

Генетический анализ вариантов ВИЧ-1 в Украине

В. А. Гребенюк, О. В. Аноприенко, А. С. Скороход, И. Л. Маричев¹, В. М. Кавсан

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

¹ Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний МОЗ Украины
252038, Киев, ул. Протасов яр, 4

В статье представлены первые результаты анализа нуклеотидных последовательностей генов ВИЧ-1, полученных с помощью полимеразной цепной реакции на ДНК из крови украинских пациентов. Два из девяти исследованных образцов отнесены к подтипу А, остальные — к подтипу В. Обнаружен редкострачающийся вариант района V3 гена env ВИЧ-1. Из двух показаний на путь передачи инфекции подтверждено одно.

Введение. Пандемия синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) к середине 90-х годов охватила практически весь мир. По оценке Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), к середине 1996 года число случаев заражения вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) достигло 27,9 миллионов [1]. В Украине после периода относительного благополучия было отмечено стремительное распространение ВИЧ инфекции. Так, на конец 1994 года количество ВИЧ инфицированных граждан составило 183 человека, к концу 1995 года — 1490 человек [2], а за первые 8 месяцев 1996 года зарегистрировано 9720 новых случаев заражения [3].

Возбудитель СПИДа — вирус иммунодефицита человека [4] проявляет необычно высокую степень генетического разнообразия *in vivo*. Источником генетического разнообразия ВИЧ является высокий уровень мутаций [5], быстрый оборот вируса [6] и явления рекомбинации [7]. Исследования структуры генома региональных вариантов вируса ведутся во многих странах не только в рамках национальных программ, но и по международным грантам. Существуют два основных типа этого вируса: ВИЧ-1, распространенный повсеместно, и ВИЧ-2, менее патогенный и встречающийся значительно реже. На основании соотношений гомологии генов *gag* и *env* изоляты ВИЧ-1 разделены на две группы: М

(main) и О (outgroup) [8]. Группа М содержит восемь подтипов (групп гомологии) для гена *env*, называемых в соответствии с латинским алфавитом А—Н [8]. Кроме того, есть сведения о выделении еще двух подтипов, I и J [9, 10]. Для гена *gag* определены семь подтипов: А—D, F, G и H [8]. Распределение изолятов по гомологии генов *gag* в основном соответствует таковому по гену *env*. Выделенная позже группа О, по-видимому, не менее вариабельна, чем М. Изоляты рекомбинантной природы [8] и не классифицированные образцы свидетельствуют о существовании еще не охарактеризованных подтипов.

Интерес к известным вариантам ВИЧ-1 вызван прежде всего тем, что беспрецедентная вариабельность вируса считается основным препятствием для создания вакцины. Мутации в геноме вируса приводят к существенным изменениям биологических [11] и антигенных свойств [12, 13]. Последнее может стать проблемой для диагностики иммунологическими средствами, поскольку, несмотря на то, что большинство антигенов вирусов одного подтипа так или иначе связывается с антителами против вирусов других подтипов, существует высокая вероятность возникновения новых подтипов и даже новых штаммов ВИЧ-1 с отличающимися иммуногенными свойствами, которые не распознаются применяемыми тест-системами. Так, некоторые варианты антигенов вирусов подгруппы О либо индуцируют продукцию антител, не определяемых распространенными иммунологическими тест-системами

ми, либо дают нетипичную картину при «western blot» анализе, не подтверждая, таким образом, данные первичного теста на антитела к ВИЧ [14]. Так же очевидны проблемы, порожденные вариативностью, при диагностике ВИЧ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР): праймеры, гомологичные участкам генома одного подтипа, не всегда гомологичны тем же участкам другого подтипа.

Частота встречаемости подтипов ВИЧ-1 географически неравномерна и изменяется со временем. В странах Европы и Северной Америки в подавляющем большинстве случаев встречаются изоляты подтипа В. Другие подтипы обычно привносятся в результате недавней эмиграции из стран Африки и встречаются значительно реже. В странах Африки спектр вариантов значительно шире, преимущественно принадлежит к не В-подтипам [15]. В странах Южной Америки преобладает подтип В, но значительная часть изолятов принадлежит и к подтипу F [16]. В Юго-Восточной Азии распространены в основном В- и Е-подтипы [17]. В странах СНГ (за исключением Украины) и Балтии при общей малочисленности случаев инфекции ВИЧ-1, выявлены шесть подтипов (А--D, G и H) [18].

На сегодняшний день доказательства связи между принадлежностью изолятов к определенному подтипу и такими биологическими свойствами, как способность к передаче преимущественно тем или иным способом, в основном, статистические. Так, характерно, что подтип В в Европе и Америке встречается преимущественно среди мужчин-гомосексуалистов, а впоследствии распространился среди инъекционных наркоманов. В то же время в странах Африки вирусом в равной степени поражены как мужчины, так и женщины, которые, как упоминалось выше, инфицированы не В-подтипами. Объяснение этих статистических данных может быть как биологическим (если есть тропизм определенных подтипов к вагинальной передаче), так и эпидемиологическим. Последнее предположение кажется более вероятным и подтверждается тем, что в Таиланде подтип Е до определенного времени был ассоциирован с гетеросексуальным путем передачи, а подтип В — с внутривенным использованием наркотических средств [19]. В дальнейшем ВИЧ-1 подтипа Е проник в среду инъекционных наркоманов. Косвенным доказательством того, что подтип F хуже передается при гетеросексуальном контакте, являются данные о том, что в Бразилии число случаев заражения подтипом F среди женщин значительно ниже, чем среди их половых партнеров — инъекционных наркоманов [20]. Экспериментальным подтверждением статистической

корреляции между принадлежностью изолятов к определенному подтипу и способностью к передаче преимущественно тем или иным способом является сообщение [21] о большем тропизме ВИЧ-1 изолятов подтипа Е и С по сравнению с подтипом В к клеткам Лангерганса (макрофаги эпителиальных тканей), которые предположительно являются основной мишенью для ВИЧ-1 при гетеросексуальном контакте.

