

## ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ: ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ РАССЛЕДОВАНИИ

А. Лопатухин<sup>1</sup>, Н. Ладная<sup>1</sup>, Л. Кириллова<sup>2</sup>,  
Д. Киреев<sup>1</sup>, кандидат биологических наук,  
Л. Никитина<sup>2</sup>, О. Щепинова<sup>2</sup>, Т. Коннова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

<sup>2</sup>Липецкий областной центр по профилактике

и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями

E-mail: federalcentre@hivrussia.net

*При эпидемиологическом расследовании случая ВИЧ-инфекции у ребенка в Липецкой области были применены методы генотипирования ВИЧ и филогенетического анализа. С высокой долей вероятности риск заражения ребенка ВИЧ при оказании медицинской помощи был исключен; сделано заключение о заражении ребенка от ВИЧ-инфицированной матери. Целесообразно использовать возможности филогенетического анализа при расследовании случаев заражения ВИЧ, вероятно, связанных с оказанием медицинской помощи.*

**Ключевые слова:** эпидемиологическое расследование, ВИЧ, генотипирование, филогенетический анализ.

В России продолжается быстрое развитие эпидемии ВИЧ-инфекции. С 1987 г. по 31.12.13 число инфицированных ВИЧ составило 800 531, из них число умерших — 153 221. Заболеваемость ВИЧ-инфекцией ежегодно растет. В 2013 г. сообщалось о 79 728 новых случаях ВИЧ-инфекции (55,6 на 100 тыс. населения), что на 12,7% больше, чем в предыдущем году.

В 2013 г. в России доминировала передача ВИЧ-инфекции при употреблении наркотиков с применением нестерильного инструментария (у 54,9% лиц с известными причинами заражения) и при гетеросексуальных контактах (43,1%). Незначительную долю вновь инфицированных (около 1%) составляли инфицированные при гомосексуальных контактах и дети, зараженные от матерей во время беременности, родов и при грудном вскармливании. К сожалению, в последние годы продолжали регистрироваться случаи заражения ВИЧ, связанные с оказанием медицинской помощи. Всего в 2013 г. зарегистрировано 6 случаев заражения во внутрибольничных очагах при использовании нестерильного инструментария, в том числе 1 случай у взрослых и 5 — у детей. Кроме того, в 2013 г. выявлен 1 реципиент, получивший гемотрансфузию от инфицированного ВИЧ донора, находившегося в периоде «серонегативного окна» на момент сдачи донорского материала.

По каждому выявленному случаю ВИЧ-инфекции в России с целью определения источника, путей, факторов передачи инфекции, установления круга контактных лиц и

реализации комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий проводится эпидемиологическое расследование. Эпидемиологическое расследование может быть существенно затруднено особенностями передачи ВИЧ-инфекции, интимным характером информации, необходимой для расследования в очаге, и значительным количеством источников инфекции. Одно из важных направлений эпидемиологического расследования при ВИЧ-инфекции — выявление и локализация возможных очагов внутрибольничного распространения ВИЧ.

Филогенетический анализ может применяться с целью обеспечения дополнительной доказательной базы при определении эпидемиологической связи между лицами из одной цепи передачи ВИЧ-инфекции. Другая задача филогенетического анализа — сужение круга предполагаемых источников инфекции при недостатке эпидемиологических данных и выявление наиболее вероятного источника заражения при наличии нескольких возможных вариантов.

Филогенетический анализ в первую очередь используют, чтобы доказать отсутствие связи между образцами, т.е. он характеризуется очень высокой ценностью отрицательного результата при ограниченной ценности положительного. Ограничение ценности положительного результата связано с тем, что филогенетический анализ сам по себе не может доказать, что передача ВИЧ произошла от одного человека другому, поскольку зачастую мы можем видеть лишь часть обширной сети передачи ВИЧ. Но в некоторых случаях и при положительном результате могут быть получены достаточно надежные данные.

