей передачи показало, что появление новых рекомбинантных штаммов (В/CRF02_AG, В/F1, G/CRF02_AG и В/CRF01_AE) в значительной степени способствовало локальной передаче ВИЧ-1 даже в условиях эпидемии, вызванной преимущественно вирусом субтипа В [92].

Исследования, проведенные в Таиланде среди ПИН, указали на предпочтение при передаче ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF01_AE по сравнению с вирусом субтипа В [99]. Совместное использование нестерильных игл и шприцов потребителями инъекционных наркотиков способствует двойной

инфекции и, как следствие, ускорению процесса формирования и распространения новых рекомбинантных форм ВИЧ [2; 8].

Патогенность. В ряде независимых сравнительных исследований было установлено, что рекомбинантные формы ВИЧ-1 способны оказывать влияние на скорость прогрессирования заболевания.

По результатам обзорного анализа, объединившего данные разных исследований за период с 1996 по 2010 год, генетические варианты вируса были расположены в следующем порядке по убыванию их патогенности: С и D > G, CRF01_AE и CRF02_AG > A [147].

Исследование когорты MSM в Китае показало преобладание рекомбинантной формы CRF01_AE с высокой частотой CXCR4-тропизма и возможное влияние этого на скорость снижения числа CD4-лимфоцитов и более быстрое прогрессирование заболевания до стадии СПИДа. [118]. Однако, аналогичные исследования когорты MSM в Таиланде не выявили разницы для данных показателей у ВИЧ-1 CRF01_AE и других генетических вариантов [115].

Изучение влияния субтипа ВИЧ на течение заболевания в когорте ВИЧ-инфицированных в Бразилии установило, что вирусы субтипа D, а также рекомбинантной формы BF являются наиболее патогенными по сравнению с вирусами субтипа B или других неB-субтипов; люди, инфицированные вариантом BF, имели более быстрое прогрессирование заболевания к СПИДу, связанное с быстрой скоростью снижения числа CD4+ Т-лимфоцитов [116; 180]. Высокая патогенность также отмечалась для ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF01_AE [28; 29].

1.6.3 Рекомбинантные формы ВИЧ-1 и эффективность терапии

Широко распространено мнение, что способность вируса к рекомбинации способствует развитию лекарственной устойчивости за счет объединения ряда мутаций от геномов ВИЧ-1 разных генетических вариантов в пределах одного нового генома. Результатом этого может стать явление лекарственной

устойчивости нового вируса, в том числе и множественной, а также компенсация снижения его жизнеспособности за счет приобретения вторичных мутаций [42; 88; 106; 138; 191].

Выявление точного эволюционного преимущества рекомбинации ВИЧ-1 остается фундаментальной проблемой эволюционной биологии, имеющей значение для лекарственной терапии ВИЧ-инфекции.

Существуют противоположные теории относительно выгоды рекомбинации для самого вируса. С одной стороны, некоторые штаммы ВИЧ-1 обладают способностью образовывать синцитий, что приводит к формированию гигантских многоядерных клеток, способных содержать более одного провируса. Такая способность вируса облегчает суперинфекцию. Было высказано предположение, что данная стратегия вируса способствует усилению рекомбинационного процесса [88].

С другой стороны, был идентифицирован ряд белков ВИЧ-1, подавляющих CD4⁺-рецептор после проникновения вируса в клетку-мишень. В связи с этим было высказано противоположное предположение, согласно которому ВИЧ-1 способен подавлять суперинфекцию за счет блокирования повторного прикрепления другого вируса к поверхности инфицируемой клетки, и как следствие, ограничивать процесс рекомбинации [40].

В ряде теоретических исследований отмечалось, что рекомбинация может оказывать как ускоряющее (при объединении в одном вирусном геноме ряда мутаций ЛУ), так и замедляющее (при разрушении комбинаций мутаций) действие на процесс формирования лекарственной устойчивости ВИЧ [109].

Исследования Bretscher M. T. et al. (2004) и Fraser C. (2005) указывают на негативный эффект рекомбинации. В частности, Fraser C. отмечал, что рекомбинация замедляет эволюцию лекарственной устойчивости ВИЧ, тогда как Bretscher M. T. с соавторами утверждали, что эффект рекомбинации зависит от типа взаимодействий между мутациями лекарственной устойчивости [40; 80]. В исследованиях Vonhoeffler S. et al. (2004) отмечается преобладание у ВИЧ фитнес-взаимодействия мутаций, при которых рекомбинация вредна [39]. Однако, в

совместном исследовании Althaus C. L. и Bonhoeffer S. (2005), а также в исследовании Carvajal-Rodriguez A. et al. (2007) отмечено ускоряющее влияние рекомбинации на процесс формирования лекарственной устойчивости ВИЧ-1 [23; 47].

Вероятность рекомбинации между двумя локусами обратно пропорциональна расстоянию между ними в геноме вируса. Мутации, несущие устойчивость к одному лекарственному препарату или к комбинациям препаратов, относящихся к одному классу АРВП, находятся на более близком расстоянии в геноме, чем мутации, несущие устойчивость к разным классам препаратов. В связи с этим было высказано предположение, что объединение мутаций в пределах одного генома в результате рекомбинации наиболее вероятно при применении ВИЧ-инфицируемыми индивидуумами комбинированной АРТ [40; 140]. В исследовании Bretscher M. T. et al. (2004) также было отмечено, что суперинфекция более способствует формированию мутантных штаммов ВИЧ-1 с множественной лекарственной устойчивостью среди наивных пациентов, чем у получающих АРТ [40].

До 2012 года данные о лекарственной устойчивости были получены в основном для вируса субтипа В, данных для рекомбинантных форм ВИЧ-1 было крайне мало, что в значительной степени ограничивало подбор и ведение рациональной схемы АРТ для увеличивающегося числа пациентов, инфицированных вирусами не В-субтипа.

В Китае было проведено исследование *in vitro* CRF07_BC ВИЧ-1 в присутствии NVP – наиболее часто используемого в Китае антиретровирусного препарата. У отобранных мутантных штаммов были идентифицированы 4 комбинированных профиля мутаций, инициированных A98G, V108I, Y181C и I135T/I382L. Под действием NVP в ОТ мутантных штаммов вируса были зарегистрированы в общей сложности 14 мутаций, семь из которых являлись новыми: A98G, V106M, V108I, I135T, Y181C, V189I, K238N, P4H, T48I, I178M, V314A, I382L/V, T386A [195]. В более крупном исследовании было изучено 375 образцов ВИЧ-1, полученных от 104 наивных пациентов и 271 пациента,

ранее уже получавшего АРТ, но не достигнувшего должного эффекта. В группе наивных пациентов мутация M46L была зарегистрирована лишь у одного пациента, в то время как в группе пациентов на АРТ частота ее встречаемости составила 31,73%. Дальнейший анализ показал, что 19,56% образцов CRF07_BC ВИЧ-1 имели мутации устойчивости к препаратам класса ННИОТ, 0,74% – к НИОТ, и 11,44% имели множественную ЛУ к обеим классам препаратов [179].

Исследование генетического разнообразия и лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на территории г. Уханя (Китай) показало широкое распространение рекомбинантов ВИЧ-1: CRF01_AE (38,2%) и CRF07_BC (35,3%) являлись двумя доминирующими рекомбинантными формами ВИЧ, за которыми следовали CRF55_01B – 6,9%, CRF59_01B – 2,0%, B – 2,0%, B' – 2,0%, CRF08_BC – 1,0%, CRF80_0107 – 1,0% и уникальные рекомбинантные формы (URFs) – 11,8%. Большинство URFs представляли собой вторичные рекомбинанты между CRF01_AE и CRF07_BC или CRF07_BC и CRF55_01B ВИЧ-1. При представленном генетическом разнообразии с явным преобладанием ВИЧ-1 рекомбинантных форм распространенность первичной лекарственной устойчивости составила 23,9%, при этом наиболее часто встречалась мутация V179D/E (18,2%), представляющая собой полиморфную вспомогательную мутацию, способствующую незначительному снижению чувствительности вируса к каждому препарату класса ННИОТ в схеме. В преобладающем числе случаев данная мутация регистрировалась у CRF55_01B ВИЧ-1 [200].

В исследовании Liu Y. et al. (2020) продемонстрировано естественное присутствие мутаций V179D и K103R/V179D у CRF65_cpx ВИЧ-1, а также V179E – у всех кроме одного из 228 пациентов, инфицированных вирусом рекомбинантной формы CRF55_01B. При этом комбинация мутаций V179D и E138G была идентифицирована с частотой 6,2%, и отмечалась достоверная тенденция к росту распространенности мутации E138G с течением времени у CRF55_01B ($p < 0,001$). Филогенетический анализ указал на растущую распространенность мутации E138G в результате множественных мутационных событий, а не за счет локальных кластеров передачи [124].

Изучение лекарственной устойчивости 130 образцов ВИЧ-1 уникальных рекомбинантных форм в провинции Юньнань (Китай) продемонстрировало значение 56,9% для распространенности МЛУ среди данных генетических вариантов вируса. Частота встречаемости к препаратам классов ИП, НИОТ и ННИОТ составил 3,8% (5/130), 36,2% (47/130) и 53,8% (70/130), соответственно; наиболее распространенными мутациями являлись M184V/I (35,4%) – для НИОТ, и K103N/R/S/T (25,4%), V179D/E/T/Y (18,9%), G190A/E/R/S (13,8%) и Y181C (9,2%) – для ННИОТ. Также был отмечен ряд факторов корреляции для развития лекарственной устойчивости у URFs ВИЧ-1, включающий в себя принадлежность к мужскому полу и половой путь передачи инфекции [65].

Связь рекомбинации и профиля лекарственной устойчивости рассматривалась в исследовании Deletsu S. D. et al. (2020); было установлено, что рекомбинантная форма ВИЧ-1 – CRF02_AG, доминирующая на территории Ганы, имела в составе своего генома ряд мутаций ко всем классам АРВП – НИОТ, НИОТ, ННИОТ и ИП; вирус субтипа G имел мутации к НИОТ и ННИОТ, в геноме CRF01_AE ВИЧ-1 не было идентифицировано мутаций лекарственной устойчивости. В исследовании также отмечалось преобладание мутаций M184V и D67N среди вирусов генетических вариантов G и CRF02_AG ВИЧ-1, что связано с повсеместным использованием ламивудина как основного препарата АРТ в Гане. Продолжительная неэффективная терапия также способствует формированию множественной лекарственной устойчивости [63].

В настоящее время еще одним препятствием на пути разработки эффективной АРТ и полного излечения от СПИДа является так называемая «остаточная вирусемия» – явление, при котором вирус сохраняется в нереплицируемой форме в латентных резервуарах, способных время от времени активироваться вместе с ним [3; 68; 163; 174; 184]. Иммунный ответ против вновь активированных из латентной стадии вариантов ВИЧ значительно сильнее, чем против циркулирующих на данный момент [59; 150; 160]. Однако, все больше данных свидетельствуют о быстрой адаптации вируса, высвобождаемого из активированных латентных резервуаров, к иммунному ответу организма ВИЧ-

инфицированного человека наряду с вирусами, эволюционированными под его давлением. Исследования по моделированию динамики эволюции ВИЧ-1 в ответ на давление со стороны иммунного ответа хозяина показали, что именно рекомбинация способна стать движущей силой быстрой адаптации и выживания вирусов, активированных из латентных резервуаров [101].

Высокое генетическое разнообразие ВИЧ-1 и широкое распространение рекомбинантных форм также усложняет и ставит под сомнение различные подходы к созданию вакцины против ВИЧ. Ученым еще предстоит выяснить, будет ли это единая вакцина, специфичная для целой группы M, или же потребуется сложный комплекс разных вакцин для каждого генетического варианта вируса [96].

1.7 Молекулярно-генетическая характеристика эпидемии ВИЧ-1

1.7.1 Распространение генетических вариантов ВИЧ-1 в мире

Глобальное распределение генетических вариантов ВИЧ-1 неоднородно и постоянно варьирует не только во всем мире, но и в пределах одного континента и регионов. Причиной неравномерного распределения генетических вариантов ВИЧ-1 в мире является так называемый «эффект основателя», заключающийся в распространении на определенной территории или внутри социальной группы того варианта вируса, который первым попал в новую популяцию хозяев [2].

Схема географического распределения генетических вариантов ВИЧ-1 представлена на Рисунке 7.



Рисунок 7 – Глобальное распределение основных субтипов и циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ-1 в мире [32]

В первые годы эпидемии ВИЧ-инфекции половина случаев инфицирования была инициирована вирусом субтипа С, а также ВИЧ-1 рекомбинантных форм, имеющими в составе генома последовательность субтипа С. Это было обусловлено распространением ВИЧ-инфекции на территории Южной Африки и Азии. В Центральной Африке обнаружены практически все субтипы ВИЧ-1 и ряд рекомбинантных форм [93; 95]. В общемировом масштабе субтип С остается наиболее распространенным генетическим вариантом ВИЧ. Следующими по распространенности являются вирусы субтипов А и В, которые составляют порядка 10–12 % от общего количества всех случаев ВИЧ-инфекции в мире, за ними следуют вирусы субтипов G – 6% и D – 3%. Менее 1% случаев ВИЧ-инфекции в мире обусловлено вирусами субтипов F, H, J и K [9; 94; 96].

Наиболее распространенными рекомбинантными формами ВИЧ-1 являются CRF01_AE и CRF02_AG, каждая из которых идентифицируется в 5% случаев заражения ВИЧ в мире. Циркулирующая рекомбинантная форма CRF03_AB составляет порядка 0,1%, остальные CRFs совместно – около 8% всех случаев ВИЧ-инфекции в мире [96].

Недавние исследования показали, что субтип А остается наиболее распространенным генетическим вариантом вируса на территории Африки, Российской Федерации и стран бывшего Советского Союза; в частности, суб-субтип А1 получил свое широкое распространение в Центральной Африке, Иране, странах Европейского Союза и Балтии, А2 и А3 – на территории Африки; случаи инфекции, вызванные вирусами суб-субтипа А4, единичны и были выявлены на территории Конго [36; 129; 135; 187]. Наибольшая распространенность ВИЧ-1 суб-субтипа А6 отмечена в регионе Восточной Европы (в основном – в республиках бывшего СССР) и Центральной Азии [1; 9].

Вирусы субтипа В наиболее распространены и эпидемически значимы в странах Европейского Союза, Северной и Южной Америки, а также Океании [32; 129].

Наиболее распространенные циркулирующие рекомбинантные формы ВИЧ-1, CRF01_AE и CRF02_AG, представлены в основном на территории Юго-Восточной Азии и Западной Африки, соответственно [32; 94; 96].

По результатам глобального обзора было установлено, что на долю CRF01_AE ВИЧ-1 приходилось порядка 5,3% всех случаев инфицирования в период 2010–2015 гг., на долю CRF02_AG – 7,8%, остальные CRFs составили 3,7% от всех случаев ВИЧ-инфекции в мире, URFs – 6,1%, таким образом, общая доля всех рекомбинантов составила порядка 22,8% в общей популяции вируса [96].

Распределение генетических вариантов ВИЧ-1, в том числе и его рекомбинантных форм, является динамичным процессом, зависящим от целого ряда факторов, таких как рост мобильности населения и рост миграционных процессов, способствующих «смешению» вирусов разных вариантов в пределах определенных территорий в разных частях мира. Распределение субтипов ВИЧ-1 стремительно менялось с течением времени. На глобальном уровне в течение 2005–2015 гг. увеличилась доля субтипа В, в то же время наблюдалось снижение распространенности вирусов субтипов С, G и рекомбинантной формы CRF02_AG; показатели распространенности вирусов субтипов А и D оставались стабильными.

Доля CRF01_AE и других циркулирующих и уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 стремительно менялась в сторону увеличения (с 9,3% в период 1990–1999 гг. до 22,8% – в 2010–2015 гг). Это свидетельствует о последовательном увеличении доли рекомбинантных форм с течением времени в глобальном масштабе [94; 96; 190].

Эпидемический процесс ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации вызывает большой интерес и обусловлен рядом особенностей страны: Россия занимает большую территорию, на которой одновременно проживают люди разных возрастных категорий, национальностей, с различиями в обычаях и поведении, образе жизни и моделях мобильности. Российская Федерация граничит с 18 государствами, в том числе с 8 бывшими союзными республиками, что способствует высокому генетическому разнообразию и быстрому распространению ВИЧ-1 за счет миграционных процессов.

1.7.2 Распространение генетических вариантов ВИЧ-1 на территории Российской Федерации

Уникальный характер эпидемии ВИЧ-инфекции на территории РФ был отмечен с начала проведения молекулярно-генетического мониторинга после регистрации первого случая инфицирования в стране: эпидемия была вызвана вирусами суб-субтипа А6, распространившимися в короткие сроки по всем регионам страны и при этом не претерпевшими почти никаких генетических преобразований. Это надолго определило однородность эпидемии ВИЧ-инфекции в России [1; 9]. Широкомасштабное распространение данного генетического варианта началось на территориях постсоветского пространства в конце 1994–начале 1995 года в результате проникновения вируса суб-субтипа А6 в популяцию потребителей инъекционных наркотиков города Одессы [91; 139; 143]. Существует мнение, что этому предшествовала его многолетняя циркуляция и распространение посредством гетеросексуальных контактов [143; 181]. По данным исследования Diez-Fuertes F. et al. (2015), проникновение ВИЧ-1

суб-субтипа А6 в среду ПИН южных регионов Украины произошла еще в 1992–1994 годах; и в течение нескольких последующих лет случаи ВИЧ-инфекции, вызванные данным генетическим вариантом вируса, были зарегистрированы среди потребителей инъекционных наркотиков в разных регионах России [1; 36; 66; 181], Беларуси [7], Молдовы [146] и затем – в большинстве стран бывшего Советского Союза [37; 45; 76; 112; 186].

Преобладание ВИЧ-1 суб-субтипа А6 (порядка 80%) было продемонстрировано в крупном исследовании генетических вариантов вируса, циркулировавших на территории РФ в период 1987–2015 гг. [9]. Такое широкомасштабное распространение данного генетического варианта ВИЧ-1 во многом обусловлено «эффектом основателя». Передача ВИЧ-1 в начальные годы эпидемии происходила преимущественно парентеральным путем при внутривенном введении наркотических веществ, на его долю приходилось более 90% всех зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции на территории России. Начиная примерно с 2001 года, ВИЧ-инфекция распространилась за пределы групп риска, доля гетеросексуального пути передачи в структуре всех выявленных на территории России случаев заражения ВИЧ увеличилась с 4,1% в 2000 году до 23,2% в 2003 году [14].

Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-1 (1987–2015 гг.) показал снижение доли субтипа А1 (суб-субтипа А6) примерно на 20% в период с 2000 по 2015 год и увеличение распространения других генетических вариантов вируса, в частности, его рекомбинантных форм [9].

1.7.3 Рекомбинантные формы ВИЧ-1 на территории Российской Федерации

С момента проникновения ВИЧ-1 на территорию Российской Федерации были зафиксированы две вспышки, вызванные вирусами циркулирующих рекомбинантных форм. Первая произошла в 1996–1997 гг. в Калининграде, – тогда была выявлена первая рекомбинантная форма ВИЧ-1, возникшая на территории РФ, она получила наименование CRF03_AB и являлась результатом

рекомбинации между вирусами генетических вариантов А6 и В, циркулирующими в среде ПИН в России [119; 120]. Позднее CRF03_AB ВИЧ-1 стала причиной новой вспышки ВИЧ-инфекции далеко за пределами Калининградской области – в Череповце в период 2002–2006 гг. [173].

Второй рекомбинантной формой ВИЧ-1, выявленной непосредственно на территории РФ в 2009–2010 гг., стала CRF63_02A6, представляющая собой вторичный рекомбинант от CRF02_AG и вируса суб-субтипа А6 и получившая свое широкое распространение на территории Сибири [30].

В 2018 году был осуществлен первый отечественный систематический обзор и метаанализ для оценки распространенности рекомбинантных форм ВИЧ-1 в регионах России и странах СНГ, по результатам которого общая распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 к середине 2017 года составила 21,3% и характеризовалась высокой гетерогенностью. На территории России были обнаружены следующие рекомбинантные формы ВИЧ-1: CRF01_AE, CRF02_AG, CRF03_AB, CRF11_crx, CRF63_02A6, а также уникальные рекомбинантные формы URF63_A1; наибольшая распространенность рекомбинантных форм наблюдалась в Сибирском федеральном округе, наименьшая – в Северо-Западном [12]. Позднее в исследовании Лебедева А.В. и соавторов было сказано о высокой распространенности рекомбинантной формы CRF03_AB на территории Северо-Западного федерального округа – она составила 9,9% [114].

Заключение. В связи со всем вышеизложенным, анализ состояния генетического разнообразия и лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии является чрезвычайно важной задачей. До сих пор ВИЧ-инфекция остается глобальной проблемой общественного здравоохранения.

В ряде исследований показана общемировая тенденция к росту доли ВИЧ-1 рекомбинантных форм, на территории Российской Федерации отмечается увеличение доли вирусов не-А-субтипов, в том числе и рекомбинантов.

Многие исследования отмечают влияние процесса рекомбинации как на биологические свойства вируса (патогенность) и течение заболевания, так и на эффективность применяемой АРТ.