Вариативность генома ВИЧ-1 позволяет применять сравнение нуклеотидных последовательностей изолятов для определения путей передачи инфекции как между отдельными пациентами, так и в небольших популяциях [22]. В литературе широко обсуждались несколько случаев использования для этой цели молекулярно-биологических методов [23—26].

Цель нашей работы состояла в изучении гетерогенности генома ВИЧ-1, распространенного на территории Украины. Здесь мы представляем первые результаты анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *gag*, *env* и *nef* ВИЧ-1, полученных с помощью ПЦР на ДНК из крови украинских пациентов.

Материалы и методы. Кровь из вены отбирали у ВИЧ-1 серопозитивных пациентов, находящихся под наблюдением в Институте эпидемиологии и инфекционных заболеваний МОЗ Украины (таблица).

ДНК выделяли из ядер лейкоцитов периферической крови (ЛПК). Препараты свежей крови (5—10 мл) собирали в гепаринизированные пробирки. Ядра получали, добавляя к цельной крови 9 объемов раствора следующего состава: 0,32 М сахараза, 10 мМ трис-НСl, рН 7,6, 5 мМ MgCl₂, 1 % Triton X-100, аккуратно перемешивали и выдерживали в течение 5 мин при 4 °С, после чего центрифугировали при 3000 об/мин (1500 g) в течение 15 мин. Осадок промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) (г/л): NaCl — 8, KCl — 0,2, Na₂HPO₄ — 1,15, KH₂PO₄ — 0,2, рН 7,2, переосадили и ресуспендировали в 400 мкл PBS. ДНК из ядер выделяли стандартным методом [27]. Выход ДНК из 1 мл цельной крови составлял 10—15 мкг.

ПЦР проводили в приборе «DNA Thermal Cycler» («Perkin Elmer», США) с использованием реактивов фирмы «USB» (США) и «Perkin Elmer». Фрагменты провируса ВИЧ-1 амплифицировали по методу «nested» ПЦР [28]. ПЦР осуществляли в 50 мкл реакционной смеси следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ трис-НСl, рН 9,0 (25 °С), 0,1 % Triton X-100, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы «AmpliTaq, Perkin Elmer»; количество праймеров указано ниже. В качестве

Клонированные фрагменты генома ВИЧ-1 украинских пациентов

Пациент	Место проживания	Год рождения	Пол	Способ передачи*	Дата первого теста на ВИЧ	Дата отбора крови
UA1	Киевская обл.	1945	Ж	гетеро	1995	07.95
UA2	Киев	1940	М	гомо	1994	07.95
UA3	Киевская обл.	1959	М	гомо	1992	07.95
UA4	Житомир	1958	М	гомо	1995	07.95
UA5	Закарпатская обл.	1962	М	гомо	1993	07.95
UA6	Киев	1970	М	гомо	1995	07.95
UA7	Киев	1964	М	гомо	1995	07.95
UA8	Крым	1973	М	гомо	1991	04.96
UA9	Николаев	1972	Ж	нарк	1994	04.96

Пациент	Диагноз	<i>gag</i>		<i>env</i>		<i>nef</i>	
		Клон	Подтип	Клон	Подтип	Клон	Подтип
UA1	СПИД	UA1 <i>gag</i>	A	—	—	—	—
UA2	СПИД	UA2 <i>gag</i>	B	UA2 <i>env</i>	B	UA2 <i>nef</i>	B
UA3	СПИД	UA3 <i>gag</i>	B	—	—	—	—
UA4	СПИД	UA4 <i>gag</i>	B	UA4 <i>env</i>	B	—	—
UA5	СПИД	UA5 <i>gag</i>	B	UA5 <i>env</i>	B	UA5 <i>nef</i>	B
UA6	ГАДП**	UA6 <i>gag</i>	B	UA6 <i>env</i>	B	—	—
UA7	ГАДП	—	—	UA7 <i>env</i>	B	UA7 <i>nef</i>	B
UA8	ГАДП	—	—	UA8 <i>env</i>	A	—	—
UA9	ГАДП	—	—	UA9 <i>env</i>	B	—	—

*Предполагаемый способ заражения: гетеро — гетеросексуальный, гомо — гомосексуальный, нарк — внутривенное употребление наркотических веществ. **Генерализованная лимфоаденопатия.

матрицы для первого этапа «nested» ПЦР использовали 1 мкг ДНК из ядер ЛПК, для второго — 1 мкл 10-кратного разведения первой реакции.

Для первого этапа амплификации района С3-С5 гена *env* (около 1,1 тыс. п. н.) использовали внешние праймеры — *env6430* (5'-TGTCSSAAAGG-T(A/G)(T/A)CCTTTGA-3') (6192—6211) (здесь и далее указаны позиции праймеров в соответствии с геномом HIVBH102), 50 пмоль на реакцию, и *env7578* (5'-TAGGTATCTTTCCACAGCCA-3') (7340—7321), 20 пмоль на реакцию; для второго этапа — *RA6430* (5'-atcgaattCCCATACATTATTG-T-3') (6219—6233) (здесь и далее строчными буквами выделены участки, содержащие сайты рестрикции и не комплементарные вирусной последовательности), 20 пмоль на реакцию, и *RA7578* (5'-ccagaattcTTGCCTGGAGCTG-3') (7314—7302),

20 пмоль на реакцию. Температурный режим для первого этапа ПЦР: 94 °C — 1 мин; 5 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C — 1 мин, 72 °C — 2 мин; 10 циклов: 94 °C — 30 с, 54 °C — 1 мин, 72 °C — 2 мин; 30 циклов: 94 °C — 30 с, 53 °C — 1 мин, 72 °C — 1 мин + 2 с. Температурный режим для второго этапа амплификации: 5 циклов: 94 °C — 30 с, 51 °C — 1 мин, 72 °C — 2 мин; 25 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин + 2 с.

