

На правах рукописи

ЩЕМЕЛЕВ

Александр Николаевич

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 НА ТЕРРИТОРИЯХ С РАЗЛИЧАЮЩЕЙСЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ ВИРУСНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

1.5.10 Вирусология

3.3.8 Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

Семенов Александр Владимирович – доктор биологических наук, директор Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Останкова Юлия Владимировна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией Иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Официальные оппоненты:

Ковеленов Алексей Юрьевич – доктор медицинских наук, главный врач Государственного казённого учреждения здравоохранения Ленинградской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями»

Кюрегян Карен Каренович – доктор биологических наук, руководитель Отдела изучения вирусных гепатитов Исследовательского центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 21.1.01.017 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава России (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.15/17)
Тел.: (812) 499 15 00

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава России (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17) и на сайте www.influenza.spb.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 21.1.01.017
Кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

На сегодняшний день, согласно данным ЮНЭЙДС, в мире зарегистрированы 31,6-44,5 миллиона человек, живущих с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), при этом число новых заражений за 2019 год составило 1,2-2,2 млн. случаев. На конец 2020 г. в мире насчитывалось около 40 миллионов лиц, живущих с ВИЧ (UNAIDS, 2020). Наша страна на сегодняшний день является одним из регионов с максимальными темпами развития эпидемии. По данным Министерства Здравоохранения количество случаев ВИЧ-инфекции в стране превышает 408 тыс. чел. Однако Минздрав учитывает только тех пациентов, которые состоят на диспансерном наблюдении. Реальное число лиц с ВИЧ в стране оценивается ЮНЭЙДС в пределах 0,8-1,2 млн. чел. Эпидемия пока еще носит концентрированный характер (Попова Е.С. и др., 2019). Это означает распространенность ВИЧ преимущественно в группах риска. ВИЧ-инфекция в России относится к так называемым социально значимым заболеваниям, опасным для окружающих, а также признана как угроза национальной безопасности (Постановление правительства РФ №715 от 01.12.2004). В первом полугодии 2020 года в Российской Федерации было выявлено 38 126 лиц, имеющих антитела к ВИЧ-1, а к концу I полугодия 2020 г. Роспотребнадзором было зарегистрировано 1 094 050 россиян с лабораторно выявленным диагнозом ВИЧ-инфекция (Федеральный центр по борьбе со СПИД, 2021).

Повсеместное широкое применение антиретровирусной терапии (АРТ) приносит свои положительные результаты, позволяет снизить пораженность, заболеваемость и смертность от ВИЧ. За двадцать лет XXI века число новых случаев заражения ВИЧ-инфекцией в мире уменьшилось на 37%, а смертность от причин, связанных с ВИЧ, снизилась на 45 %, при этом благодаря терапии в мире за аналогичный период было спасено 13,6 миллиона лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ) (UNAIDS, 2020). На сегодняшний день применение антиретровирусных препаратов (АРП) позволяет значительно улучшить качество жизни пациентов с ВИЧ-инфекцией, а также является профилактическим фактором, так как в результате лечения снижается вирусная нагрузка (ВН) и вероятность передачи вируса половым путем. Однако повсеместное использование АРТ связано с развитием лекарственной устойчивости (ЛУ) вируса к препаратам, что приводит к неудачной терапии. В связи с тем, что ЛУ непосредственно влияет на стратегию выбора лечения, она является объектом эпидемиологического и молекулярно-генетического надзора. Лекарственная устойчивость ВИЧ к АРТ возникает из-за накопления в организме человека вариантов вируса, имеющих в геноме мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью (МЛУ), которые влияют на способность АРП или их схем терапии в целом подавлять размножение вируса. В результате появления фармакорезистентных квазивидов вируса происходит вирусологический прорыв – повышение вирусной нагрузки и последующие проявления неэффективности терапии: иммунологические и клинические. Все существующие АРП, включая новые классы, рискуют стать частично или полностью неактивными из-за появления лекарственно-устойчивых вирусов. Согласно рекомендациям ВОЗ сегодня выделяют две основных категории ЛУ ВИЧ (ВОЗ, 2017), важных для эпидемиологического надзора: приобретенная (вторичная) лекарственная устойчивость ВИЧ возникает у ЛЖВ на фоне приема АРП; передающаяся (первичная) лекарственная устойчивость ВИЧ выявляется у ВИЧ-инфицированных пациентов, не имеющих опыта приема АРП («наивные» пациенты), то есть получившие устойчивые варианты вируса при инфицировании. Надзор за передающейся ЛУ не входит в список приоритетных задач ВОЗ.