Молекулярно-генетический анализ образцов ВИЧ-1, полученных из 7 федеральных округов Российской Федерации за десятилетний период, позволит охарактеризовать генетическое разнообразие ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии, оценить вклад рекомбинантных форм, а также выявить и оценить возможные различия в профилях мутаций лекарственной устойчивости у ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом настоящего исследования служили образцы ВИЧ-1, полученные от ВИЧ-инфицированных лиц из 7 федеральных округов Российской Федерации в ходе выполнения систематической работы по молекулярно-генетическому мониторингу эпидемии ВИЧ-инфекции в России в период с 2011 по 2020 год (Таблица 1).

Таблица 1 – Объем проведенного исследования

Город	Год сбора коллекции	Федеральный округ РФ	Число полученных образцов	Число образцов, включенных в исследование
Благовещенск	2012	Дальневосточный	40	40
Владивосток	2012		66	62
Хабаровск	2012		88	88
Южно-Сахалинск	2013		53	53
Ижевск	2017	Приволжский	42	42
Казань	2012–2013		66	65
Нижний Новгород	2011–2012		72	72
Пермь	2011, 2013		74	72
Архангельск	2013–2014	Северо-Западный	65	64
Вологда	2016–2017		26	26
Мурманск	2013–2014		66	66
Череповец	2017–2018		50	50
Барнаул	2017	Сибирский	82	82
Иркутск	2012		97	97
Красноярск	2011–2016		281	281
Нижевартовск	2017	Уральский	32	30
Ноябрьск	2011–2016		131	123
Сургут	2017		45	45
Ханты-Мансийск	2017	Уральский	18	18
Москва и Московская область	2011–2016, 2019–2020	Центральный	1253	1247
Краснодар	2014–2019	Южный	582	478
Симферополь	2016–2017		84	77
Итого	2011–2020	-	3313	3178

Всего в процессе проведения молекулярно-генетического мониторинга было собрано 3313 образцов ВИЧ-1, из которых 3178 (96,0%) образцов были включены в настоящее исследование. Остальные 135 образцов (4,0%) были исключены из исследования в связи с низким качеством или длиной получаемой последовательности менее 919 нуклеотидных оснований.

Все образцы были собраны в сотрудничестве с лабораториями федеральных и региональных Центров по профилактике и борьбе со СПИДом (далее «Центры СПИД»).

2.2 Материал исследования

2.2.1 Сбор биоматериала

В работе были использованы коллекции мононуклеарных клеток периферической крови (лимфоцитов) 613 ВИЧ-инфицированных лиц, коллекции плазмы крови 2502 пациентов и коллекция замороженной цельной крови от 63 пациентов федеральных и региональных Центров СПИД.

Забор крови от ВИЧ-инфицированных пациентов производили в период с 2011 по 2020 год. Отбор образцов крови объемом 4,5 см³ осуществляли в вакуумные одноразовые пробирки-вакутайнеры (“Becton Dickinson”, США) с ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) в качестве антикоагулянта. Процедуры забора крови, получения лимфоцитов и плазмы крови осуществляли сотрудники федеральных и региональных Центров СПИД.

2.2.2 Получение лимфоцитов

Цельную кровь в объеме 0,6 мл из пробирки-вакутайнера с ЭДТА переносили в новые пробирки объемом 1,5 мл. В каждую пробирку добавляли 0,7 мл буфера для отмывки лимфоцитов (TST-буфер: на 1 л буфера – 10 мл 1М TRIS-HCl pH 7.8–8.0, 1М сахарозы – 342,3 г, 100 mM MgCl₂ – 20,33 г, Triton 100x – 10 мл, мертиолят натрия – 100 мкл). Пробирки плотно закрывали, тщательно

перемешивали их содержимое на вортексе в течение 5–10 с и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугировали (12–14 тыс. об/мин) в течение 20 с; надосадочную жидкость аккуратно сливали в заранее подготовленную емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок снова тщательно ресуспендировали в 0,5 мл TST-буфера и перемешивали на вортексе 4 раза по 5 с. Всю процедуру отмывки повторяли еще 3–5 раз (без стадии инкубации) до тех пор, пока надосадочная жидкость и осадок не становились прозрачными и бесцветными, соответственно. Затем к осадку добавляли 0,4 мл 96%-го этанола. В таком виде клетки были готовы к длительному хранению и транспортировке. Хранение клеток «под спиртом» осуществляли в пробирках с завинчивающимися крышками и кольцом в диапазоне температур от -20 до -70 °С.

2.2.3 Получение плазмы

Для получения плазмы пробирку-вакутайнер с цельной кровью центрифугировали (1000–2000 об/мин) в течение 15 мин при комнатной температуре (от 15 °С до 25 °С). Хранение и транспортировку образцов плазмы осуществляли в диапазоне температур от -40 °С до -70 °С.

Выявление факторов риска и вероятных мест инфицирования, а также эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза.

Также регистрировали дополнительную информацию, включающую в себя: пол и возраст пациента, дату забора клинического образца, регион постановки диагноза «ВИЧ-инфекция», стадию заболевания, показатели вирусной нагрузки (ВН) и иммунный статус пациента (количество CD4+-клеток). В случае назначения АРТ получали сведения обо всех известных применяемых схемах и причинах их замены или прерывания, на основании записей в амбулаторных картах.

Весь полученный клинический материал использовали с информированного согласия пациентов на основании Комитетов по биомедицинской этике: федерального государственного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора – протокол № 1 (от 30 марта 2010 г.), государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» – протокол № 06-13 (от 5 мая 2013 г.); федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации – протоколы № 2 (от 4 февраля 2016 г.), № 16 (от 8 февраля 2019 г.).

Все полученные сведения были внесены в лабораторную базу данных (БД), включающую демографические, клинико-эпидемиологические и лабораторные данные, а также данные, полученные на основании результатов генотипирования нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 (анализируемый ген/часть гена, нуклеотидная последовательность и генетический вариант ВИЧ-1).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Экстракция вирусной РНК и провирусной ДНК

2.3.1.1 Экстракция РНК ВИЧ-1 из плазмы цельной крови

На первом этапе выделения РНК ВИЧ-1 пробу плазмы цельной крови в объеме 0,5–1 мл центрифугировали при 21000–25000x g в течение 60 мин при температуре +2–+8 °С для концентрирования вирусных частиц на дне пробирки. Затем удаляли супернатант и к полученному осадку добавляли 600 мкл буфера лизиса вируса (*viral lysis buffer*), центрифугировали 3–5 с при 2000x g и выдерживали пробы при комнатной температуре (15–25 °С) в течение 10 мин.

После этапа лизиса осуществляли реакцию осаждения РНК: к каждой пробе добавляли 600 мкл изопропанола и центрифугировали при 12500–15000x g в

течение 15 мин при комнатной температуре. Затем удаляли супернатант, добавляли по 1 мл 70%-го этанола в каждую пробу и центрифугировали при тех же условиях, что и на этапе осаждения, в течение 5 мин. Снова тщательно удаляли супернатант и высушивали пробирки на воздухе с открытыми крышками в течение 1–5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в холодном разбавителе РНК (RNA Diluent). Полученные образцы РНК хранили в холодильнике при температуре от -65°C до -80°C .

2.3.1.2 Экстракция провирусной ДНК из лимфоцитов

Выделение провирусной ДНК из лимфоцитов выполняли с использованием автоматической системы экстракции DNA/RNA Extractor QIAcube (“QIAGEN”, Германия) и коммерческого набора реактивов для выделения ДНК QIAamp DNA Blood Mini Kit (“QIAGEN”, Германия). Перед началом экстракции удаляли спирт, полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл однократного PBS-буфера ($\text{NaCl} - 137 \text{ мМ}$, $\text{KCl} - 2,7 \text{ мМ}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 10 \text{ мМ}$, $\text{KH}_2\text{PO}_2 - 2 \text{ мМ}$; $\text{pH} = 7.4$) и полученную смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин. Все последующие этапы выделения проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Кратко, при помощи прибора осуществлялись следующие стадии: в пробирки с буфером и суспензией клеток вносились входящие в состав набора для экстракции фермент протеиназа К и буфер для лизиса; затем клетки в суспензии разрушались при помощи нагревания. Полученные лизаты переносили на колонки с фильтрами, задерживающими ДНК. Затем нуклеиновую кислоту дважды промывали и смывали с фильтра при помощи специального буфера для элюции, также входящего в состав набора. Получаемый фильтрат ДНК в объеме 200 мкл собирали в пробирки Eppendorf (1,5 мл). Выделенную ДНК хранили при температуре -70°C .

2.3.1.3 Экстракция провирусной ДНК в составе геномной ДНК человека из замороженной цельной крови

Для выделения провирусной ДНК в составе геномной ДНК из замороженной цельной крови в лаборатории вирусов лейкозов подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана стандартная операционная процедура (СОП): «Метод экстракции геномной ДНК человека с интегрированной ДНК ВИЧ-1 из биологического материала». На первом этапе кровь размораживали при комнатной температуре в течение 30–60 мин. Затем размороженную кровь переносили в полипропиленовые пробирки на 15 мл и доводили объем однократным буфером для лизиса эритроцитов (RCL 5-х буфер: на 1 л – сахароза – 548 г + деионизированная MilliQ вода – 700 мл, Тритон X-100 – 50 мл, 1М $MgCl_2 \times 6H_2O$ – 25 мл, 1М Tris-HCl, pH 7.5–8.0 – 60 мл, MilliQ вода – до объема 1000 мл), центрифугировали при 2500g в течение 20 мин при комнатной температуре. По окончании процесса полученную суспензию отмывали до получения бесцветного осадка и осуществляли выделение провирусной ДНК по методике, описанной ранее (пп. 2.3.1.2).

2.3.2 Амплификация фрагментов гена *pol* ВИЧ-1

Амплификацию фрагментов гена *pol* проводили по двум схемам «гнездовой (Nested)» двухраундовой ПЦР:

1. Схема А – с использованием праймеров RP1S, RP1A для первого раунда и PROS2, RTOA для второго раунда с получением единого фрагмента, кодирующего протеазу (PR; позиция 2253–2549 относительно генома референсного штамма НХВ2 ВИЧ-1, GenBank Accession №: K03455) и часть (2/3) обратной транскриптазы (RT; НХВ2-позиция: 2250–3206).

2. Схема Б (использовалась в случае неудачи со схемой А) – с использованием праймеров POM, R2726 и F2111, polR1 для первого и второго

раундов, соответственно, для получения фрагмента, кодирующего протеазу; и F2491, RT2A – первый раунд, и RT1A, R3271 – второй раунд, – для получения фрагмента, кодирующего часть обратной транскриптазы. Последовательности использованных в работе праймеров представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика праймеров, использованных в работе

Наименование	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Координаты
RP1S	GAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAA	2016–2041
RP1A	AAATTTAGGAGTCTTTCCCATATTA CTATGC	3685–3716
PROS2	GCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTT	2080–2107
RTOA	TGCCTCTGTTAATTGTTTTACATCATTAGTGTG	3630–3662
POM	CCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGA	2010–2032
R2726	TGGAGTATTGTATGGATTTTCAGGC	2702–2726
F2111	CAAAGGGAGGCCAGGAAATTT	2112–2132
polR1	TCTCTTCTGTTAATGGCCATTGTTTAA	2611–2637
F2491	CCCCTGTCAACATAATTGGA	2491–2510
RT2A	TCTGTATATCATTGACAGTCCAGC	3301–3324
RT1A	GTTGACTCAGCTTGGTTGTAC	2519–2539
R3271	ACTGTCCATTTGTCAGGATG	3252–3271

Состав реакционной смеси при использовании схем А и Б в расчете на 1 реакцию:

1 раунд:

-5-кратный ПЦР-буфер (ФГБУН «ЦНИИЭ», Россия) – конечная концентрация (по Mg^{2+}) 2,0 мМ;

-рабочий раствор дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфаты) (Promega, США) – конечная концентрация каждого типа дНТФ 0,2 мМ;

-праймер прямой («Литех»/«Евроген», Россия) – в конечной концентрации 1,0 мкМ;

-праймер обратный («Литех»/«Евроген», Россия) – в конечной концентрации 1,0 мкМ;

-фермент ДНК Таq-полимераза (ФГБУН «ЦНИИЭ», Россия) – 2,0 ед/мкл;

-dN2O (Sigma, США) – до объема смеси 20 мкл;

-ДНК-матрица – 5,0 мкл

В качестве ДНК-матрицы в первом раунде ПЦР использовали провирусную ДНК ВИЧ-1.

При проведении второго раунда ПЦР использовали удвоенные количества всех реагентов и соответствующие праймеры, ДНК-матрицей являлся продукт амплификации первого раунда в объеме 5,0 мкл.

Режимы амплификации приведены в Таблице 3.

Таблица 3 – Программы ПЦР для получения ампликонов гена *pol*

Кодирующая область	Раунд	Праймеры	Условия амплификации
Протеаза– Обратная транскриптаза (PR–RT)	1	RP1S/RP1A	95 °C – 5 мин 94 °C – 30 с 55 °C – 1 мин 72 °C – 1 мин 30 с } 35 циклов 72 °C – 10 мин 4 °C – ∞
	2	PROS2/RTOA	95 °C – 5 мин 94 °C – 30 с 51 °C – 1 мин 72 °C – 1 мин } 35 циклов 72 °C – 5 мин 4 °C – ∞
Протеаза (PR)	1	POM/R2726	95 °C – 2 мин 95 °C – 30 с 56 °C – 1 мин 72 °C – 1 мин } 35 циклов 72 °C – 7 мин 4 °C – ∞
	2	F2111/polR1	95 °C – 2 мин 95 °C – 30 с 55 °C – 1 мин 72 °C – 1 мин 30 с } 35 циклов 72 °C – 7 мин 4 °C – ∞
Обратная транскриптаза (RT)	1	F2491/RT2A	95 °C – 2 мин 95 °C – 30 с 49 °C – 1 мин 72 °C – 2 мин } 35 циклов 72 °C – 7 мин 4 °C – ∞
	2	RT1A/R3271	95 °C – 2 мин 95 °C – 30 с 46 °C – 1 мин 72 °C – 2 мин } 35 циклов 72 °C – 7 мин 4 °C – ∞

При работе использовали амплификаторы GeneAmp PCR System 2700 и 9700 (“Applied Biosystem”, США).

В случае работы с РНК ВИЧ-1 на первой стадии проводили реакцию обратной транскрипции. Выделенную РНК в объеме 10 мкл переносили в

пробирки MicroAmp (0,2 мл) и нагревали при 65 °С (30 с) с целью денатурации вторичной структуры РНК. Затем в пробирки добавляли реакционную смесь:

-HIV RT Mix – 8 мкл;

-ингибитор РНКазы – 1 мкл;

-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Обратная Транскриптаза – 1 мкл;

-дитиотреитол (ДТТ), 100 мМ – 0,4 мкл

Данные представлены в расчете на 1 реакцию.

Режим проведения реакции обратной транскрипции представлен в Таблице 4.

Таблица 4 – Режим реакции обратной транскрипции

Температура (°С)	Время	Процесс
65	30 с	Релаксация вторичной структуры РНК
42	5 мин	Охлаждение до температуры, оптимальной для активности фермента
42	60 мин	Реакция обратной транскрипции
99	5 мин	Инактивация обратной транскриптазы
-	10 мин	Охлаждение пробы до 4 °С

После стадии обратной транскрипции в пробирки с пробами вносили по 30 мкл реакционной смеси:

-HIV PCR Mix – 29,5 мкл;

-фермент ДНК-полимераза (AmpliTaq Gold polymerase) – 0,5 мкл;

-ампераза (AmpErase UNG) – 1 мкл

Данные представлены в расчете на 1 реакцию.

Далее осуществляли амплификацию, режим проведения которой представлен в Таблице 5.

Таблица 5 – Режим амплификации

Температура (°С)	Время	Число циклов
50	10 мин	1
93	12 мин	1
93	20 с	40
64	45 с	
66	3 мин	
72	10 мин	1
4 – Хранение		

Реакции обратной транскрипции и ПЦР осуществлялись в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (“Applied Biosystem”, США).

2.3.3 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле и визуализация результатов

Оценку качества амплифицированных фрагментов ДНК проводили по электрофоретической картине в 1,2% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Для приготовления геля использовали однократный трис-ацетатный буфер (ТАЕ) (2М Трис-НСl, 1М СН₃СООН, 50 мМ ЭДТА). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 100В в течение 15–20 мин

Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли с применением гель-документирующей системы Doc-Print VX2 1100/26М (“Vilber Lourmat”, Франция) в проходящем УФ-свете при длине волны 254 нм. Концентрацию ДНК определяли флуориметрическим методом с использованием флуориметра Qubit (“Invitrogen”, США).

2.3.4 Очистка ПЦР-продукта

Очистку амплифицированных ДНК-фрагментов проводили с использованием коммерческого набора для очистки ДНК из реакционных смесей при помощи суспензии магнитных частиц («Силекс», Россия) или набора для очистки ПЦР-фрагментов – Cleanup S-Cap («Евроген», Россия) в соответствии с протоколами фирм-производителей.

Принцип очистки при помощи суспензии магнитных частиц основан на обратимом связывании ДНК на их поверхности. Стадия очистки ПЦР-продукта при помощи Cleanup S-Cap использует ультрафильтрационную мембрану, позволяющую меньшим по размеру ДНТФ и праймерам пройти сквозь нее, в то время как более крупные фрагменты ДНК остаются на верхней поверхности фильтра.

Для проверки результатов очистки 2 мкл полученного продукта смешивали с красителем и осуществляли электрофорез; затем визуально сравнивали электрофоретическую картину с результатами, полученными в предыдущем пункте, и оценивали качество очистки (по содержанию и интенсивности дополнительных полос) и концентрацию очищенного продукта (по интенсивности свечения основной полосы).

2.3.5 Секвенирование продуктов амплификации

Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли дидезокси-методом по Сэнгеру, основанном на включении терминирующих дидезокинуклеотидов с флуоресцентными метками при синтезе цепи ДНК [162].

Набор праймеров, используемых для реакции секвенирования, зависел от схемы амплификации (п. 2.3.2):

- схема А – Prsec1, PPOS2, RTsec1, RTOA – для секвенирования фрагмента, кодирующего протеазу и 2/3 обратной транскриптазы (последовательности

праймеров: Prsec1 – CAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATA; RTsec1 – CAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATA);

- схема Б:

F2111, polR1 – для секвенирования фрагмента, кодирующего протеазу;

RT1A, R3271 – для секвенирования фрагмента, кодирующего часть обратной транскриптазы.

В системе генотипирования ВИЧ-1 ViroSeq (при работе с плазмой крови, схема В) используются 7 праймеров (4 прямых (forward) и 3 обратных (reverse)) для секвенирования фрагмента, кодирующего область протеазы и 2/3 обратной транскриптазы).

Реакцию секвенирования для схем А и Б проводили с использованием коммерческого набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Реакционная смесь в расчете на 1 образец состояла из Ready reaction mix – 2 мкл, 5-кратного Sequencing Buffer – 1 мкл, праймера – 1 мкл и dH₂O – 3 мкл; к полученной смеси добавляли 3 мкл исследуемой пробы.

Реакцию секвенирования осуществляли при следующем режиме:

- | | | |
|----|----------------|-------------|
| 1. | 96 °C – 2 мин; | } 25 циклов |
| 2. | 96 °C – 10 с; | |
| 3. | 50 °C – 5 с; | |
| 4. | 72 °C – 4 мин; | |
| 5. | 72 °C – 7 мин | |

Затем полученные образцы ДНК очищали от побочных продуктов секвенирования и концентрировали путем осаждения спиртом в присутствии соли. Для этого в каждую пробирку с продуктом секвенирования вносили по 27 мкл смеси, состоящей из 25 мкл 96%-го этанола, 1 мкл 3М ацетата натрия и 1 мкл ЭДТА, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 мин. По окончании центрифугирования удаляли супернатант, полученный осадок ресуспендировали в 125 мкл 70%-го этанола и снова подвергали центрифугированию при 1400 об/мин

в течение 5 мин. Затем удаляли этанол, осадок ДНК подсушивали в течение 2 мин при 50 °С и ресуспендировали в 10 мкл формамида, подвергали денатурации при 93 °С в течение 2 мин и охлаждали во льду.

Проведение оценки реакции секвенирования осуществлялось автоматически в генетическом анализаторе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США).

Первичная обработка полученных нуклеотидных последовательностей осуществлялась с помощью программ Sequencing Analyzer v. 5.2 (“Applied Biosystems”, США).

Для проведения реакции секвенирования в системе ViroSeq использовали готовые смеси (HIV SEQ Mix A-H, включающие в себя соответствующие праймеры) в объеме 12 мкл и очищенный ПЦР-продукт в объеме 8 мкл

Режим реакции секвенирования представлен на схеме:

- | | | |
|----|---------------|-------------|
| 1. | 96 °С – 10 с; | } 25 циклов |
| 2. | 50 °С – 5 с; | |
| 3. | 60 °С – 4 мин | |

Очистку продуктов реакции секвенирования проводили также с помощью этанола/ацетата натрия.

Обработка последовательностей осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения ViroSeq HIV-1 Genotyping Software v. 3.0.

2.4 Биоинформатические методы

2.4.1 Обработка нуклеотидных последовательностей

Редактирование полученных последовательностей, а также конструирование консенсусных нуклеотидных последовательностей выполняли с применением приложения SeqMan II (DNASTAR Inc, США). Консенсусную последовательность проверяли «вручную» во всех точках, где автоматическая интерпретация указывала на наличие полиморфизма или выявляла проблемы считывания.