Центральный научно-исследовательский институт (ЦНИИ) эпидемиологии Роспотребнадзора в последние годы неоднократно оказывал помощь территориальным центрам по профилактике и борьбе со СПИДом в проведении эпидемиологического расследования с использованием метода генотипирования ВИЧ и филогенетического анализа. Пример такого подхода представлен в данной статье.

Эпидемиологическое расследование проводилось в связи с выявлением ВИЧ-инфекции у ребенка, проживающего в Липецкой области. В данном случае из-за невозможности получения надежного заключения классическими методами стандартная методика проведения эпидемиологического расследования была дополнена методом генотипирования ВИЧ и филогенетическим анализом.

При проведении эпидемиологического расследования случая ВИЧ-инфекции у ребенка 6 лет специалисты Липецкого областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями изучали основные пути и факторы риска инфицирования ВИЧ ребенка, обследовали на ВИЧ контактные лица в лечебных учреждениях и семейном очаге, определяли границы очага ВИЧ-инфекции. Все полученные данные были отражены в карте эпидемиологического расследования. По результатам расследования проводились противоэпидемические и профилактические мероприятия с целью устранения факторов риска и разрыва путей передачи инфекции.

Для проведения филогенетического анализа при расследовании данного случая ВИЧ-инфекции производился анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ, полученных от 2 инфицированных ВИЧ лиц, входящих в исследуемую группу, и 6 лиц из группы сравнения. В исследуемую группу были включены ребенок и лицо, потенциально являющееся для него источником инфекции. В группу срав-

нения, согласно рекомендациям, включали больных со схожими эпидемиологическими характеристиками (те же географический регион, социальная группа, группы риска заражения и инфицированных ВИЧ в близкие сроки) [1–3].

При получении нуклеотидных последовательностей использовали набор реагентов АмплиСенс® HIV-Resist-Seq [4]. Субстратом для получения нуклеотидных последовательностей для филогенетического анализа служила провирусная ДНК. Для анализа провирусной ДНК использовали в качестве клинического материала лейкоцитарные кольца периферической крови. Исследование провирусной ДНК позволило использовать данную методику, в том числе для образцов с низкой вирусной нагрузкой, а именно таким был один из образцов в исследуемой группе.

Нуклеотидные последовательности получали методом популяционного секвенирования с использованием автоматического капиллярного ДНК-секвенатора 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Молекулярно-генетический анализ был проведен по 3 генам — *gag*, *int*, *gp120* — и заключался в определении субтипа, расчете генетических дистанций и построении филогенетических деревьев для исследуемых образцов. Длина исследуемых фрагментов составила от 352 до 933 нуклеотидов. Расчет генетических дистанций и филогенетический анализ провели с помощью программного обеспечения Mega 5.05. Для анализа полученных хроматограмм и формирования консенсусной последовательности использовали программное обеспечение ДЕОНА. Полученные последовательности объединялись в 1 файл и выравнивались с использованием программного обеспечения BioEdit. Субтип образцов определяли с помощью ресурса COntext-based Modeling for Expeditious Typing, v. 0.2. Филогенетический анализ полученных последовательностей проводили, применяя программное обеспечение Mega. Филогенетические деревья строили методом Maximum Likelihood с проведением бутстреп-анализа [5].

При анализе структуры филогенетического дерева парно оценивали отношения между образцами исследуемой группы и группы сравнения. Если образец из исследуемой группы не кластеризовался с другими образцами исследуемой группы, делали вывод, что данный образец и остальные образцы исследуемой группы не связаны друг с другом. Если образец из исследуемой группы кластеризовался с другими образцами исследуемой группы (генетическая дистанция между исследуемым образцом и образцами группы сравнения больше, чем между образцами исследуемой группы), можно было заключить, что результаты филогенетического анализа указывают на возможную эпидемиологическую связь между образцами исследуемой группы [1, 3].