Амплификацию района p17-p24 гена *gag* (около 0,56 тыс. п. н.) проводили с использованием внешних праймеров: *MaXba* (5'-ACCAAGGAAG-CTcTAGACAAGATAGAGGAA-3') (400—429) и *RvSal* (5'-GGAAGCACgTcgacCTGATATCTAATC-CCTGGTG-3') (2356—2323) и внутренних праймеров: *MaXba* и *SK39* (5'-TTTGGTCSTTGTCTT-ATGTCCAGAATGC-3') (980—953). Количество

каждого праймера 20 пмоль на реакцию. Температурный режим для первого этапа амплификации: 94 °C — 1 мин; 5 циклов: 94 °C — 30 с, 58 °C — 1 мин, 72 °C — 2 мин; 10 циклов: 94 °C — 30 с, 57 °C — 1 мин, 72 °C — 2 мин; 30 циклов: 94 °C — 30 с, 56 °C — 30 с, 72 °C — 2 мин + 1 с. Температурный режим для второго этапа амплификации: 5 циклов: 94 °C — 30 с, 56 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин; 25 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин + 1 с.

Амплификацию полного гена *nef* ВИЧ-1 (около 0,65 тыс. п. н.) проводили с использованием внешних праймеров: ENVend (5'-GCC(A/G)CAGC-(A/C/T)(A/G)TAGCAGTA(A/G)(G/C)-3') (8028—8047) и Oligo1 (5'-TCAGCAGTTCTTGAAGTACT-3') (8772—8746) и внутренних праймеров: NEFATGn (5'-gcggatccATGGGTGGCAAGTGGTCAAAA-3') (8152—8172) и Oligo1. Количество каждого праймера 20 пмоль на реакцию. Температурный режим для первого этапа амплификации: 94 °C — 1 мин; 5 циклов: 94 °C — 30 с, 58 °C — 1 мин, 72 °C — 2 мин; 10 циклов: 94 °C — 30 с, 57 °C — 1 мин, 72 °C — 2 мин; 30 циклов: 94 °C — 30 с, 56 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин + 1 с. Температурный режим для второго этапа: 5 циклов: 94 °C — 30 с, 56 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин; 25 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин + 2 с.

При клонировании продуктов ПЦР использовали ферменты и буферные растворы фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ). Продукты ПЦР после окрашивания бромистым этидием выделяли из агарозного геля с помощью набора «GeneClean II» («BIO 101 Inc.», США) и клонировали в составе вектора *pBluescriptII SK+* («Stratagene» США) с использованием сайтов рестрикции, введенных в праймеры: *EcoRI* для гена *env*, *XbaI* для гена *gag* и *BamHI* для гена *nef*. Продукты ПЦР генов *gag* и *nef* для затупления концов обрабатывали ДНК-полимеразой I *Escherichia coli*, а затем рестрицировали соответствующими эндонуклеазами и клонировали в *pBluescriptII SK+*. Продукты ПЦР гена *nef* клонировали сходным образом, но с использованием рестрикционной эндонуклеазы *BamHI*. Лигирование проводили в течение ночи при 16 °C. Лигазную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* XLI-Blue («Stratagene»), полученных, как описано [29]. Плазмидную ДНК выделяли методом кипячения [30].

Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера, используя набор «Sequenase version 2.0 DNA Sequencing Kit» («USB») и [α -³⁵S]dATP («Amersham», Англия).

Для редактирования нуклеотидных последова-

тельностью использовали программу SEQMAN (DNASar, Madison, Wisconsin, США). Для выравнивания, сравнения и определения филогенетических соотношений последовательностей ВИЧ-1 применяли программу Megalign (DNASar) и CLUSTAL V [31], филогенетические деревья рассчитывали по методу ближайших соседей (neighbor-joining). Расчет длин ветвей (дивергенции) осуществляли с учетом транзаций/трансверсий для нуклеотидных последовательностей и с использованием таблицы PAM250 для экстраполированных аминокислотных последовательностей. В качестве фонового набора использовали 2—4 соответствующие последовательности каждого из подтипов ВИЧ-1 и последовательность SIV-1_{cr7 gab}, рекомендованные для этих целей [8].

Определенные в этой работе нуклеотидные последовательности были введены в базу данных EMBL под следующими номерами: Y16071, Y16072, Y16073, Y16074, Y16075, Y16076, Y16077, Y16078, Y16079, Y16080, Y16081, Y16082, Y16083, Y16084, Y16085, Y16086, Y16087.

Результаты и обсуждение. Для анализа вариантов ВИЧ-1, распространенных в Украине, с использованием «nested» ПЦР на ДНК из крови девяти пациентов были выделены и клонированы район p17-p24 (около 560 п. н.) гена *gag*, район C3-C5 (около 1100 п. н.) гена *env* и ген *nef* (около 650 п. н.) (см. таблицу). Были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена *gag* ВИЧ-1 шести пациентов, фрагмента гена *env* ВИЧ-1 семи пациентов и гена *nef* ВИЧ-1 трех пациентов. Все полученные нуклеотидные последовательности содержат открытую рамку считывания. Определение нуклеотидной последовательности соответствующего фрагмента гена *env* лабораторного штамма ВИЧ-1 — NL4-3 [32] показало, что уровень ошибок, вносимых *Taq*-полимеразой в условиях эксперимента, составляет 0,19 %, что практически не влияет на результаты филогенетического анализа.

