

Н.Н.Зайцева¹, О.В.Парфенова¹, О.Ю.Пекшева¹, Е.И.Ефимов¹, Л.П.Потемина², Т.Л.Абрамян²**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ РАССЛЕДОВАНИИ СЛУЧАЯ ЗАРАЖЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ**¹ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт имени академика И.Н.Блохиной», Нижний Новгород, Российская Федерация; ²ГУЗ «Центр-СПИД» Саратовской области, Саратов, Российская Федерация

Цель. Расследование криминального случая заражения ВИЧ-инфекцией с использованием молекулярно-генетического анализа образцов плазмы крови предполагаемого источника инфекции и реципиента для определения вероятности наличия эпидемиологической связи между ними. **Материалы и методы.** Проведены генотипирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вариантов ВИЧ-1, выделенных от пациентов исследуемой группы и группы сравнения с помощью современных молекулярно-генетических методов. Построение филогенетического дерева и расчет генетической дистанции проводились путем анализа 36 образцов. **Результаты и выводы.** Варианты вируса, выделенные в исследуемых образцах, относятся к субтипу А ВИЧ-1. Проведенный филогенетический анализ показал, что нуклеотидные последовательности исследуемых образцов достоверно группируются на филогенетическом дереве, образуя общий кластер, отличный от образцов группы сравнения. Расчет генетической дистанции свидетельствует, что генетическая близость между образцами исследуемой группы выше, чем между образцами исследуемой группы и группы сравнения. С помощью филогенетического анализа было показано, что штаммы, полученные от предполагаемого источника инфекции и реципиента, генетически более близки друг с другом, чем со штаммами из группы сравнения. В связи с этим можно с большой долей уверенности утверждать о вероятности наличия эпидемиологической связи между ними.

Ключевые слова: заражение ВИЧ-инфекцией, эпидемиологическое расследование, филогенетический анализ, генетическая дистанция, группа сравнения.

Корреспондирующий автор: Зайцева Наталья Николаевна, e-mail: prokaids@mail.ru

N.N.Zaitseva¹, O.V.Parfenova¹, O.Yu.Peksheva¹, E.I.Efimov¹, L.P.Potemina², T.L.Abramyan²**Experience in Utilization of Phylogenetic Analysis for Epidemiological Investigation
of HIV Infection Case**¹Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology Named after I.N.Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation; ²State Healthcare Institution "Center-AIDS" of the Saratov Region, Saratov, Russian Federation

Objective of the study was to investigate a criminal case of infection with HIV, applying molecular-genetic analysis of blood plasma samples from an estimated source of an infection and the recipient for evaluation of probability of epidemiological connection between them. **Materials and methods.** The study involved genotyping and phylogenetic analysis of nucleotide sequences of HIV-1 variants, isolated from patients in the investigated group and the control one (19 nucleotide sequences of the HIV-1 from the patients living in the Saratov region, and 15 nucleotide sequences from GenBank). Genotyping was performed using the commercial ViroSeq HIV-1 Genotyping System. The sub-typing of HIV-1 strains was carried out on-line, through the COMET HIV-1/2 and HCV and REGA HIV-1 Sybtyping Tool programs. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences was carried out by Mega software, version 5.2. Phylogenetic trees were constructed; nucleotide distances were calculated by Kimura method (bootstrap level 1000). **Results and conclusions.** Virus variants, isolated from the studied samples, were defined as HIV-1 A subtype. Performed phylogenetic analysis showed that nucleotide sequences of the studied samples authentically grouped on the phylogenetic tree, forming a common cluster, which mismatched that of control group. Calculation of the genetic distance testifies that the genetic relation between the samples within the investigated group is higher, than between the same samples and those of the control group. Thus, by means of phylogenetic analysis it is shown that the strains received from an estimated source of infection and the recipient are genetically closer to each other, than to the strains from the group of comparison. In this regard, it is possible to claim with a big share of confidence that probability of epidemiological connection between them exists.

Keywords: infection with HIV, epidemiological investigation, phylogenetic analysis, genetic distance, control group.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Natal'ya N. Zaitseva, e-mail: prokaids@mail.ru

Citation: Zaitseva N.N., Parfenova O.V., Peksheva O.Yu., Efimov E.I., Potemina L.P., Abramyan T.L. Experience in Utilization of Phylogenetic Analysis for Epidemiological Investigation of HIV Infection Case. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 1:61–63. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-61-63

Появление в последние годы сложных, с точки зрения установления источника инфекции, случаев заражения ВИЧ определяет актуальность и необходимость использования в практике работы специалистов службы профилактики ВИЧ-инфекции/СПИД современных молекулярно-генетических методов исследования, в том числе генотипирования

ВИЧ и филогенетического анализа. Исследование филогенетического родства нуклеотидных последовательностей вируса иммунодефицита человека, выделенных от инфицированных лиц из эпидемиологического очага, позволяет с достаточно высокой степенью достоверности определить или опровергнуть взаимосвязь между предполагаемым источником

инфекции и реципиентом.

