

На правах рукописи

ОЖМЕГОВА ЕКАТЕРИНА НИКИТИЧНА

**ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ВИЧ-1 НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД С 2002 ПО 2020 ГГ.**

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

Научный руководитель:

Бобкова Марина Ридовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией вирусов лейкозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (до 10 февраля 2023 г.); главный специалист лаборатории биологии лентивирусов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова)

Официальные оппоненты:

Останкова Юлия Владимировна – кандидат биологических наук, с.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии, заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора)

Канестри Вероника Геннадиевна – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник специализированного научно-исследовательского отдела по профилактике и борьбе со СПИДом федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (СНИО ЭП СПИД ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора)

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)), г. Москва

Защита диссертации состоится «23» октября 2023 года в «12» часов на заседании Диссертационного совета 21.1.018.02 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 16.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18) и на сайте института <https://www.gamaleya.org/>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Е.И. Бурцева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. По состоянию на 2021 год в Российской Федерации (РФ) общее количество лиц, живущих с вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), включая умерших, составило 1 562 570 человек, тогда как в 2020 году этот показатель составлял 1 492 998 человек. В то же время продолжает регистрироваться значительное количество новых случаев заражения ВИЧ-инфекцией (71 тыс. человек). Сейчас люди, живущие с ВИЧ, зарегистрированы во всех субъектах Российской Федерации (РФ), а число смертей продолжает сохраняться на высоком уровне (424 974 человек за весь период наблюдения) [Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2021 г., 2022].

Вышеприведенные данные указывают на то, что состояние эпидемии ВИЧ-инфекции в России продолжает ухудшаться, а проводимых мер по остановке распространения вируса в стране недостаточно.

ВИЧ-инфекция является неизлечимым заболеванием, и в настоящее время целью лечения ВИЧ, основанного на антиретровирусной терапии (АРТ), является установление неопределяемой вирусной нагрузки (ВН) в крови. Это, в свою очередь, позволяет сохранить функцию иммунной системы, увеличить продолжительность и качество жизни пациента, а также снизить контагиозность ВИЧ-инфицированного человека и, следовательно, уровень распространения ВИЧ в популяции.

Внедрение АРТ и ее эффективность в борьбе с ВИЧ позволило разработать организациям, занимающимся ВИЧ-инфекцией специальные программы, обеспечивающие улучшение показателей, связанных с ВИЧ, по всем направлениям, начиная от снижения распространенности ВИЧ-инфекции и заканчивая качеством жизни пациентов.

Так, в 2014 году Объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС) представила новую стратегию по противодействию эпидемии ВИЧ - 90-90-90, в рамках которой к 2020 году 90% ВИЧ-инфицированных должны знать о своем ВИЧ-статусе, 90% из них должны получать АРТ и 90% из них должны добиться вирусологического успеха [ЮНЭЙДС. Информационный бюллетень – 90-90-90: Лечение для всех, 2014]. Помимо обеспечения АРТ всех инфицированных лиц, независимо от клинических проявлений, рекомендовано применять АРТ в до- и пост-контактной профилактике, а также для предотвращения вертикальной передачи ВИЧ от матери к ребенку [Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации: ВИЧ-инфекция у взрослых, 2020].

В связи с постоянным ростом применения АРТ и высокой изменчивостью ВИЧ, особенно под воздействием АРТ у пациентов, имеющих так называемую субоптимальную терапию, когда пациент имеет приверженность в пределах 70-80%, растет частота возникновения лекарственной устойчивости (ЛУ) [Sethi A. K. et.al., 2003]. В свою очередь, наличие ЛУ у ВИЧ-инфицированного пациента влияет на эффективность терапии, что ведет за собой ограничение выбора и удорожание схем лечения,

прогрессирование заболевания и, следовательно, повышенный риск летального исхода [Nacheга J. B. et al., 2011].

Устойчивость ВИЧ может возникать, если мутации устойчивости происходят под действием лекарственных препаратов; в таком случае ЛУ называют приобретенной (acquired drug resistance, ADR). Если же происходит заражение ранее неинфицированного человека устойчивым штаммом вируса, то такую устойчивость называют передающейся (transmitted drug resistance, TDR). Также существует понятие ЛУ перед лечением или первичная лекарственная устойчивость (pre-treatment drug resistance, PDR), которая выявляется у людей, никогда не принимавших АРТ или повторно начинающих. И приобретенная, и передающаяся/первичная устойчивость представляют собой серьезную угрозу с точки зрения лечения ВИЧ-инфекции в силу того, что ограничивается выбор и повышается стоимость препаратов второй и последующих линий, способных подавить вирусную репликацию. Передающаяся ЛУ представляет собой особый интерес по причине того, что, помимо неуспеха уже первой линии терапии, проявляющейся продолжением репликации вируса, она предполагает вероятность заражения других людей устойчивым вариантом вируса [ВОЗ. Устойчивость ВИЧ к лекарственным препаратам, 2022].

В настоящее время в РФ не проводится систематизированный мониторинг передающейся и первичной ЛУ для выявления регионов с высокой распространенностью устойчивых вариантов вируса. Генотипирование пациентов при вирусологической неэффективности лечения (приобретенная ЛУ) проводится в очень ограниченном числе случаев. При необходимости замены схем лечения врачи руководствуются почти исключительно историей лечения пациентов и дают новые назначения на основе клинических рекомендаций. Такая система назначения терапии, в особенности при повторных неудачах АРТ, при которой неизвестны данные о геноме вируса, влечет за собой ряд трудностей, в том числе дополнительные финансовые затраты [ITPSru. Анализ закупок АРВ-препаратов в Российской Федерации в 2019 году, 2020; Министерство здравоохранения Российской Федерации. ВИЧ-инфекция у взрослых, 2020].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует проводить мониторинг ЛУ ВИЧ как необходимую часть всех стратегических национальных программ по противодействию распространению устойчивых вариантов вирусов. На сегодняшний день существует особый вид надзора, который не требует проведения генотипирования вируса, но может ориентировочно оценить вероятность распространения устойчивых вариантов ВИЧ. Данный вид надзора называется мониторинг индикаторов раннего предупреждения (ИРП). ИРП это показатели, оценивающие состояние назначения и эффективности терапии в отдельно взятом медицинском учреждении. В их числе находится оценка приверженности пациентов к лечению, ограничение доступа к лечению и правильность назначения АРТ [ВОЗ. Руководство по мониторингу и оценке совместной деятельности по борьбе с ТБ/ВИЧ, 2015].

Все вышеизложенное указывает на то, что, несмотря на существование оптимизированных клинических рекомендаций и успехи науки в создании новых

препаратов, которые обладают большей эффективностью в борьбе с ВИЧ, эпидемия продолжает развиваться, а вместе с ней продолжает развиваться ЛУ, и поэтому актуальность данной темы стоит вне всяких сомнений.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на то, что охват тестированием пациентов на наличие ЛУ крайне низок, исследования на тему уровня и структуры ЛУ проводятся уже давно, и к настоящему времени существует немало публикаций. Так, недавно было проведено масштабное исследование, охватывающее ВИЧ-инфицированных людей с неуспехом терапии из всех федеральных округов (ФО) России, однако большинство данных пациентов были из Центрального ФО (714 чел.), в то время как в остальных округах выборка пациентов варьировалась от 1 до 60 чел. [Кириченко А. А. и др., 2021]. В остальных работах исследования на тему ЛУ у пациентов с опытом приема терапии проводились в разных регионах, на разных выборках, использовались разные методики и интерпретации результатов [Кириченко А. А. и др., 2017; Коломеец А. Н. и др., 2015; Останкова Ю. В. и др., 2019; Плотникова Ю. К. и др., 2017]. Таким образом, систематизированного и обобщенного исследования, которое позволяло бы экстраполировать полученные результаты на страну в целом и охватывало бы период времени с начала масштабного применения АРТ в России и до настоящего времени, не проводилось.

Аналогично ситуация обстояла и с первичной ЛУ, в отношении которой существует только одно масштабное исследование распространенности ЛУ перед началом терапии, где выборка состояла из 1560 пациентов, проживавших в разных ФО России. В данном исследовании были получены важные сведения о частоте встречаемости основных мутаций ЛУ, динамике распространенности первичной ЛУ, а также распространенности первичной ЛУ в зависимости от ФО России [Кириченко А. А. и др., 2019]. Тем не менее, вопросы о факторах, ассоциированных с развитием ЛУ и кластерах передачи лекарственно-устойчивых вариантов вирусов оставались открытыми. Также было проведено несколько исследований в разных регионах РФ, результаты которых сложно сравнить между собой в силу различий между когортами пациентов и использованными методиками выполнения исследований [Дементьева Н. Е. и др., 2011; Larovok I. et.al., 2016; Зайцева Н. Н. и др., 2016].

Цель исследования. Оценить распространенность и структуру лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Российской Федерации и выявить основные причины, влияющие на ее развитие.

Задачи исследования:

1. Определить и проанализировать нуклеотидные последовательности фрагментов областей гена *pol*, кодирующего основные мишени терапии ВИЧ-1, и соответствующие им клинично-эпидемиологические данные, собранные в Российской Федерации в период с 2002 по 2020 гг.

2. Охарактеризовать мутации приобретенной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 и установить частоту их встречаемости у леченных пациентов с неэффективностью терапии.

3. Выполнить анализ первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 и установить частоту индивидуальных мутаций в когорте пациентов без опыта лечения.