Надзор за фармакорезистентностью ВИЧ необходим для минимизации риска возникновения и распространения вариантов вируса, обладающих МЛУ, ограничения последствий их распространения для здоровья населения. Для осуществления и унификации надзора за ЛУ ВИЧ разработан список «надзорных мутаций», наиболее часто ассоциирующихся с ЛУ вируса (Bennet D.E. et al, 2009).

Кроме мониторинга МЛУ, надзор за ЛУ включает в себя также наблюдение за распространением геновариантов ВИЧ в разных регионах. Такие исследования являются важным инструментом эпидемиологического надзора и проводятся, в том числе, и в России с момента начала регистрации первых случаев ВИЧ-инфекции. Подобный мониторинг позволяет отслеживать тенденции в эволюции вируса, пути развития эпидемии, а также наиболее достоверно регистрировать случаи появления МЛУ (Казеннова Е.В. и др., 2010).

Степень разработанности темы исследования

Первые сообщения об устойчивости к азидотимидину были опубликованы в 1989 г. С тех пор описана устойчивость ко всем новым препаратам, используемым в клинике: нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ и ННИОТ), ингибиторам протеазы (ИП), а также ингибиторам слияния. В настоящее время накоплен значительный объем информации относительно связи определенных мутаций с устойчивостью к конкретным АРВП. Существуют доступные и постоянно обновляющиеся базы данных, облегчающие интерпретацию результатов лабораторных тестов, используемых для выявления устойчивости ВИЧ. На сегодняшний день описаны случаи первичной резистентности ко всем классам АРВП.

На сегодняшний день существуют работы Бобковой М. Р. (2018, 2019, 2020, 2021 гг.), Казенновой Е.В. (2019, 2020, 2021 гг.), Лебедевым А. В. (2020 г.) и др., посвященной распространённости мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ в России. Преимущественно данные работы посвящены Центральному федеральному округу.

В Северо-Западном федеральном округе до настоящего времени проводились лишь единичные исследования в регионах по мониторингу резистентности к АРВП у лиц, получающих терапию. Среди них были отмечены случаи неэффективности терапии, в том числе в связи с наличием резистентности к АРВП. Петровой Л. В. с соавторами было обследовано 73 пациента с ВИЧ-инфекцией, получавших антиретровирусную терапию и наблюдавшихся в ГИБ № 30 им. С.П. Боткина (Санкт-Петербург) в период с 2002 по 2007 гг. Дементьева с соавторами провели исследование лекарственной устойчивости ВИЧ у пациентов с неэффективностью АРТ в 2012 году. Мутации, ассоциированные с резистентностью, выявлены у 26 % пациентов. У 25 % обнаружена устойчивость к одному или более препаратам, 65 из группы НИОТ, у 15 % — из группы ННИОТ, у 16 22 % — из группы ИП, к препаратам из 2-х групп — у 23 % и из 3-х групп — у 12 % больных.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод о том, что до сих пор на территории Северо-Западного федерального округа не проводилось детального исследования резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам, позволяющего более глубоко понять природу и тенденции развития лекарственной устойчивости ВИЧ к АРВП.

Сведения о распространённости ЛУ достаточно фрагментарны для многих стран. Например, в Гвинейской Республике в 2016 г. Mbange A. E. с соавторами не удалось проанализировать достаточное количество проб для выявления распространённости ЛУ в Гвинейской Республике. Для Гвинеи, как и для других стран Западной Африки остается неизвестной возможность применения отечественных диагностических средств для выявления ЛУ. Эта научная задача не разработана и является актуальной для целого ряда стран Африканского континента.

Цель исследования

Изучить разнообразие мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам на территориях с разной генетической структурой вирусной популяции при низком охвате АРТ.

Задачи исследования

1. Изучить структуру мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью ВИЧ, у пациентов из СЗФО с вирусологической неэффективностью АРТ за период с 2014 по 2019 гг.

2. Изучить структуру и разнообразие мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ у пациентов без опыта терапии из СЗФО и Гвинеической Республики и провести сравнительный анализ вариантов ВИЧ, обладающих лекарственной устойчивостью, на территориях с различающейся генетической структурой вирусной популяции.