Попарное и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено с помощью модуля ClustalW, интегрированного в программный пакет AliView [113]. Если в полученных алайнментах были выявлены проблемные участки, то проводили их дополнительное выравнивание «вручную».

2.4.2 Определение генетических вариантов ВИЧ-1

Предварительное определение генетических вариантов ВИЧ-1 осуществляли с применением программ: COMET HIV-1 [176], HIVdbProgram Sequence Analysis, представленной на сайте Стэнфордского университета [158; 165; 166], и REGA HIV-1 Subtyping Tool (V3) [151]. При однозначной интерпретации генетического варианта ВИЧ-1 с процентом идентичности от 97 до 100% во всех трех программах его считали достоверно определенным. При неоднозначных результатах и/или идентичности менее 97% исследуемые нуклеотидные последовательности подвергали дополнительному анализу. Сначала осуществляли поиск близкородственных им последовательностей с применением инструмента BLAST [89] – при нахождении нескольких схожих последовательностей с процентом идентичности 97–100 % генетический вариант исследуемых последовательностей определяли как идентичный найденным.

Образцы с неопределенным генетическим вариантом подвергались дополнительному рекомбинационному анализу (Рисунок 8).

Образцы, предварительно определенные как ВИЧ-1 рекомбинантных форм CRF02_AG и CRF63_02A6, были дополнительно проанализированы с использованием программы Recombination Identification Program (RIP) [168] (так как она, в отличие от других, включает в себя референсные нуклеотидные последовательности, характерные для данных генетических вариантов), а также посредством филогенетического анализа.

Отношение нуклеотидных последовательностей субтипа А к суб-субтипу А1 или А6 определяли также при помощи программы RIP.

2.4.3 Рекомбинационный анализ

Для выявления и детального анализа (определения точек рекомбинации) рекомбинантных форм ВИЧ-1 применяли программы jpHMM [164], RIP [157] и Recombination Detection Program [132] (Рисунок 8).

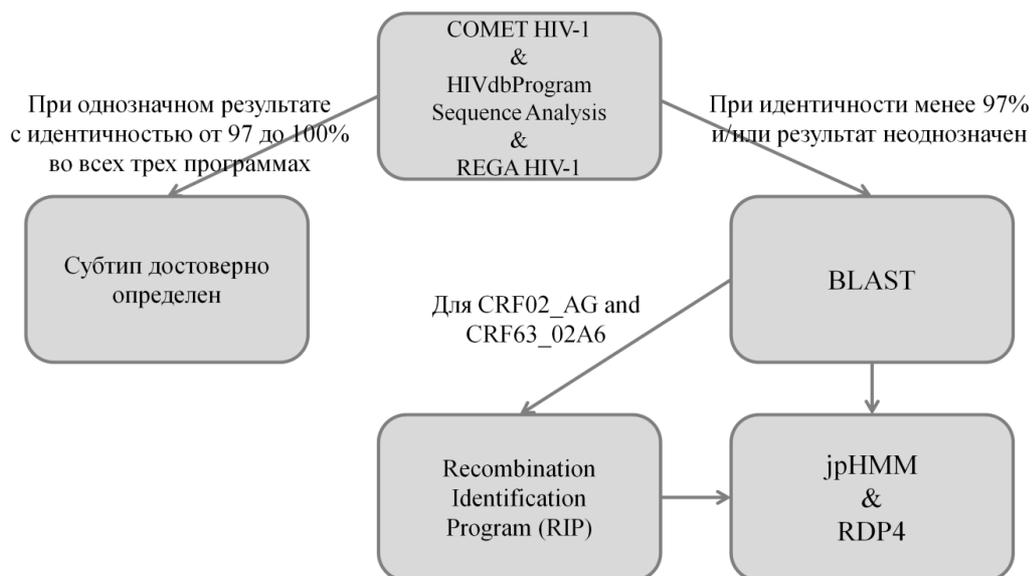


Рисунок 8 – Алгоритм определения генетических вариантов ВИЧ-1

Для рекомбинационного анализа в программе RDP4 были использованы референсные нуклеотидные последовательности, представленные в Таблице 6.

Таблица 6 – Референсные нуклеотидные последовательности, использованные для рекомбинационного анализа (RDP4)

Генетический вариант	Референсные нуклеотидные последовательности (номер в международной базе данных Лос-Аламосской лаборатории [90])
A1	A1.KE.1994.Q23_17.AF004885 A1.SE.1994.SE7253.AF069670 A1.UG.1998.98UG57136.AF484509 A1.UG.1992.92UG037.U51190
A6	A6.UA.2000.98UA0116.AF413987 A6.GE.1999.99GEMZ011.DQ207944 A6.IT.2002.60000.EU861977 A6.BY.2013.PV85.KT983615
B	<u>Пандемический B субтип (B pandemic):</u> B.US.1986.5019_86.AY835780 B.US.1983.RF_HAT3.M17451 <u>B-FSU (MCM):</u> B.UA.2001.01UAKV252.DQ823363 B.UA.2001.01UAKV259.DQ823364 <u>B-FSU (ПИН):</u> B.UA.2001.01UAKV259.DQ823364 B.RU.2011.11RU21n.JX500708 <u>Карибский B субтип (Car-B):</u> B.HT.2005.05HT_129389.EU839602 B.JM.2005.05JM_KJ108.EU839605 <u>Таиландский B субтип (Thai-B):</u> B.TH.2005.05TH429730.JN248347 B.TH.1996.M041.DQ354114 B.TH.2005.05TH429730.JN248347

Продолжение таблицы 6

Генетический вариант	Референсные нуклеотидные последовательности (номер в международной базе данных Лос-Аламосской лаборатории [90])
G	G.KE.1993.HH8793_1_1.AF061640 G.BE.1996.DRCBL.AF084936 G.NG.1992.92NG083_JV10832.U88826 G.SE.1993.SE6165_G6165.AF061642
CRF03_AB	03_A6B.RU.1997.KAL153_2.AF193276
CRF02_AG	02_AG.NG.-.IBNG.L39106
CRF63_02A6	63_02A6.RU.2010.10RU6637.JN230353

Событие рекомбинации в программе RDP4 считалось достоверным при ее идентификации двумя и более математическими моделями.

Графическое изображение карт геномов с точками рекомбинации получали в программе jPHMM или выполняли вручную по результатам программы RDP4 с применением инструмента Recombinant HIV-1 Drawing Tool [156].

2.4.4 Филогенетический анализ

Филогенетический анализ осуществляли методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с использованием программы IQ-TREE [142]. Источником эталонных последовательностей служила база данных Лос-Аламосской лаборатории, США [90].

Модель замещения нуклеотидов определяли в программе jModelTest v.2.1.7 на основании информационного критерия Акаике (Akaike information criterion, AIC) [62]. Наиболее подходящей моделью для последующего анализа считали модель с наименьшим значением критерия [21]. Достоверность выведенных филогений оценивали с помощью бутстрэп-теста (bootstrap) и критерия приблизительного отношения правдоподобия Шимодайры-Хасегавы (SH-aLRT) с 1000 послестартовых итераций. Кластеры с поддержкой SH-aLRT > 0,9 считались достоверно установленными. Визуализацию и графическую обработку результатов филогенетического анализа осуществляли в программе iTOL [117].

2.4.5 Определение мутаций лекарственной устойчивости

Мутации лекарственной устойчивости были определены с использованием инструмента базы данных (HIVdb) Стэнфордского университета – Calibrated Population Resistance Tool (CPR), включающего список надзорных МЛУ (surveillance drug resistance mutations, SDRMs) [60].

2.5 Статистический анализ данных и их визуализация

Статистический анализ данных был проведен с помощью языка программирования R (RStudio, Inc. Software, США), а также программы STATISTICA v. 6.0 (StatSoft Inc., США).

Для оценки распространенности (частоты встречаемости) рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации в динамике были определены следующие критерии:

1. Нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 должны быть получены не менее чем из 4-х федеральных округов (ФО) в год, то есть не менее чем из 50% от всех федеральных округов РФ.

2. При несоблюдении данного критерия допускалось объединение данных за несколько лет или привлечение дополнительных н. п. из международной базы данных Лос-Аламосской лаборатории [90] с характеристиками, соответствующими исследуемым последовательностям (область гена *pol*, координаты: 2253–3554, минимальная длина последовательности – 919 н. о.).

Оцениваемые в работе категориальные данные представляли в виде долей и частот, их сравнение проводили с использованием критерия «хи-квадрат» (χ^2); в случае его неустойчивости (при небольших объемах выборки и/или при значениях ожидаемых наблюдений $< 5,0$ более чем в 1 ячейке – для четырехпольных таблиц или более чем в 20% – для произвольных) применяли χ^2 с поправкой Йейтса или

двусторонний точный тест Фишера. Оценку силы связи между исследуемыми признаками проводили с применением критерия ϕ и V Крамера.

Принятая в работе величина уровня значимости (p , probability) составляла 0,05 (или 5,0 %); различия признавали значимыми $p < 0,05$.

Визуализация данных была выполнена с применением языка программирования R.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Характеристика ВИЧ-инфицированных пациентов, включенных в исследование

Образцы лимфоцитов от 613 ВИЧ-инфицированных лиц, образцы плазмы крови от 2502 пациентов и 63 образца замороженной цельной крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, принадлежащих к разным группам риска и проживающих в разных регионах Российской Федерации (Архангельск, Барнаул, Благовещенск, Владивосток, Вологда, Ижевск, Иркутск, Казань, Краснодар, Красноярск, Москва и Московская область (МО), Мурманск, Нижневартовск, Нижний Новгород, Ноябрьск, Пермь, Симферополь, Сургут, Хабаровск, Ханты-Мансийск, Череповец, Южно-Сахалинск) были получены с их информированного согласия в период с 2011 по 2020 гг. Данные образцы были собраны в ходе выполнения систематических работ по молекулярно-генетическому мониторингу эпидемии ВИЧ-инфекции на территории РФ в период 2011–2020 гг.

Образцы были получены как от пациентов, никогда ранее не принимавших антиретровирусную терапию (далее – нелеченые/наивные), так и от пациентов, получающих АРТ (далее – леченые). Всего за период с 2011 по 2020 год было получено 1494 образца от наивных пациентов и 1674 образца – от пациентов, находящихся на терапии, для 10 пациентов данные о терапии не были точно известны.

Основные характеристики ВИЧ-инфицированных пациентов, включенных в исследование, представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Эпидемиологическая характеристика пациентов, включенных в исследование

Год	Пол		Медиана [МКИ] возраста пациентов	Фактор риска инфицирования ВИЧ-1						Всего пациентов
	Мужчины, N (%)	Женщины, N (%)		ГТСК, N (%)	ПИН, N (%)	МСМ, N (%)	Вертикальный, N (%)	Не установлен, N (%)	Другие, N (%)	
2011	107 (53,50)	93 (46,50)	32,0 [23,6-40,4]	88 (44,00)	99 (49,50)	5 (2,50)	3 (1,50)	4 (2,00)	1 (0,50)	200
2012	309 (48,66)	326 (51,34)	33,0 [23,3-42,7]	271 (42,68)	306 (48,19)	9 (1,42)	34 (5,35)	14 (2,20)	1 (0,16)	635
2013	183 (50,83)	177 (49,17)	34,0 [23,7-44,3]	189 (52,50)	134 (37,22)	10 (2,78)	10 (2,78)	15 (4,17)	2 (0,56)	360
2014	177 (55,14)	144 (44,86)	35,0 [24,3-45,7]	156 (48,60)	122 (38,01)	15 (4,67)	16 (4,98)	9 (2,80)	3 (0,93)	321
2015	237 (60,15)	157 (39,85)	35,0 [24,2-45,8]	200 (50,76)	147 (37,31)	18 (4,57)	22 (5,58)	6 (1,52)	1 (0,25)	394
2016	206 (59,37)	141 (40,63)	36,0 [25,3-46,7]	198 (57,06)	112 (32,28)	10 (2,88)	20 (5,76)	4 (1,15)	3 (0,86)	347
2017	235 (58,75)	165 (41,25)	36,0 [26,2-45,8]	223 (55,75)	147 (36,75)	18 (4,50)	6 (1,50)	5 (1,25)	1 (0,25)	400
2018	60 (56,07)	47 (43,93)	34,0 [23,0-45,0]	60 (56,07)	29 (27,10)	13 (12,15)	1 (0,93)	3 (2,80)	1 (0,93)	107
2019	164 (62,36)	99 (37,64)	37,0 [26,2-47,8]	168 (63,88)	64 (24,33)	28 (10,65)	1 (0,38)	1 (0,38)	1 (0,38)	263
2020	97 (64,24)	54 (35,76)	39,0 [29,4-48,6]	89 (58,94)	36 (23,84)	22 (14,57)	-	4 (2,65)	-	151
Итого	1775 (55,89)	1403 (44,11)	35,0 [24,6-45,4]	1642 (51,67)	1196 (37,63)	148 (4,66)	113 (3,56)	65 (2,05)	14 (0,44)	3178

В половой структуре ВИЧ-инфицированных пациентов отмечалось преобладание мужчин. Возраст пациентов варьировал от 6 месяцев (0 лет) до 85 лет, при этом средний возраст исследуемой популяции на момент забора крови составил 35,0 лет.

Преобладающим фактором риска инфицирования в общей структуре исследуемой популяции являлись гетеросексуальные контакты (ГТСК), доля которых составила 51,67% (1642/3178). При этом стоит отметить незначительное преобладание риска заражения ВИЧ-1 при потреблении инъекционных наркотиков до 2012 года включительно, в то время как гетеросексуальный путь заражения становится наиболее распространенным, начиная с 2013 года. Также среди факторов риска инфицирования выделялись гомосексуальные контакты (МСМ) и вертикальный путь передачи ВИЧ-1 от матери к ребенку, доля которых составила 4,66% (148/3178) и 3,56% (113/3178), соответственно. Для 65 пациентов (2,06%) фактор риска заражения не был точно установлен, при это 20 пациентов отмечали факт потребления инъекционных наркотиков и множественные гетеросексуальные контакты одновременно; 14 случаев (0,44%) заражения ВИЧ-1 были объединены в группу «Другие» и включали в себя: внутрибольничные заражения – 12, инфицирование в ходе выполнения профессиональной медицинской деятельности – 1 и один случай инфицирования в процессе нанесения татуировки.

3.2 Молекулярно-генетический анализ образцов ВИЧ-1

3.2.1 Анализ нуклеотидных последовательностей области гена *pol* исследуемых образцов ВИЧ-1

В рамках настоящей работы были проанализированы 3178 нуклеотидных последовательностей области гена *pol*, кодирующей вирусные ферменты – протеазу (PR) и 2/3 обратной транскриптазы (OT, RT).

Суммарная длина фрагмента PR-RT_{*pol*} после выравнивания составила 1305 н. о. (HXB2-позиция: 2253–3557).

3.2.2 Субтипология принадлежности расшифрованных участков генома ВИЧ-1

По результатам первичного анализа нуклеотидных последовательностей, согласно алгоритму, представленному в п. 2.4.2 и 2.4.3, было установлено, что 2633 образца (82,85%) принадлежали суб-субтипу А6, 227 образцов (7,14%) – субтипу В, 151 образец (4,75%) – суммарно составили рекомбинантные формы CRF02_AG и CRF63_02A6, 36 образцов (1,13%) относились к рекомбинантному варианту CRF03_AB. Остальные генетические варианты ВИЧ-1 составили менее 1% каждый и были представлены субтипами А1 (1/3178), С (22/3178), D (1/3178), F1 (1/3178) и G (18/3178) и рекомбинантными формами CRF01_AE (1/3178) и CRF11_crx (1/3178). Для 86 образцов (2,71%) был получен сложный для интерпретации результат генотипирования области PR-RT_{*pol*}: геном ВИЧ-1 данных образцов включал в себя фрагменты от разных генетических вариантов вируса и при этом был отличен ото всех известных на данных рекомбинантных форм ВИЧ-1. Данные генетические последовательности ВИЧ-1 были отнесены к уникальным рекомбинантам, результаты их детального анализа описаны в п. 3.3.3.

Среди пациентов, зараженных гетеросексуальным путем, наблюдалось преобладание ВИЧ-1 суб-субтипа А6 – 84,35% (1385/1642); в когорте мужчин,

практикующих секс с мужчинами, доминировал субтип В – 49,32% (73/148) (Таблица 8).

Таблица 8 – Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 по путям передачи в исследуемых образцах

Генетический вариант ВИЧ-1	Путь передачи						
	ГТСК, N (%)	ПИН, N (%)	МСМ, N (%)	Вертикальный, N (%)	Нозокомальный, N (%)	Другие, N (%)	Не установлен, N (%)
A1	1 (0,06)	0	0	0	0	0	0
A6	1385 (84,35)	1010 (84,45)	62 (41,89)	104 (92,04)	9 (75,00)	1 (50,00)	62 (95,38)
B	97 (5,91)	55 (4,60)	73 (49,32)	1 (0,88)	0	0	1 (1,54)
C	13 (0,79)	8 (0,67)	0	0	0	0	1 (1,54)
CRF01_AE	1 (0,06)	0	0	0	0	0	0
CRF02_AG/ CRF63_02A6	65 (3,96)	77 (6,44)	3 (2,03)	3 (2,65)	2 (16,67)	1 (50,00)	0
CRF03_AB	24 (1,46)	12 (1,00)	0	0	0	0	0
CRF11_cpx	1 (0,06)	0	0	0	0	0	0
D	1 (0,06)	0	0	0	0	0	0
F1	0	0	0	1 (0,88)	0	0	0
G	12 (0,73)	1 (0,08)	5 (3,38)	0	0	0	0
URFs	42 (2,56)	33 (2,76)	5 (3,38)	4 (3,54)	1 (8,33)	0	1 (1,54)
Итого	1642	1196	148	113	12	2	65

Наибольшая суммарная доля ВИЧ-1 рекомбинантных форм (CRFs и URFs) была отмечена в группе ПИН и составила 10,20% (122/1196), однако, данные различия не являлись статистически значимыми.

3.3 Анализ выявленных рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации

Детальный анализ выявленных рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории России включал в себя филогенетический анализ с целью уточнения их происхождения, оценку генетического разнообразия выявленных рекомбинантов, оценку их распространенности и сравнительный анализ первичной лекарственной устойчивости к основным классам антиретровирусных препаратов для ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов. Также был осуществлен детальный анализ выявленных уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 с изучением структуры их генома.

3.3.1 Филогенетический анализ рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных на территории Российской Федерации

Методом филогенетического анализа были установлены пути заноса ВИЧ-1 рекомбинантных форм на территорию Российской Федерации.

CRF01_AE. На филогенетическом древе исследуемый образец MOW121459.MH666441 сформировал достоверный кластер (SH-aLRT = 1) с образцами ВИЧ-1, полученными на территории Филиппин (Рисунок 9).

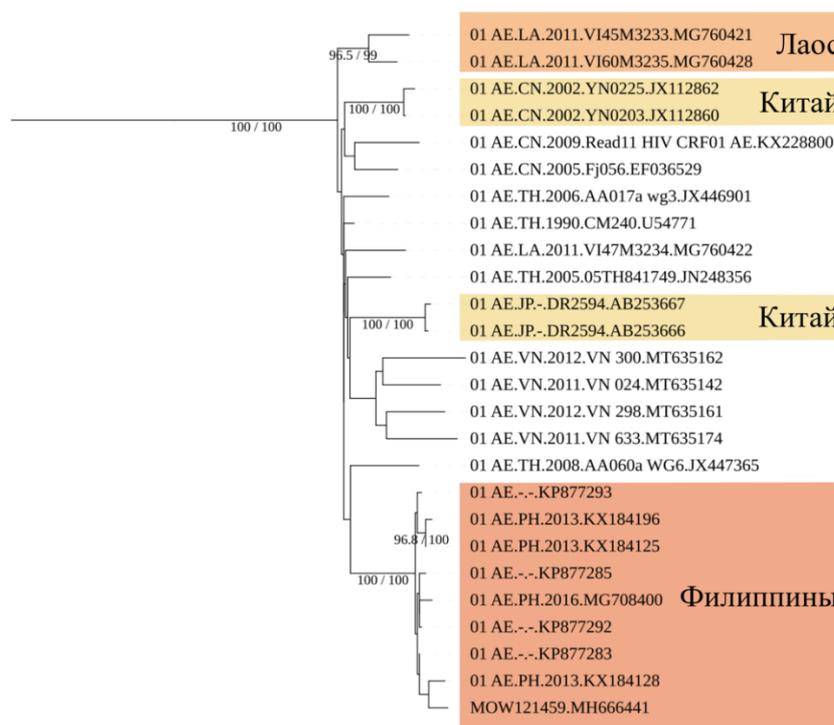


Рисунок 9 – Филогенетический анализ CRF01_AE ВИЧ-1, выявленной на территории Российской Федерации

(длина алайнмента – 1305 н. о.; модель замещения нуклеотидов – TVM + I + G4)

Данная кластеризация указывает на случай единичного заноса ВИЧ-1 CRF01_AE на территорию Российской Федерации из островного государства – Республики Филиппины – в Юго-Восточной Азии.

Образцы ARH022.KU670322, KRD204.MK795071, KRD205.MK795072 и 1312000030.OK474712 были исключены из филогенетического анализа, так длина их нуклеотидных последовательностей составила менее 1098 н. о. и не входила в доверительный интервал точек рекомбинации исследуемых CRFs. Генетические варианты данных образцов оставались определенными при помощи онлайн-программ, а также инструментов BLAST и RIP.