**Ребенок А.** родился в 2006 г. в Липецкой области от матери, инфицированной ВИЧ. Мать ребенка была инфицирована ВИЧ при гетеросексуальных контактах в Москве в 2003–2004 гг., антиретровирусную терапию получает с 2009 г. по настоящее время. Отец ребенка не был инфицирован ВИЧ, при этом регулярно 2 раза в год проходил обследование на ВИЧ. Мать и новорожденный своевременно получили трехэтапную химиопрофилактику вертикальной передачи ВИЧ-инфекции (мать — с 14 нед беременности, во время родов; ребенок получал химиопрофилактику с рождения в течение 6 нед). Роды были проведены оперативным путем. Ребенок находился на искусственном

вскармливании, регулярно проходил в 2006–2007 гг. рекомендованные обследования в рамках диспансерного наблюдения по перинатальному контакту в Липецком областном центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. На основании результатов лабораторной диагностики (отрицательные результаты иммуноферментного анализа — ИФА, иммунного блоттинга — ИБ — у ребенка в возрасте 1 год 3 мес, отрицательные результаты во всех случаях проведения диагностики в полимеразной цепной реакции — ПЦР — на ДНК ВИЧ: при рождении, в возрасте 2 мес, 5 мес, 1 год 1 мес) и клинического осмотра ребенок был снят с диспансерного наблюдения по перинатальному контакту в связи с отсутствием ВИЧ-инфекции в 2007 г. в возрасте 1 год 3 мес. После снятия с учета ребенок не обследовался на ВИЧ до 2012 г.

В 2012 г. (в возрасте 6 лет) по клиническим показаниям в связи с впервые диагностированной в детской районной поликлинике лимфаденопатией ребенок был обследован на ВИЧ. Обследование на ВИЧ дало положительные результаты в ИФА, ИБ, ПЦР РНК ВИЧ. Количество CD4 составило 341 кл/мкл, вирусная нагрузка — 1 600 000 копий/мл. После осмотра врачом-инфекционистом Центра СПИД на основании клинических и лабораторных данных ребенку был поставлен диагноз: ВИЧ-инфекция, III стадия (бессимптомный инфекционный статус, вызванный ВИЧ) и назначено обследование в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи.

При проведении эпидемиологического расследования по случаю заражения ребенка ВИЧ-инфекцией была опрошена мать и обследованы на ВИЧ с отрицательным результатом другие члены семьи, проживающие совместно с ребенком. Мать отрицала наличие у ребенка контакта с ее кровью и применение грудного вскармливания, но указала на совместное использование ложки (при пробе пищи), маникюрных ножниц и расчески. В 2012 г. мать на дому проводила ребенку внутримышечные инъекции цефазолина, в это же время у женщины наблюдался краткий эпизод повышения вирусной нагрузки до 874 копий/мл. Инъекции мать проводила без перчаток, отметила, что были случаи порезов пальцев рук стеклянной ампулой при ее вскрытии, но утверждала, что такие ампулы немедленно утилизируются, раны обрабатывались и у ребенка отсутствовали парентеральные контакты с ее кровью. Таким образом, мать отрицала возможность заражения от нее ребенка ВИЧ-инфекцией известными путями передачи инфекции. Ребенок не подвергался переливанию крови и ее препаратов, к стоматологу не обращался, оперативных вмешательств ему не проводилось. В 2007–2012 гг. ребенок вакцинировался в соответствии с национальным календарем прививок, посещал детский сад и неоднократно проходил стационарное лечение в лечебно-профилактических организациях (ЛПО) Липецкой области по поводу острой респираторной вирусной инфекции, пневмонии и отита. В период пребывания в стационаре ребенок получал внутримышечные и внутривенные инъекции, у него брали кровь для лабораторных исследований. Был установлен круг контактных с ребенком лиц по ЛПО — 68 пациентов

и 53 представителя медицинского персонала (всего 121 человек). В рамках эпидемиологического расследования были обследованы на ВИЧ с отрицательным результатом 115 контактных лиц, в том числе 64 (94,1%) пациента ЛПО и 51 (96,2%) представитель медицинского персонала. ВИЧ-инфицированных среди них не выявлено. Из числа контактных лиц не удалось обследовать на ВИЧ 6 человек в связи с выбытием с территории Липецкой области или отказом от обследования. В стационарах, режимных кабинетах детской поликлиники (где получал помощь ребенок А.) на момент проведения проверки нарушений требований инфекционной безопасности не выявлено. В журналах учета аварийных ситуаций таковые в период пребывания ребенка в стационарах не регистрировались. Однако ввиду наличия не обследованных на ВИЧ контактных лиц не полностью исключалась гипотеза о возможности инфицирования ребенка при оказании медицинской помощи.