3. Установить основные закономерности появления мутаций лекарственной устойчивости вируса для разных субтипов ВИЧ-1.

4. Определить изменение распределения преобладающих мутаций лекарственной устойчивости по времени и выявить основные тенденции развития резистентности ВИЧ к АРП для использования в прогностических моделях развития инфекционного процесса.

5. Оценить валидность используемой тест-системы для диагностики лекарственной устойчивости ВИЧ, зарегистрированной для применения на территории Российской Федерации, в регионах с высокой генетической гетерогенностью вируса, в том числе для субтипов, редко встречающихся на территории России.

6. Разработать инструмент, способствующий повышению эффективности мониторинга распространенности мутаций лекарственной устойчивости и изменения во времени структуры генотипического и фенотипического профиля ВИЧ.

Научная новизна

Получены новые данные о распространенности мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в Северо-Западном федеральном округе России.

Получены новые данные о генетическом разнообразии ВИЧ-1 в СЗФО.

Получены новые данные о распространенности первичной ЛУ в СЗФО.

Впервые изучена распространенность первичной лекарственной устойчивости в Гвинеической Республике.

Определены первичные нуклеотидные последовательности фрагментов гена *pol*, ответственных за синтез протеазы и обратной транскриптазы, 535 изолятов, циркулирующих на территориях СЗФО РФ и Гвинеической Республики, все нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных GenBank.

Разработаны базы данных для хранения и обработки данных по надзору за распространенностью лекарственной устойчивостью ВИЧ.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость заключается в следующем:

выявлены закономерности распространения ЛУ ВИЧ на основании изучения генетического разнообразия ВИЧ-1 в СЗФО;

оценена распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в Северо-Западном федеральном округе России;

оценена распространенность первичной ЛУ в СЗФО;

исследовано генетическое разнообразие ВИЧ-1 и распространенность первичной лекарственной устойчивости в Гвинеической Республике;

Практическая значимость заключается в следующем:

в международную базу данных GenBank депонированы 535 нуклеотидных последовательностей под номерами: МК510016 – МК510079, MN317576 – MN317587,

OL505461 – OL505538, ON367567 – ON367728, MT874291 – MT874321, MT874310 – MT874321, MT919401 – MT919427;

получены достоверные данные о распространенности первичной ЛУ в СЗФО, подтверждающие необходимость внедрения скрининга на наличие МЛУ у всех пациентов перед началом терапии;

подтверждена валидность отечественной тест-системы для диагностики ЛУ ВИЧ при использовании на территориях с высокой генетической гетерогенностью вируса, в том числе для субтипов, редко встречающихся или не встречающихся на территории РФ;

разработанная база данных для хранения и обработки данных по надзору за распространенностью лекарственной устойчивостью ВИЧ зарегистрирована Федеральной службой по интеллектуальной собственности и доступна в открытом доступе.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди субтипов ВИЧ-1 в Северо-Западном федеральном округе доминируют субтип А, субсубтип А6 и рекомбинантные формы между субтипами А и В, в том числе CRF03_AB и URF, характерных для Калининградской области СЗФО.

2. В группе пациентов с неэффективностью АРТ варианты ВИЧ, обладающие лекарственной устойчивостью, выявлены в 84 % случаев, исследованные изоляты ВИЧ чаще всего обладали МЛУ к НИОТ и ННИОТ. Наиболее часто встречающимися мутациями лекарственной устойчивости к НИОТ являлись: M184V, L74V, K65R; к ННИОТ – G190S, K103N, K101E.

3. За период 2014 – 2019 гг. произошло более чем двукратное увеличение встречаемости первичной устойчивости ВИЧ к АРП до значений, необходимых для исследования на наличие фармакорезистентности вируса перед началом лечения. Вследствие этого за 2017 и 2018 годы произошло трехкратное увеличение доли случаев неэффективности первой линии АРТ среди всех случаев неэффективности.

4. Используемая методика диагностики ЛУ ВИЧ валидна при применении на территориях с высокой генетической гетерогенностью вируса, в том числе для субтипов, редко встречающихся на территории РФ, и позволила установить распространенность первичной лекарственной устойчивости ВИЧ в Гвинейской республике. Разработанная база данных позволила определить изменение генотипического и фенотипического профиля ВИЧ в СЗФО за период 2014 – 2019 гг., а также оценить распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса среди пациентов с неэффективной АРТ и лиц с впервые выявленной инфекцией.