По результатам филогенетического анализа 3 исследуемых образца, MRK092.KX432133, KRD316.MK795125, KHB035.KC665935, были включены в кластер, образованный нуклеотидными последовательностями CRF02_AG ВИЧ-1 из Нигерии, Ганы, Сенегала и Камеруна, что свидетельствует об их африканском происхождении. Более того, образец KHB035.KC665935 сформировал достоверный кластер (SH-aLRT = 0,99) с образцом из Нигерии (IBNG.L39106), что точно указывает на случай его заноса с территории Республики.

Остальные образцы были разделены на два достоверных кластера (SH-aLRT = 1) – 33 исследуемые нуклеотидные последовательности по результатам филогенетического анализа вошли в кластер CRF02_AG ВИЧ-1, выявленных на территории бывшего Советского Союза, в Узбекистане (референсные последовательности: 02UZ693.AY829204, 02UZ710.AY829207, 02UZ0683.AY829214 [46]); остальные 110 исследуемых последовательностей вошли в кластер CRF63_02A6 ВИЧ-1, выявленных на территории РФ, в Сибири, в 2009–2010 гг. Также были идентифицированы множественные достоверные кластеры (SH-aLRT = 0,97–1,00), образованные между исследуемыми образцами, что указывает на множественные случаи передачи вируса данных CRFs внутри страны.

Так, было обнаружено несколько достоверных кластеров с передачей вируса среди потребителей инъекционных наркотиков: BRN128.MK612487 и BRN052.MK612455; BRN033.MK612442 и BRN034.MK612443, BRN050.MK612453 и BRN127.MK612486, BRN084.MK612468 и BRN147.MK612496. Отдельно стоит отметить достоверный кластер, образованный образцами 1311000510.OL792364, 1311001096.OL792592,

1311000528.OL792371, 1311000453.OL792342 – из Москвы и образцом SMF206.МК606615 – из Симферополя. Согласно эпидемиологическим данным, было установлено, что выявленный кластер объединил в себе нуклеотидные последовательности, полученные от потребителей инъекционных наркотиков, а предполагаемым местом заражения пациента SMF206.МК606615 являлась Коломна. Еще один крупный кластер был образован последовательностями: 2006D.ОК474394, 3027D.ОК474449, 3561.ОК474479, 7137.ОК474617, 2010А.ОК474395, 5845А.ОК474588, 4974.ОК474543 – из Краснодара и 1311000520.OL792369 – из Москвы и KRS3265.МК589433 – из Красноярска. Анализ эпидемиологических данных указал на множественные гетеросексуальные контакты пациентов, включенных в данный кластер, с потребителями инъекционных наркотиков на территории Краснодарского края. Вероятное место заражения для образцов из Москвы не было указано, однако было установлено, что последовательность 1311000520.OL792369 была получена от женщины 37 лет, зараженной гетеросексуальным путем, а последовательность KRS3265.МК589433 – от женщины, 28 лет, являющейся потребителем инъекционных наркотиков. Такие же кластеры, включающие в себя последовательности как от ПИН, так и от их сексуальных партнеров, были образованы образцами 1311000329.MW756421, 1311001024.OL792539 и 1311000659.OL792408 – из Москвы и образцами BRN037.МК612446, BRN133.МК612490 и BRN134.МК612491 – из Барнаула. Особого внимания заслуживает кластер, включающий последовательности KRS3182.МК589432, KRS6342.МК589444 – из Красноярска и KMD.ОК474673 – из Краснодара. Согласно эпидемиологическим данным, образцы из Красноярска были получены от лиц мужского пола, возраста 27 лет (потребитель инъекционных наркотиков) и 1 года (путь заражения – вертикальный), таким образом, данные филогенетического анализа позволяют предположить родственную связь данных пациентов, однако достоверно установить это при эпидемиологическом расследовании не удалось. Также были обнаружены два достоверных кластера с передачей вируса при гомосексуальных контактах: 1311000615.OL792394,

1311000464.OL792348 и 5608D.OK474578; MRK055.KX432106 и MRK074.KX432120. С помощью филогенетического анализа и анализа эпидемических данных также был установлен случай заражения при выполнении профессиональной медицинской деятельности – кластер KRS4261.MK589437 и KRS4267.MK589438 и случай нозокомиального инфицирования – кластер KRS6554.MK589445 и KRS6558. MK589446.

Последовательность BRN125.MK612484 по результатам филогенетического анализа была отнесена к уникальным рекомбинантным формам ВИЧ-1, так как кластеризовалась опосредованно от CRF02_AG и CRF63_02A6. Такая кластеризация возможна при относительном сходстве генетических вариантов и небольшом отличии в расположении точек рекомбинации.

Образцы 1312000014.ОК474705, 7686.ОК474635 и 5000-5.МТ461107 были исключены из филогенетического анализа, так как длина их нуклеотидных последовательностей составила менее 1100 н. о., что представляет менее 95% от длины остальных исследуемых последовательностей.

В результате филогенетического анализа были обнаружены 3 достоверных кластера ($SH-aLRT = 1$), образованных между образцами CHR081.MN187981 и CHR082.MN187982; CHR910.MN188012 и CHR912.MN188014; CHR911.MN188013 и CHR913.MN188015. Это свидетельствует о передаче вирусов рекомбинантной формы CRF03_AB внутри страны. Анализ эпидемиологических данных позволил установить связи внутри каждого кластера, почти все они были обусловлены гетеросексуальными контактами, при этом стоит отметить, что образцы CHR910 и CHR913 были получены от потребителей инъекционных наркотиков.

CRF11_срх. Исследуемый образец SHL083.MF124870 на филогенетическом дереве входил в кластер с CRF11_срх ВИЧ-1 африканского происхождения (Рисунок 12).

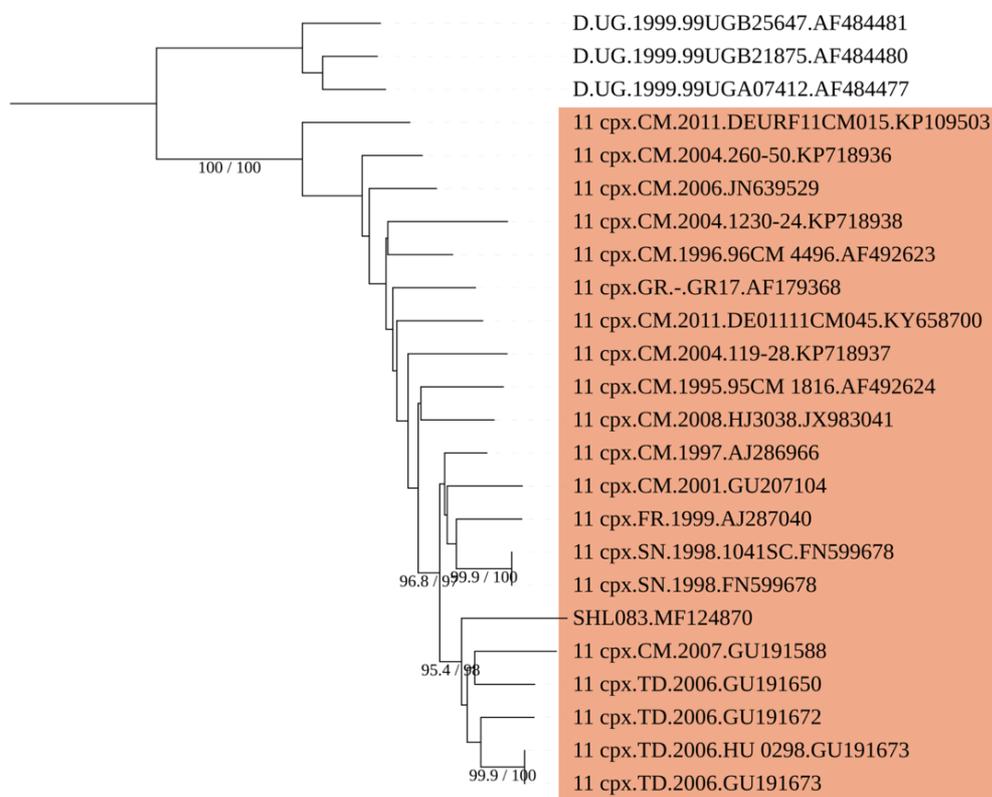


Рисунок 12 – Филогенетический анализ CRF11_срх ВИЧ-1, выявленной на территории Российской Федерации

(длина алайнмента – 1305 н. о.; модель замещения нуклеотидов – GTR + I + G4)

Такая кластеризация может свидетельствовать о начальном заносе CRF11_срх на территорию РФ из стран Африки.

3.3.2 Выявленные рекомбинантные формы ВИЧ-1 на территории Российской Федерации

На основании анализа нуклеотидных последовательностей исследованных образцов было выявлено 275 рекомбинантных форм ВИЧ-1 (Таблица 9).

Таблица 9 – Рекомбинантные формы ВИЧ-1, выявленные на территории Российской Федерации

Рекомбинантная форма	Количество, N (%)
CRF01_AE	1 (0,36%)
CRF02_AG	36 (13,09%)
CRF03_AB	36 (13,09%)
CRF11_cpx	1 (0,36%)
CRF63_02A6	114 (41,46%)
URFs	87 (31,64%)
Итого	275 (100,0%)

Немного меньше половины случаев инфицирования (114/275) вирусами рекомбинантных форм приходилось на CRF63_02A6 – 41,46%; по 36 случаев (13,09%) заражения были вызваны CRF02_AG и CRF03_AB ВИЧ-1, 1 случай (0,36%) – CRF01_AE и 1 случай (0,36%) – CRF11_cpx. Также было выявлено 87 случаев (31,64%) инфицирования вирусами с уникальной структурой генома. Далее был проведен их детальный анализ.

3.3.3 Анализ уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных на территории Российской Федерации

По итогу проведенных исследований нуклеотидных последовательностей методами генетического, филогенетического, а также рекомбинационного анализа было обнаружено 87 образцов ВИЧ-1 с уникальной структурой генома. Структура генома, а также расположение точек рекомбинации данных нуклеотидных последовательностей представлены в Таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных в исследовании

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
AB-уникальные рекомбинантные формы				
KZN014.KJ466558	2253-2450 (Thai-B)	2451-3551 (A6)	-	
ARH008.KU557644	2253-3233 (A6)	3234-3485 (B-FSU)	-	
ARH025.KU933330	2253-2992 (Car-B)	2993-3233 (A6)	-	
ARH040.KU670323	2253-3226 (CRF03)	3227-3506 (A6)	-	
CHR019.MN187975	2253-3255 (CRF03)	3256-3551 (A6)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
CHR070.MN187978	2253-2913 (A6)	2914-3202 (Thai-B)	3203-3551 (A6)	
CHR080.MN187980	2253-3199 (CRF03)	3200-3547 (A6)	-	
CHR166.MN187986	2253-3255 (CRF03)	3256-3551 (A6)	-	
CHR556.MN188005	2253-2952 (A6)	2953-3255 (Thai-B)	3256-3551 (A6)	
SHL057.MF124853	2253-3221 (A6)	3222-3541 (B pandemic)	-	
SHL061.MF124856	2253-2546 (A6)	2547-3260 (Car-B)	-	
74-2007.OM050092	2253-3386 (A6)	3387-3511 (B-FSU)	-	
KRS4269.MK589439	2253-3478 (A6)	3479-3551 (B pandemic)	-	
NNG561.KJ722105	2253-2450 (B pandemic)	2451-3551 (A6)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
3532.OK474476	2253-2609 (A6)	2610-3171 (B-FSU)	-	
1703A.OK474378	2253-2609 (A6)	2610-3171 (B-FSU)	-	
4362A.OK474517	2253-2609 (A6)	2610-3171 (B-FSU)	-	
KRD209.MK795075	2253-2556 (A6)	2557-3232 (Car-B)	-	
3570D OK474482	2253-2952 (A6)	2953-3171 (B-Thai)	-	
2713A.OK474433	2253-2554 (Thai-B)	2555-3050 (A6)	3051-3171 (Thai-B)	
1312000070.OK474725	2253-3030 (A6)	3031-3171 (B pandemic)	-	
1312000202.OK474750	2253-2556 (A6)	2557-3171 (Car-B)	-	
1312000208.OK474753	2253-2556 (A6)	2557-3171 (Car-B)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
1312000261.ОК474757	2253-2654 (A6)	2655-3171 (B-FSU)	-	
MOW102645.MH666364	2253-2462 (Thai-B)	2463-3551 (A6)	-	
MOW103145.MH666370	2253-2459 (Car-B)	2460-3551 (A6)	-	
MOW109184.MH666393	2253-2437 (Thai-B)	2438-3551 (A6)	-	
MOW119218.MH666433	2253-3277 (A6)	3278-3551 (B pandemic)	-	
MOW125543.MH666460	2253-2479 (A6)	2480-3046 (Car-B)	3047-3551 (A6)	
MOW126388.MH666465	2253-3404 (A6)	3405-3551 (B-FSU)	-	
MOW127873.MH666474	2253-3479 (A6)	3480-3551 (B pandemic)	-	
MOW129062.MH666490	2253-3418 (A6)	3419-3551 (B-FSU)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
MOW170294.MH666600	2253-2351 (B pandemic)	2352-3551 (A6)	-	
MOW173915.MH666609	2253-2450 (B pandemic)	2451-3551 (A6)	-	
MOW178169.MH666629	2253-3386 (A6)	3387-3551 (B pandemic)	-	
MOW179103.MH666637	2253-3444 (A6)	3445-3551 (B pandemic)	-	
MOW189742.MH666666	2253-3416 (A6)	3417-3551 (B-FSU)	-	
MOW191857.MH666675	2253-3413 (A6)	3414-3551 (B-FSU)	-	
MOW197769.MH666700	2253-3445 (A6)	3446-3551 (Car-B)	-	
MOW206415.MH666754	2253-3346 (A6)	3347-3551 (B pandemic)	-	
MOW212381.MH666794	2253-2440 (Thai-B)	2441-3551 (A6)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
MOW230737.MH666850	2253-3405 (A6)	3406-3551 (B pandemic)	-	
MOW236022.MH666874	2253-3323 (A6)	3324-3551 (B pandemic)	-	
MOW23690.MH666876	2253-3365 (A6)	3366-3551 (B-FSU)	-	
MOW238398.MH666879	2252-3337 (A6)	3338-3551 (Car-B)	-	
MOW243074.MH666904	2253-3400 (A6)	3401-3551 (B-FSU)	-	
MOW243257.MH666908	2253-3344 (A6)	3345-3551 (B pandemic)	-	
MOW255873.MH666973	2253-2983 (A6)	2984-3203 (B-FSU)	3204-3551 (A6)	
MOW257204.MH666986	2253-2434 (Car-B)	2435-3551 (A6)	-	
MOW259253.MH667011	2253-3069 (B pandemic)	3070-3212 (A6)	3213-3551 (B pandemic)	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
MOW259399.MH667013	2253-3478 (A6)	3479-3551 (B pandemic)	-	
MOW262312.MH667034	2253-2314 (B-FSU)	2315-3551 (A6)	-	
MOW26246.MH667035	2253-2313 (B-FSU)	2314-3551 (A6)	-	
MOW263544.MH667042	2253-2416 (Car-B)	2417-3551 (A6)	-	
MOW263861.MH667050	2253-2458 (B-FSU)	2459-3551 (A6)	-	
MOW267311.MH667060	2253-3255 (Thai-B)	3256-3551 (A6)	-	
MOW269550.MH667067	2253-2314 (B-FSU)	2315-3551 (A6)	-	
MOW270119.MH667070	2253-2751 (A6)	2752-3085 (B-FSU)	3086-3551 (A6)	
MOW272471.MH667076	2253-2314 (B-FSU)	2315-3551 (A6)	-	

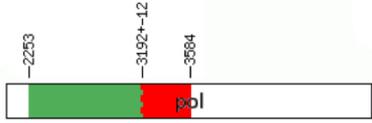
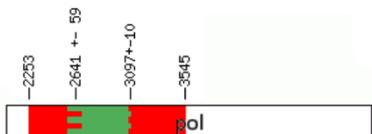
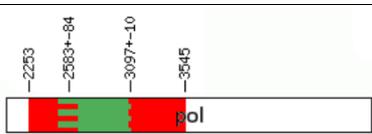
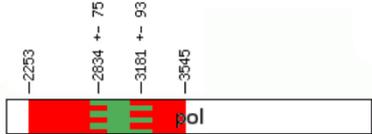
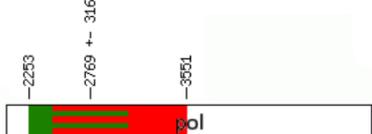
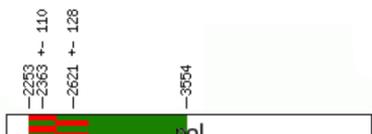
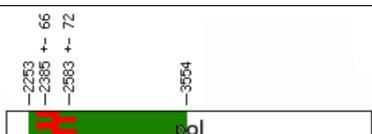
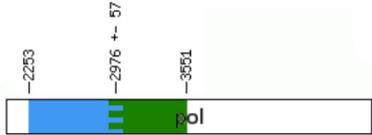
Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
MOW273948.MH667082	2253-3361 (A6)	3362-3551 (B pandemic)	-	
MOW283088.MH667113	2253-2441 (B pandemic)	2442-3551 (A6)	-	
MOW284149.MH667116	2253-3432 (A6)	3433-3551 (Car-B)	-	
MOW285258.MH667121	2253-2666 (B pandemic)	2667-3551 (A6)	-	
MOW302647.MH667192	2253-2314 (B-FSU)	2315-3551 (A6)	-	
MOW316504.MH667217	2253-2970 (A6)	2971-3267 (Thai-B)	3268-3551 (A6)	
MOW328087.MH667247	2253-3347 (A6)	3348-3551 (B-FSU)	-	
MOW328606.MH667250	2253-3344 (A6)	3345-3551 (B-FSU)	-	
1311000247.MW756410	2253-3267 (Thai-B)	3268-3551 (A6)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
1311000771.OL792445	2253-2963 (A6)	32964-3291 (Thai-B)	3292-3554 (A6)	
1311001057.OL792566	2253-2556 (A6)	2557-3098 (Car-B)	3099-3554 (A6)	
AG-уникальные рекомбинантные формы				
BRN007.MK612420	2253-2582 (CRF63)	2583-3263 (A6)	-	
BRN012.MK612425	2253-2519 (CRF63)	2520-3260 (A6)	-	
BRN017.MK612430	2253-2893 (CRF63)	2894-3309 (A6)	3310-3611 (CRF63)	
BRN021.MK612434	2253-2954 (A6)	2955-3235 (CRF63)	-	
BRN061.MK612464	2253-2545 (CRF63)	2546-3181 (A6)	3182-3263 (CRF63)	
BRN108.MK612479	2253-2392 (CRF63)	2393-3581 (A6)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
BRN125.MK612484	2253-3179 (G)	3180-3584 (A6)	-	
SHL007.MF124826	2253-2624 (A6)	2625-3089 (G)	3090-3545 (A6)	
SHL018.MF124832	2253-2512 (A6)	2513-3098 (G)	3099-3545 (A6)	
SHL087.MF124872	2253-2841 (A6)	2842-3152 (G)	3153-3545 (A6)	
MOW18862.MH666662	2253-2790 (CRF63)	2791-3551 (A6)	-	
1311001021.OL792536	2253-2386 (CRF63)	2387-2656 (A6)	2657-3554 (CRF63)	
1311001107.OL792603	2253-2357 (CRF63)	2358-2619 (A6)	2620-3554 (CRF63)	
Уникальные рекомбинантные формы с мозаичной структурой				
MOW105047.MH666377	2253-2968 (Car-B)	2969-3551 (CRF63)	-	

Продолжение таблицы 10

Имя последовательности в GenBank	Фрагмент генома (субтип)			Схема карты генома исследуемой области гена <i>pol</i>
	1	2	3	
MOW177762.MH666627	2553-3450 (CRF63)	3451-3551 (B pandemic)	-	
MOW212318.MH666793	2253-2451 (Thai-B)	2452-3551 (CRF02)	-	
1312000001.OK474695	2253-2876 (CRF02)	2877-3171 (Car-B)	-	
Примечание – В схемах карт генома суб-субтип А6 обозначен красным цветом, субтип В – синим цветом, G – светло-зеленым (салатовым) цветом; рекомбинантная форма CRF02_AG – коричневым цветом и CRF63_02A6 – темно-зеленым.				

Вывод об уникальности полученных в работе АВ- и АG-генотипов был сделан на основании сравнения точек рекомбинации, разделяющих фрагменты генома, относящиеся к разным генетическим вариантам ВИЧ-1, в исследованных и референсных последовательностях: для АВ- генотипов – с Kal153 (AF193276), BM2010_1 (FR729474) и BM2010_2 (FR729475); для АG-генотипов – IbNG (L39106) и 10RU6637 (JN230353).

Было установлено, что 80,46% (70/87) обнаруженных уникальных рекомбинантов были образованы в результате рекомбинации между вирусами субтипов А6 (IDU-A) и В; 14,94% (13/87) – между вирусами субтипов А6 и G (и их рекомбинантных форм), остальные 4,60% (4/87) представляли собой уникальные рекомбинанты с мозаичной структурой генома, то есть включали в себя фрагменты нескольких генетических вариантов ВИЧ-1.

Также было изучено происхождение В-сегментов в составе генома обнаруженных АВ-уникальных рекомбинантов. Анализ был выполнен в

программе RDP4 при включении референсных последовательностей вируса субтипа В, принадлежащих разным В-кладам (см. Таблицу 6).