По результатам филогенетического анализа фрагментов гена *gag* ВИЧ-1, распространенного на территории Украины, один из образцов (UA1gag) был отнесен к подтипу А, остальные — к подтипу В (рис. 1). Дивергенция между украинскими линиями ВИЧ-1 одного подтипа в этом районе составляет от 3,6 до 7,3 % (в среднем 6,2 %) по нуклеотидным и от 3,9 до 9,2 % (в среднем 6,2 %) по аминокислотным последовательностям. Дивергенция между линиями разных подтипов составляет от 14,3 до 15,8 % по нуклеотидным (в среднем 14,9 %) и от 11,2 до 13,8 % (в среднем 12,5 %) по аминокислотным последовательностям.

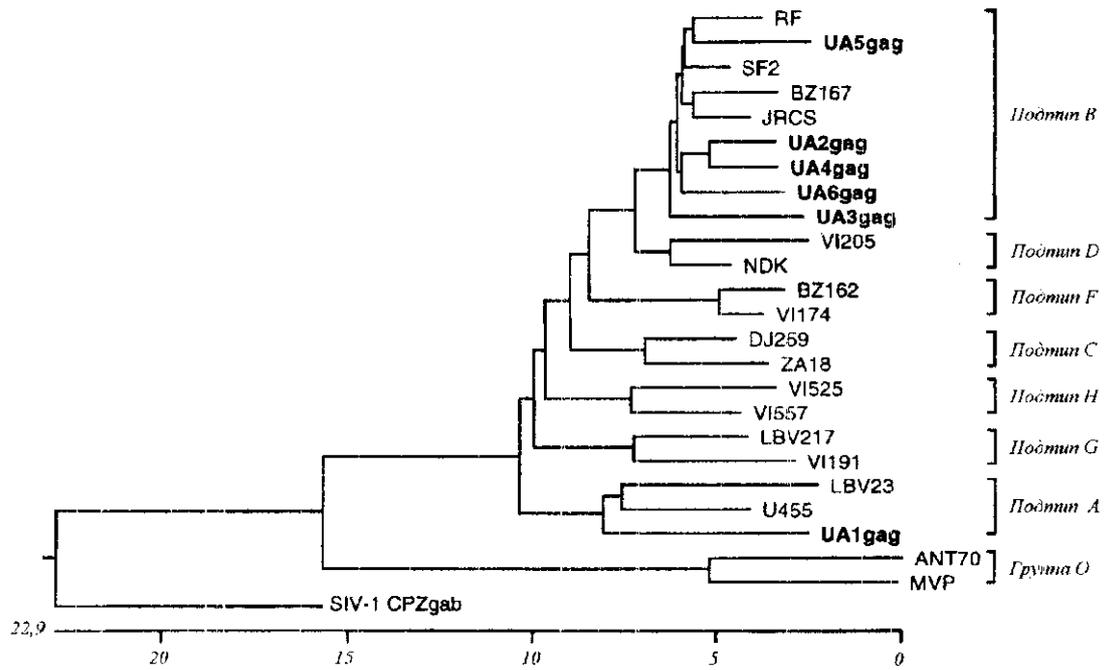


Рис. 1. Филогенетические соотношения нуклеотидных последовательностей гена *gag* ВИЧ-1. Процент дивергенции между отдельными последовательностями может быть определен с помощью шкалы как суммарная длина соединяющихся горизонтальных ветвей. Вертикальные линии служат исключительно для удобства представления. Названия нуклеотидных последовательностей, определенных в этой работе, выделены жирным шрифтом

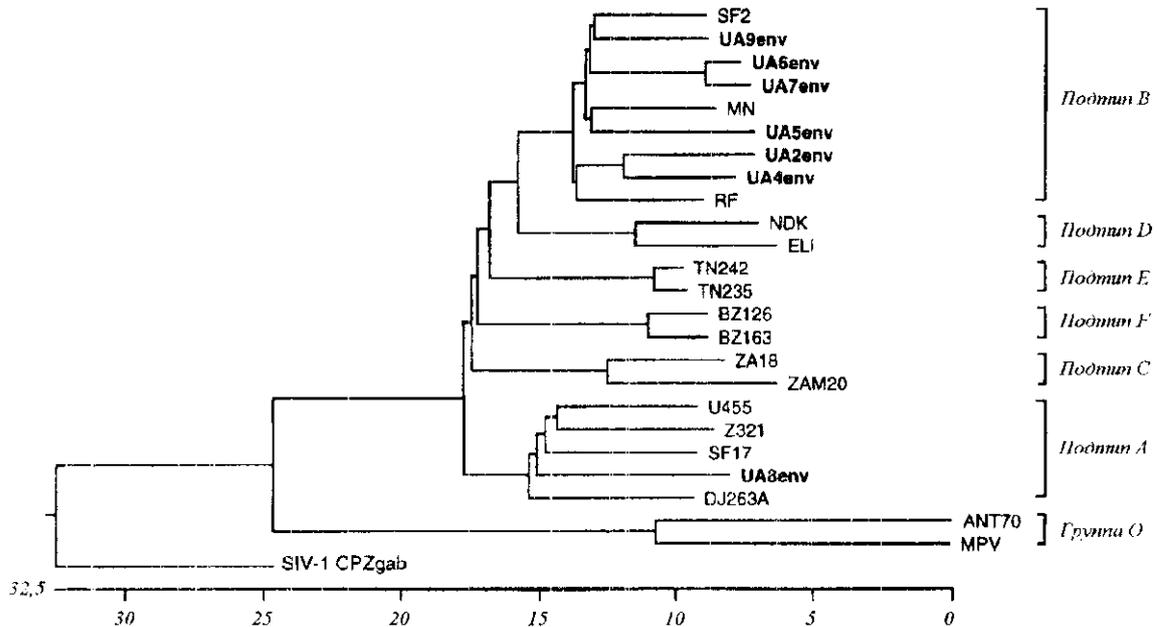


Рис. 2. Филогенетические соотношения нуклеотидных последовательностей гена *env* ВИЧ-1. Пояснения к рисунку те же, что и для рис. 1