Методология исследования

Исследовательская работа проводилась с соблюдением всех правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики. Теоретическая основа работы состояла в анализе фундаментальных и прикладных исследований. Для реализации цели и задач научной работы были применены стандартные вирусологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы, а также разработан оригинальный метод на основе ПЦР для идентификации вируса при низкой вирусной нагрузке в биологическом материале с последующим секвенированием полученных фрагментов. Выполнен сбор и систематизация материалов исследования, проведен статистический анализ данных, позволяющий сделать обоснованные выводы.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.3.8 «Клиническая лабораторная диагностика». Основные научные положения диссертации соответствуют п. 2, 11, 12 паспорта специальности 3.3.8 «Клиническая лабораторная диагностика».

Реализация результатов работы

В международную базу данных GenBank депонированы 535 нуклеотидных последовательностей под номерами: MK510016-MK510079, MN317576-MN317587, OL505461-OL505538, ON367567-ON367728, MT874291-MT874321, MT874310-MT874321, MT919401-MT919427.

Результаты настоящего исследования используются в лекциях, проводимых на кафедре микробиологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Получены свидетельства о регистрации Баз данных RU 2022621301; RU 2022622009.

Созданная база данных находится в открытом доступе: https://disk.yandex.ru/d/WbM_quh0__H3bQ

Личный вклад автора

Личное участие автора в проведенном исследовании состоит в самостоятельном планировании и проведении лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Автором разработаны базы данных. Автором написан текст диссертации и автореферата. Биоинформатическая обработка результатов секвенирования проводилась совместно с заведующей лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.б.н. Останковой Юлией Владимировной.

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликованы 42 печатных работы, в том числе 9 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и приравниваемых к ним.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего 193 источников, в том числе 61 отечественного и 132 зарубежных. Текст содержит 12 таблиц и 26 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Настоящее исследование включало в себя изучение изолятов ВИЧ, полученных от 663 пациентов, обращавшихся в Северо-Западный окружной центр СПИД для диагностики лекарственной устойчивости в период 2013 – 2019 гг.

Для изучения использовался ряд данных из анамнеза пациентов, а именно: пол, возраст, код контингента, факт наличия или отсутствия терапии, количество применявшихся схем АРТ, использованные для лечения препараты, степень приверженности к лечению.

Кроме того, было проведено исследование изолятов, полученных от 200 пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией в период 2015-2018 гг. Данные этих пациентов включали в себя пол и возраст.

Была также сформирована группа пациентов из Гвинеиской Республики. Для этого исследовали 2168 образцов плазмы крови, полученные от жителей Гвинеиской Республики – доноров крови и условно здоровых людей без подозрения на болезнь, вызванную вирусом Эбола, – в рамках плановой диспансеризации сотрудников ОК РУСАЛ и членов их семей. Обследованные лица отрицали инфицирование ВИЧ в анамнезе.

В качестве основного материала для исследования использовали плазму крови ВИЧ-инфицированных пациентов, содержащую РНК ВИЧ-1.

Все полученные материалы предварительно были исследованы на вирусную нагрузку в плазме крови с помощью набора «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» с порогом чувствительности 100 копий/мл. После чего образцы, в которых ВН превышала 1000 копий/мл, были использованы для выявления лекарственной устойчивости ВИЧ с использованием набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq».

В дальнейшем проводилась реакция циклического секвенирования согласно инструкции и учет результатов с помощью генетических анализаторов Applied Biosystems 3100 и Applied Biosystems 3500.

Для образцов, полученных из Гвинейской Республики, проводилось предварительное исследование на наличие антител и антигенов ВИЧ с использованием набора реагентов ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН согласно инструкции производителя (ООО «Диагностические системы», Россия). Для дальнейшего исследования использовались только положительные в ИФА образцы.

Сборка консенсусных последовательностей из фрагментов, полученных при секвенировании, проводилось в программном обеспечении «Unipro UGENE» (Okonechnikov K. et al, 2012). Консенсусная последовательность включала в себя участок гена полимеразы (*pol*) протяженностью 1302 нт., кодирующего протеазу (PR) и часть обратной транскриптазы (RT/OT) в области 2253–3554 нт., координаты даны для представленного в международной базе данных GenBank ВИЧ HXB2 (K03455.1). Полученные последовательности были исследованы на наличие мутаций лекарственной устойчивости в базе данных «Stanford University HIV drug resistance database» (США, Стэнфордский университет) (Rhee S. et al, 2003).