Штамм В-FSU был впервые выявлен на территории Украины (г. Николаев) в среде ПИН; непосредственная близость стран, а также рост числа трудовых мигрантов из Украины могли способствовать его проникновению и распространению на территории РФ [38]. Субтип В, относящийся к его пандемической В-кладе, возник в США, откуда позднее попал в Европу посредством локальных эпидемий среди МСМ или через потребителей инъекционных наркотиков [86; 111; 127; 182]. В-Car и В-Thai были выделены на территории Карибского региона и Таиланда, соответственно.

По меньшей мере 22 (31,43%) АВ-уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1 содержали сегмент вируса субтипа В, распространенного на территории стран бывшего Советского Союза (В-FSU клада), 19 (27,14%) содержали сегмент вируса субтипа В, относящегося к его пандемической кладе; 13 (18,57%) последовательностей содержали фрагмент В-Caribbean и 12 (17,14%) – В-Thailand, циркулирующие на территории Карибского региона и Таиланда, соответственно. Также было обнаружено 4 АВ-уникальных рекомбинанта ВИЧ-1, геном которых образован сегментами вирусов суб-субтипа А6 и рекомбинантной формы, CRF03_AB, выявленной и получившей свое распространение на территории стран бывшего Советского Союза.

3.3.4 Оценка распространенности рекомбинантных форм ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в Российской Федерации

Было изучено распределение генетических вариантов ВИЧ-1 в федеральных округах Российской Федерации (Рисунок 13).



Рисунок 13 – Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 (по гену *pol*) в федеральных округах Российской Федерации в период 2011–2020 гг. (N_{общ} = 3178 образцов)

Также был проведен сравнительный анализ распространенности рекомбинантных форм ВИЧ-1 в федеральных округах Российской Федерации (Рисунок 14).

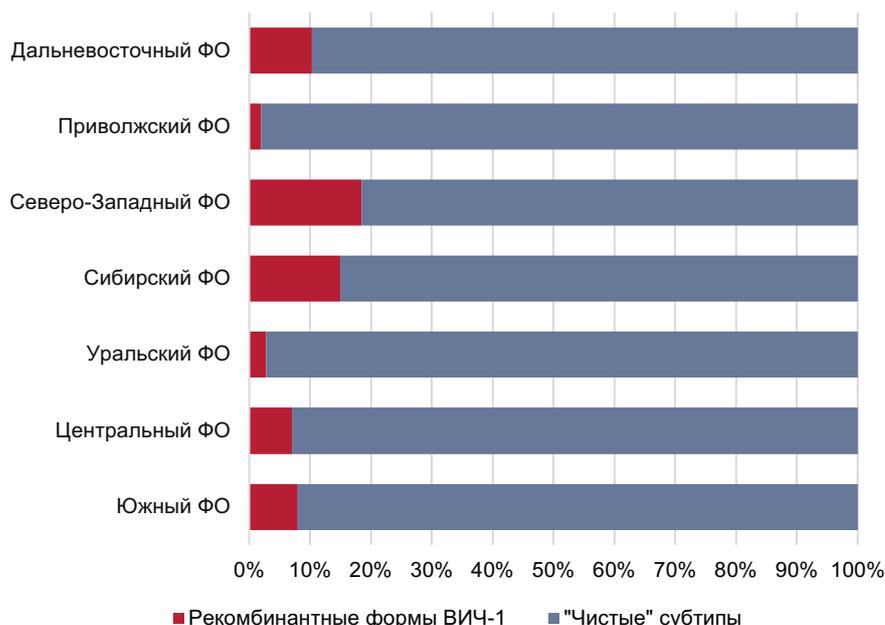


Рисунок 14 – Соотношение (в %) ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов в федеральных округах Российской Федерации в период 2011–2020 гг.

Было установлено, что вирус суб-субтипа А6 остается доминирующим (62,14–94,44 %) на территории всех федеральных округов РФ. Вирус субтипа В являлся наиболее часто встречающимся ВИЧ-1 не А-субтипа, его доля составила от 2,78 до 19,34% в пяти из семи федеральных округах РФ, кроме Северо-Западного и Сибирского ФО.

Наибольшее генетическое разнообразие ВИЧ-1 было отмечено в 4-х федеральных округах РФ: Центральном (11 генетических вариантов), Северо-Западном (9), Дальневосточном (8) и Южном (8) ФО.

Наибольшая доля рекомбинантных форм ВИЧ-1 была зарегистрирована на территории Северо-Западного (18,45%) и Сибирского (15,0%) федеральных округов, наименьшая – в Приволжском (1,99%) и Уральском (2,77%) ФО ($p < 0,001$). При этом на территории Северо-Западного ФО преобладала CRF03_AB ВИЧ-1, а на территории Сибирского ФО – CRF63_02A6.

Также было оценено изменение соотношения вирусов рекомбинантных форм и «чистых» субтипов на территории Российской Федерации в динамике с 2011 по 2020 год (Рисунок 15).

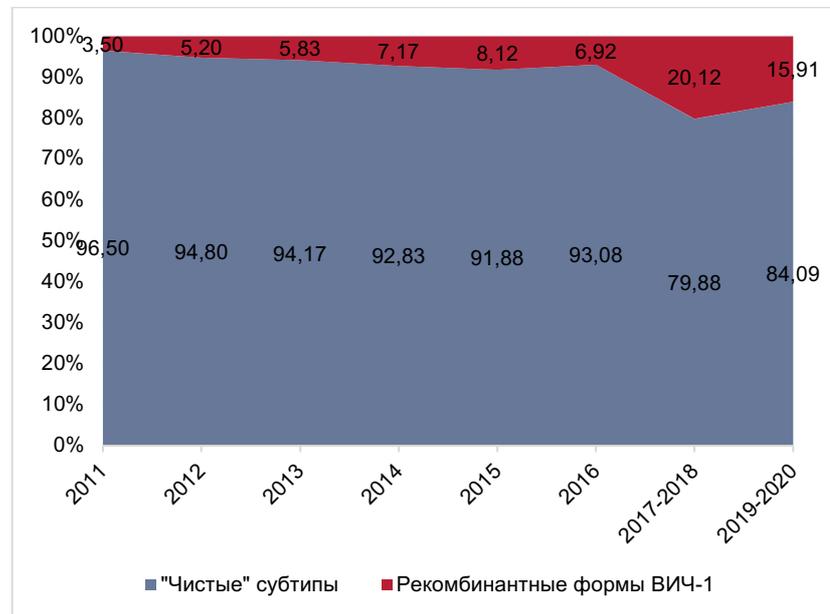


Рисунок 15 – Изменение (в %) соотношения ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов на территории Российской Федерации в период 2011–2020 гг.

Частота выявления рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации увеличивалась с течением времени: в коллекции образцов, собранных в период 2011–2012 гг. (N=835) рекомбинантные формы вируса были идентифицированы лишь в 4,79%, в коллекции образцов 2013–2015 гг. (N=1075) рекомбинанты были выявлены в 7,07%, в коллекции образцов 2016–2018 гг. (N=854) на долю рекомбинантных форм приходилось 14,75%, в коллекции образцов 2019–2020 гг. года (N=924) данный показатель составил 15,90% ($p < 0,001$). При визуальной оценке отмечался подъем доли рекомбинантов в период 2017–2018 гг., что, скорее всего, связано с включением в анализ последовательностей из города Череповца, для которого характерна высокая распространенность CRF03_AB ВИЧ-1. Несмотря на данное смещение выборки, общая тенденция к увеличению частоты выявления рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации сохраняется.

3.4 Анализ мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в составе гена *pol* и их связь с генетическим вариантом вируса

Полученные в ходе работы нуклеотидные последовательности от наивных пациентов ($n = 1494$) были проанализированы с помощью программы Calibrated Population Resistance Tool, включающей список надзорных мутаций для оценки первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1.

Частота встречаемости МЛУ среди 175 наивных пациентов, инфицированных ВИЧ-1 рекомбинантных форм, составила 11,4%, то есть 20 из 175 исследуемых нуклеотидных последовательностей содержали как минимум 1 надзорную мутацию. Частота встречаемости МЛУ среди 1319 наивных пациентов, инфицированных вирусами «чистых» субтипов, составила 6,9%. Общая доля резистентности среди всех наивных пациентов составила 7,4% (111/1494). Наиболее распространенными мутациями являлись: K103N – 33,33% (37/111), M184V – 32,43% (36/111), G190S – 17,12% (19/111) и M46I – 10,81% (12/111) (Таблица 11).

Таблица 11 – Мутации лекарственной устойчивости, обнаруженные в исследованных образцах ВИЧ-1 от наивных пациентов

Мутация	Препарат, устойчивость к которому ассоциирована с мутацией	Количество образцов ВИЧ-1 рекомбинантных форм с данной мутацией (Нобщ = 20)	Количество образцов ВИЧ-1 «чистых» субтипов с данной мутацией (Нобщ = 91)
Ингибиторы протеазы (ИП)			
M46I	ATV, FPV, IDV, LPV и	2	10
M46L	NFV	1	0
G73S	ATV, IDV, NFV, SQV	1	0
Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ)			
M41L	AZT, d4T; ABC, ddI и TDF	2	4
D67N	AZT, d4T;	1	5
K70R	ABC, ddI и TDF	1	3
M184V	3TC/FTC	2	34
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ)			
K103N	EFV, NVP	13	24
Y181C	ETR, NVP, RPV	1	3
G190S	EFV, NVP	1	18

При сравнении общих профилей резистентности среди ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов было выявлено статистически значимое различие ($p = 0,047$), оно обусловлено наличием МЛУ к препаратам класса ННИОТ.

При сравнении отдельных мутаций к препаратам разных классов были выявлены статистически значимые различия для К103N и М184V (Рисунок 16).

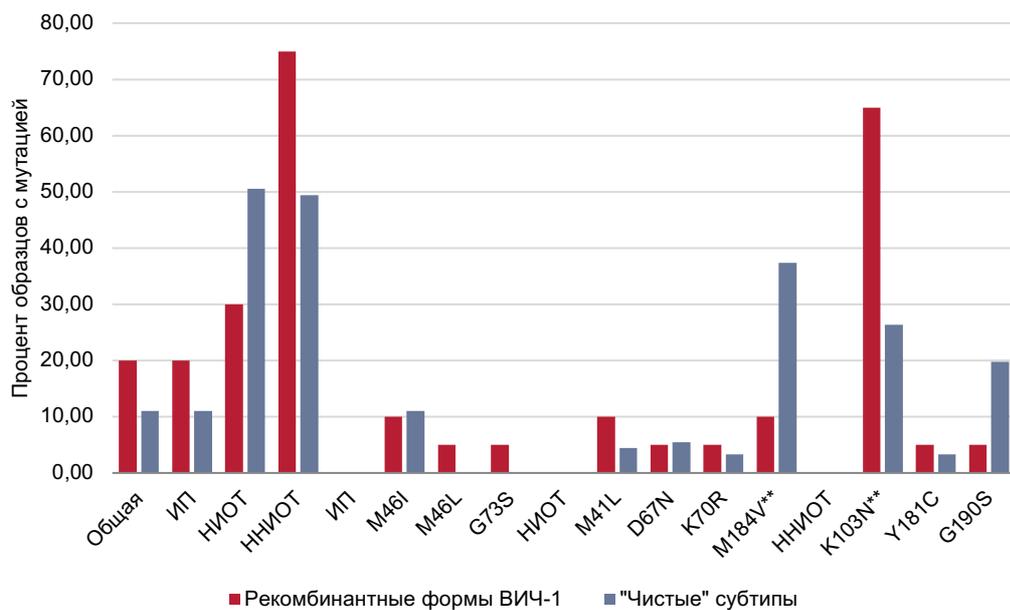


Рисунок 16 – Частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости среди ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов

Примечание – Звездочками отмечены мутации, для которых были выявлены статистически значимые различия в зависимости от генетического варианта

ВИЧ-1.

Мутация К103N значительно чаще встречалась среди вирусов рекомбинантных форм ($p = 0,002$), в частности у CRF63_02A6 ВИЧ-1, а мутация М184V – среди ВИЧ-1 «чистых» субтипов ($p = 0,018$) – чаще у вируса суб-субтипа А6.

Наибольшее разнообразие МЛУ наблюдалось у вирусов с уникальной структурой геномов, которые несли в себе мутации к АРВП разных классов: G73S – к ИП; M41L, D67N, K70R, M184V – к НИОТ; K103N, Y181C, G190S – к ННИОТ.

Доля множественной лекарственной устойчивости среди ВИЧ-1 рекомбинантных форм составила 10%, при этом, стоит отметить, что одним из пациентов с множественной ЛУ являлся ребенок, инфицированный от матери вертикальным путем; анализ нуклеотидной последовательности образца ВИЧ-1, полученного от данного пациента выявил целый ряд мутаций в пределах одного генома: M41L, D67N, K70R, M184V, T215F, K219E и Y181C.

Анализ когорты пациентов, инфицированных первично устойчивыми вариантами ВИЧ-1 рекомбинантных форм (N = 20), продемонстрировал следующее соотношение генетических вариантов вируса и факторов риска инфицирования – Рисунок 17.

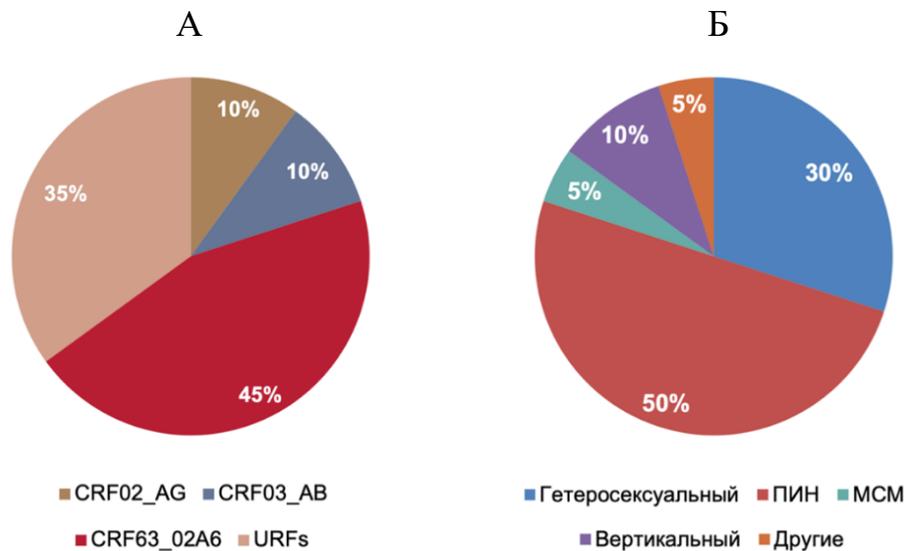


Рисунок 17 – Соотношение генетических вариантов (А) и факторов риска заражения (Б) в когорте пациентов, инфицированных первично устойчивыми вариантами ВИЧ-1 рекомбинантных форм

Почти половина пациентов (45,0%) были инфицированы первично устойчивым CRF63_02A6 ВИЧ-1; 35,0% – первично устойчивыми вариантами вируса с уникальной структурой генома, на долю CRF02_AG и CRF03_AB в генетической структуре первично устойчивых вариантов ВИЧ-1 рекомбинантных форм приходилось по 10,0%.

Основными факторами риска инфицирования в исследуемой когорте пациентов являлись потребление инъекционных наркотиков (50,0%) и гетеросексуальные контакты (30,0%), вертикальный путь заражения от матери к ребенку составил – 10,0%, по 5,0% пришлось на случаи заражения при гомосексуальных контактах и в ходе выполнения профессиональной медицинской деятельности.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная работа включала в себя систематический анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, полученных за десятилетний период (с 2011 по 2020 год) от 3178 пациентов, проживающих в разных регионах Российской Федерации. Основные характеристики пациентов, включенных в исследование, отражают основные тенденции, характерные для ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации в целом [14]. Так, соотношение женщин/мужчин составило 1:1,3, при этом отмечается увеличение вовлеченности женщин в эпидемический процесс по сравнению с предыдущим десятилетием. Это также сказывается на росте гетеросексуального пути передачи ВИЧ, доля которого, по данным проведенных исследований, составила порядка 52%, что подтверждает выход ВИЧ-инфекции за пределы уязвимых групп населения и ее широкое распространение в общей популяции. Около 38% случаев заражения ВИЧ-1 были выявлены в среде ПИН. Также среди факторов риска инфицирования выделяли гомосексуальные контакты (~5%) и передачу ВИЧ-1 от матери к ребенку (~4%). Средний возраст исследуемой популяции составил 35,0; при этом отмечалось «старение» популяции ВИЧ-инфицированных с преобладанием лиц активного трудоспособного возраста (от 23,0 до 48,6 лет).

Результаты исследования показали, что суб-субтип А6, доля которого составила 82,85%, остается доминирующим в генетической структуре ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в Российской Федерации. Такое широкое и повсеместное распространение данного генетического варианта может быть связано с «эффектом основателя», обусловленного проникновением в 90-х годах XX века вируса суб-субтипа А6 в среду ПИН города Одессы, ставшего локальным центром эпидемии вируса подтипа IDU-A (injecting drug use – A) на территории всего бывшего Советского Союза [36; 38; 66; 181].

Вторым по распространенности стал субтип В, доля которого составила 7,14%, что также отражает общие закономерности эпидемии ВИЧ-инфекции на территории РФ, описанные в предыдущих исследованиях [9].

Очевидно, что совместная циркуляция ВИЧ-1, принадлежащих разным субтипам, наряду с высокой мобильностью населения в пределах единой территории может способствовать их дальнейшей рекомбинации и формированию новых генетических вариантов, о чем свидетельствуют исследования рекомбинантных форм ВИЧ-1, выявленных на территории России – CRF03_AB, и соседних государств (Узбекистан) – CRF02_AG [46; 120]. Совместная циркуляция вирусов суб-субтипа А6 и CRF02_AG ВИЧ-1 на территории РФ привела к формированию вторичного рекомбинанта CRF63_02A6, выявленного в 2009–2010 году на территории Сибири [30]. По результатам настоящего исследования, доля каждой из рекомбинантных форм CRF02_AG и CRF03_AB составила 1,13%, CRF63_02A6 – 3,59%. Такие результаты свидетельствуют о нарастании генетического разнообразия ВИЧ-1 на территории нашей страны. Данная тенденция уже не раз отмечалась при проведении молекулярно-генетического анализа ВИЧ-1 на территории РФ [38]. Помимо циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ в настоящей работе было обнаружено 87 уникальных рекомбинантов, что составило 2,74% от общего числа всех исследованных нуклеотидных последовательностей.

Помимо основных генетических вариантов ВИЧ-1, на территории РФ также были выявлены вирусы субтипов А1 (1/3181), С (22/3181), D (1/3181), F1 (1/3181) и G (18/3181) и рекомбинантных форм CRF01_AE (1/3181) и CRF11_cpx (1/3181), доля каждого составила менее 1% от общего числа всех проанализированных нуклеотидных последовательностей. Все это еще раз подтверждает широкое высокое генетическое разнообразие ВИЧ-1 на территории России и требует систематического мониторинга.

Детальный анализ генома области гена *pol* выявленных уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 показал, что 80,46% их них были образованы вирусами суб-субтипа А6 (IDU-A) и В, которые, как уже говорилось ранее, являются доминирующими на территории РФ; 14,94% уникальных рекомбинантов были образованы вирусами вариантов А6 и G и их рекомбинантными формами, остальные 4,60% имели сложную мозаичную

структуру генома. Такое разнообразие выявленных URFs ВИЧ-1 свидетельствует об активном процессе рекомбинации на территории страны, что впоследствии может привести к быстрому формированию и широкому распространению новых циркулирующих рекомбинантных форм.

Анализ В-сегментов генома АВ-уникальных рекомбинантных форм показал, что по меньшей мере 31,43% нуклеотидных последовательностей содержали В-сегмент вирусов, распространенных на территории стран бывшего Советского Союза (В-FSU), 27,14% – сегмент В, относящегося к его пандемической кладе (Америка, позднее – страны Западной Европы). Распространение данного подтипа В на территории РФ, вероятнее всего, обусловлено относительной географической близостью России со странами Европы и усилением контактов между ними.

Остальные 18,57% АВ-последовательностей содержали фрагменты последовательностей В-Caribbean и 17,14% – В-Thailand, распространенные на территории Карибского региона и Таиланда, соответственно. Попаданию данных В-вариантов на территорию России мог способствовать туризм, однако географическая удаленность (в случае Карибского региона), а также относительно недавняя популяризация такого туристического направления, как Таиланд, могли сказаться на более медленном распространении данных В-подтипов ВИЧ-1 на территории РФ по сравнению с В-FSU и пандемическим В.

Результаты, полученные при филогенетическом анализе циркулирующих рекомбинантных форм, также указывают на вероятные пути заноса того или иного генетического варианта ВИЧ-1 на территорию РФ. Так, было установлено, что CRF01_AE ВИЧ-1 попала в Россию в результате единичного заноса из Республики Филиппины, а CRF11_crx – из стран Африки. Для вирусов рекомбинантных форм CRF03_AB и CRF63_02A6 была отмечена множественная передача внутри страны, что объясняется их первичным выявлением на территории РФ [30; 119; 128]. Большинство достоверных кластеров объединяли в себе сразу несколько нуклеотидных последовательностей образцов, полученных от ПИН. Анализ CRF02_AG ВИЧ-1 показал наличие образцов данного

генетического варианта как африканского происхождения, так и с территории стран бывшего Советского Союза (Узбекистан).