В результате аналогичного анализа фрагментов гена *env* ВИЧ-1, распространенного на территории Украины, один из образцов (UA8env) был отнесен к подтипу А, остальные — к подтипу В (рис. 2). Дивергенция между украинскими линиями ВИЧ-1 одного подтипа в этом районе составляет от 3,2 до 13,1 % (в среднем 10,9 %) по нуклеотидным и от 6,2 до 20,7 % (в среднем 16,5 %) по аминокислотным последовательностям. Дивергенция между линиями разных подтипов составляет от 18,1 до

19,2 % по нуклеотидным (в среднем 18,7 %) и от 23,1 до 26,8 % (в среднем 25,1 %) по аминокислотным последовательностям.

Во всех исследованных нами образцах сохранены консервативные остатки цистина (рис. 3). В каждой последовательности содержится от 14 до 19 потенциальных сайтов N-гликозилирования, распределение которых в целом соответствует характерному для данных подтипов, за исключением одного сайта в третьей «константной» петле образ-

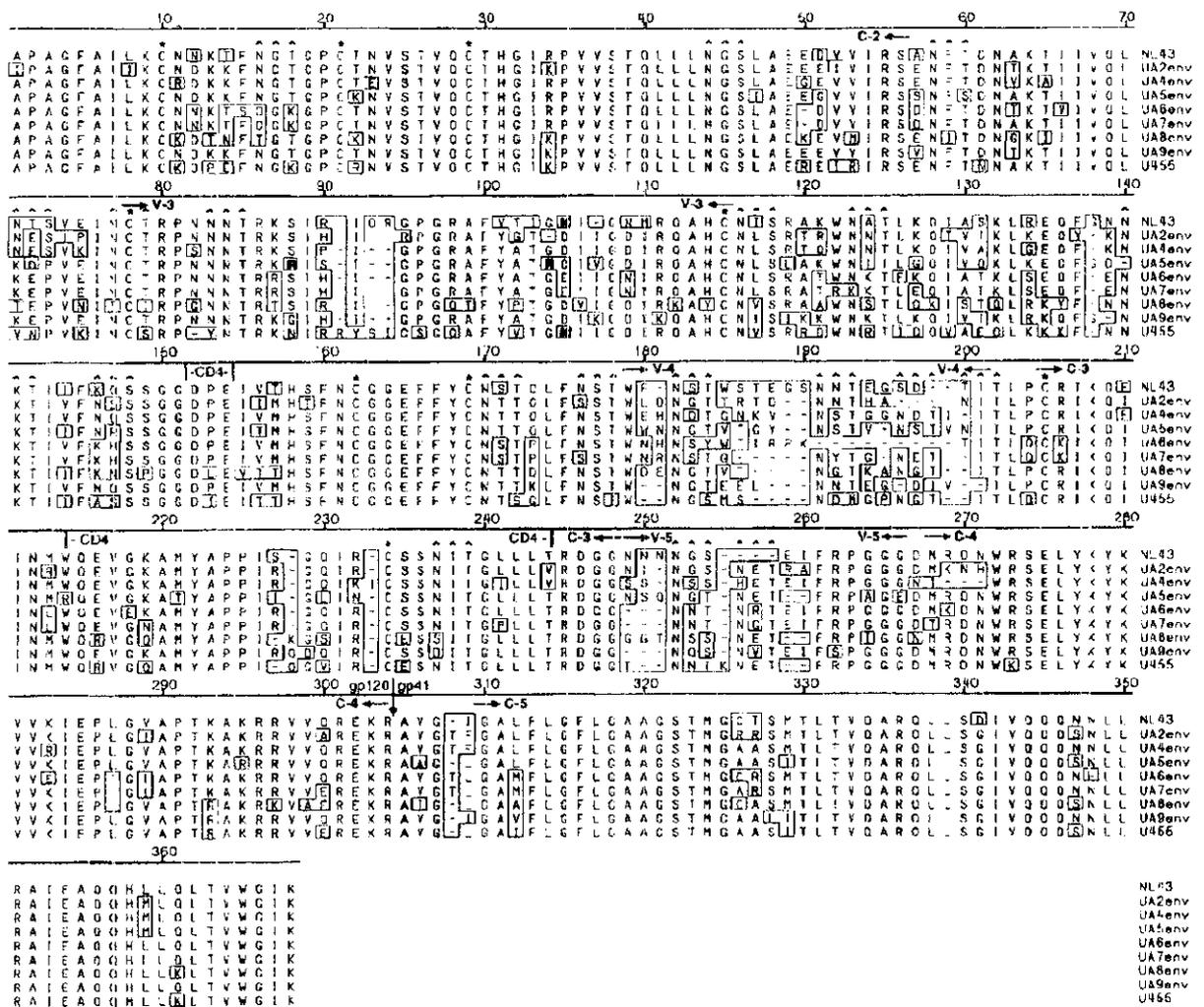


Рис. 3. Сравнение экстраполированных аминокислотных последовательностей фрагментов C3—C5 гена *env* ВИЧ-1 украинских пациентов и референсных последовательностей подтипа А (U455) и подтипа В (NL4-3). Консервативные остатки цистина отмечены звездочками (*). Потенциальные сайты N-гликозилирования обозначены символом ^^^. Границы консервативных (С) и переменных (V) районов указаны стрелками. Положительно заряженные аминокислотные остатки района V3, определяющие SI/NSI генотип, выделены жирным шрифтом. Сайты связывания с CD4 рецептором и сайт протеолиза gp160 обозначены вертикальными линиями (|)