В связи с этим Липецкий областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями обратился в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора с просьбой о проведении генотипирования

и филогенетического анализа ВИЧ в рамках данного эпидемиологического расследования.

В исследуемую группу были включены образцы №1 и №2 (ребенок А. и его мать); группа сравнения была представлена 6 образцами (№3–8). Исследовали вирусную ДНК ВИЧ образцов вследствие низкой вирусной нагрузки в образце №2 (мать ребенка) и невозможности исследования вирусной РНК, поскольку женщина получает антиретровирусную терапию, подавляющую размножение вируса.

По участку нуклеотидной последовательности, содержащей ген *int*, были проанализированы все 8 образцов. Длина исследуемых фрагментов – 933 нуклеотида. Анализ исследуемых последовательностей с целью определения субтипа показал, что все образцы как исследуемой группы, так и группы сравнения относятся к варианту ВИЧ субтипа А. Дистанция между нуклеотидными последовательностями образцов исследуемой группы составила 0,003, дистанция между нуклеотидными последовательностями образцов исследуемой группы и группы сравнения – от 0,011 до 0,065 (в среднем – 0,038). Полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности образцов исследуемой группы по гену *int* больше схожи между собой, чем с последовательностями образцов группы сравнения. На рис. 1 представлено филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей гена *int*. В представленном филогенетическом дереве образцы №1 и №2 образуют кластер, расположенный отдельно от остальных образцов.

По гену *gp120* были проанализированы 6 образцов из 8; 2 образца (№4 и №7) не были проанализированы, так как не были определены их нуклеотидные последовательности. Длина исследуемых фрагментов составила 352 нуклеотида. Дистанция между нуклеотидными последовательностями образцов исследуемой группы составила 0,023, дистанция между нуклеотидными последовательностями образцов исследуемой группы и группы сравнения – от 0,043 до 0,170 (в среднем – 0,1065). Полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности образцов исследуемой группы по гену *gp120* больше схожи между собой, чем с последовательностями образцов группы сравнения. На рис. 2 представлено филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей гена *gp120*. Образцы №1 и 2 образуют кластер, расположенный отдельно от остальных образцов.

На рис. 3 представлено филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей гена *rev*. Видно, что образцы №1 и №2 сгруппированы и образуют кластер, расположенный отдельно от остальных образцов. Дистанция между нуклеотидными последовательностями образцов исследуемой группы составила 0,004, дистанция между нуклеотидными последовательностями образцов исследуемой группы и группы сравнения – от 0,004 до 0,067 (в среднем – 0,0355). Полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности образцов исследуемой группы по гену *rev* больше схожи между собой, чем в целом с последовательностями образцов группы сравнения.