Генотипирование изолятов проводилось с помощью нескольких программ в режиме on-line: REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0, jPHMM.

Дополнительно проводилось изучение филогенетических отношений между генетическими последовательностями исследуемых изолятов и референсными изолятами из GenBank. Выравнивание исследуемых последовательностей и последовательностей референсных изолятов проводилось по принципу ClustalW.

Визуализация результатов филогенетического исследования проводилась в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции», который предполагает расчет длины ветвей с учетом генетической дистанции таким образом, чтобы общая длина всех ветвей на филогенетическом дереве была минимальной. Для проведения данного исследования было использовано программное обеспечение MEGA-X. При оценке достоверности филогенетических связей использовали многократную генерацию выборок методом Bootstrap для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева (Kumar S. et al, 2016).

Для анализа поиска устойчивых сочетаний мутаций ЛУ ВИЧ-1 был использован метод математического моделирования, в котором разнообразие встреченных мутаций было принято за совокупность множеств. В таком случае сочетания мутаций будут выглядеть, как пересечение отдельных множеств отдельных мутаций.

Визуализация модели осуществлялась с помощью построения линейных диаграмм (Gottfried B. A., 2015; Rodgers P. et al, 2015). В подобных моделях множества показаны в виде линий, пересекающих диаграмму по горизонтали, а пересечения множеств показаны в виде перекрытия линий по вертикали. Вертикальные линии отображают каждый встреченный профиль фармакорезистентности, которые автоматически сортируются таким образом, чтобы наиболее схожие профили оказывались друг рядом с другом, представляя множества мутаций в виде максимально возможно длинных непрерывных линий.

Разработка базы данных проводилась с помощью построения таблиц, форм, запросов и отчетов средствами Microsoft Access. В основу схемы данных (рис. 6) был положен принцип реляционной базы со связями между объектами один к одному и один ко многим. Благодаря связям происходит каскадное обновление данных в отдельных объектах базы. В качестве интерфейса для работы с данными выбраны такие объекты, как формы.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ GraphPad Prism v 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Статистическую значимость различий между количественными показателями оценивали с использованием параметрических (t-теста Стьюдента и однофакторного анализа вариаций (ANOVA) и непараметрических тестов (U-тест Манна-Уитни и ANOVA Краскела-Уолисса). Сравнение категориальных данных проводили с использованием критерия «хи-квадрат» (χ^2). В случае неустойчивости данного критерия применяли двусторонний точный тест Фишера. Принятая в настоящей работе величина уровня значимости (P) составляла 0,05 (или 5,0 %).

Результаты собственных исследований

Результаты исследования генетического разнообразия ВИЧ-1 и встречаемости мутаций лекарственной устойчивости у пациентов с неэффективностью АРТ

Возникновению лекарственной устойчивостью у обследованных пациентов предшествовало от 1 до 5 различных схем АРТ ($M_0 = 3$) (рис.1).

Схема первой линии АРТ, как правило, включала в себя два НИОТ в сочетании с одним ННИОТ. Значительно реже встречались схемы с ИП в составе. Наиболее часто встречающимся препаратом группы НИОТ являлся ЗТС (98 %), назначавшийся, в большинстве случаев, с TDF (57 %) или AZT (38 %). Остальные препараты данной группы встречались лишь в единичных случаях, чаще не в первой линии терапии. Из препаратов группы ННИОТ в подавляющем большинстве случаев использовался EFV (91 %), кроме него в единичных случаях использовались NVP (2 %) и RPV (1 %).

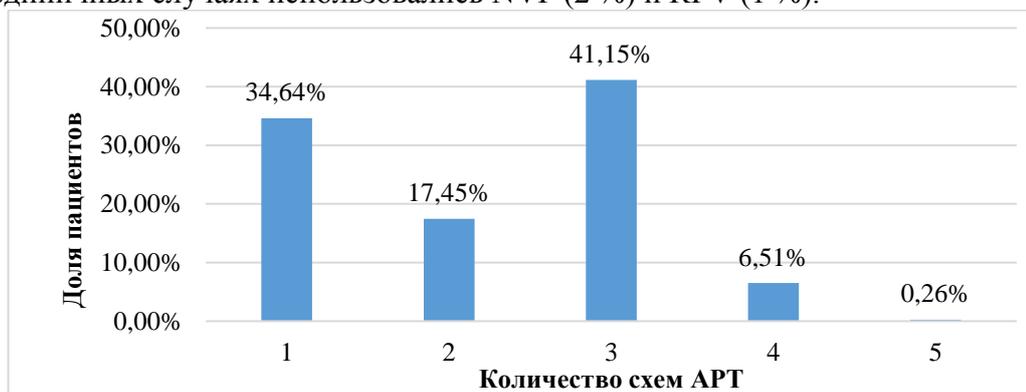


Рисунок 1. Распределение количества пациентов в зависимости от количества схем АРТ.