ца, относящегося к подтипу А (UA8env). Эта позиция встречается в подтипах В (1,1 %), F (20,0 %) и G (12,5 %) и отсутствует во всех известных аминокислотных последовательностях подтипа А. Генотип одного из образцов подтипа В (UA5env), по результатам анализа аминокислотной последовательности V3-петли, относится к синцитийобразующим (SI генотип) [33]. Этот образец также содержит наибольшее количество сайтов N-гликозилирования.

Длина V3-петли в шести образцах составляет 35 аминокислотных остатков (ак) и в одном образце — 34 ак. Пять образцов подтипа В содержат GPGR-тетрамер вершины V3-петли, наиболее характерный для этого подтипа. Один из образцов подтипа В (UA2env) содержит необычный тетрамер, RPGR, ранее обнаруженный в единственном образце из Уругвая [34]. Образец подтипа А содержит тетрамер GPGQ — наиболее общий для этого подтипа. Октамеры вершины V3-петли трех образцов подтипа В содержат последовательность, наиболее общую для этого подтипа — HIGPGRAF. Два других образца подтипа В (UA4env и UA5env) содержат октамеры, встречающиеся реже и только в этом подтипе.

Один из образцов подтипа В (UA2env) содержит последовательность HIRPGRAF, не представленную в базе данных [8]. Образец подтипа А (UA8env) содержит последовательность RIGPGQTF, чаще встречающуюся в подтипе С, но

также представленную в части линий ВИЧ-1 подтипа А (27 из 138 известных).

По результатам филогенетического анализа гена *nef* ВИЧ-1, распространенного на территории Украины, все три образца отнесены к подтипу В (рис. 4). Дивергенция между нуклеотидными последовательностями составляет от 9,8 до 12,6 % (в среднем 10,7 %) и от 14,6 до 19,9 % (в среднем 18,1 %) между аминокислотными последовательностями.

В экстраполированной аминокислотной последовательности UA7nef консервативный остаток цистеина в позиции 61 заменен на валин (рис. 5). Интересно, что такая замена (на Val или Ile) есть в четырех из 75 последовательностей Nef (две из них относятся к подтипу В), представленных в базе данных [8]. В то же время последовательность UA7nef содержит Cys в позиции 145, где он обнаружен только в трех (все подтипа В) из 75 последовательностей [8]. Наличие Cys в этом положении связывают с длительным инкубационным периодом и неразвитием СПИД [35]. Кроме того, во всех последовательностях Nef украинских образцов ВИЧ-1 присутствует Cys в позиции 170, где он представлен у 18 последовательностей подтипа В (28 %) и двух из трех последовательностей подтипа D.

Вставка в N-концевой части Nef, обнаруженная нами в UA2nef, вообще характерна для белков Nef ВИЧ-1. Так, 9 последовательностей (12 %)

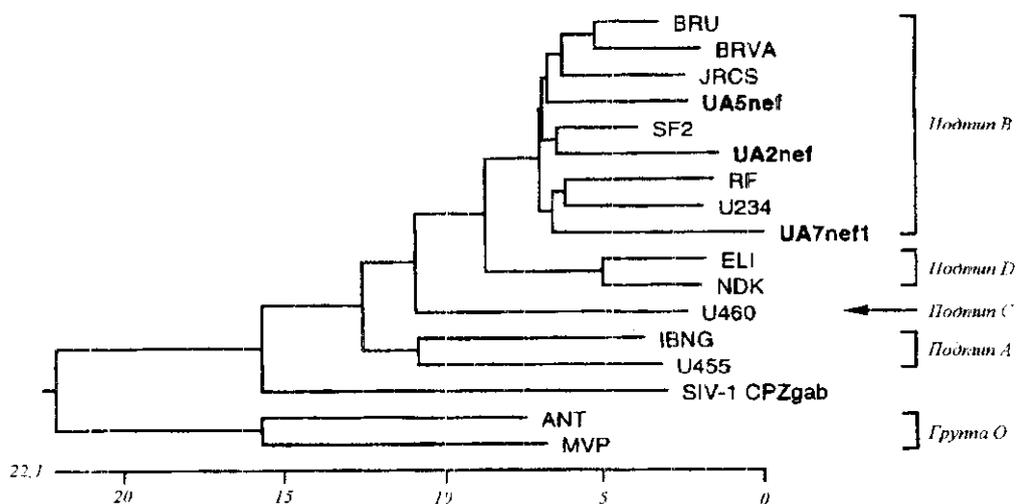


Рис. 4. Филогенетические соотношения нуклеотидных последовательностей генов *nef* ВИЧ-1. Пояснения к рисунку те же, что и для рис. 1