В РФ применение филогенетического анализа в расследовании случаев заражения ВИЧ-инфекцией еще не вошло в рутинную практику, тем не менее имеются единичные сообщения об опыте его применения в эпидемиологических расследованиях инфицирования ВИЧ при оказании медицинской помощи [1, 2, 3].

Филогенетический анализ является одним из важных инструментов получения объективных данных о наличии/отсутствии эпидемиологической связи, в том числе и при расследовании криминальных случаев заражения ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы

Проводили молекулярно-генетический анализ двух исследуемых образцов плазмы крови (№ 859 – предполагаемый источник инфекции и № 860 – реципиент) и группы сравнения. Исследования включали в себя определение субтипа ВИЧ-1, проведение филогенетического анализа и расчет генетической дистанции.

В качестве группы сравнения из базы данных Приволжского окружного центра ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной были использованы 19 нуклеотидных последовательностей вариантов ВИЧ-1, полученных от пациентов, проживающих в Саратовской области, и 15 нуклеотидных последовательностей, дополнительно взятых в качестве референсных, из международной базы GenBank. Построение филогенетического дерева и расчет генетической дистанции проводили путем анализа 36 образцов.

Для получения нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 по участку гена протеазы (*pro*) и обратной транскриптазы (*rev*) с длиной 1302 п.н. использовался набор реагентов ViroSeq (Abbott, США). Исследования проводили методом прямого автоматического секвенирования с использованием генетического анализатора ABI Prism 3100 «Applied Biosystems», США. Обработку данных секвенирования и получение консенсусной последовательности для участка гена *pol* осуществляли с помощью программного обеспечения «ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software» v.2.8 (Celera, США).

Для идентификации близкородственных штаммов ВИЧ-1 данные нуклеотидные последовательности анализировали в программе BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>]. Выравнивание последовательностей, филогенетический анализ и расчет генетических дистанций выполняли с помощью программы MEGA 5.2 с использованием статистического метода Maximum Likelihood, 2-параметрической модели Kimura (bootstrap level 1000). Субтипирование штаммов ВИЧ-1 проводили в on-line программах «COMETHIV-1/2 andHCV» и REGAHIV-1 Sybtyping Tool.

Результаты и обсуждение

В лаборатории молекулярно-генетических и серологических методов исследования Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной генотипирование ВИЧ и филогенетический анализ проводили для оказания практической помощи органам здравоохранения и учреждениям Роспотребнадзора.

По данным эпидемиологического расследования и сведений, предоставленных специалистами ГУЗ «Центр-СПИД» Саратовской области (Центр) и следственным управлением Следственного комитета РФ по Саратовской области, ВИЧ-инфицированный мужчина, ранее состоящий на диспансерном учете в Центре, поставил под угрозу заражения ВИЧ-инфекцией (насильственный половой контакт) женщину, ранее не имеющую диагноза «ВИЧ-инфекция» и не состоявшую на диспансерном учете в Центре СПИД. Впоследствии у нее была обнаружена ВИЧ-инфекция и в рамках возбужденного уголовного дела следствием было сделано предположение о возможном заражении ВИЧ-инфекцией женщины № 860 от ВИЧ-позитивного мужчины № 859.

В результате проведенных исследований было установлено, что варианты вируса, выделенные из образцов пациентов № 859 и № 860, относятся к субтипу А ВИЧ-1.

Проведенный филогенетический анализ показал, что нуклеотидные последовательности исследуемых образцов № 859 и № 860 достоверно группируются на филогенетическом дереве, образуя общий кластер, отличный от образцов группы сравнения (рисунок). Это говорит о высокой генетической близости исследуемых образцов, не исключающей эпидемиологической связи между ними.

Генетическая дистанция, рассчитанная для нуклеотидных последовательностей образцов № 859 и № 860, составила 0,002. Дистанция, рассчитанная между нуклеотидными последовательностями исследуемых образцов и группы сравнения, составила от 0,016 до 0,054 (среднее – 0,035). Это свидетельствует о том, что генетическая близость между образцами исследуемой группы выше, чем между образцами исследуемой группы и группы сравнения.

Таким образом, с помощью филогенетического анализа было показано, что штаммы ВИЧ, полученные от инфицированных пациентов № 859 и № 860, генетически более близки друг с другом, чем со штаммами из группы сравнения. Это свидетельствует о вероятности наличия эпидемиологической связи между ними и не вступает в противоречие с результатами эпидемиологического расследования. Применение современных молекулярно-генетических методов исследования, таких как филогенетический анализ, вносит значимый вклад в систему совершенствования эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией. Результаты филогенетического анализа являются

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нешумаев Д.А., Татьяна Е.А., Малышева М.А., Шевченко Н.М., Кокотюха Ю.А., Мейрманова Е.М., Виноградова М.Н., Уланова Т.И., Загрядская Ю.Е. Опыт совместного использования филогенетического анализа и определения давности инфицирования при исследовании внутрибольничного заражения ВИЧ-инфекцией. В кн.: Матер. VIII Всерос. конф. с междунар. участ. «Молекулярная диагностика – 2014». М.; 2014. Т. 1. С. 64–5.