4. Определить различия в частоте встречаемости первичной и приобретенной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 между федеральными округами Российской Федерации.

5. Провести анализ приобретенной и первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в динамике с 2002 по 2020 год.

6. Выполнить анализ генетических сетей передачи ВИЧ-инфекции.

7. Провести мониторинг индикаторов раннего предупреждения лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в региональных Центрах по профилактике и борьбе со СПИДом.

Научная новизна. Впервые проведено масштабное и систематизированное исследование, посвященное оценке структуры и уровня ЛУ ВИЧ-1, затрагивающее различные регионы РФ. Достижимость получения надежного результата обеспечивается существованием уникального и большого объема данных о нуклеотидных последовательностях ВИЧ, а также клинико-эпидемиологических показателях, имеющихся в распоряжении лаборатории вирусов лейкозов подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Впервые показана динамика изменчивости ЛУ и оценка профиля и частоты встречаемости мутаций ЛУ у пациентов, испытавших неуспех лечения, а также пациентов, которые только начинают первую линию терапии. Эта информация носит принципиальный характер, поскольку оценивается влияние профиля данных мутаций на эффективность лекарственных средств для лечения ВИЧ-инфекции, как среди пациентов, уже имеющих опыт приема терапии, так и у пациентов без опыта АРТ.

В ходе выполнения работы впервые проведен мониторинг ИРП ЛУ ВИЧ-1, который, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, должен ежегодно проводиться во всех региональных Центрах профилактики и борьбы со СПИДом (далее Центры СПИД) и который представляет собой программные и клинические факторы АРТ, коррелирующие с возникновением предотвратимой ЛУ ВИЧ на популяционном уровне.

Теоретическая и практическая значимость работы. В теоретическом аспекте значимость работы заключается в получении обобщенной и систематизированной информации, касающейся ЛУ, среди пациентов, которым предстоит начать АРТ, а также среди тех, кто уже получает это лечение в России. Данная информация вносит существенный вклад в представления мировой науки о распространенности первичной и приобретенной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 и профилях их мутаций.

Проведен мониторинг ИРП, который дает фактические данные о ситуациях, провоцирующих возникновение ИРП, для всех лиц, получающих АРТ, и может способствовать выявлению клинических или программных событий, заслуживающих более пристального внимания и поддержки.

В прикладном аспекте значимость работы состоит в обосновании рекомендации о необходимости применения генотипирования ВИЧ до начала терапии у «наивных» пациентов для оптимального подбора лекарственных средств лечения ВИЧ-инфекции.

Даны рекомендации о предпочтительном выборе схем АРТ на основании сведений о геноме ВИЧ, вызвавшем заражение у пациентов, которые испытали неуспех терапии, что, без сомнения, способно дать экономический эффект и положительно сказаться на качестве и продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных пациентов.

Полученные в результате выполнения проекта данные доведены до сведения специалистов, занимающихся лечением и диагностикой ВИЧ-инфекции, включая научных и клинично-лабораторных сотрудников, и найдут свое применение в практике диагностики и лечения ВИЧ-инфекции.

Внедрение полученных результатов в практику. Результаты диссертационной работы внедрены в научно-практическую деятельность государственного казенного учреждения здравоохранения «Московский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями» при работе с когортами пациентов как с опытом приема антиретровирусной терапии, так и без опыта, которые значительно повысили качество лечения ВИЧ-инфекции, а также результаты диссертации внедрены в учебный процесс кафедры вирусологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Методология и методы исследования. Основу методологии настоящей работы составили современные теоретические и экспериментальные подходы изучения лекарственной устойчивости ВИЧ-инфекции. В исследовании были использованы такие современные экспериментальные подходы молекулярной биологии как автоматическая экстракция ДНК из лимфоцитов колоночным методом, ПЦР-амплификация, очистка, полученных ампликонов колоночным методом, а также секвенирование целевого фрагмента по Сэнгеру; современные биоинформатические методы анализа генетической информации (программы для анализа популяций последовательностей ВИЧ-1, статистические методы для оценки представленности и характера мутаций лекарственной устойчивости).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Среди нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от пациентов с опытом приема терапии и вирусологической неэффективностью большинство составляют устойчивые варианты вируса к НИОТ, ННИОТ и НИОТ+ННИОТ за счет преобладания мутаций M184V/I и G109A/S.

2. В структуре первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 преобладают устойчивые варианты вируса к НИОТ, ННИОТ и НИОТ+ННИОТ за счет мутаций M184V/I и K103N.

3. Наибольшая частота встречаемости приобретенной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди пациентов с опытом приема антиретровирусной терапии в регионах России отмечена в Центральном и Сибирском округах Российской Федерации.

4. Наиболее пораженными в отношении распространенности первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 являются Сибирский и Уральский округа Российской Федерации.

5. Отмечено преобладание доли ВИЧ-1, имеющих мутации лекарственной устойчивости к препаратам классов НИОТ+ННИОТ, НИОТ и ННИОТ, среди пациентов с неудачей терапии в период с 2005 по 2019 гг..

6. Наиболее часто выявляемые мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к ННИОТ и НИОТ+ННИОТ (M184V, K103N, G190S) связаны с генетическими сетями передачи устойчивых штаммов между пациентами.

7. Анализ индикаторов раннего предупреждения лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в региональных Центрах по профилактике и борьбе со СПИДом указывает на то, что сниженная приверженность пациентов является центральной проблемой лечения, которая создает условия для формирования устойчивых штаммов ВИЧ-1.

Степень достоверности результатов. Степень достоверности полученных результатов является высокой за счет репрезентативности объема выборки обследованных пациентов (3023 человека) и фактического материала, а также за счет применения современных молекулярно-биологических методов исследования: экстракция ДНК/РНК, амплификация, секвенирование ампликонов методом Сэнгера. Надежность результатов была обеспечена статистической обработкой полученных результатов при уровне значимости $<0,05$.

Апробация результатов. Тема диссертации утверждена на ученом совете ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России 1 июля 2021 г.. Апробация диссертации состоялась 25 января 2023 года на совместной научной конференции отдела общей вирусологии и Совета по предварительной экспертизе диссертационных работ подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол №48).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: международной конференции в Париже (Франция) «18th European Meeting on HIV & Hepatitis» (28-30 октября 2020 г.); всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием в Сочи (Россия) «Социально значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (8-11 ноября 2022 г.) и международной встрече студентов-медиков в Санкт-Петербурге (Россия) «XVI IFMSA European Regional Meeting EuRegMe 2019» (20-24 апреля 2019).

Декларация личного участия автора. Основные разделы диссертационной работы (написание литературного обзора, результатов и их обсуждения, статистическая обработка данных, многофакторный анализ, кластерный анализ, построение графиков и диаграмм), а также выделение провирусной ДНК/РНК, амплификация и секвенирование по Сэнгеру 1200 образцов от ВИЧ-инфицированных пациентов сделаны автором лично. Выделение провирусной ДНК/РНК, амплификация и секвенирование по Сэнгеру 1823 образцов от ВИЧ-инфицированных пациентов сделаны сотрудниками лаборатории вирусов лейкозов подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, а именно: Антоновой А.А., к.б.н. Лебедевым А.В., к.б.н. Лагой В.Ю., Ким К.В., Громовым К.Б., Тумановым А.С., д.б.н. Казенновой Е.В.. Сбор биологического материала проводился с участием сотрудников региональных Центров СПИД.

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

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 4 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 1 статья в зарубежном издании и 2 тезиса в сборниках материалов всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, перечня условных обозначений, библиографического списка литературы, включающего 155 источников, в том числе 25 отечественных и 130 зарубежных, а также 2 приложения. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 41 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования. В работе использованы нуклеотидные последовательности ВИЧ-1, которые, в зависимости от поставленных задач, получены путем секвенирования провирусной ДНК из лимфоцитов периферической крови либо вирусной РНК из плазмы 3023 ВИЧ-инфицированных пациентов, находившихся на диспансерном учете с зарегистрированным диагнозом «ВИЧ-инфекция» в 7-ми федеральных округах в период с 2002 года по 2020 год. Образцы лимфоцитов и плазмы были собраны в ходе выполнения проектов лаборатории в сотрудничестве с лабораториями региональных центров по профилактике и борьбе со СПИДом (Центры СПИД).

Выявление факторов риска инфицирования, возможных мест заражения, эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводилось путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Сведения о возрасте, поле пациента, дате забора клинического материала, дате и регионе постановки диагноза «ВИЧ-инфекция», а также стадии ВИЧ-инфекции, показателях вирусной нагрузки и иммунного статуса пациентов были получены на основании записей в амбулаторных картах.

Молекулярно-генетические методы. Для получения нуклеотидных последовательностей из провирусной ДНК лимфоцитов 956 пациентов использовали *in house* методы, включающие в себя: экстракцию провирусной ДНК из лимфоцитов, амплификацию участка гена *pol*, электрофоретический анализ ампликонов, очистку и концентрацию продуктов амплификации, секвенирование участка гена *pol* по Сэнгеру. Для получения нуклеотидных последовательностей из вирусной РНК плазмы крови 2067 пациентов использовали коммерческую систему генотипирования ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Applied Biosystems, США), включающую в себя реагенты для

проведения экстракции вирусной РНК из плазмы крови, обратной транскрипции РНК, амплификации участка гена *pol*, очистки и концентрации продуктов амплификации, циклического секвенирования.