Все обнаруженное генетическое разнообразие ВИЧ-1, включающее в себя циркулирующие и уникальные рекомбинантные формы, является результатом сочетанного действия множества факторов, таких как высокая мобильность населения, интенсивные трудовые миграционные процессы, туризм. Все это приводит к неизбежной активной коммуникации между людьми, способствующей как множественному заражению ВИЧ-1 (суперинфекция), так и активному распространению уже имеющихся циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ. Стоит отметить, что наибольшее суммарное число лиц, инфицированных вирусами рекомбинантных форм, наблюдалось в когорте ПИН, что легко объясняется наибольшей вероятностью двойной и суперинфекции при использовании нестерильного инструментария (иглы/шприцы). В ряде исследований подчеркивалась важность двойной ВИЧ-инфекции в формировании новых рекомбинантных форм ВИЧ-1 и развитии лекарственной устойчивости. Отмечалось, что лекарственная устойчивость, полученная в результате суперинфекции, снижает вероятность успешного применения АРТ даже среди наивных пациентов [8; 172].

Оценка распространенности рекомбинантных форм ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в РФ выявила достоверное увеличение частоты их идентификации с течением времени. Наибольшая доля рекомбинантных форм ВИЧ-1 была зарегистрирована в Северо-Западном (18,45%) и Сибирском (15,0%) федеральных округах. Это может быть результатом того, что данные округа являются территориальными центрами возникновения рекомбинантных форм CRF03_AB и CRF63_02A6, соответственно [11; 30; 119; 128].

В ранее проведенных исследованиях Лебедева А. В. с соавторами было показано, что общая распространенность CRF03_AB в Северо-Западном ФО составляет 9,9 % [114].

Стоит отметить, что в нашем исследовании при визуальной оценке отмечался подъем доли рекомбинантов в период 2017–2018 гг., однако данное

явление объясняется небольшим смещением выборки за счет включения в анализ нуклеотидных последовательностей из города Череповца, где рекомбинантная форма CRF03_AB является доминирующим генетическим вариантом ВИЧ-1. Несмотря на это, при совместном сравнении данных за период с 2011 по 2020 год общая тенденция к увеличению частоты встречаемости рекомбинантных форм ВИЧ-1 на территории Российской Федерации сохраняется.

В работе Богачева В. В. отмечалась доминирующая роль CRF63_02A6 и «вытеснение» ею с ранее лидирующих позиций суб-субтипа A6 на территории Новосибирской области [4]. Полученные в работе результаты совпадают и с мировыми тенденциями в целом, показывающими стабильное увеличение общей доли рекомбинантов, которая к 2015 году составила порядка 22,8% от общего числа всех проанализированных нуклеотидных последовательностей, и их существенный вклад в пандемию ВИЧ-инфекции [96].

Наименьшая доля рекомбинантных форм ВИЧ-1 была зарегистрирована в Приволжском (1,99%) и Уральском (2,77%) ФО. Это может быть связано с внутренними процессами миграции на территории России – для Приволжского федерального округа отмечается наибольший отток населения в другие регионы, чаще всего – в Центральный и Северо-Западный ФО, в котором отмечается высокая частота встречаемости ВИЧ-1 рекомбинантных форм [16].

В работе был проведен сравнительный анализ мутаций лекарственной устойчивости в составе гена *pol* ВИЧ-1 среди наивных пациентов, инфицированных вирусами рекомбинантных форм и «чистых» субтипов. Первичная лекарственная устойчивость характеризуется наличием в геноме ВИЧ-1 наивного пациента мутаций, обуславливающих резистентность вируса к АРВП еще до начала лечения. Таким образом, профиль мутаций лекарственной устойчивости у наивных пациентов играет важную роль при выборе эффективных схем терапии и успеха ее применения в целом. Согласно клиническим рекомендациям ВОЗ и Минздрава РФ, пороговое значение распространенности первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 составляет 10%; при этом в регионах с данным показателем более 10% рекомендован анализ на

генотипическую резистентность до начала лечения, сразу после постановки диагноза ВИЧ/СПИД [6].

По результатам проведенных исследований было установлено, что общая распространенность первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 составила 7,4%, при этом стоит отметить, что данный показатель в группе наивных пациентов, инфицированных ВИЧ-1 рекомбинантных форм, составил 11,4%, то есть превышал пороговое значение на 1,4%. В группе наивных пациентов, инфицированных ВИЧ-1 «чистых» субтипов, частота встречаемости МЛУ была равна 6,9%. Такие различия являются статистически значимыми, при этом они обусловлены главным образом мутациями устойчивости к препаратам класса ННИОТ. Так, мутация K103N, сообщающая вирусу устойчивость к эфавирензу и невирапину – нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы, значительно чаще встречалась у ВИЧ-1 рекомбинантных форм, в частности, – у CRF63_02A6. Преобладание данной мутации отмечал ранее в своих исследованиях Богачев В. В., где частота встречаемости K103N среди наивных пациентов, инфицированных CRF63_02A6 ВИЧ-1, составила 5,3% [4].

Мутация K103N расположена в области генома CRF63_02A6 ВИЧ-1, включающей фрагмент, принадлежащий вирусу другой рекомбинантной формы – CRF02_AG. В исследованиях Toni T.D.A. et al. (2005, 2021) была отмечена высокая частота встречаемости мутации K103N среди пациентов, инфицированных ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF02_AG [44; 183]. В ряде других работ было показано, что частота возникновения мутации K103N более высока для вирусов субтипов, отличных от А, в частности, для С и D [71; 72; 73; 78; 79].

В исследовании Flys T. S. et al. (2006) было обнаружено, что представленность мутации K103N после однократной дозы NVP значительно выше у вируса субтипа D, чем у субтипа А, что может указывать на негативное влияние данной мутации на репликативную способность вирусов субтипа А [78]. Наличие мутации K103N, в первую очередь, обусловлено применением EFV в составе предпочтительной схемы терапии первого ряда на территории РФ [13].

Рост числа рекомбинантных форм и «выход» генетического варианта CRF63_02A6 за пределы Сибирского федерального округа может привести к дальнейшему распространению первично устойчивых вариантов ВИЧ-1, несущих мутацию K103N, а также – к формированию новых вторичных рекомбинантов.

Было установлено, что мутация M184V, определяющая устойчивость ВИЧ-1 к ламивудину и эмтрицитабину – нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы – значительно чаще встречалась у вируса суб-субтипа А6. Это можно объяснить повсеместным широким распространением данного генетического варианта ВИЧ-1 на территории РФ в совокупности с применением ЗТС и ФТС в качестве основных компонентов предпочтительной схемы терапии первого ряда. В ранее проведенных исследованиях также было показано преобладание мутаций M184V у вируса субтипа А, однако данное сравнение проводилось лишь с субтипом D [152].

Доля множественной лекарственной устойчивости среди ВИЧ-1 рекомбинантных форм составила 10%. Стоит отметить, что среди таких пациентов был ребенок, инфицированный от матери; набор мутаций в геноме ВИЧ составил: M41L, D67N, K70R, M184V, T215F, K219E и Y181C.

Анализ когорты пациентов, инфицированных первично устойчивыми вариантами ВИЧ-1 рекомбинантных форм, продемонстрировал следующее соотношение генетических вариантов вируса: CRF63_02A6 – 45,0%; URFs – 45,0%; CRF02_AG – 10,0% и CRF03_AB – 10,0%. Основными факторами риска инфицирования в исследуемой когорте пациентов являлись потребление инъекционных наркотиков (50,0%) и гетеросексуальные контакты (30,0%). Такое распределение можно объяснить наибольшей вероятностью двойной или суперинфекции в когорте ПИН, а также их поведенческими особенностями и низкой приверженностью к назначаемой АРТ [8; 172].

Полученные данные указывают на рост доли рекомбинантных форм в генетической структуре ВИЧ-1, в том числе первично устойчивых, вместе с выходом ВИЧ-инфекции из уязвимых групп в общую популяцию. Все это может способствовать росту распространенности первичной лекарственной

устойчивости и пересечению ею пороговой отметки 10%, рекомендованной для проведения анализа на генотипическую резистентность до начала терапии, уже в ближайшие годы.

Таким образом, данное исследование способствует пониманию основных тенденций эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации, оценке ее биологических и социальных движущих сил, а также пониманию динамики изменения генетической структуры ВИЧ-1 и оценке эффективности применяемой в настоящее время антиретровирусной терапии. Все это в совокупности играет важную роль в прогнозировании будущих тенденций, поиске и предложении эффективных предупредительных мер и подходов к лечению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты свидетельствуют о растущем генетическом разнообразии ВИЧ-1 на территории Российской Федерации, а также о высокой вовлеченности ВИЧ-1 рекомбинантных форм в эпидемический процесс. Наибольшая распространенность ВИЧ-1 рекомбинантных форм была отмечена в Северо-Западном и Сибирском федеральных округах.

Сравнительный анализ первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 рекомбинантных форм и «чистых» субтипов продемонстрировал статистически значимые различия: частота встречаемости МЛУ среди наивных пациентов, инфицированных ВИЧ-1 рекомбинантных форм, в 1,7 раз превышала данный показатель среди наивных пациентов с вирусами «чистых» субтипов (11,4% и 6,9%, соответственно). При изучении частоты встречаемости индивидуальных МЛУ были выявлены мутации, обладающие субтипической спецификой: K103N – для CRF63_02A6 ВИЧ-1, M184V – для вирусов суб-субтипа А6. Таким образом, возрастающая с течением времени распространенность ВИЧ-1 рекомбинантных форм неизбежно ведет и к распространению первично устойчивых вирусных вариантов, что, безусловно, отразится на эффективности применяемой антиретровирусной терапии и, как следствие, на степени контролируемости ВИЧ-инфекции в целом.

Анализ когорты пациентов, инфицированных первично устойчивыми вариантами ВИЧ-1 рекомбинантных форм, показал преобладание фактора риска инфицирования при потреблении инъекционных наркотиков и гетеросексуальных контактах.

С целью совершенствования мониторинга за ВИЧ-инфекцией и предотвращения распространения передающейся лекарственной устойчивости рекомендуется включить в национальные клинические рекомендации анализ на генотипическую резистентность до начала антиретровирусной терапии в федеральных округах с наибольшей распространенностью рекомбинантных форм

вируса – в Северо-Западном и Сибирском, а также повсеместно – в когорте потребителей инъекционных наркотиков, наиболее подверженных двойной и суперинфекции ВИЧ-1.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярно-генетический анализ 3178 образцов вируса, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов в период с 2011 по 2020 год, показал, что эпидемия ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации характеризуется высоким генетическим разнообразием вирусных вариантов. Распределение субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 составило: А6 – 82,85%, В – 7,14%, CRF63_02А6 – 3,59%, URFs – 2,74%, CRF02_AG – 1,13%, CRF03_AB – 1,13%; остальные субтипы составили менее 1% каждый и были представлены: А1, С, D, F1, G, CRF01_AE, CRF11_cpx.

2. Филогенетический анализ рекомбинантных форм ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации, выявил как единичные случаи их заноса из других государств (для CRF01_AE, CRF02_AG и CRF11_cpx), так и множественную передачу рекомбинантов внутри страны (для CRF02_AG, CRF03_AB и CRF63_02А6).

3. В общей структуре вирусов рекомбинантных форм, выявленных на территории Российской Федерации, 31,64% представляют собой уникальные рекомбинанты, геном большинства которых образован фрагментами подтипов А6/В – 80,46% и А6/Г – 14,94%; остальные 4,60% идентифицированы как URFs с мозаичной структурой генома.

4. Наибольшая доля рекомбинантных форм ВИЧ-1 была зарегистрирована на территории Северо-Западного (18,45%) и Сибирского (15,00%) федеральных округов, наименьшая – в Приволжском (1,99%) и Уральском (2,77%) федеральных округах ($p < 0,001$).

5. Оценка распространенности рекомбинантных форм ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в Российской Федерации выявила достоверное увеличение частоты их встречаемости с течением времени ($p < 0,001$).

6. Первичная лекарственная устойчивость в 1,7 раз чаще встречается среди ВИЧ-1 рекомбинантных форм (11,4%) по сравнению с «чистыми» субтипами (6,9%), а также на 1,4% превышает пороговое значение распространенности (10%), при котором рекомендован анализ на генотипическую резистентность до начала лечения. Среди ВИЧ-1 «чистых» субтипов наиболее часто встречается мутация M184V ($p = 0,018$), среди вирусов рекомбинантных форм – K103N ($p = 0,002$).

7. В генетической структуре первично устойчивых вариантов ВИЧ-1 рекомбинантных форм преобладает CRF63_02A6 (45,0%) и уникальные рекомбинанты (35,0%); основными факторами риска заражения являются потребление инъекционных наркотиков (50,0%) и гетеросексуальные контакты (30,0%).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АРТ	антиретровирусная терапия
АРВП	антиретровирусные препараты
БД	база данных
ВААРТ	высокоактивная антиретровирусная терапия
ВАК	Высшая аттестационная комиссия
ВИО	вирус иммунодефицита обезьян
ВИЧ-1	вирус иммунодефицита человека 1 типа
ВИЧ-2	вирус иммунодефицита человека 2 типа
ВН	вирусная нагрузка
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ГТСК	гетеросексуальные контакты
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	дезоксинуклеозидтрифосфаты
ДТТ	дитиотреитол
ИИ	ингибиторы интегразы
ИП	ингибиторы протеазы
кДНК	комплиментарная цепь ДНК
ЛЖВС	люди, живущие с ВИЧ/СПИД
ЛУ	лекарственная устойчивость
МЛУ	мутации лекарственной устойчивости
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
МСМ	мужчины, практикующие секс с мужчинами
н. о.	нуклеотидные основания
н. п.	нуклеотидные последовательности
НИОТ	нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ННИОТ	ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ООН	Организация Объединенных Наций

ОТ	фермент обратная транскриптаза
ПИН	потребители инъекционных наркотиков
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
РНКаза Н	фермент, катализирующий расщепление РНК
РФ	Российская Федерация
СНГ	Содружество Независимых Государств
СОП	стандартная операционная процедура
СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита человека
США	Соединенные Штаты Америки
ФО	федеральный округ
ЦНС	центральная нервная система
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
ЮНЭЙДС, UNAIDS	объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу
A-FSU (IDU-A)	вариант субтипа А ВИЧ-1, получивший свое широкое распространение среди наркопотребителей на территории стран бывшего Советского Союза
AIC	информационный критерий Акаике (Akaike information criterion)
AIDS	синдром приобретенного иммунодефицита человека (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
АРОВЕС3G	каталитический полипептид типа 3G, корректирующий мРНК аполипопротеина В (apolipoprotein В mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G)
B-FSU	вариант субтипа В ВИЧ-1, получивший свое распространение среди наркопотребителей на территории стран бывшего Советского Союза
CA	капсид (capsid)
CD	маркер клеточной дифференциации (cluster of differentiation)

CDC	центр по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention)
CCR5	C-C рецептор хемокина 5-го типа (C-C chemokine receptor type 5)
CD317/BST-2	клеточный белок тетерин
CPR	инструмент, предназначенный для анализа лекарственной устойчивости ВИЧ (Calibrated Population Resistance Tool)
CRF_cpx	сложные (комплексные) рекомбинанты ВИЧ-1, геном которых содержит фрагменты 3-х и более генетических вариантов вируса (complex)
CRF	циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ (circulating recombinant form)
CXCR4	C-X-C рецептор хемокина 4-го типа (C-X-C chemokine receptor type 4)
CypA	циклофилин А (cyclophilin A)
DNA	дезоксирибонуклеиновая кислота (deoxyribonucleic acid)
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)
Env	вирусный белок оболочка (envelope viral glycoprotein)
Gag	группоспецифический антиген (group specific antigen)
gp	гликопротеин (glycoprotein)
HIV	вирус иммунодефицита человека (human immunodeficiency virus)
HIVdb	база данных Стэнфордского университета (HIV database)
HLA	человеческий лейкоцитарный антиген (human leukocyte antigens)
IN	фермент интегразы (integrase)
LTR	«длинные концевые повторы» (long terminal repeats)
MA	матриксный белок (matrix)
ML	метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood)
MuLV	вирус мышинной лейкемии (Moloney Murine Leukemia Virus)
NC	нуклеокапсид (nucleocapsid)

NGS	секвенирование нового поколения (next-generation sequencing)
p	вероятность (probability)
PBS	натрий-фосфатный буфер (phosphate buffered saline)
PCP	пневмоцистная пневмония (<i>Pneumocystis carinii pneumonia</i>)
PIC	преинтеграционный комплекс (pre-integration complex)
Pol	полимераза (polymerase)
PR	фермент протеаза (protease)
RNA	рибонуклеиновая кислота (ribonucleic acid)
RT	фермент обратная транскриптаза (reverse transcriptase)
SDRMs	надзорных мутации лекарственной устойчивости (surveillance drug resistance mutations)
SH-aLRT	критерий приближительного отношения правдоподобия Шимодайры-Хасегавы (SH-like approximate likelihood ratio test)
SIV	вирус иммунодефицита обезьян (simian immunodeficiency virus)
SU	поверхностный гликопротеин (surface glycoprotein)
TAE	трис-ацетатный ЭДТА буфер (tris-acetate-EDTA)
TAMs	мутации к аналогам тимидина (thymidine analog mutation)
TM	трансмембранный гликопротеин (transmembrane glycoprotein)
URF	уникальная рекомбинантная форма ВИЧ (unique recombinant form)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобков, А. Ф. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вспышки ВИЧ-инфекции в Иркутской области / А. Ф. Бобков, Е. В. Казеннова, Л. М. Селимова [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 4. – С. 18–20.
2. Бобкова, М. Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ / М. Р. Бобкова. – Москва: Человек, 2014. – 288 с. – ISBN 978-5-906131-42-3.
3. Бобкова, М. Р. Стратегии излечения ВИЧ-инфекции: основные методологические подходы и проблемы их реализации / М. Р. Бобкова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 22–31.
4. Богачев, В. В. Молекулярно-эпидемиологические особенности распространения ВИЧ-инфекции в Новосибирской области в 2008–2012 гг. : дисс. канд. биол. наук : 03.01.03 / Богачев Владислав Викторович ; науч. рук. Н. М. Гашникова ; ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». – Кольцово, 2014. – 128 с.
5. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ). Информационный бюллетень ВИЧ : официальный сайт. – 2022. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> (дата обращения: 06.12.2022).
6. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ). Устойчивость ВИЧ к лекарственным препаратам : официальный сайт. – 2022. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-drug-resistance> (дата обращения: 06.12.2022).
7. Костикова, Л. И. Анализ вспышки ВИЧ-инфекции в городе Светлогорск, Республика Беларусь, среди лиц, употребляющих наркотики путем инъекций / Л. И. Костикова, Н. П. Фирсова, А. Е. Василевская [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. – № 1. – С. 18–19.
8. Лаповок, И. А. Исследование частоты встречаемости двойной ВИЧ-инфекции в России / И. А. Лаповок, Д. В. Салеева, А. А. Кириченко [и др.]. // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 18, № 4. – С. 138–148.

9. Лаповок, И. А. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. / И. А. Лаповок, А. Э. Лопатухин, Д. Е. Киреев [и др.]. // Терапевтический архив. – 2017. – С. 44–49.
10. Николенко, Г. Н. Механизмы лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы / Г. Н. Николенко, А. Т. Котелкин, С. Ф. Орешкова [и др.]. // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 108–126.
11. Ожмегова, Е. Н. Генетический профиль ВИЧ-1 в Вологодской области: доминирование CRF03_AB и быстрое распространение URFs / Е. Н. Ожмегова, А. А. Антонова, А. В. Лебедев [и др.]. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия. – 2020. – Т. 12, № 2. – С. 79–88.
12. Пасечник, О. А. Распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 в регионах Российской Федерации и стран СНГ: систематический обзор и метаанализ / О. А. Пасечник, А. И. Блох // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, № 2. – С. 127–138.
13. Покровский, В. В. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство. Краткое издание / В. В. Покровский. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 512 с. – ISBN 978-5-9704-6468-7.
14. Покровский, В. В. ВИЧ-инфекция наступает / В. В. Покровский // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 4. – С. 9–14.
15. ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора. Справка «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2021 г.» : официальный сайт. – 2022. – URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf> (дата обращения: 06.12.2022).
16. Федеральная служба государственной статистики. Демография : официальный сайт. – 2023. – URL: <https://rosstat.gov.ru/folder/12781> (дата обращения: 17.02.2023).

17. ЮНЭЙДС. Информационный бюллетень – Глобальная статистика по ВИЧ : официальный сайт. – 2022. – URL: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet> (дата обращения: 06.12.2022).
18. ЮНЭЙДС. Документы – Парижская декларация : официальный сайт. – 2022. – URL: https://www.unaids.org/ru/resources/documents/2014/20141201_Paris_declaratio (дата обращения: 06.12.2022).
19. Abecasis, A. B. Quantifying differences in the tempo of human immunodeficiency virus type 1 subtype evolution / A. B. Abecasis, A.-M. Vandamme, P. Lemey // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83, № 24. – P. 12917–12924.
20. Abram, M. E. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication / M. E. Abram, A. L. Ferris, W. Shao [et al.]. // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84, № 19. – P. 9864–9878.
21. Aho, K. Model selection for ecologists: the worldviews of AIC and BIC / K. Aho, D. Derryberry, T. Peterson // *Ecology*. – 2014. – Vol. 95, № 3. – P. 631–636.
22. Aibekova, L. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype A in former Soviet Union countries / L. Aibekova, B. Foley, G. Hortelano [et al.]. // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, № 2. – e0191891.
23. Althaus, C. L. Stochastic interplay between mutation and recombination during the acquisition of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 / C. L. Althaus, S. Bonhoeffer // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79, № 21. – P. 13572–13578.
24. Archer, J. Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints / J. Archer, J. W. Pinney, J. Fan [et al.]. // *PLoS Computational Biology*. – 2008. – Vol. 4, № 9. – e1000178.
25. Armitage, A. E. APOBEC3G-induced hypermutation of human immunodeficiency virus type-1 is typically a discrete ‘all or nothing’ phenomenon / A. E. Armitage, K. Deforche, C. hao Chang [et al.]. // *PLoS Genetics*. – 2012. – Vol. 8, № 3. – e1002550.