Из 658 образцов вирусная нагрузка, достаточная для исследования, была выявлена у 458 пациентов, генетические последовательности изолятов, полученных от них, они были успешно секвенированы и генотипированы. Наиболее представленные регионы: Ленинградская область (N = 262); Калининградская область (N = 196); Архангельская область (N = 97).

На основании двух методов типирования, филогенетического анализа и анализа последовательностей с использованием программы REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0, что позволило более точно оценить распределение субтипов ВИЧ-1. Доминирующим является субтип А, суб-субтип А6 (таблица 1). При этом, если анализировать генетическое разнообразие вируса в регионах, то в большинстве регионов доминирующим является субтип А6, кроме Калининградской области, где 74 % изолятов принадлежат к рекомбинантным формам между А и В субтипами.

Таблица 1. Встречаемость субтипов ВИЧ-1 в изученных изолятах.

Субтип	Количество изолятов	Процент	ДИ
A6	326	72,20%	67,83 % - 75,64 %
B	20	4,30%	2.46 % - 5.96 %
G	2	0,40%	0.05 - 1,35 %
K	1	0,20%	0 - 1,04 %
J	1	0,20%	0 - 1,04 %
CRF02_AG	4	0,80%	0,20 % - 1.91 %
CRF03_AB	60	13,10%	10,38 % - 16,30 %
CRF03_AB+A	44	9,60%	7,21 % - 12,39 %

Из полученных последовательностей хотя бы с одной значимой мутацией лекарственной устойчивости оказалось – 383 (84 %). В подавляющем большинстве исследованных изолятов (61 %) встречались мутации ЛУ к препаратам классов НИОТ+ННИОТ, в 4 % случаев встречены МЛУ сразу к трем классам препаратов (таблица 2).

Таблица 2. Встречаемость лекарственной устойчивости ВИЧ к разным классам препаратов в разные годы исследования

	нет ЛУ	ИП	НИОТ	ННИОТ	ИП+ НИОТ	ИП+ ННИОТ	НИОТ+ ННИОТ	ИП+ НИОТ+ ННИОТ
2013	17%	2%	4%	1%	10%	5%	59%	2%
2014	25%	5%	7%	3%	7%	3%	46%	5%
2015	29%	5%	5%	0%	5%	5%	39%	11%
2016	6%	3%	5%	1%	10%	0%	71%	3%
2017	9%	3%	4%	1%	11%	4%	62%	5%
2018	16%	4%	2%	1%	3%	1%	70%	2%
всего	16%	4%	4%	1%	8%	3%	61%	4%

Всего нами было встречено 153 различных мутаций (НИОТ – 75; ННИОТ – 65; ИП - 13). Более, чем в половине случаев, была выявлена мутация M184V, в четверти случаев – мутация G190S, остальные мутации встречались менее, чем в 20 % случаев (таблица 3).

Таблица 3. Наиболее часто встречающиеся мутации ЛУ ВИЧ-1 у пациентов с неэффективностью АРТ

Мутация	Число изолятов	Встречаемость	95% ДИ
M184V	220	57,4%	52,32% - 62,45%
G190S	102	26,6%	22,27% - 31,36%
K103N	76	19,8%	15,97% - 24,19%
K101E	74	19,3%	15,49% - 23,64%
L74V	54	14,1%	10,77% - 17,99%
A62V	50	13,1%	9,85% - 16,85%
K65R	47	12,3%	9,16% - 15,98%
Y181C	46	12,0%	8,93% - 15,69%
D67N	33	8,6%	6,01% - 11,89%

Анализ наличия устойчивых сочетаний мутаций в мутационных профилях исследованных изолятов показал наличие паттернов устойчивости к тимидиновым аналогам ингибиторов обратной транскриптазы: TAM-1 (4 % ДИ 2,46 % - 5,96%) и TAM-2 (2 % ДИ 1,30 % – 4,13 %), а также устойчивого сочетания не TAM мутаций - L74V+Y115F (9 % ДИ 6,55 % - 11,55 %). Кроме того были выявлены устойчивые сочетания мутаций, ассоциированных с ЛУ к ННИОТ: K101E+G190S (18 % ДИ 14,67 % - 21,34 %); K103N (18 % ДИ 15,01 % - 21,74 %); K103N+V108I (8 % ДИ 6,06 % - 10,92 %).