Процедура получения нуклеотидных последовательностей из провирусной ДНК лимфоцитов. Экстракцию провирусной ДНК из лимфоцитов проводили с использованием коммерческого набора реактивов ДНК QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия), разработанных специально для автоматической станции DNA/RNA Extractor QuiCube (QIAGEN, Германия). Проверку качества выделения проводили методом горизонтального электрофореза в 1,2% агарозном геле. Все этапы экстракции ДНК выполнялись согласно инструкции производителя для соответствующего комплекта реагентов.

Амплификацию участка гена *pol*, кодирующего протеазу и часть (2/3) обратной транскриптазы провирусной ДНК ВИЧ-1 осуществляли *in house* методом с использованием «гнездовой (nested)» ПЦР с помощью амплификатора GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США). Смесь для ПЦР содержала 5-кратный ПЦР-буфер (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), дНТФ (Promega, США), прямой и обратный праймер (Евроген, Россия), ДНК-полимеразу Taq (Евроген, Россия), деионизованную воду (Sigma, США) и ДНК-матрицу. Режим амплификации: 1 раунд (95 °С – 5 мин., затем 35 циклов - 94 °С – 30 сек., 55 °С – 1 мин., 72 °С – 1 мин., затем 72 °С – 10 мин. и 4 °С – хранение), 2 раунд (95 °С – 5 мин., затем 35 циклов - 94 °С – 30 сек., 51 °С – 1 мин., 72 °С – 1 мин., затем 72 °С – 10 мин. и 4 °С – хранение).

Оценку качества ПЦР-продукта проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1,2% геле. Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли с применением гель-документирующей системы Doc-Print VX2 1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

Очистку амплифицированных ДНК-фрагментов проводили с использованием коммерческого набора для выделения ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей с помощью микроцентрифужных колонок Cleanup S-cap (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты очистки оценивали с помощью электрофореза.

Постановку реакции секвенирования осуществляли с использованием коммерческого набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Режим секвенирования проводили при следующих параметрах: 96°С – 2 мин., 96°С – 10 мин., 50°С – 5 мин., 72°С – 4 мин. (25 циклов).

Определение нуклеотидной последовательности осуществляли в автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Процедура получения нуклеотидных последовательностей из вирусной РНК плазмы крови. Экстракцию вирусной РНК ВИЧ-1 осуществляли согласно инструкции производителя с использованием лизирующего буфера (Viral Lysis Buffer) и холодного разбавителя РНК (RNA Diluent), входящих в состав коммерческого набора ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System.

Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, США). Смесь, помимо РНК ВИЧ-1, содержала буферный раствор (RT Mix), ингибитор РНКазы (RNase Inhibitor), обратную

транскриптазу (MuLV Reverse Transcriptase), дитиотрейтол (ДТТ). Все этапы выполняли по стандартному протоколу производителя.

ПЦР осуществляли после обратной транскрипции в соответствии с инструкцией производителя. Смесь содержала AmpliTaq Gold ДНК полимеразу, прямой и обратный праймеры, dNTPs и AmpErase UNG. Реакцию ПЦР проводили в термоциклере GeneAmp 9600 (Applied Biosystems, США).

Оценку качества ПЦР-продукта проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1,2% геле. Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли с применением гель-документирующей системы Doc-Print VX2 1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

После ПЦР пробы очищали при помощи Microcon YM-100 микроконцентраторов, входящих в набор ViroSeq в соответствии с инструкцией производителя.

Постановку реакции секвенирования осуществляли с использованием трех прямых и обратных и одного перекрывающего праймеров (A-H) для секвенирования в составе микса (HIV-1 SEQ mix). Для определения последовательности использовали программное обеспечение ViroSeq HIV-1 Genotyping Software v 3.0 и секвенатор ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Биоинформационные методы. Построение общей (консенсусной) нуклеотидной последовательности выполняли с помощью приложения SeqMan II expert sequence analysis software (v 6.1) пакета программ LaserGen (DNASTAR Inc, США). Парное и множественное выравнивание последовательностей выполняли с помощью программы AliView 1.28. Работу по определению субтипа вируса по исследуемым областям генома проводили с применением on-line программ COMET v 0.5 и REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 3.0. Для получения информации о мутациях ЛУ и естественных полиморфизмах ВИЧ-1 использовали базу данных Стэнфордского Университета HIVdb Program, в состав которой входит программа по слежению за надзорными мутациями ЛУ – CPR (Calibrated Population Resistance). Кластеры близкородственных последовательностей (кластеры передачи) оценивали с помощью инструмента MicrobeTrace, сопоставив последовательности ВИЧ гена *pol* с эталонной последовательностью HXB2 (координаты: 2253–3869) и рассчитав парные генетические расстояния по модели Тамура-Ней (d). Использовались генетические сети с разным генетическим расстоянием (диапазон 1,5–2,5%).

Статистические методы. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA v6.0 (StatSoft Inc., USA) и GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., США). Представление количественных данных в настоящем исследовании осуществлялось с использованием следующих описательных статистик: объем выборки (N), среднеарифметическое (среднее) значение и 95%-й доверительный интервал среднего (95% ДИ), медиана и межквартильный интервал (МКИ; в виде 25% и 75% перцентилей), а также стандартная ошибка среднего (стандартная ошибка). Многофакторный логистический регрессионный анализ был выполнен с переменной исхода в качестве подтипов ВИЧ-1: А6, В, CRF63_02А6. Отношение шансов оценивали с 95% доверительными интервалами (ДИ). Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Статистическую значимость различий между

количественными показателями оценивали с использованием критерия χ^2 ; в случае его неустойчивости использовали χ^2 с поправкой Йетса или точный тест Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Участвующие в исследовании пациенты были разделены на две группы. В 1-ую группу были включены пациенты, получавшие АРТ в период с 2005 по 2019 гг. (n=1369). Во 2-ую группу были включены пациенты, никогда не получавшие АРТ на момент получения образца крови в период с 2002 по 2020 гг. (n=1654).

Клинико-эпидемиологическая характеристика популяции. Основные клинико-эпидемиологические характеристики лиц, включенных в исследование, отображают основные тенденции, характерные для эпидемиологического процесса в Российской Федерации в целом. Так, в когорте лиц с опытом приема АРТ, так же как и в когорте пациентов с неуспехом терапии, преобладали мужчины (58,7% и 52,3%, соответственно, $p < 0,01$). Отмечалось разнообразие факторов риска заражения ВИЧ-1, однако основными факторами передачи ВИЧ оставались гетеросексуальный путь и потребление инъекционных наркотиков, причем гетеросексуальный путь преобладал в 1-ой и 2-ой группах пациентов (46,2% и 58,1%, соответственно, $p < 0,01$). Стадии ВИЧ-инфекции тоже отличались разнообразием, начиная от острой стадии и заканчивая стадией СПИДа. В выборке пациентов из 1-ой группы преобладала доля лиц с 4-й стадией ВИЧ-инфекции, она составила 63,8% (874/1369, $p < 0,01$). В выборке пациентов из 2-й группы преобладала доля лиц с 3-й стадией ВИЧ-инфекции, она составила 50,8% (840/1654, $p < 0,01$).

Распределение таких клинико-эпидемиологических показателей, как возраст, число CD4+ Т-клеток, вирусная нагрузка было равномерным ($p > 0,05$). Возраст пациентов варьировал от 6 лет до 91 года. Более возрастной являлась группа ВИЧ-инфицированных лиц с опытом приема АРТ (медиана 43 года, $p < 0,01$). Показатель числа CD4+ Т-клеток пациентов из обеих когорт, для которых данный показатель был известен, находился в интервале от 1 до 2360 клеток/мм³ и был выше в группе ВИЧ-инфицированных лиц, не имевших опыт приема АРТ (медиана 204,5 клеток/мм³ для 1 группы, медиана 384,0 клеток/мм³ для 2 группы; $p < 0,05$). Медиана вирусной нагрузки в обеих группах пациентов, для которых данный показатель был известен, составлял 4,4 log₁₀ копии РНК/см³.

Анализ ЛУ среди пациентов с опытом приема АРТ и вирусологической неэффективностью. При анализе ЛУ среди пациентов с опытом приема АРТ в период с 2005 по 2019 гг. включали только лиц, у которых была зафиксирована вирусологическая неэффективность. За показатель вирусологической неэффективности принимали уровень ВН свыше 3 log₁₀ копий РНК/см³ (свыше 1000 копий РНК/см³) (Рисунок 1). За все время исследования 55,0% (753/1369) пациентов с вирусологической неэффективностью приобрели ЛУ, в то время как у остальных пациентов (616/1369; 45,0%) мутаций резистентности не наблюдалось, и причиной неэффективности АРТ, по-видимому, могла быть низкая приверженность пациентов к лечению. Рассмотрение факторов, которые были связаны с приверженностью пациентов к лечению, не входило в задачи настоящей

работы, поэтому данный факт просто отмечен по ходу обсуждения полученных результатов. При анализе ЛУ среди пациентов, получающих АРТ и имеющих вирусологическую неэффективность на фоне приема терапии за все годы наблюдения, резистентность была часто связана с множественной ЛУ к НИОТ и ННИОТ (31,7%). Данный факт был ожидаем, так как наиболее часто используемая в России схема терапии состояла из 2 НИОТ + ННИОТ. Суммарно от общего числа лиц, получавших АРТ, за все годы исследования мутации ЛУ к препаратам группы НИОТ (единичные) возникали в 11,8% случаев, ЛУ к ННИОТ - в 6,4% случаев, а к ИП - в 1,1% (Рисунок 1).