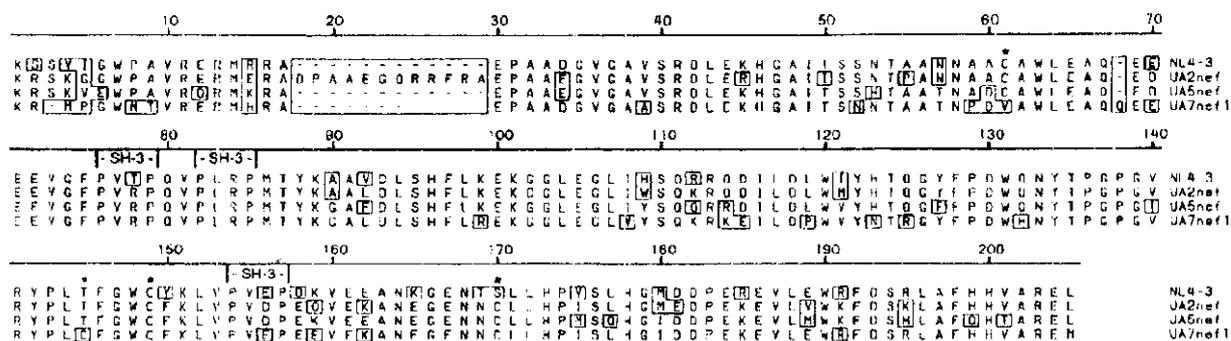


Рис. 5. Сравнение экстраполированных аминокислотных последовательностей генов *nef* ВИЧ-1 украинских пациентов и референсной последовательности подтипа В (NL4-3). Консервативные остатки цистеина отмечены звездочками (*). Сайты связывания с SH3-доменом протеинкиназ класса С обозначены вертикальными линиями (|)

содержат в этом районе вставку размером более 9 ак и 23 последовательности (36 %) имеют вставку размером 6 ак. Необычен размер вставки у UA2nef — 12 ак. Более длинная вставка присутствует только у одной последовательности — HIVBRVA. Интересно отметить, что большая часть белков Nef, содержащих длинную вставку, относится к «старым» случаям заражения ВИЧ-1. В том числе и образец (HIVU23487), полученный на материале пациента, известного как Manchester Sailor (1958 год).

Три сайта связывания с SH3-доменом протеинкиназ класса С присутствуют во всех белках Nef украинских образцов ВИЧ-1.

Процент дивергенции между украинскими линиями ВИЧ-1 не превышает значений, характерных для рассматриваемых участков генома, и вместе с тем достаточно высок, что указывает на множественные источники заражения в Украине.

Наблюдающаяся в других странах ассоциация подтипа В с гомосексуальным путем передачи, видимо, характерна и для Украины. Распространенный в основном в Африке подтип А ассоциирован с гетеросексуальным путем передачи. Обнаружение ВИЧ-1 этого подтипа у UA8, возможно, объясняется профессией пациента — моряк дальнего плавания.

Характерно, что наиболее гомологичные последовательности ВИЧ-1 обнаружены у двух пациентов (UA6 и UA7), указавших на гомосексуальную связь друг с другом как на источник заражения. В то же время указание пациента UA8 на связь с UA4 в качестве источника заражения не верно, так как обнаруженные у них линии ВИЧ-1 весьма дивергентны и относятся к разным подтипам.

Работа частично финансировалась грантом 93/8 Национального комитета по борьбе с заболеванием СПИД при президенте Украины.

В. А. Гребенюк, О. В. Аноприенко, А. С. Скороход,
I. Л. Маричев, В. М. Кавсан

Генетичний аналіз варіантів ВІЛ-1 в Україні

Резюме

Представлено перші результати аналізу нуклеотидних послідовностей генів вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), отриманих за допомогою полімеразної ланцюгової реакції на ДНК з крові українських пацієнтів. Два з дев'яти досліджених зразків віднесено до підтипу А, інші — до підтипу В. Знайдено варіант ділянки V3 гену *env* ВІЛ-1; цей варіант зустрічається рідко. З двох показань щодо шляху передачі інфекції підтверджено одне.

V. A. Grebenjuk, O. V. Anoprienko, A. S. Skorokhod,
I. L. Marichev, V. M. Kavsan

Genetic characterization of HIV-1 variants in Ukraine

Summary

Here we report first results on genetic characterization of HIV-1 samples from Ukraine using polymerase chain reaction (PCR) and viral genes sequencing. PCR was done on DNA from uncultured peripheral blood mononuclear cells of 7 male (all homosexual) and 2 female (one heterosexual and one injection drug user, IDU) HIV-1 seropositive individuals. After the PCR products cloning partial sequencing of HIV-1 gag gene (0.56 kb, p17-p24), HIV-1 *env* gene (1.1 kb, C3-C5), and HIV-1 *nef* gene were performed. Nucleotide and deduced amino acid sequences were aligned to reference strains of different HIV-1 subtypes by CLUSTAL method and phylogenetic neighbor-joining trees were generated. By the results of phylogenetic analysis two HIV-1 samples (one from IDU and one from male homosexual) belonged to subtype A while others were clustered to subtype B by nucleotide as well as by amino acid sequences. Most closely related *env* sequences were found in samples from a couple of homosexual partners. One rare V3 tip tetramer