Большая часть пациентов, обращавшихся в СЗФО ЦСПИД для диагностики лекарственной устойчивости ВИЧ, имели низкий (51,67 %) и суб-оптимальный (43,20 %) уровни приверженности к лечению.

График взаимосвязи между приверженностью и резистентностью имеет вид куполообразной кривой, для экстраполяции данных исследования на генеральную совокупность при этом использовалась аппроксимация с помощью квадратичного полинома, так как данная методика показала наибольшую степень достоверности ($R^2 = 1$ при 95% ДИ) (рис. 2).

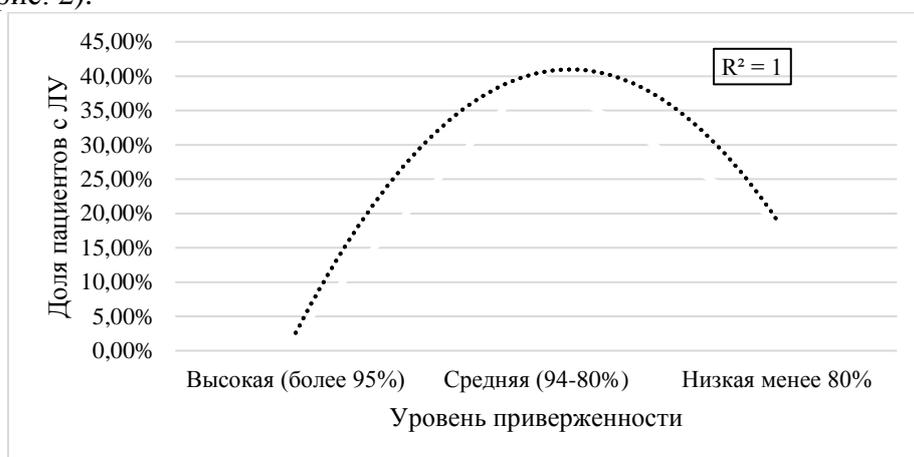


Рисунок 2 Связь между наличием лекарственной устойчивости и уровнем приверженности.

От пациентов с неэффективностью первой линии АРТ были получены 133 изолята, из них 69 не достигали вирусологической эффективности вовсе, а 64 достигали подавления ВН, но сталкивались с неэффективностью терапии. Почти половина изолятов от пациентов с неэффективностью первой линии АРТ получена за 2017 и 2018 годы (рис. 3), при этом 58 пациентов, не достигавших подавления ВН, обратились в 2018 году.

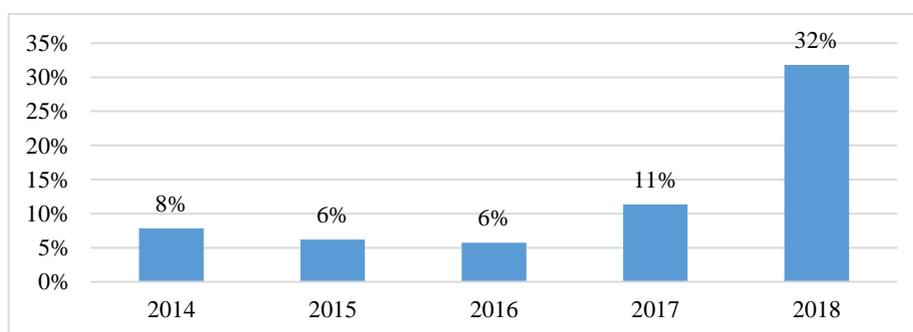


Рисунок 3. Увеличение доли пациентов с неэффективностью первой линии АРТ среди пациентов с неэффективностью терапии в СЗФО.