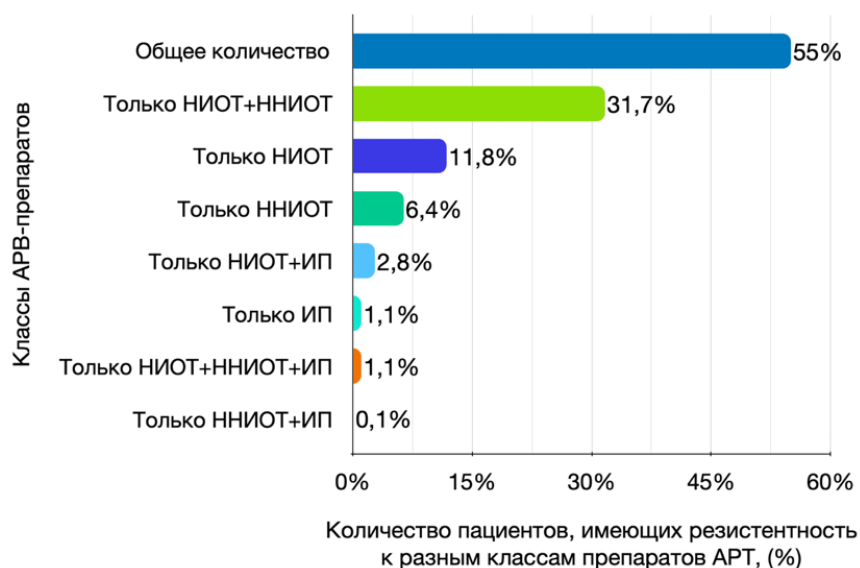


Рисунок 1 – Диаграмма процентного соотношения пациентов с опытом приема АРТ и вирусологической неэффективностью, имеющих мутации ЛУ к разным АРВ-препаратам (2005 – 2019 гг.)

Ретроспективный анализ ЛУ среди пациентов с опытом приема АРТ и вирусологической неэффективностью. Ретроспективный анализ ЛУ за 15 лет (2005 — 2019 гг.) не продемонстрировал роста выявления мутаций резистентности среди пациентов с опытом приема АРТ (Рисунок 2). Наибольшую распространенность устойчивости ко всем препаратам АРТ мы выявили в 2005-2007 гг. (62,5%) и 2014-2016 гг. (60,6%). Наблюдалась тенденция к преобладанию ЛУ к препаратам класса НИОТ+ННИОТ, а также отдельно к препаратам класса НИОТ и ННИОТ, при этом пик для НИОТ+ННИОТ приходился на 2014-2016 гг. (40,6%), а пик для НИОТ и ННИОТ в отдельности приходился на 2005-2007 гг. (37,5% и 12,5%, соответственно). Это может быть связано с тем, что в 2014-2016 гг., в частности в 2016 году, когда мы наблюдали наибольшую распространенность устойчивых вариантов вирусов по сравнению с 2014 и 2015 гг., были зафиксированы перебои в поставках АРВ-препаратов. Пациенты жаловались на замену препаратов без медицинских показаний, что вызывало непереносимость новых выданных АРВ-препаратов взамен отсутствующих, а также зафиксированы жалобы на отказ в выдаче всей схемы АРТ [ITPSru. Анализ закупок АРВ-препаратов в Российской Федерации в 2019 году, 2020]. Все вышеперечисленное могло

сказаться на качестве терапии ВИЧ-инфекции, что поспособствовало появлению ЛУ у пациентов. Стабильно редко наблюдались мутации ЛУ к ИП+ННИОТ, ННИОТ+ИП и НИОТ+ННИОТ+ИП.

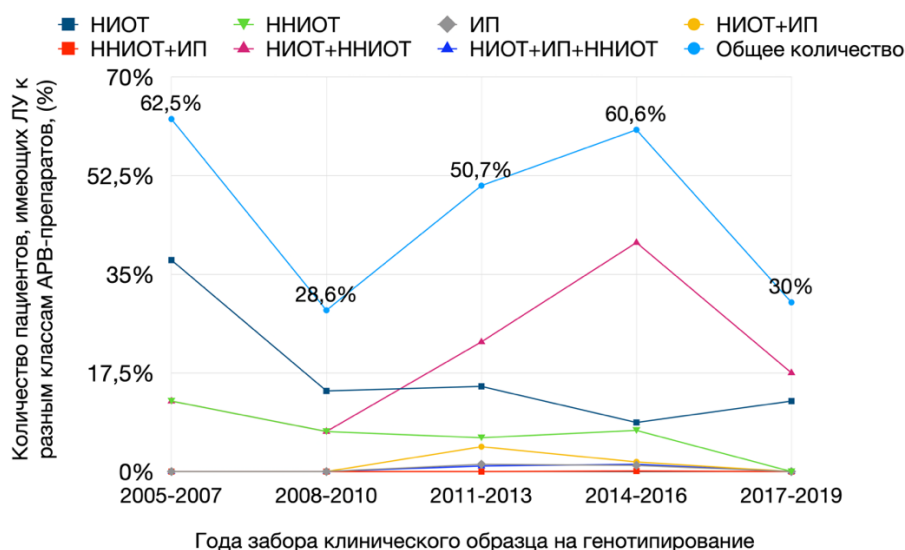


Рисунок 2 - Диаграмма процентного соотношения пациентов, имеющих мутации ЛУ к разным классам препаратов АРТ за весь период исследования в динамике (2005-2019 гг.)

Анализ ЛУ среди пациентов с опытом приема АРТ и вирусологической неэффективностью в ФО РФ. Анализ ЛУ ВИЧ-1 в ФО России показал, что чаще всего мутации ЛУ при неуспехе терапии встречались в Центральном (61,8%) и Сибирском ФО (50%), реже всего - в Северо-западном (18,2%) и Дальневосточном ФО (6,3%) (Рисунок 3).

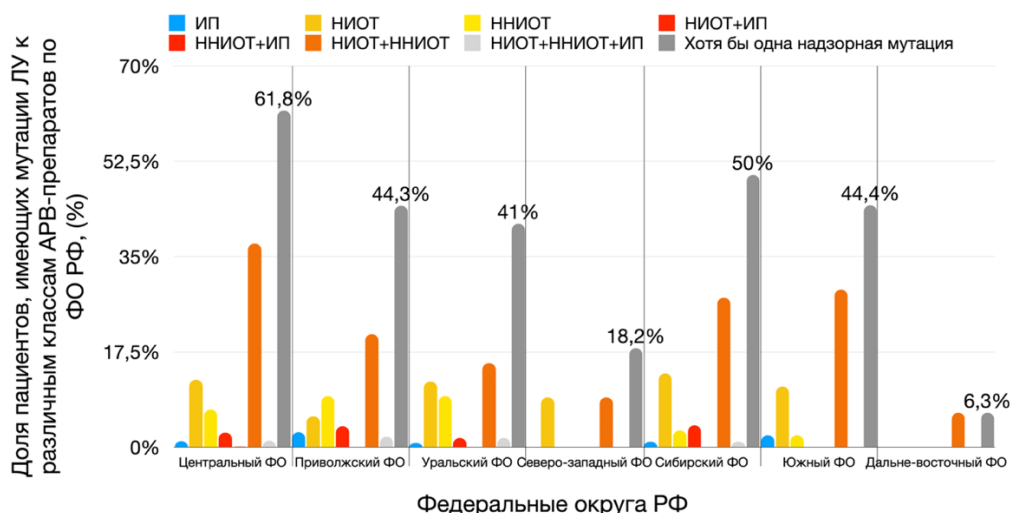


Рисунок 3 – Диаграмма частоты встречаемости мутаций приобретенной ЛУ у пациентов с неуспехом АРТ за весь период исследования по ФО (2005 – 2019 гг.)

Кроме того, основной вклад вносила множественная ЛУ сразу к двум классам препаратов – НИОТ+ННИОТ (37,4% в Центральном ФО, 27,4% в Сибирском ФО), что в

очередной раз доказывает целесообразность оптимизации клинических рекомендаций в указанных округах с применением препаратов с более высоким генетическим барьером, например ингибиторов интегразы второго поколения. В указанных округах регистрировалась наибольшая доля потребителей инъекционных наркотиков среди пациентов (57,4% - в Центральном, 20,1% - в Сибирском). Известно, что для данной категории лиц характерно частое прекращение лечения, в основном связанное с продолжением потребления наркотиков и алкоголя, и, соответственно, низкой приверженностью, что подтверждает высокая вирусная нагрузка в этих группах (Me = 24693 копий РНК/см³) [Zaccarelli M. et.al., 2002]. Высокий процент приобретенной ЛУ в Центральном округе объясняется также более длительным и масштабным применением АРТ по сравнению с другими округами России, а значит, и длительному существованию пациентов с ЛУ, передающих устойчивые вирусы в контакте.