(*RPGR*) was found in subtype B *env* sequence. All three sequenced samples of HIV-1 *nef* genes belonged to the subtype B. One *nef* sequence contains unusually long insert in the N-terminal region.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *HIV/AIDS: The Global Epidemic*. Fact sheet.—Geneva: UN-AIDS and WHO 1996.
2. Кобица Ю., Мухарська Л., Бочкова Л. та ін. ВІЛ-Інфекція на Україні. Інформаційний бюлетень № 9.—Київ, 1996.
3. Івасюк В., Кобица Ю., Кордюм В. та ін. Епідемія СНІДу в Україні і світі. Аналітичний огляд.—Київ, 1996.
4. Popovic M., Sarngadharan M. G., Read E., Gallo R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS // *Science*.—1984.—224.—P. 497—500.
5. Preston B. D., Poiesz B. J., Loeb L. A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase // *Ibid.*—1988.—242.—P. 1168—1171.
6. Ho D., Neumann A. U., Perelson A. S., Chen W. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection // *Nature (London)*.—1995.—373.—P. 123—126.
7. Sharp P. M., Robertson D. L., Gao F., Hahn B. H. Origins and diversity of Human Immunodeficiency Viruses // *AIDS*.—1994.—8.—P. 27—42.
8. Muers G., Kcbert B., Hahn B. H. et al. Human retroviruses and AIDS 1995.—New Mexico: Los Alamos Nat. Lab. publ. 1995.
9. Kostrikis L. G., Bagdades E., Cao Y. et al. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: Identification of a new subtype, designated subtype 3 // *J. Virol.*—1995.—69.—P. 6122—6130.
10. Leitner T., Alaeus A., Marquina S. et al. Yet another subtype of HIV type 1? // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.—1995.—11—N 8.—P. 995—997.
11. de Wolf F., Hogervorst E., Goudsmit J., Fenyo E. M. and the WHO Network for HIV isolation and characterization. Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B. Phenotypic and genotypic characteristics // *Ibid.*—1994.—10—P. 1401—1408.
12. Pou C. P., Kai M., Holloman-Candal D. I. et al. and the WHO Network for HIV isolation and characterization. Antigenic variation and serotyping of HIV type 1 from four World Health Organization-sponsored HIV vaccine sites // *Ibid.*—P. 1369—1377.
13. Cheingsong-Popov R., Lister S., Callow D. et al. and the WHO Network for HIV isolation and characterization. Serotyping HIV type 1 by antibody binding to the V3 loop. Relationship to viral genotype // *Ibid.*—P. 1379—1386.
14. Loussert-Ataka I., Ly T. D., Chaix M. L. et al. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients // *Lancet*.—1994.—343.—P. 1393—1394.
15. WHO Network for HIV isolation and characterization HIV type 1 variation in World Health organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.—1994.—10.—P. 1327—1343.
16. Louwagae J., Delwart E. L., Mullins J. I. et al. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brasil reveals presence of two distinct genetic subtypes // *Ibid.*—P. 561—567.
17. Graz M., Dietrich U., Balfe P. et al. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infection in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses // *J. Virol.*—1994.—68.—P. 2161—2168.
18. Lukashov V. V., Cornelissen M., Goudsmit J. et al. Simultaneous introduction of distinct HIV-1 subtypes into different risk groups in Russia, Byelorussia, and Lithuania // *AIDS*.—1995.—9.—P. 435—439.
19. Kalish M. L., Luo C. C., Weniger B. G. et al. Early HIV type 1 strains in Thailand were not responsible for the current epidemic // *AIDS Res. Hum. Retrovirus*.—1994.—10.—P. 1573—1575.
20. Brigido L. F., Rossini M., Santos J. et al. HIV-1 subtypes in female sexual partners of IDU at the San Paulo // XI Int. Conf. on AIDS.—Vancouver, 1996.—Tu. C. 220.
21. Soto-Ramirez L. E., Renjifo B., Marlink R. et al. Differential growth of HIV-1 subtypes in Langerhans cells. Relation to transmission route // *Ibid.*—Tu. A. 370.
22. Hills D. M., Huelsenbeck J. P., Cunningham C. W. Application and accuracy of molecular phylogenesis // *Science*.—1994.—264.—P. 671—677.
23. Ou C. Y., Ciesielski C. A., Myers G. et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice // *Ibid.*—1992.—256.—P. 1165—1171.
24. Holmes E. C., Zhang L. Q., Simmonds P. et al. Molecular investigation of human immunodeficiency virus (HIV) infection in a patient of an HIV-infected surgeon // *J. Infect. Dis.*—1993.—167.—P. 1411—1444.
25. Albert J., Wahlberg J., Leitner T. et al. Analysis of rope case by direct sequencing of human immunodeficiency virus type 1 *pol* and *gag* genes // *J. Virol.*—1994.—68.—P. 5918—5924.
26. Jaffe H. W., McCurdy J. M., Kalish M. L. et al. Lack of HIV transmission in the practice of a dentist with AIDS // *Ann. Int. Med.*—1994.—121.—P. 855—859.
27. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.
28. Rogers M., Ou C.-Y., Rayfield M. Polymerase chain reaction for early detection of HIV proviral sequence in infants born to seropositive mothers // *N. Engl. J. Med.*—1989.—320.—P. 1649—1654.
29. Nishimura A., Morita M., Nishimura J., Sugino J. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *E. coli* cells // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18.—P. 6169.
30. Holmes D. S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // *Anal. Biochem.*—1981.—114.—P. 193.
31. Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R. CLUSTAL V improved software for multiple sequence alignment // *Comput. Appl. Biosci.*—1992.—8.—P. 189—191.
32. Adachi A., Gendelman S., Koenig S. et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone // *J. Virol.*—1986.—59.—P. 284—291.
33. Jong de J. J., Ronde de A., Keulen W. et al. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 domain to support the syncytium-inducing phenotype: Analysis by single amino acid substitution // *Ibid.*—1992.—66.—P. 6777—6780.
34. Medina F. R. D., Jansson M., Halapi E. et al. Genetic analysis of V3 domain sequences obtained from uruguayan HIV type 1-infected individuals // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.—1996.—12, N 15.—P. 1491—1493.
35. Premkumar D., Ma X., Maitra R. K. et al. The *nef* gene from a long-term HIV type 1 nonprogressor // *Ibid.*—N 4.—P. 337—345.

Поступила в редакцію 19.01.98