26. Baird, H. A. Sequence determinants of breakpoint location during HIV-1 intersubtype recombination / H. A. Baird, R. Galetto, Y. Gao [et al.]. // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34, № 18. – P. 5203–5216.
27. Barré-Sinoussi, F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) / F. Barré-Sinoussi, J.C. Chermann, F. Rey [et al.]. // *Science*. – 1983. – Vol. 220, № 4599. – P. 868–871.
28. Bartolo I. Origin and epidemiological history of HIV-1 CRF14_BG. / I. Bartolo, A. B. Abecasis, P. Borrego [et al.]. // *PloS ONE*. – 2011. – Vol. 6, № 9. – e24130.
29. Bartolo I. HIV-1 Diversity and its implications in diagnosis, transmission, disease progression, and antiretroviral therapy. / I. Bartolo, N. Taveira // *Genetic diversity in microorganisms*. – 2012. – P. 171–214.
30. Baryshev, P. B. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia / P. B. Baryshev, V. V. Bogachev, N. M. Gashnikova // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2014. – Vol. 30, № 6. – P. 592–597.
31. Batisse, J. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication / J. Batisse, S. Guerrero, S. Bernacchi [et al.]. // *Virus Research*. – 2012. – Vol. 169, № 2. – P. 361–376.
32. Bbosa, N. HIV subtype diversity worldwide / N. Bbosa, P. Kaleebu, D. Ssemwanga // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. 153–160.
33. Bennett, A. L. et al. HIV-1 envelope conformation, allostery, and dynamics / A. L. Bennett, R. Henderson // *Viruses*. – 2021, Vol. 13, № 5. – P. 852.
34. Berger, R. AIDS guidelines / R. Berger // *Sun*. – 1986. – Vol. 15A.
35. Béthune, M. P. de. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009) / M. P. de Béthune // *Antiviral Research*. – 2010. – Vol. 85, № 1. – P. 75–90.

36. Bobkov, A. An HIV type 1 epidemic among injecting drug users in the former Soviet Union caused by a homogeneous subtype A strain / A. Bobkov, R. Cheingsong-Popov, L. Selimova [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1997. – Vol. 13, № 14. – P. 1195–1201.
37. Bobkov, A. F. An HIV type 1 subtype A outbreak among injecting drug users in Kazakhstan / A. F. Bobkov, E. V. Kazennova, A. L. Sukhanova [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2004. – Vol. 20, № 10. – P. 1134–1136.
38. Bobkova, M. R. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR / M. R. Bobkova // *AIDS Reviews*. – 2013. – Vol. 15, № 4. – P. 204–212.
39. Bonhoeffer, S. Evidence for positive epistasis in HIV-1 / S. Bonhoeffer, C. Chappey, N. T. Parkin [et al.]. // *Science*. – 2004. – Vol. 306, № 5701. – P. 1547–1550.
40. Bretscher, M. T. Recombination in HIV and the evolution of drug resistance: for better or for worse? / M. T. Bretscher, C. L. Althaus, V. Müller [et al.]. // *BioEssays*. – 2004. – Vol. 26, № 2. – P. 180–188.
41. Bruzzese, E. Dolutegravir-based anti-retroviral therapy is effective and safe in HIV-infected paediatric patients / E. Bruzzese, A. Lo Vecchio, A. Smarrazzo [et al.]. // *Italian Journal of Pediatrics*. – 2018. – Vol. 44, № 1. – P. 37.
42. Burke, D. S. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy / D. S. Burke // *Emerging Infectious Diseases journal*. – 1997. – Vol. 3, № 3. – P. 253–259.
43. Burton, D. R. Structural biology: images from the surface of HIV / D. R. Burton // *Nature*. – 2006. – Vol. 441, № 7095. – P. 817–818.
44. Camara-Cisse, M. Determination of reverse transcriptase inhibitor resistance mutations in HIV-1 infected children in Côte d'Ivoire / M. Camara-Cisse, Y. F. Djohan, T. D. Toni [et al.]. // *Genome*. – 2021. – Vol. 64, № 4. – P. 347–354.

45. Caplinskas S. Distinct HIV type 1 strains in different risk groups and the absence of new infections by drug-resistant strains in Lithuania / S. Caplinskas, V. V. Loukachov, E. L. Gasich [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2013. – Vol. 29, № 4. – P. 732–737.
46. Carr, J. K. Outbreak of a West African recombinant of HIV-1 in Tashkent, Uzbekistan / J. K. Carr, Y. Nadai, L. Eyzaguirre [et al.]. // *AIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2005. – Vol. 39, № 5. – P. 570–575.
47. Carvajal-Rodríguez, A. Recombination favors the evolution of drug resistance in HIV-1 during antiretroviral therapy / A. Carvajal-Rodríguez, K. A. Crandall, D. Posada // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2007. – Vol. 7, № 4. – P. 476–483.
48. Casasnovas, J. M. Virus-receptor interactions and receptor-mediated virus entry into host cells / J. M. Casasnovas // *Sub-cellular Biochemistry*. – 2013. – Vol. 68. – P. 441–466.
49. Case, K. Nomenclature: human immunodeficiency virus / K. Case // *Annals of Internal Medicine*. – 1986. – Vol. 105, № 1. – P. 133.
50. CDC Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. / CDC // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 1982. – Vol. 31, № 37. – P. 513–514.
51. Checkley, M. A. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation / M. A. Checkley, B. G. Luttge, E. O. Freed // *Journal of Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 410, № 4. – P. 582–608.
52. Chin, B. S. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus / B. S. Chin // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 49, № 1. – P. 1–9.
53. Chiu, T. Structure and function of HIV-1 integrase / T. Chiu, D. Davies // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2004. – Vol. 4, № 9. – P. 965–977.
54. Cimarelli, A. HIV-1 reverse transcription / A. Cimarelli, J. L. Darlix // *Methods in Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 1087. – P. 55–70.
55. Clavel F. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS / F. Clavel, D. Guétard, F. Brun-Vézinet [et al.]. // *Science*. – 1986. – Vol. 233, № 4761. – P. 343–346.

56. Clercq, E. De. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years / E. De Clercq, G. Li // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2016. – Vol. 29, № 3. – P. 695–747.
57. Clutter, D. S. Genetic Variability of HIV-1 for Drug Resistance Assay Development / D. S. Clutter, P. R. Sánchez, S. Y. Rhee [et al.]. // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8, № 2. – P. 48.
58. Coakley, E. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV / E. Coakley, C. J. Petropoulos, J. M. Whitcomb // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 18, № 1. – P. 9–15.
59. Costiniuk, C. T. HIV reservoir dynamics in the face of highly active antiretroviral therapy / C. T. Costiniuk, M. A. Jenabian // *AIDS Patient Care and STDs*. – 2015. – Vol. 29, № 2. – P. 55–68.
60. CPR: Calibrated Population Resistance Tool – HIV Drug Resistance Database. – 2022. – URL: <https://hivdb.stanford.edu/cpr/> (дата обращения: 07.07.2022).
61. Craigie, R. HIV DNA integration / R. Craigie, F. D. Bushman // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2012. – Vol. 2, № 7. – a006890.
62. Darriba, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing / D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo [et al.]. // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9, № 8. – P. 772.
63. Deletsu, S. D. High resistance to reverse transcriptase inhibitors among persons infected with human immunodeficiency virus type 1 subtype circulating recombinant form 02_AG in Ghana and on antiretroviral therapy / S. D. Deletsu, E. K. Maina, O. Quaye [et al.]. // *Medicine (Baltimore)*. – 2020. – Vol. 99, № 7. – e18777.
64. Delviks-Frankenberry, K. A. Minimal Contribution of APOBEC3-Induced G-to-A Hypermutation to HIV-1 Recombination and Genetic Variation / K. A. Delviks-Frankenberry, O. A. Nikolaitchik, R. C. Burdick [et al.]. // *PLoS Pathogens*. – 2016. – Vol. 12, № 5. – e1005646.
65. Deng, X. Prevalence of HIV-1 Drug-Resistance Genotypes Among Unique Recombinant Forms from Yunnan Province, China in 2016-2017 / X. Deng, J. Liu, J. Li [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2020. – Vol. 36, № 5. – P. 389–398.

66. Díez-Fuertes, F. Bayesian phylogeographic analyses clarify the origin of the HIV-1 subtype A variant circulating in former Soviet Union's countries / F. Díez-Fuertes, M. Cabello, M. M. Thomson // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. – Vol. 33. – P. 197–205.
67. Dorr, P. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity / P. Dorr, M. Westby, S. Dobbs [et al.]. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49, № 11. – P. 4721–4732.
68. Doyle, T. Low-level viraemia on HAART: significance and management / T. Doyle, A. M. Geretti // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 25, № 1. – P. 17–25.
69. Emery, A. HIV-1: To Splice or Not to Splice, That Is The Question / A. Emery, R. Swanstrom // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 181.
70. Eron, J. HIV-1 protease inhibitors / J. Eron // *Clinical Infectious Diseases*. – 2000. – Vol. 30, № 2. – P. 160–170.
71. Eshleman, S. H. Resistance after single-dose nevirapine prophylaxis emerges in a high proportion of Malawian newborns / S. H. Eshleman, D. R. Hoover, S. Chen [et al.]. // *AIDS*. – 2005. – Vol. 19, № 18. – P. 2167–2169.
72. Eshleman, S. H. Distinct patterns of emergence and fading of K103N and Y181C in women with subtype A vs. D after single-dose nevirapine: HIVNET 012 / S. H. Eshleman, L. A. Guay, J. Wang [et al.] // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2005. – Vol. 40, № 1. – P. 24–29.
73. Eshleman, S. H. Comparison of HIV-1 mother-to-child transmission after single-dose nevirapine prophylaxis among African women with subtypes A, C, and D / S. H. Eshleman, J. D. Church, S. Chen [et al.]. // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2006. – Vol. 42, № 4. – P. 518–521.
74. Faria, N. R. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations / N. R. Faria, A. Rambaut, M. A. Suchard [et al.]. // *Science*. – 2014. – Vol. 346, № 6205. – P. 56–61.

75. Felsenstein, J. The evolutionary advantage of recombination. II. Individual selection of recombination. / J. Felsenstein, S. Yokoyama // *Genetics*. – 1976. – Vol. 83, № 4. – P. 845–859.
76. Ferdats, A. An HIV type 1 subtype A outbreak among injecting drug users in Latvia / A. Ferdats, V. Konicheva, I. Dievberna [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1999. – Vol. 15, № 16. – P. 1487–1490.
77. Flint, J. Principles of Virology / J. Flint, V. R. Racaniello, G. F. Rall, A. M. Skalka. – 4th Edition. – Vol. 1. – Washington, DC: ASM PRESS, 2015. – 1060 p. – ISBN 978-1-55581-933-0.
78. Flys, T. S. Quantitative analysis of HIV-1 variants with the K103N resistance mutation after single-dose nevirapine in women with HIV-1 subtypes A, C, and D / T. S. Flys, S. Chen, D. C. Jones [et al.]. // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2006. – Vol. 42, № 5. – P. 610–613.
79. Flys, T. S. Persistence of K103N-containing HIV-1 variants after single-dose nevirapine for prevention of HIV-1 mother-to-child transmission / T. S. Flys, D. Donnell, A. Mwatha [et al.]. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 195, № 5. – P. 711–715.
80. Fraser, C. HIV recombination: what is the impact on antiretroviral therapy? / C. Fraser // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2005. – Vol. 2, № 5. – P. 489–503.
81. Freed, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation / E. O. Freed // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – Vol. 13, № 8. – P. 484–496.
82. Galetto, R. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene determines a recombination hot spot in vivo / R. Galetto, A. Moumen, V. Giacomoni [et al.]. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 35. – P. 36625–36632.
83. Gallo, R. C. A human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome / R. C. Gallo, F. A. Wong-Staal // *Annals of Internal Medicine*. – 1985. – Vol. 103, № 5. – P. 679–89.
84. Ganser-Pornillos, B. K. The structural biology of HIV assembly / B. K. Ganser-Pornillos, M. Yeager, W. I. Sundquist // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2008. – Vol. 18, № 2. – P. 203–217.

85. Gifford, R. J. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance / R. J. Gifford, T. F. Liu, S. Y. Rhee [et al.]. // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25, № 9. – P. 1197–1198.
86. Glauser, M. P. Clinical and epidemiological survey of acquired immune deficiency syndrome in Europe / M. P. Glauser, P. Francioli // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 1984. – Vol. 3, № 1. – P. 55–58.
87. Gottlieb, G. S. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression / G. S. Gottlieb, D. C. Nickle, M. A. Jensen [et al.]. // *Lancet*. – 2004. – Vol. 363, № 9409. – P. 619–622.
88. Gu, Z. Possible involvement of cell fusion and viral recombination in generation of human immunodeficiency virus variants that display dual resistance to AZT and 3TC / Z. Gu, Q. Gao, E. A. Faust [et al.]. // *Journal of General Virology*. – 1995. – Vol. 76, № 10. – P. 2601–2605.
89. HIV BLAST search. – 2019. – URL: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html (дата обращения: 07.07.2022).
90. HIV Databases. – 2022. – URL: <https://www.hiv.lanl.gov> (дата обращения: 07.07.2022).
91. Hamers, F. F. The HIV epidemic associated with injecting drug use in Europe: geographic and time trends / F. F. Hamers, V. Batter, A. M. Downs [et al.]. // *AIDS*. – 1997. – Vol. 11, № 11. – P. 1365–1374.
92. Hebberecht, L. High frequency of new recombinant forms in HIV-1 transmission networks demonstrated by full genome sequencing / L. Hebberecht, V. Mortier, K. Dauwe [et al.]. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2020. – Vol. 84. – 104365.
93. Hemelaar, J. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004 / J. Hemelaar, E. Gouws, P. D. Ghys [et al.]. // *AIDS*. – 2006. – Vol. 20, № 16. – P. W13–W23.
94. Hemelaar, J. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007 / J. Hemelaar, E. Gouws, P. D. Ghys [et al.]. // *AIDS*. – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 679–689.

95. Hemelaar, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic / J. Hemelaar // *Trends in Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 18, № 3. – P. 182–192.
96. Hemelaar, J. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis / J. Hemelaar, R. Elangovan, J. Yun [et al.]. // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 19, № 2. – P. 143–155.
97. Hoffman, C. The epidemiology of HIV coreceptor tropism / C. Hoffman // *European Journal of Medicine Research*. – 2007. – Vol. 12, № 9. – P. 385–390.
98. Hu, W. S. Retroviral recombination and reverse transcription / W. S. Hu, H. M. Temin // *Science*. – 1990. – Vol. 250, № 4985. – P. 1227–1233.
99. Hudgens, M. G. Subtype-specific transmission probabilities for human immunodeficiency virus type 1 among injecting drug users in Bangkok, Thailand / M. G. Hudgens, I. M. Longini Jr., S. Vanichseni [et al.]. // *American Journal of Epidemiology*. – 2002. – Vol. 155, № 2. – P. 159–168.
100. Hymes, K. B. Kaposi's sarcoma in homosexual men—a report of eight cases / K. B. Hymes, J. B. Greene, A. Marcus [et al.]. // *Lancet*. – 1981. – Vol. 2, № 8247. – P. 598–600.
101. Immonen, T. T. Recombination Enhances HIV-1 Envelope Diversity by Facilitating the Survival of Latent Genomic Fragments in the Plasma Virus Population / T. T. Immonen, J. M. Conway, E. O. Romero-Severson [et al.]. // *PLoS Computational Biology*. – 2015. – Vol. 11, № 12. – e1004625.
102. Iyidogan, P. Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance / P. Iyidogan, K. S. Anderson. // *Viruses*. – 2014. – Vol. 6, № 10. – P. 4095–4139.
103. Jeang, K. T. Multi-Faceted Post-Transcriptional Functions of HIV-1 Rev / K. T. Jeang // *Biology (Basel)*. – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 165–174.
104. Jern, P. Likely role of APOBEC3G-mediated G-to-A mutations in HIV-1 evolution and drug resistance / P. Jern, R. A. Russell, V. K. Pathak [et al.]. // *PLoS Pathogens*. – 2009. – Vol. 5, № 4. – e1000367.

105. Jolly, C. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1 / C. Jolly, I. Mitar, Q. J. Sattentau // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81, № 11. – P. 5547–5560.
106. Kellam, P. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance / P. Kellam, B. A. Larder // *Journal of Virology*. – 1995. – Vol. 69, № 2. – P. 669–674.
107. Khan, N. Role of viral protein U (Vpu) in HIV-1 infection and pathogenesis / N. Khan, J. D. Geiger // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 8. – P. 1466.
108. Knipe, D. M. *Fields Virology* / D. M. Knipe, P. M. Howley. – 6th Edition. – Vol. 1. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. – 2455 p. – ISBN-13: 978-1-4511-0563-6.
109. Kouyos, R. D. Recombination and drug resistance in HIV: population dynamics and stochasticity / R. D. Kouyos, D. Fouchet, S. Bonhoeffer // *Epidemics*. – 2009. – Vol. 1, № 1. – P. 58–69.
110. Kramer-Hämmerle, S. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus / S. Kramer-Hämmerle, I. Rothenaigner, H. Wolff [et al.]. // *Virus Research*. – 2005. – Vol. 111, № 2. – P. 194–213.
111. Kuiken, C. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus / C. Kuiken, R. Thakallapalli, A. Eskild [et al.]. // *American Journal of Epidemiology*. – 2000. – Vol. 152, № 9. – P. 814–822.
112. Kurbanov, F. Human immunodeficiency virus in Uzbekistan: epidemiological and genetic analyses / F. Kurbanov, M. Mizokami, M. Imai [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2003. – Vol. 19, № 9. – P. 731–738.
113. Larsson, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets / A. Larsson // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, № 22. – P. 3276–3278.
114. Lebedev, A. Correction: Prevalence and spatiotemporal dynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Form 03_AB (CRF03_AB) in the Former Soviet Union countries / A. Lebedev, O. Pasechnik, E. Ozhmegova [et al.]. // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16, № 2. – e0247611.

115. Leelawiwat, W. Association between HIV genotype, viral load and disease progression in a cohort of Thai men who have sex with men with estimated dates of HIV infection / W. Leelawiwat, S. Pattanasin, A. Sriporn [et al.]. // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, № 7. – e0201386.
116. Leite, T. C. N. F. Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort / T. C. N. F. Leite, D. P. Campos, A. B. Coelho [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2017. – Vol. 33, № 1. – P. 41–48.
117. Letunic, I. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation / I. Letunic, P. Bork // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49, № W1. – P. W293–W296.
118. Li, X. Evidence that HIV-1 CRF01_AE is associated with low CD4+T cell count and CXCR4 co-receptor usage in recently infected young men who have sex with men (MSM) in Shanghai, China / X. Li, Y. Xue, L. Zhou [et al.]. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 2. – e89462.
119. Liitsola, K. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad / K. Liitsola, I. Tashkinova, T. Laukkanen [et al.]. // *AIDS*. – 1998. – Vol. 12, № 14. – P. 1907–1919.
120. Liitsola, K. An AB recombinant and its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. UNAIDS Virus Isolation Network / K. Liitsola, K. Holm, A. Bobkov [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2000. – Vol. 16, № 11. – P. 1047–1053.
121. Little, K. M. A review of evidence for transmission of HIV from children to breastfeeding women and implications for prevention / K. M. Little, P. H. Kilmarx, A. W. Taylor [et al.]. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2012. – Vol. 31, № 9. – P. 938–942.
122. Liu, J. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers / J. Liu, A. Bartesaghi, M. J. Borgnia [et al.]. // *Nature*. – 2008. – Vol. 455, № 7209. – P. 109–113.
123. Liu, Q. Quaternary Interaction of the HIV-1 Envelope Trimer with CD4 and Neutralizing Antibodies / Q. Liu, P. Zhang, P. Lusso // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 7. – P. 1405.