Анализ применяемых препаратов АРТ и устойчивости к ним. Проанализирована частота возникновения ЛУ к индивидуальным препаратам класса ИП, НИОТ и ННИОТ. Мы наблюдали, что чаще всего в схеме АРТ пациенты принимали EFV (57,5%), 3ТС (96,1%), AZT (61,3%) и LPV или LPV/RTV (61,7%), что обусловлено включением данных препаратов в клинические рекомендации Минздрава России по лечению ВИЧ-инфекции, довольно невысокой стоимостью перечисленных препаратов по сравнению с другими и относительной эффективностью при соблюдении определенных правил приема (приверженность). Мы обнаружили, что при приеме некоторых индивидуальных АРВ-препаратов почти в половине случаев неуспеха выявлялась ЛУ, это препараты класса НИОТ - 3ТС (46,5%), ABC (55,2%) и препараты класса ННИОТ - EFV (49,9%, 392/785), NVP (61,1%, 171/280) и RPV (50,0%, 12/6), для которых характерна широкая перекрестная резистентность и острые побочные эффекты. ЛУ к ИП оставалась на низком уровне в силу того, что для приобретения устойчивости к данному классу препаратов требуется формирование порядка 7-8 мутаций резистентности. ЛУ к IDV и NFV возникала чаще, чем к другим ИП (10,5%, 2/19 для IDV и 13,6%, 3/22 для NFV). Эти данные свидетельствуют о целесообразности оптимизации современных клинических рекомендаций в пользу более эффективных препаратов, для которых вероятность возникновения ЛУ остается минимальной, а также препаратов с большей переносимостью для формирования приверженности у пациентов. Среди ингибиторов ИП чаще всего пациентам назначали LPV (61,5%), ЛУ к нему и в целом ко всему классу оставалась на низком уровне весь период наблюдения. Представленные данные согласуются с другим исследованием, проведенным во многих регионах России, где аналогично прослеживалась тенденция к росту устойчивости лишь к НИОТ и ННИОТ [Кириченко А.А. и др., 2017].

Анализ частоты встречаемости основных ЛУ к разным классам препаратов АРТ. Проанализирована частота встречаемости мутаций ЛУ к ИП, НИОТ и ННИОТ в исследованной группе пациентов за весь период исследования (2005 – 2019 гг.). Наиболее часто встречающейся мутацией, вызывающей ЛУ к препаратам группы НИОТ, была замена M184V/I (54,5%), вызывающая высокий уровень устойчивости (in vitro и in vivo) к 3ТС и FTC и низкий уровень устойчивости - к ABC и ddI (Рисунок 4).

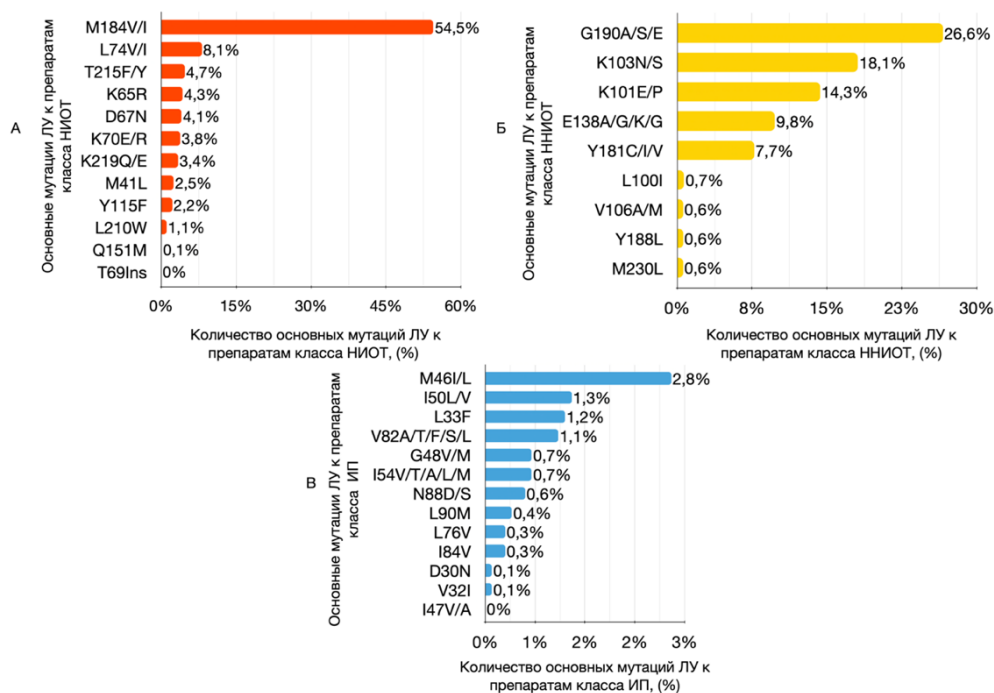


Рисунок 4 – Диаграммы частот встречаемости (%) основных мутаций к: А - НИОТ, Б – ННИОТ, В – ИП

Замена M184V/I обладает уникальным свойством повышать точность работы обратной транскриптазы вируса, тем самым снижая вероятность формирования мутаций к другим препаратам и дополнительно повышая чувствительность к AZT, TDF и d4T [Borroto-Esoda K. et.al., 2007; Wei X. et.al., 2003]. По этой причине наличие M184V/I не является противопоказанием к продолжению лечения ЗТС или FTC, если в схеме присутствуют AZT, TDF и d4T, однако в 15% случаев замена M184V/I встречалась с заменами K65R, T215F/Y, V75M, Q151M, которые вызывают высокий и средний уровень устойчивости к TDF, AZT и d4T. Таким образом, сочетанное наличие данных мутаций может поставить под угрозу эффективность всего спектра препаратов НИОТ.

Наиболее часто встречаемыми мутациями, вызывающими ЛУ к препаратам группы ННИОТ, были мутации G190A/S/E (26,6%). Это непалиморфные мутации, связанные с высокой перекрестной устойчивостью к NVP и EFV. Они обладают высоким уровнем резистентности (более 60 баллов) к NVP и EFV. Согласно данным исследований, проведенных в Европе [Schultze A. et.al., 2015; Miranda M. N. S. et.al., 2022] у пациентов, инфицированных ВИЧ-1 субтипа В, мутация G190A/S/E выявлялась хотя и часто, но не была преобладающей, как в нашем исследовании: для Европы было характерно преобладание мутации K103N/S.

В классе ИП чаще всего возникала мутация M46I/L (2,8%), вызывающая понижение чувствительности вируса преимущественно к NFV, ATV, APV и LPV. Этот результат согласуется с исследованием, проведенным в России [Кириченко А. А. и др., 2021] и отличается от исследований, проведенных в Европе [Schultze A. et.al., 2015; Miranda M. N. S. et.al., 2022], где преобладающей мутацией к ИП была L90M, вызывающая устойчивость ко всем ИП, кроме DRV и TPV.

Анализ ЛУ среди пациентов без опыта приема терапии. В анализ ЛУ среди пациентов без опыта приема АРТ включали пациентов, которые на момент исследования не получали терапию АРВ-препаратами. Данными о предшествующем опыте АРТ мы не располагали. В период от 2002 по 2020 гг. всего было включено 1654 пациента. Для оценки распространенности ЛУ к разным классам препаратов АРТ были проанализированы надзорные мутации ЛУ (SDRM) в соответствии со списком ВОЗ [Bennet D. E. et.al., 2009].

В целом, как и в случае с приобретенной ЛУ, мутации к ИП среди наивных пациентов встречались довольно редко. Мутации ЛУ к НИОТ и ННИОТ, наоборот, встречались чаще в силу того, что они часто выявлялись у пациентов на фоне приема терапии, которые могли передать вирусы с мутациями своим партнерам. Хотя бы одна мутация ЛУ к АРВ-препаратам была обнаружена у 130 пациентов (7,9%). Мутации к НИОТ в единичном варианте встретились у 1,5% пациентов (25/1654), мутации к ННИОТ встретились у 2,6% пациентов (43/1654), к ИП - у 1,1% (18/1654). При анализе схем терапии было обнаружено, что чаще всего в исследованной когорте пациентов выявлялись мутации к схемам, состоящим из НИОТ + ННИОТ (2,1%, 34/1654). К схемам, состоящим из НИОТ + ИП ЛУ устойчивость выявлялась у 0,5% (9/1369) пациентов с ВИЧ, в то же время к схемам ННИОТ + ИП ЛУ обнаруживалась у 0,1% (1/1654). Наконец, мутации ЛУ к схемам терапии, в которую входили все классы препаратов НИОТ+ННИОТ+ИП не были выявлены.

Ретроспективный анализ ЛУ среди пациентов без опыта приема АРТ. Эта часть работы дала ответ на вопрос, как менялось соотношение пациентов, имеющих мутации к индивидуальным классам препаратов АРТ, с течением времени. Для этого все пациенты, не имеющие опыт приема АРТ, были разделены на группы по годам забора клинического образца на генотипирование: 2002-2007, 2008-2012, 2013-2015, 2016-2018, 2019-2020. Группы были разделены таким образом для того, чтобы в каждом конкретном периоде времени (группе) количество пациентов было равномерным. Для учета брали надзорные мутации, входящие в список ВОЗ. Анализ динамики показал, что за весь период исследования с 2002 года по 2020 год ЛУ не была стабильной и менялась в зависимости от года исследования и класса препаратов. Максимальной частота встречаемости ЛУ ко всем препаратам АРТ была в 2002-2007 гг. (11,8%) и в 2013-2015 гг. (14,4%), при этом особую роль играл город Красноярск, в котором было выявлено значительное количество пациентов с ЛУ перед лечением, а генотипирование таким пациентам проводили как раз в 2013-2015 гг. Согласно полученным результатам, в 2002-2007, когда в России активно стала применяться АРТ, наблюдались пики резистентности к ННИОТ (7,1%) и НИОТ+ИП (7,1%). В 2008-2012 гг. наиболее часто встречалась резистентность к НИОТ (1,6%), ННИОТ (1,2%) и НИОТ+ННИОТ (1,2%). В 2013-2015 гг. максимальной частота встречаемости ЛУ была для классов препаратов НИОТ+ННИОТ (4,8%), ННИОТ (3,4%) и НИОТ (2,8%). В 2016-2018 гг. и в 2019-2020 гг. наиболее распространенной была устойчивость только к ННИОТ (3,4% и 2,6% соответственно) (Рисунок 5).