2. Сандырева Т.П., Герасимова Н.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Кувда Д.А., Шипулин Г.А., Подымова А.С. Филогенетический анализ в эпидемиологических расследованиях случаев ВИЧ-инфекции. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2014; 1:17–21.

3. Сандырева Т.П., Герасимова Н.А., Подымова А.С. Молекулярно-генетические методы в системе эпидемиологической диагностики ВИЧ-инфекции. В кн.: Матер. VIII Всерос. конф. с междунар. участ. «Молекулярная диагностика – 2014». М.; 2014. Т. 1. С. 41–2.

References

1. Neshumaev D.A., Tat'yanina E.A., Malysheva M.A., Shevchenko N.M., Kokotyukha Yu.A., Meyrmanova E.M., Vinogradova M.N., Ulanova T.I., Zagryadskaya Yu.E. [Experience in shared use of phylogenetic analysis and infection prescription specification in the investigation of a hospital-acquired HIV infection]. In: [Proceedings of the VIII All-Russian Conference with International Participation "Molecular Diagnostics – 2014"]. M.; 2014. Vol. 1. P. 64–5.

2. Sandryeva T.P., Gerasimova N.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kuevda D.A., Shipulin G.A., Podymova A.S. [Phylogenetic analysis in epidemiological investigations of HIV-infection cases]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2014; 1:17–21.

3. Sandryeva T.P., Gerasimova N.A., Podymova A.S. [Molecular-genetic methods within the system of epidemiological diagnostics of HIV-infection]. In: [Proceedings of the VIII All-Russian Conference with International Participation "Molecular Diagnostics – 2014"]. M.; 2014. Vol. 1. P. 41–2.

Authors:

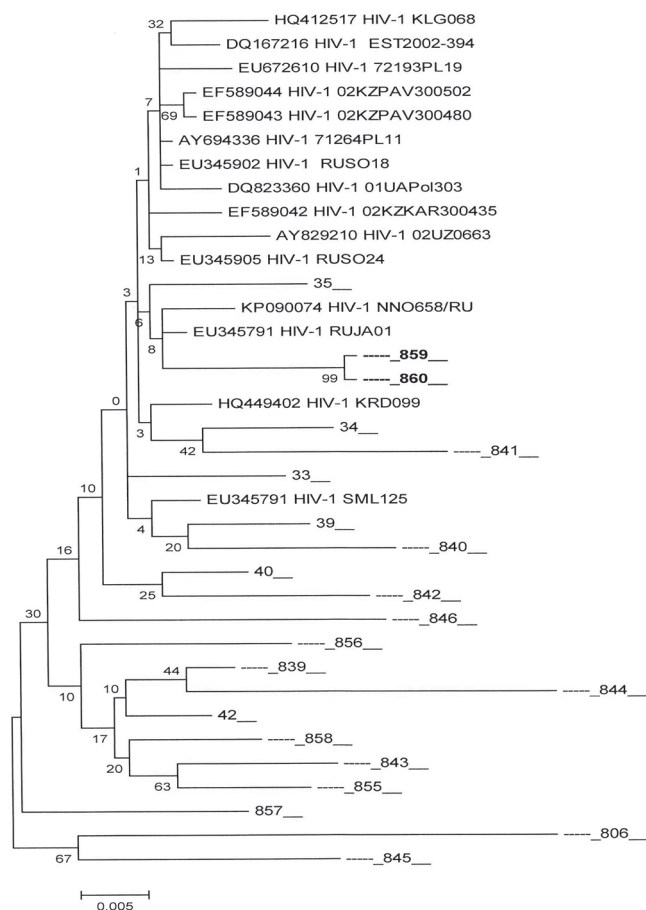
Zaitseva N.N., Parfenova O.V., Peksheva O.Yu., Efimov E.I. Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology Named after I.N. Blokhina. 71, Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation. E-mail: micro@sinn.ru

Potemina L.P., Abramyan T.L. State Healthcare Institution "Center-AIDS" of the Saratov Region. 69, Melnichnaya St., Saratov, 410009, Russian Federation. E-mail: centr_spid@overta.ru

Об авторах:

Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Пекшиева О.Ю., Ефимов Е.И. Нижегородский научно-исследовательский институт имени академика И.Н.Блохиной. Российская Федерация, 603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71. E-mail: micro@sinn.ru

Потемина Л.П., Абрамян Т.Л. «Центр-СПИД» Саратовской области. Российская Федерация, 410009, Саратов, ул. Мельничная, 69. E-mail: centr_spid@overta.ru



Филогенетическое дерево образцов исследуемой группы (№ 859, 860) и группы сравнения, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ-1

важным дополнением и, зачастую, единственным объективным доказательством установления источника инфекции при проведении эпидемиологических расследований, позволяя сократить число нерасшифрованных очагов инфицирования ВИЧ, в том числе и при криминальном заражении.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Поступила 30.06.15.