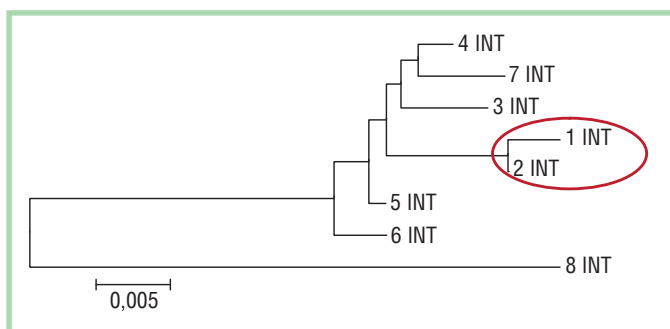


Рис. 1. Филогенетический анализ последовательностей по гену *int*

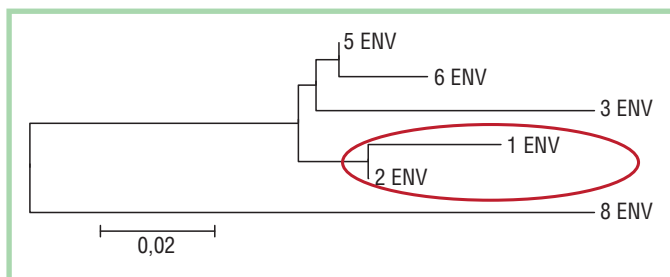


Рис. 2. Филогенетический анализ последовательностей по гену *gp120*

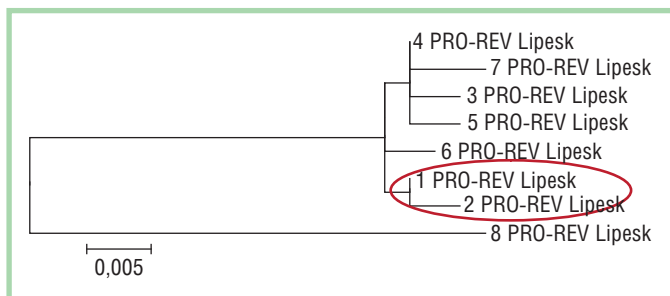


Рис. 3. Филогенетический анализ последовательностей по гену *rev*



Изложенное позволяет заключить, что:

- согласно результатам филогенетического анализа, по всем 3 исследованным регионам клинические образцы, относящиеся к исследуемой группе (№1 и №2), оказались генетически близкими; генетическая близость между образцами исследуемой группы достоверно выше, чем между образцами исследуемой группы и группы сравнения, что дает основание для предположения о наличии эпидемиологической связи между образцами №1 и №2;
- по результатам эпидемиологического расследования и филогенетического анализа можно сделать вывод о заражении ребенка А. от инфицированной ВИЧ матери; с высокой долей вероятности риск заражения ребенка ВИЧ при оказании медицинской помощи можно исключить;
- применение методов генотипирования ВИЧ и филогенетического анализа дает возможность усовершенствовать классическую методику проведения эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции, сократить его сроки и повысить достоверность результатов; целесообразно использовать возможности генотипирования ВИЧ с последующим филогенетическим анализом при расследовании случаев заражения ВИЧ, вероятно, связанных с оказанием медицинской помощи.

---

## Литература

1. Bernard E., Azad Y., Vandamme A. et al. HIV forensics: pitfalls and acceptable standards in the use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigations of HIV transmission // *HIV Med.* – 2007; 8: 382–87. doi: 10.1111/j.1468-1293.2007.00486.x
2. Ou C., Ciesielski C., Myers G. et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice // *Science.* – 1992; 256: 1165–71.
3. Bernard E., Azad Y., Vandamme A.-M. et al. The use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigation of HIV transmission // *HIV Med.* – 2007; 8 (6): 382–7.
4. Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Поляков А.Н. и др. Первый опыт применения стандартизированной генотипической методики определения тропизма ВИЧ // *Клин. лабораторная диагностика.* – 2013; 6: 46–8.
5. Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Кувва Д.А. Возможности молекулярных методов при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции. Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 12–13 апреля 2012 г., с. 417–8.

---

## HIV INFECTION: USE OF HIV GENOTYPING AND PHYLOGENETIC METHODS DURING AN EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION

**A. Lopatukhin<sup>1</sup>, N. Ladnaya<sup>1</sup>, L. Kirillova<sup>2</sup>, D. Kireev<sup>1</sup>, L. Nikotina<sup>2</sup>, O. Shchepinova<sup>2</sup>, T. Konnova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Russian Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow

<sup>2</sup>Lipetsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases

*HIV genotyping and phylogenetic methods were used in the epidemiological investigation of a case of HIV infection in a child in the Lipetsk Region. The risk of HIV infection in the child receiving healthcare was ruled out with a high degree of probability; the virus was concluded to have been transmitted from an HIV-infected mother to her child. It is expedient to use the capabilities of the phylogenetic assay to investigate HIV infection cases that are likely to be associated with healthcare.*

**Keywords:** epidemiological investigation, HIV, genotyping, phylogenetic assay.