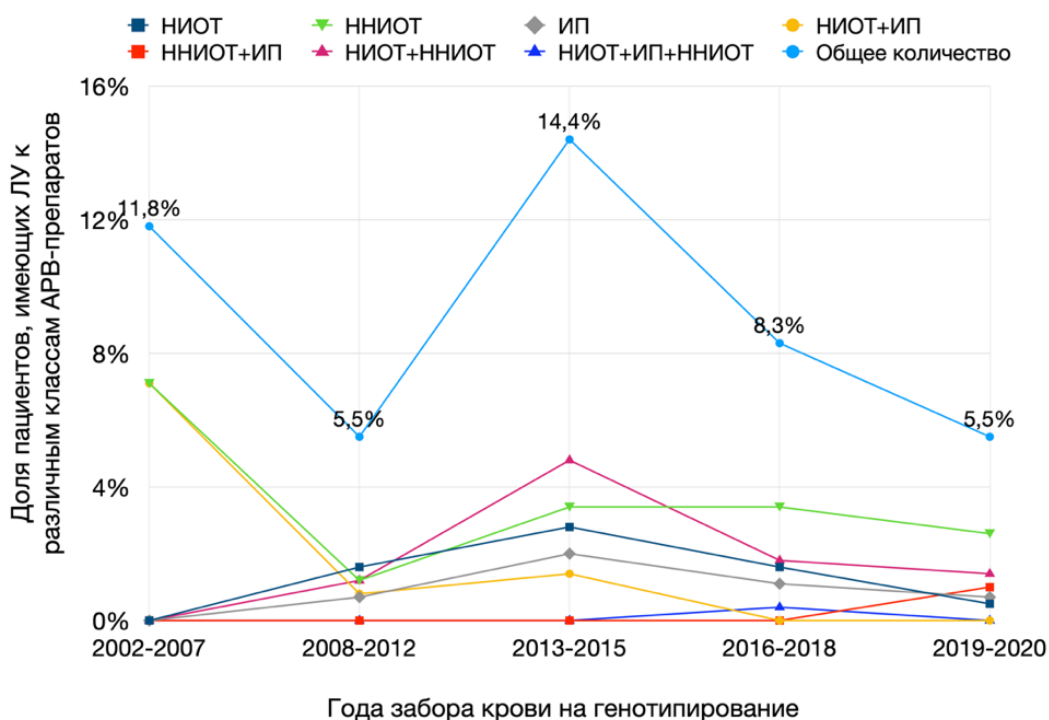


Рисунок 5 – Диаграмма процентного соотношения пациентов, имеющих мутации ЛУ к разным классам препаратов АРТ в динамике (2002-2020 г.)

Анализ ЛУ среди пациентов с опытом приема АРТ и вирусологической неэффективностью в ФО РФ. Лидерами по уровню пораженности устойчивыми вариантами вирусов среди округов России оказались Сибирский и Уральский ФО (17,7% и 17,3%, соответственно), в частности, в Сибирском ФО высокий уровень приобретенной ЛУ был обнаружен в Красноярске, а в Уральском ФО – в Сургуте (Рисунок 6).

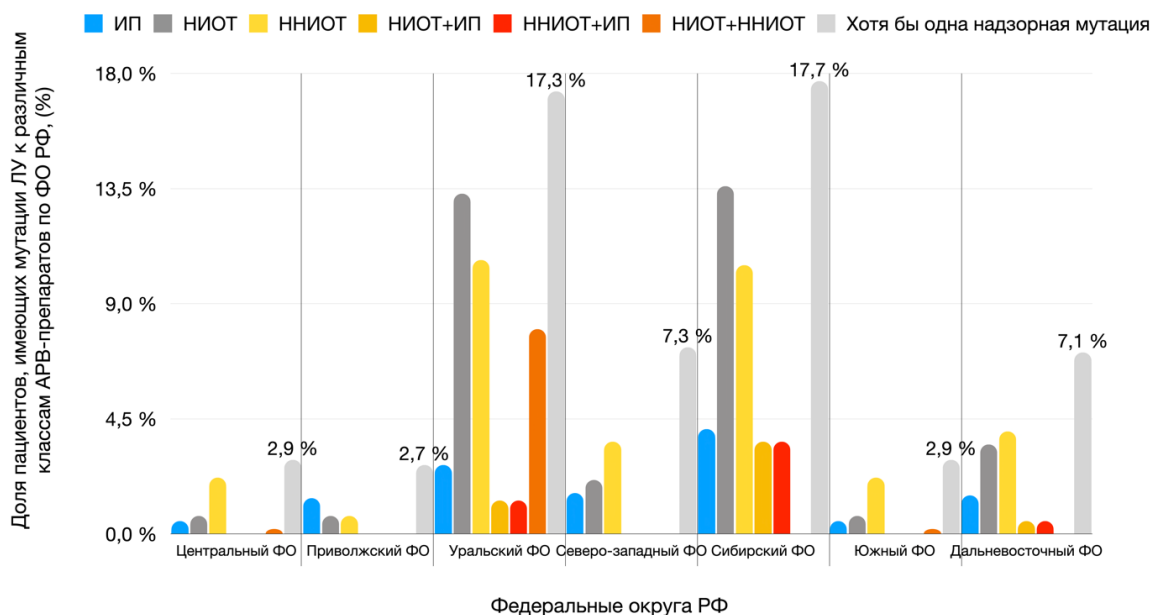


Рисунок 6 – Диаграмма частоты встречаемости мутаций первичной ЛУ у пациентов без опыта приема АРТ за весь период исследования по ФО (2002-2020 гг.)

Максимальной была частота ЛУ к препаратам НИОТ: в Уральском ФО она составила 13,3%, а в Сибирском ФО - 13,6%, в то время как в остальных округах, а именно в Центральном, Приволжском, Южном, Северо-Западном и Дальневосточном этот показатель варьировал от 0,7% до 3,5%, то есть был значительно ниже. По распространенности ЛУ к ННИОТ, как и к НИОТ, наиболее пораженными округами также оказались Уральский и Сибирский, где было выявлено 10,7% и 10,5% вирусов с ЛУ, соответственно. Остальные регионы имели низкую распространенность мутаций резистентности к ННИОТ (0,7-4,0%). Резистентность к сочетаниям ННИОТ+ИП во всех федеральных округах была низкой и колебалась в пределах от 0,0% до 1,3%. Мутаций к ИП+НИОТ+ННИОТ не было найдено ни в одном из округов.

В единственном исследовании, посвященном распространенности первичной ЛУ, в котором была проанализирована и описана большая часть ФО России и в котором имелась внушительная выборка пациентов (1560 чел.), результаты анализа показали высокую распространенность лекарственно-устойчивых вариантов вируса в Центральном ФО ввиду более масштабного и длительного применения АРТ в указанном регионе, а также умеренную распространенность (<5%) в Сибирском и Уральском ФО с датой постановки диагноза 1998-2017 [Кириченко А. А. и др., 2019]. Эти данные говорят о том, что эпидемия ВИЧ-инфекции развивается, и распространенность ЛУ в зависимости от выборки пациентов может различаться, поэтому для более репрезентативных результатов необходимо использовать больший охват пациентов, для которых будет проведено генотипирование. Более того, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, присутствие более 10% ЛУ вариантов ВИЧ-1 в регионе требует проведения обязательного генотипирования у всех пациентов перед началом лечения, чтобы прогнозировать эффективность первой схемы АРТ.

Анализ ЛУ к индивидуальным АРВ-препаратам. ЛУ вируса к различным ИП, НИОТ и ННИОТ оценивали в выборке пациентов, не принимавших АРТ на момент исследования (N = 1654).

Вероятность ЛУ к АРВ-препаратам у «наивных» пациентов оставалась невысокой (0,2% до 4,7% в зависимости от препарата) и была связана с теми же препаратами, что и в случае неуспеха терапии. Как в случае с пациентами, имеющих опыт приема АРВ-препаратов, так и у большего числа «наивных» пациентов ЛУ к ИП обнаруживалась гораздо реже, чем к НИОТ и ННИОТ. ЛУ к SQV и NFV обнаруживалась чаще, чем к другим ИП: 0,5% для SQV и 1,0% для NFV. Немного иначе выглядел профиль ЛУ к НИОТ и ННИОТ. В частности, ЛУ к НИОТ чаще всего выявлялась к ABC (55/1654; 3,3%), 3ТС (54/1654; 3,3%) и FTC (54/1654; 3,3%). Среди ННИОТ ЛУ выявлялась чаще всего к EFV и NVP (78/1654; 4,7% для обоих препаратов).

Анализ частоты встречаемости надзорных мутаций ЛУ к разным классам препаратов АРТ. Проанализирована частота встречаемости надзорных мутаций ЛУ к ИП, НИОТ, ННИОТ. По сравнению с приобретенной ЛУ, у пациентов с первичной ЛУ за вклад в развитие ЛУ к ННИОТ была ответственна замена K103N/S (2,5%), а не G190A/S/E (1,8%) (Рисунок 7).