124. Liu, Y. Natural presence of V179E and rising prevalence of E138G in HIV-1 reverse transcriptase in CRF55_01B viruses / Y. Liu, H. Li, X. Wang [et al.]. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2020. – Vol. 77. – P. 104098.
125. Llibre, J. M. Resistance profile and genetic barrier of dolutegravir / J. M. Llibre, B. Clotet // *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*. – 2015. – Vol. 33, № S1. – P. 20–25.
126. Luban, J. Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions / J. Luban // *Cell*. – 1996. – Vol. 87, № 7. – P. 1157–1159.
127. Lukashov, V. V. Evidence for HIV type 1 strains of U.S. intravenous drug users as founders of AIDS epidemic among intravenous drug users in northern Europe / V. V. Lukashov, C. L. Kuiken, D. Vlahov [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1996. – Vol. 12, № 12. – P. 1179–1183.
128. Lukashov, V. V. Circulation of subtype A and gagA/envB recombinant HIV type 1 strains among injecting drug users in St. Petersburg, Russia, correlates with geographical origin of infections / V. V. Lukashov, R. Huismans, A. G. Rakhmanova [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1999. – Vol. 15, № 17. – P. 1577–1583.
129. Maartens, G. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention / G. Maartens, C. Celum, S. R. Lewin // *Lancet*. – 2014. – Vol. 384, № 9939. – P. 258–271.
130. Maginnis, M. S. Virus-Receptor Interactions: The Key to Cellular Invasion / M. S. Maginnis // *Journal of Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 430, № 17. – P. 2590–2611.
131. Malim, M. H. HIV-1 accessory proteins-ensuring viral survival in a hostile environment / M. H. Malim, M. Emerman // *Cell Host & Microbe*. – 2008. – Vol. 3, № 6. – P. 388–398.
132. Martin, D. P. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes / D. P. Martin, B. Murrell, M. Golden [et al.]. // *Virus Evolution*. – 2015. – Vol. 1, № 1. – vev003.

133. Mbhele, N. HIV-1 integrase strand transfer inhibitors: a review of current drugs, recent advances and drug resistance / N. Mbhele, B. Chimukangara, M. Gordon // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2021. – Vol. 57, № 5. – P. 106343.
134. Melikian, G. L. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing / G. L. Melikian, S. Y. Rhee, V. Varghese [et al.]. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 69, № 1. – P. 12–20.
135. Meloni, S. T. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3 / S. T. Meloni, B. Kim, J.-L. Sankalé [et al.]. // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78, № 22. – P. 12438–12445.
136. Menzo, S. Processivity and drug-dependence of HIV-1 protease: determinants of viral fitness in variants resistant to protease inhibitors / S. Menzo, A. Monachetti, C. Balotta [et al.]. // *AIDS*. – 2003. – Vol. 17, № 5. – P. 663–671.
137. Moumen, A. Evidence for a mechanism of recombination during reverse transcription dependent on the structure of the acceptor RNA / A. Moumen, L. Polomack, T. Unge [et al.]. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 18. – P. 15973–15982.
138. Moutouh, L. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure / L. Moutouh, J. Corbeil, D. D. Richman // *Proceeding of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93, № 12. – P. 6106–6111.
139. Nabatov, A.A. Simultaneous introduction of HIV type 1 subtype A and B viruses into injecting drug users in southern Ukraine at the beginning of the epidemic in the former Soviet Union / A. A. Nabatov, O. N. Kravchenko, M. G. Lyulchuk [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2002. – Vol. 18, № 12. – P. 891–895.
140. Neher, R. A. Recombination rate and selection strength in HIV intra-patient evolution / R. A. Neher, T. Leitner // *PLoS Computational Biology*. – 2010. – Vol. 6, № 1. – e1000660.

141. Ngoupo, P. A. First evidence of transmission of an HIV-1 M/O intergroup recombinant virus / P. A. Ngoupo, S. A. Sadeuh-Mba, F. De Oliveira [et al.]. // *AIDS*. – 2016. – Vol. 30, № 1. – P. 1–8.
142. Nguyen, L. T. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies / L. T. Nguyen, H. A. Schmidt, A. Von Haeseler [et al.]. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2015. – Vol. 32, № 1. – P. 268–274.
143. Novitsky, V. A. Molecular epidemiology of an HIV-1 subtype A subcluster among injection drug users in the Southern Ukraine / V. A. Novitsky, M. A. Montano, M. Essex // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1998. – Vol. 14, № 12. – P. 1079–1085.
144. Oliveira, F. De. Multiple HIV-1/M + HIV-1/O dual infections and new HIV-1/MO inter-group recombinant forms detected in Cameroon / F. De Oliveira, T. Mourez, A. Vessiere [et al.]. // *Retrovirology*. – 2017. – Vol. 14, № 1. – P. 1.
145. Pancera, M. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility / M. Pancera, S. Majeed, Y-E. A. Ban [et al.]. // *Proceeding of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, № 3. – P. 1166–1171.
146. Pandrea, I. HIV type 1 genetic diversity and genotypic drug susceptibility in the Republic of Moldova / I. Pandrea, C. Apetrei, I. Pandrea [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2001. – Vol. 17, № 13. – P. 1297–1304.
147. Pant, P. N. Does genetic diversity of HIV-1 non-B subtypes differentially impact disease progression in treatment-naive HIV-1-infected individuals? A systematic review of evidence / P. N. Pant, S. Shivkumar, J. M. Cajas // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2012. – Vol. 59, № 4. – P. 382–328.
148. Pantaleo, G. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection / G. Pantaleo, C. Graziosi, A. S. Fauci // *The New England Journal of Medicine*. – 1993. – Vol. 328, № 5. – P. 327–335.

149. Peeters, M. Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient / M. Peeters, F. Liegeois, N. Torimiro [et al.]. // *Journal of Virology*. – 1999. – Vol. 73, № 9. – P. 7368–7375.
150. Pham, H. T. The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies / H. T. Pham, T. Mesplède // *Drugs in Context*. – 2018. – Vol. 7. – P. 212522.
151. Pineda-Peña, A. C. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools / A. C. Pineda-Peña, N. R. Faria, S. Imbrechts [et al.]. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2013. – Vol. 19. – P. 337–348.
152. Poon, A. F. Y. First-line HIV treatment failures in non-B subtypes and recombinants: a cross-sectional analysis of multiple populations in Uganda / A. F. Y. Poon, E. Ndashimye, M. Avino [et al.]. // *AIDS Research and Therapy*. – 2019. – Vol. 16, № 1. – P. 3.
153. Qiao, Q. A review on architecture of the gag-pol ribosomal frameshifting RNA in human immunodeficiency virus: a variability survey of virus genotypes / Q. Qiao, Y. Yan, J. Guo [et al.]. // *Journal of biomolecular Structure & Dynamics*. – 2017. – Vol. 35, № 8. – P. 1629–1653.
154. Rahman, S. A. Investigating the Role of F-Actin in Human Immunodeficiency Virus Assembly by Live-Cell Microscopy / S. A. Rahman, P. Koch, J. Weichsel [et al.]. // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88, № 14. – P. 7904–7914.
155. Ramkumar, K. HIV-1 integrase inhibitors: 2007-2008 update / K. Ramkumar, E. Serrao, S. Odde [et al.]. // *Medical Care Research & Review*. – 2010. – Vol. 30, № 6. – P. 890–954.
156. Recombinant Genome Drawing Tool. – 2022. – URL: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/DRAW_CRF/recom_mapper.html (дата обращения: 08.08.2022).
157. Recombinant Identification Program 3.0. – 2022. – URL: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html> (дата обращения: 12.12.2022).

158. Rhee, S. Y. HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes / S. Y. Rhee, R. Kantor, D. A. Katzenstein [et al.]. // *AIDS*. – 2006. – Vol. 20, № 5. – P. 643–651.
159. Romani, B. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1 / B. Romani, S. Engelbrecht, R. H. Glashoff // *Journal of General Virology*. – 2010. – Vol. 91, № 1. – P. 1–12.
160. Rose, R. Eradication of HIV from Tissue Reservoirs: Challenges for the Cure / R. Rose, D. J. Nolan, E. Maidji [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2018. – Vol. 34, № 1. – P. 3–8.
161. Ruiz, A. The Vpu protein: new concepts in virus release and CD4 down-modulation / A. Ruiz, J. C. Guatelli, E. B. Stephens // *Current HIV Research*. – 2010. – Vol. 8, № 3. – P. 240–252.
162. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proceeding of the National Academy of Sciences*. – 1977. – Vol. 74, № 12. – P. 5463–5467.
- 163 Sarmati, L. HIV Replication at Low Copy Number and its Correlation with the HIV Reservoir: A Clinical Perspective / L. Sarmati, G. D’Ettorre, S. Parisi [et al.]. // *Current HIV Research*. – 2015. – Vol. 13, № 3. – P. 250–257.
164. Schultz, A. K. jpHMM: recombination analysis in viruses with circular genomes such as the hepatitis B virus / A. K. Schultz, I. Bulla, M. Abdou-Chekaraou [et al.]. // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40. – P. W193–198.
165. Shafer, R. W. Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database / R. W. Shafer // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 194, № 1. – P. S51 – S58.
166. Shafer, R. W. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease mutation search engine for queries / R. W. Shafer, D. R. Jung, B. J. Betts // *Nature Medicine*. – 2000. – Vol. 6, № 11. – P. 1290–1292.
167. Sharp, P. M. Origins of HIV and the AIDS pandemic / P. M. Sharp, B. H. Hahn // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2011. – Vol. 1, № 1. – a006841.

168. Siepel, A. C. A computer program designed to screen rapidly for HIV type 1 intersubtype recombinant sequences / A. C. Siepel, A. L. Halpern, C. Macken [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1995. – Vol. 11, № 11. – P. 1413–1416.
169. Sluis-Cremer, N. Proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor: insights into the mechanism of reverse transcriptase p66/p51 heterodimer formation / N. Sluis-Cremer, D. Arion, M. E. Abram [et al.]. // *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2004. – Vol. 36, № 9. – P. 1836–1847.
170. Sluis-Cremer, N. The emerging profile of cross-resistance among the nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors / N. Sluis-Cremer // *Viruses*. – 2014. – Vol. 6, № 8. – P. 2960–2973.
171. Sluis-Cremer, N. Resistance to reverse transcriptase inhibitors used in the treatment and prevention of HIV-1 infection / N. Sluis-Cremer, M. A. Wainberg, R. F. Schinazi // *Future Microbiology*. – 2015. – Vol. 10, № 11. – P. 1773–1782.
172. Smith, D. M. HIV drug resistance acquired through superinfection / D. M. Smith, J. K. Wong, G. K. Hightower [et al.]. // *AIDS*. – 2005. – Vol. 19, № 12. – P. 1251–1256.
173. Smolskaya, T. HIV epidemiology in the Northwestern Federal District of Russia: dominance of HIV type 1 subtype A / T. Smolskaya, K. Liitsola, V. Zetterberg [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2006. – Vol. 22, № 11. – P. 1074–1080.
174. Spivak, A.M. HIV-1 Eradication: Early Trials (and Tribulations) / A. M. Spivak, V. Planelles // *Trends in Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 22, № 1. – P. 10–27.
175. STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE Major HIV-1 Drug Resistance Mutations. – 2022. – URL: <https://cms.hivdb.org/prod/downloads/resistance-mutation-handout/resistance-mutation-handout.pdf> (дата обращения: 07.07.2022).
176. Struck, D. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification / D. Struck, G. Lawyer, A. M. Ternes [et al.]. // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, № 18. – e144.
177. Stupfler, B. Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by the HIV-1 Vif Protein / B. Stupfler, C. Verriez, S. Gallois-Montbrun [et al.]. // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 617.

178. Su C. T. T. Reviewing HIV-1 Gag Mutations in Protease Inhibitors Resistance: Insights for Possible Novel Gag Inhibitor Designs / C. T. T. Su, D. W. S. Koh, S. K. E. Gan // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 18. – P. 3243.
179. Su, L. Prevalence and patterns of drug-resistance mutations among HIV-1 patients infected with CRF07_BC strains in Sichuan province, China / L. Su, X. Zhou, D. Yuan [et al.]. // *Virologica Sinica*. – 2014. – Vol. 29, № 4. – P. 237–241.
180. Tarosso, L. F. Short communication: HIV type 1 subtype BF leads to faster CD4+ T cell loss compared to subtype B / L. F. Tarosso, S. S. Sanabani, S. P. Ribeiro [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2014. – Vol. 30, № 2. – P. 190–194.
181. Thomson, M. M. New insights into the origin of the HIV type 1 subtype A epidemic in former Soviet Union's countries derived from sequence analyses of preepidemically transmitted viruses / M. M. Thomson, E. V. De Parga, A. Vinogradova [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2007. – Vol. 23, № 12. – P. 1599–1604.
182. Thomson, M. M. Increasing HIV-1 genetic diversity in Europe / M. M. Thomson, R. Nájera // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 196, № 8. – P. 1120–1124.
183. Toni, T. D. A. Characterization of nevirapine (NVP) resistance mutations and HIV type 1 subtype in women from Abidjan (Côte d'Ivoire) after NVP single-dose prophylaxis of HIV type 1 mother-to-child transmission / T. D. A. Toni, B. Masquelier, E. Lazaro [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2005. – Vol. 21, № 12. – P. 1031–1034.
184. Trono, D. HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals / D. Trono, C. Van Lint, C. Rouzioux [et al.]. // *Science*. – 2010. – Vol. 329, № 5988. – P. 174–180.
185. Urmacher, C. Outbreak of Kaposi's sarcoma with cytomegalovirus infection in young homosexual men / C. Urmacher, P. Myskowski, M. Ochoa [et al.]. // *The American Journal of Medicine*. – 1982. – Vol. 72, № 4. – P. 569–575.
186. Ustina, V. Epidemiology of HIV in Estonia / V. Ustina, K. Zilmer, L. Tammai [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2001. – Vol. 17, № 1. – P. 81–85.

187. Vidal, N. Identification and molecular characterization of subtype A4 in central Africa / N. Vidal, C. Mulanga, S. E. Bazepeo [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2006. – Vol. 22, № 2. – P. 182–187.
188. Vidyavijayan, K. K. Biased Nucleotide Composition and Differential Codon Usage Pattern in HIV-1 and HIV-2 / K. K. Vidyavijayan, S. Hassan, L. K. Precilla [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2017. – Vol. 33, № 3. – P. 298–307.
189. Visseaux, B. Hiv-2 molecular epidemiology / B. Visseaux, F. Damond, S. Matheron [et al.]. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 46. – P. 233–240.
190. Vuilleumier, S. Contribution of recombination to the evolutionary history of HIV / S. Vuilleumier, S. Bonhoeffer // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. 84–89.
191. Wain-Hobson, S. Network analysis of human and simian immunodeficiency virus sequence sets reveals massive recombination resulting in shorter pathways / S. Wain-Hobson, C. Renoux-Elbé, J. P. Vartanian [et al.]. // *Journal of General Virology*. – 2003. – Vol. 84, № Pt 4. – P. 885–895.
192. Wallet, C. Evolution of a concept: From accessory protein to key virulence factor, the case of HIV-1 Vpr / C. Wallet, O. Rohr, C. Schwartz // *Biochemical Pharmacology*. – 2020. – Vol. 180. – P. 114128.
193. Wertheim, J. O. Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2 / J. O. Wertheim, M. Worobey // *PLoS Computational Biology*. – 2009. – Vol. 5, № 5. – e1000377.
194. Wilen, C. B. Molecular mechanisms of HIV entry / C. B. Wilen, J. C. Tilton, R. W. Doms // *Advanced in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Vol. 726. – P. 223–242.
195. Wu, H. Identification of drug resistant mutations in HIV-1 CRF07_BC variants selected by nevirapine in vitro / H. Wu, H. J. Zhang, X.-min Zhang [et al.]. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 9. – e44333.

196. Wymant C. A highly virulent variant of HIV-1 circulating in the Netherlands / C. Wymant, D. Bezemer, F. Blanquart [et al.]. // *Science*. – 2022. – Vol. 375, № 6580. – P. 540–545.
197. Yamaguchi, J. Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L / J. Yamaguchi, A. Vallari, C. McArthur [et al.]. // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom*. – 2020. – Vol. 83, № 3. – P. 319–322.
198. Yusim, K. Using human immunodeficiency virus type 1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution / K. Yusim, M. Peeters, O. G. Pybus [et al.]. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Science*. – 2001. – Vol. 356, № 1410. – P. 855–866.
199. Zhang, J. Retrovirus recombination depends on the length of sequence identity and is not error prone / J. Zhang, H. M. Temin // *Journal of Virology*. – 1994. – Vol. 68, № 4. – P. 2409–2414.
200. Zhang, Y. Genetic Diversity, Complicated Recombination, and Deteriorating Drug Resistance Among HIV-1-Infected Individuals in Wuhan, China / Y. Zhang, Y. Luo, Y. Li [et al.]. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2021. – Vol. 37, № 3. – P. 246–251.

Приложение А

(справочное)

Перечень антиретровирусных препаратов и обозначающих их сокращений

Таблица 1 – Перечень антиретровирусных препаратов и обозначающих их сокращений

Международное название препарата	Сокращение
НИОТ	
Зидовудин	AZT
Диданозин	ddI
Ставудин	d4T
Ламивудин	3TC
Абакавир	ABC
Тенофовир	TDF
Эмтрицитабин	FTC
Фосфазид	f-AZT
Тенофовира алафенамид	TAF
ННИОТ	
Эфаривенз	EFV
Невирарпин	NVP
Этравирин	ETR
Рилпивирин	RPV
Доравирин	DOR
Эльсифавирин	ESV
ИП	
Саквинавир	SQV
Ритонавир	RTV
Атазанавир	ATV
Фосампренавир	FPV
Типранавир	TPV
Дарунавир	DRV
ИИ	
Ралтегравир	RAL
Долутегравир	DTG
Ингибиторы слияния	
Энфувиртид	ENF
Ингибиторы (блокаторы) рецепторов	
Маравирок	MVC

Приложение Б

(обязательное)

Регистрационные номера использованных в работе нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1

Таблица 1 – Регистрационные номера всех использованных в работе последовательностей ВИЧ-1 в базе данных Лос-Аламосской национальной лаборатории

Город	Год сбора коллекции	Число полученных образцов	Регистрационный номер нуклеотидных последовательностей в международной базе данных GenBank
Архангельск	2013–2014	64	KU557639-KU557648, KU645849-KU645856, KU645858-KU645883, KU670321-KU670329, KU933329-KU933337, KU933339-KU933340
Барнаул	2017	82	МК612415-МК612496
Благовещенск	2012	40	KC254581-KC254615, KC156532-KC156533, KC208003-KC208005
Владивосток	2012	62	KC701380-KC701384, KF205368-KF205369, KF205371-KF205374, KF205376-KF205391, KF971919-KF971945, KJ461969-KJ461976
Вологда	2016–2017	26	MN188025-MN188049, MN188051
Ижевск	2017	42	MN235900-MN235941
Иркутск	2012	97	KC254616-KC254643
Казань	2012–2013	65	KJ499552-KJ499592, KJ499609-KJ499622, KJ499625-KJ499626, KJ499628, KJ499630-KJ499636
Краснодар	2014–2019	478	МК795070-МК795125, ОК474336-ОК474757
Красноярск	2011–2016	281	МК589431-МК589711
Москва и Московская область	2011–2016, 2019–2020	1247	MH666355-MH666433, MH666435-MH666454, MH666456-MH666510, MH666512-MH666645, MH666647-MH666648, MH666650-MH666683, MH666685-MH666703, MH666705-MH666726, MH666728-MH666768, MH666770-MH666777, MH666779-MH666797, MH666799-MH666809, MH666811-MH666828, MH666830- MH666831, MH666833-MH666842, MH666844-MH666870, MH666872-MH666897, MH666899-MH666901, MH666903-MH666931, MH666933, MH666935-MH666959, MH666961-MH667006, MH667008-MH667086, MH667088-MH667140, MH667142-MH667163, MH667165-MH667169, MH667171, MH667173-MH667200, MH667202-MH667223, MH667225-MH667238, MH667240-MH667241, MH667243-MH667255, KY857892-KY587904, KY857906-KY587907, KY857909-KY587913,

Продолжение таблицы 1

Город	Год сбора коллекции	Число полученных образцов	Регистрационный номер нуклеотидных последовательностей в международной базе данных GenBank
Москва и Московская область	2011–2016, 2019–2020	1247	KY857915, KY857918-KY587922, MW756383-MW756390, MW756393-MW756414, MW756416-MW756419, MW756421-MW756427, OL792300-OL792570, OL792574-OL792612
Мурманск	2013–2014	66	KX432074-KX432139
Нижневартовск	2017	30	MW115451-MW115458, MW115460-MW115466, MW115468-MW115482
Нижний Новгород	2011–2012	72	KJ722070-KJ722139
Ноябрьск	2011–2016	123	OM049964-OM049965, OM049967, OM049969, OM049972-OM049973, OM049976-OM049979, OM049982-OM049984, OM049988-OM049990, OM049992-OM049997, OM050001-OM050006, OM050008-OM050009, OM050012, OM050014-OM050017, OM050019-OM050022, OM050025-OM050027, OM050031-OM050033, OM050035-OM050046, OM050049-OM050053, OM050056, OM050058-OM050061, OM050063-OM050064, OM050066, OM050068-OM050079, OM050081-OM050092, OM050094-OM050101, OM050103, OM050106-OM050111, OM050113-OM050115, OM050118-OM050121, KX517440-KX517441, KX517443, KX530764, KX530766, MT461102, MT461107
Пермь	2011, 2013	72	KP659664-KP659684, KP659686-KP659736, KP659663, KP659685
Симферополь	2016–2017	77	MK606541, MK606543-MK606563, MK606565-MK606573, MK606575-MK606580, MK606583-MK606586, MK606588-MK606593, MK606595-MK606624
Сургут	2017	45	MW115483-MW115527
Хабаровск	2012	88	KC509837-KC509885, KC665916-KC665944, KF177159-KF177168
Ханты-Мансийск	2017	18	MW115433-MN115450
Череповец	2017–2018	50	MN187975-MN188024
Южно-Сахалинск	2013	53	MF124822-MF124874