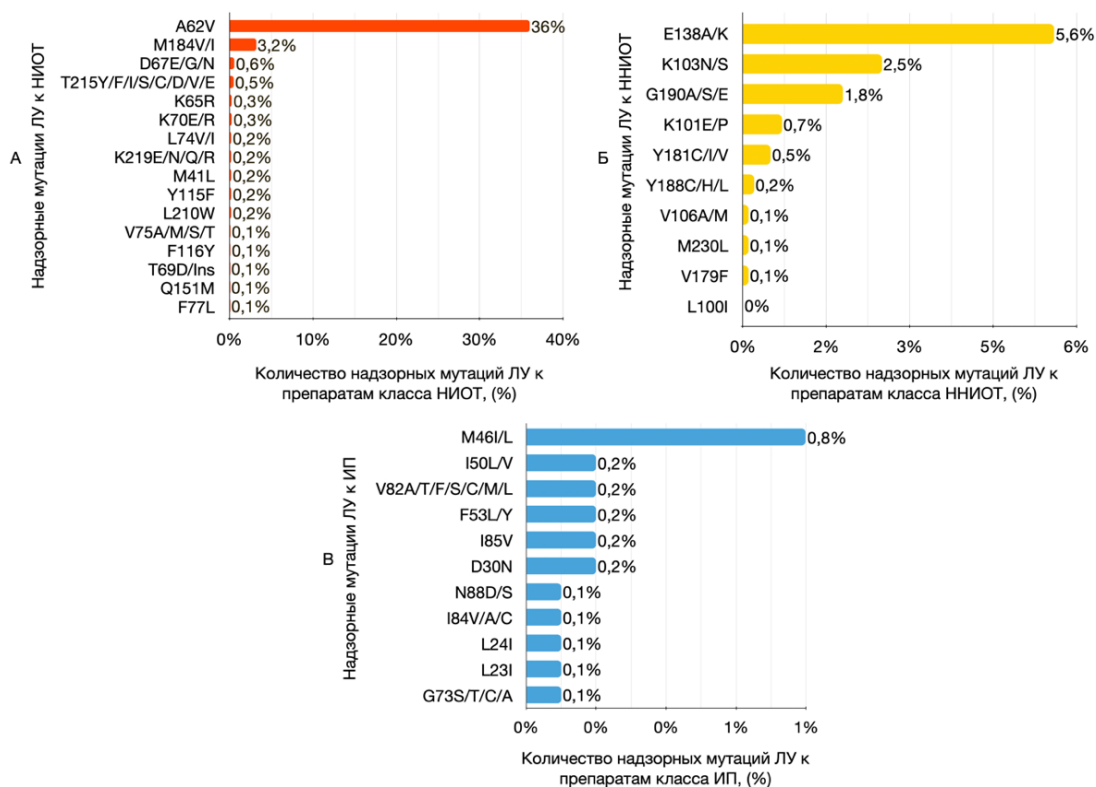


Рисунок 7 – Диаграммы частот встречаемости (%) надзорных мутаций к: А - НИОТ, Б - ННИОТ, В – ИП

Эти данные согласовались с исследованиями, проведенными как в России, так и в Европе, где тоже преобладающей мутацией среди пациентов без опыта приема терапии была K103N/S [Кириченко А. А. и др., 2019; Miranda M. N. S. et.al., 2022]. Как и в случае с приобретенной ЛУ, у «наивных» пациентов более распространенной мутацией к НИОТ была M184V/I (3,2%). Интересно, что в приведенном выше исследовании в когорте пациентов из Европы мутация к НИОТ M41L выявлялась чаще всего и составляла 3,2%, тогда как в нашем исследовании данная мутация не встретилась ни разу. Ранее было сообщено, что мутация M41L в большей степени распространена у вариантов вируса В субтипа [Montes V. et.al., 2004]. Авторы предположили, что различия в аминокислотных последовательностях ОТ между субтипами ВИЧ-1, возникающие в результате природного полиморфизма, могут оказывать негативное влияние на развитие мутационных паттернов M41L. Мутации к ИП выявлялись гораздо реже в силу высокого генетического барьера данного класса препаратов, и чаще всего это была замена M46I/L (0,8%).

Анализ генетических сетей передачи. На основании данных о нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1 были анализированы генетические сети передачи для преобладающих в данном исследовании субтипов ВИЧ-1 (А6, В, CRF63_02А6) с различными генетическими порогами (диапазон 1,5-2,5%). Обнаружение надзорных мутаций ЛУ свидетельствовало о наличии прогностической лекарственной устойчивости. Обнаружено, что генетический порог 2,0% позволял получить большее количество кластеров молекулярной сети передачи для суб-субтипа А6, для субтипа В этот показатель был 2,5%, а для субтипа CRF63_02А6 - 1,5% (Рисунок 8).

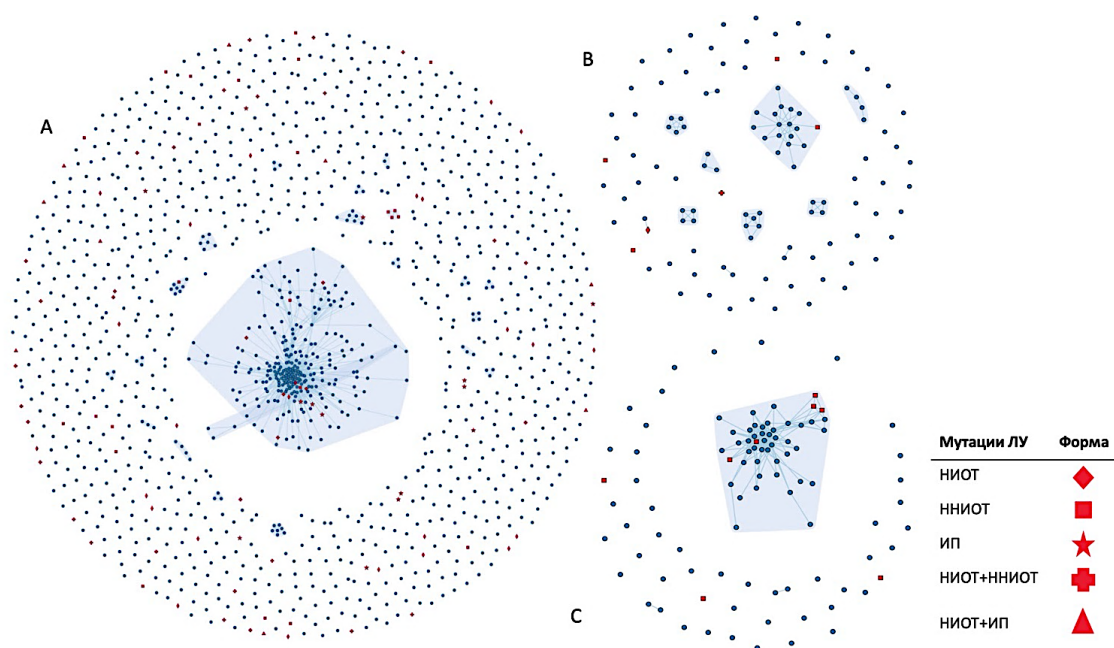


Рисунок 8 - Сети молекулярной передачи, связанные с ЛУ ВИЧ-1 перед лечением. Красные узлы представляют пациентов с ЛУ, а синие узлы представляют собой пациентов без ЛУ. А соответствует суб-субтипу А6, В – субтипу В, С – рекомбинанту CRF63_02А6

При применении наиболее подходящего порогового генетического расстояния 2,0% для суб-субтипа А6 всего было использовано 1329 последовательностей гена *pol*, которые образовывали 72 кластера (от 2 до 264 человек) молекулярной сети передачи. Данные кластеры были представлены в основном вирусами с множественной ЛУ к НИОТ+ННИОТ (34/106; 32%) за счет мутаций М184V и G190S. Следует отметить, что доля лиц с мутациями ЛУ, принадлежащих к кластерам, была ниже, чем у лиц без первичной ЛУ ($p < 0,001$).

В кластере субтипа В было зарегистрировано 6 (6/117; 5,1%) пациентов с ЛУ ВИЧ-1 перед лечением, распределенных только в 2 кластерах; в первом кластере, состоящем из 18 человек, вариант вируса был устойчив к ННИОТ с мутацией K103N. Во втором кластере-диаде был пациент с устойчивостью также к ННИОТ.

Для кластера рекомбинанта CRF63_02А6 8 случаев ЛУ ВИЧ-1 с мутацией K103N были обнаружены только в одном кластере, где все пациенты проживают в одном округе (Барнаул и Красноярск).

Эти факты указывают на то, что лекарственно-устойчивые вирусы уже распространяются горизонтально в популяции людей. Заметим, что в нашем исследовании ВИЧ-позитивные лица не были недавно инфицированы, однако не принимали терапию. Вполне вероятно, что лекарственно-устойчивые штаммы успели «исчезнуть» из популяции вирусов, будучи замещены чувствительными, и не могли быть обнаружены [Petrella M. et.al., 2002; Turner D. et.al., 2003], поэтому связь между общими показателями кластеризации и ЛУ перед лечением была ослаблена, и в действительности показатель передачи устойчивых вирусов может быть еще выше.

Анализ индикаторов раннего предупреждения. Еще одну большую часть настоящей работы составил анализ ИП распространения ЛУ. В их числе находится

оценка некоторых показателей, таких как соблюдение пациентами всех рекомендаций врача, правильность работы Центров СПИД, а также эффективность АРТ, что вкуче позволяет понять вероятность распространения резистентных вариантов вирусов, а также, что немаловажно, позволяет сформулировать и определить выводы, касающиеся профилактики резистентности ВИЧ. В соответствии с рекомендациями ВОЗ [ВОЗ. Глобальный отчет о показателях раннего предупреждения лекарственной устойчивости ВИЧ, 2022] анализу подлежат 8 индикаторов (Рисунок 9), из которых 4 (2, 3, 4, 6 пункты Рисунок 9) дают возможность ориентировочно оценить уровень приверженности пациентов, 3 других (1, 5, 8 пункты Рисунок 9) дают возможность оценить правильность лечения и его назначения, и 7 пункт дает возможность оценить вероятность распространения резистентных вариантов ВИЧ-1. Исследование индикаторов раннего предупреждения (ИРП) проводилось с участием 62 субъектов Российской Федерации, входящих в 8 Федеральных округов. В 82 Центров СПИД были разосланы письма, включающие анкету, содержащую информацию об ИРП, а также объяснение, содержащее информацию о смысле и важности проводимой работы. Согласились участвовать в данном исследовании только 11 Центров СПИД. После того, как были получены от 11 Центров СПИД заполненные анкеты, был проведен собственно анализ ИРП, результаты которого представлены далее (Рисунок 9)



Рисунок 9 - Анализ 8 ИРП предупреждения для 11 Центров СПИД. Красный цвет соответствует «красной карточке», желтый цвет – «желтой карточке», зеленый цвет – «зеленой карточке». Цифрами 1,2,3,4,5,6,7,8 указаны пункты, соответствующие каждому показателю ИРП

Наше исследование показало, что предположительный риск распространения лекарственно-устойчивых штаммов вируса, который можно оценить по показателю ВН

более 1000 копий РНК/мл, составлял 14,9%, так как при таком уровне нагрузки можно говорить о неэффективности терапии и/или приверженности пациента к лечению и о том, что пациент может передавать заведомо устойчивый вирус другому человеку. Было показано, что самая большая проблема была связана с тем, что не все пациенты при постановке на диспансерный учет в итоге получали рекомендуемое лечение в течение 12 месяцев наблюдения, при этом 45,5% Центров СПИД полностью не достигли целевого показателя. Также основной проблемой, с которой сталкивались Центры СПИД, было недостаточная эффективность терапии, которая не проявлялась снижением вирусной нагрузки, здесь 27,3% Центров СПИД не достигли целевого значения. Похожие результаты были отображены в исследовании [Лебедева Н. Н. и др., 2018], где 9 Центров СПИД также сообщили о проблемах получения пациентами терапии и снижения ВН в крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования проведен масштабный и систематизированный анализ мутаций ЛУ и профиль резистентности у различных вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории РФ, на большой коллекции генотипов ВИЧ-1 из разных регионов России, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов в течение 18 лет эпидемии.

На основании проведенного исследования получены новые данные, касающиеся ЛУ ВИЧ-1 на территории России, дополнившие существующие представления о причинах и характере резистентности, которые смогут оказать влияние на разработку новых стандартов назначения тестов на определение ЛУ ВИЧ, корректировку клинических рекомендаций по лечению ВИЧ-инфекции и сделать существенный вклад в развитие персонализированной медицины в области лечения ВИЧ-инфекции в РФ.

ВЫВОДЫ

1. Среди анализированных генотипов ВИЧ-1 у пациентов, испытавших неуспех лечения, преобладают устойчивые и множественно-устойчивые варианты вируса к препаратам классов НИОТ (11,8%), ННИОТ (6,4%) и НИОТ+ННИОТ (31,7%), характеризующиеся наличием мутаций M184V/I (54,5%) и G109A/S (27,2%), вызывающих устойчивость к ЗТС, FTC, EFV и NVP, что, вероятно, связано с широким применением схем препаратов классов НИОТ+ННИОТ, имеющих низкий генетический барьер. Лекарственная устойчивость к препаратам класса ИП оставалась на низком уровне и составляла 1,1%.

2. Среди генотипов ВИЧ-1 у пациентов без опыта приема антиретровирусной терапии выявлены варианты вируса, устойчивые к препаратам классов НИОТ (1,5%), ННИОТ (2,6%) и НИОТ+ННИОТ (2,1%), что обусловлено наличием таких мутаций, как M184V/I (3,2%) и K103N (2,5%). Лекарственная устойчивость к препаратам класса ИП оставалась на низком уровне и составляла 1,1%.

3. Наиболее пораженными федеральными округами по распространенности лекарственно-устойчивых вариантов вируса в случаях неуспеха антиретровирусной терапии являются Центральный и Сибирский (61,8% и 50,0% соответственно).

4. В Уральском и Сибирском округах уровень лекарственной устойчивости перед лечением составил 17,3% и 17,7%, что требует проведения анализа генотипа ВИЧ-1 перед назначением первой линии терапии у всех пациентов в данных округах.

5. Преобладание множественной лекарственной устойчивости в структуре устойчивости у пациентов с опытом приема терапии и вирусологической неэффективностью ВИЧ-1 сохраняется в динамике всего периода наблюдения. Эти данные требуют пересмотра спектра применяемых схем терапии на общенациональном уровне в пользу препаратов с высоким генетическим барьером.

6. Кластерный анализ генетических сетей передачи для доминирующих вариантов ВИЧ-1: суб-субтипа А6, В и CRF63_02А6 обнаружил, что вирусы с мутациями к ННИОТ и НИОТ+ННИОТ, такими как М184V, К103N, G190S способны передаваться горизонтально в популяции.

7. Анализ индикаторов раннего предупреждения лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в 11-ти регионах Российской Федерации продемонстрировал, что основной причиной ее формирования являются проблемы, связанные с недостаточной приверженностью пациентов, проявляющейся несвоевременным приемом препаратов, получением лекарств и несистематическим обследованием.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Обобщение полученных результатов позволяет обосновать следующие практические рекомендации:

1. В связи с зарегистрированной распространенностью первичной резистентности более 10% рекомендуется обязательно проводить генотипирование ВИЧ-1 у пациентов, которые начинают первую линию терапии, в Уральском и Сибирском Федеральных округах.

2. Рекомендуется оптимизировать национальные клинические рекомендации по лечению ВИЧ-инфекции в пользу препаратов с более высоким генетическим барьером резистентности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лага В.Ю. Молекулярно-генетический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Республике Крым. / В.Ю. Лага, А.В. Немыкин, Е.Н. Бегма, А.М. Страхова, Н.А. Васильева, **Е.Н. Ожмегова**, А.А. Антонова, М.Р. Бобкова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2019. – Т. 11, № 4. – С. 91–97. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-91-97>.

2. Казеннова Е.В. Генетический анализ ВИЧ-1 в Алтайском крае: дальнейшее распространение варианта CRF63_02A1 по территории Западной Сибири. / Е.В.

Казеннова, А.А. Антонова, **Е.Н. Ожмегова**, Э.Р. Демьяненко, М.В. Минакова, О.В. Белоусова, К.Б. Громов, М.Р. Бобкова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 47–57. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-1-47-57>.

3. **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, Т.Н. Мельникова, Т.В. Крылова, А.В. Казачек, Н.А. Ширяева, И.Л. Кириллова, Е.В. Казеннова, М.Р. Бобкова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12, № 2. – С. 79–88. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-2-79-88>.

4. **Ожмегова Е.Н.** Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции. / Е.Н. Ожмегова, М.Р. Бобкова // Вопросы вирусологии. – 2022. Т. 67, № 3. – С. 193-205. <https://elpub.ru/elpub-article/virusjour/617>

5. van de Klundert MAA. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Eastern Europe and Russia. / MAA van de Klundert, A. Antonova, G. Di Teodoro, R. Ceña Diez, N. Chkhartishvili, E. Heger, A. Kuznetsova, A. Lebedev, A. Narayanan, **E. Ozhmegova**, A. Pronin, A. Shemshura, A. Tumanov, N. Pfeifer, R. Kaiser, F. Saladini, M. Zazzi, F. Incardona, M. Bobkova, A. Sönnnerborg // Viruses. – 2022. – V. 14, № 10. – 2099. doi: 10.3390/v14102099. PMID: 36298654; PMCID: PMC9609922.

6. **Ожмегова Е.Н.** Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 на территории Российской Федерации в период с 2005 по 2020 год. / Е.Н. Ожмегова, М.Р. Бобкова // Материалы IX Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием. – Краснодар: Новация, 2022. – С. 144-147.

7. Giannini A. Susceptibility to HIV-1 integrase inhibitors in HIV-1 sub-subtype A6 isolates. / F. Giammarino, A. Antonova, **E. Ozhmegova**, R. Kaiser, F. Dragoni, A. Voccuto, I. Vicenti, A. Sönnnerborg, M. Bobkova, M. Zazzi, F. Saladini // Reviews in Antiviral Therapy & Infectious Diseases. – 2020. – V. 7. – P. 15. (18th European Meeting on HIV & Hepatitis, October 28–30, 2020; Abstract 13)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АРВ-препараты антиретровирусные препараты

АРТ антиретровирусная терапия

ВИЧ вирус иммунодефицита человека

ВН вирусная нагрузка

ВОЗ всемирная организация здравоохранения

ИРП индикаторы раннего предупреждения

ИИ ингибиторы интегразы

ИП ингибиторы протеазы

ЛУ лекарственная устойчивость

МСМ мужчины, практикующие секс с мужчинами

ЛУ лекарственная устойчивость

НИОТ нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ННИОТ нунуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

СПИД синдром приобретенного иммунодефицита