В 82 % случаев была встречена хотя бы одна мутация ЛУ (78 % - НИОТ, 68 % ННИОТ, 8 % - ИП) (рис. 4). Наиболее часто встречаются мутации: M184V (53 %); G90S (37 %); K101E (24 %); K65R (23 %); A62V (15 %); Y181C (14 %); K103N (11 %); E138A (11 %); L74V (9 %).

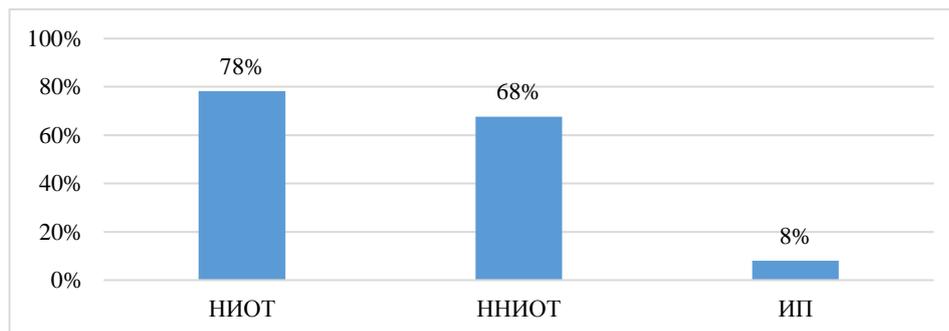


Рисунок 4. Распределение устойчивости к разным классам препаратов у пациентов с неэффективностью первой линии АРТ.

Результаты исследования генетического разнообразия и встречаемости мутаций лекарственной устойчивости у пациентов без опыта АРТ

Было обнаружено, что вирус от 11 пациентов (6 %) обладает мутациями, ассоциированными с устойчивостью к АРП (рис. 5). У четырех пациентов были обнаружены мутации устойчивости к тимидиновым аналогам. У одного субъекта был вирус с множественными мутациями устойчивости, включая ТАМ в сочетании с мутациями устойчивости к ННИОТ (V106M, G190S). У 7 пациентов была выявлена мутация А62V, при этом в 5 случаях она выявлялась в сочетании с мутациями резистентности к ННИОТ. Аминокислотная замена А62V в гене обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1 является важной адаптивной мутацией в вирусах с множественной лекарственной устойчивостью, для вирусов суб-субтипа А6 она является частым полиморфным вариантом, но при этом нельзя исключать того, что она влияет на частоту возникновения новых мутаций ЛУ [16].

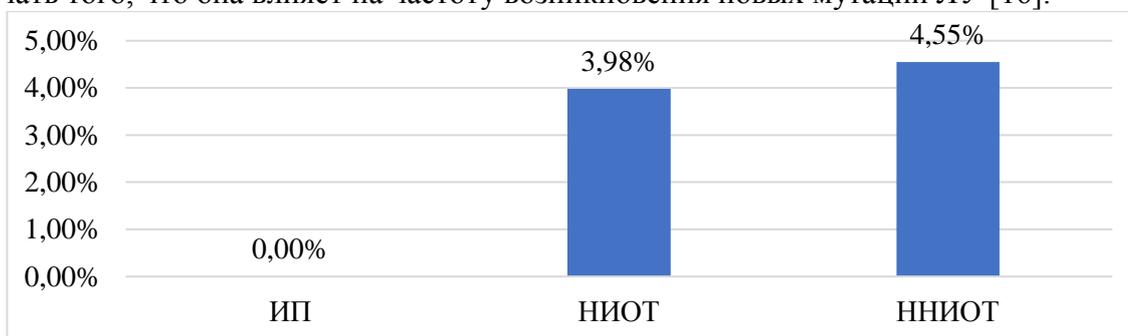


Рисунок 5. Встречаемость ЛУ ВИЧ к разным классам препаратов у пациентов без опыта АРТ

Мутации, вызывающие резистентность к ННИОТ, наблюдались у 8 человек (5%). Было обнаружено, что четыре из них содержат мутации, связанные с устойчивостью к рилпивирину и этравирину.

Поскольку в группе пациентов с первичной ЛУ было обнаружено абсолютное преобладание суб-субтипа А6 (рис. 6), не представлялось возможным в полной мере изучить особенности устойчивых вариантов вируса других субтипов у пациентов без опыта АРТ. Для сравнительного анализа молекулярно-генетических характеристик вируса, принадлежащего к субтипам, редко встречающимся на территории РФ, было проведено исследование штаммов, полученных из Гвинейской республики.

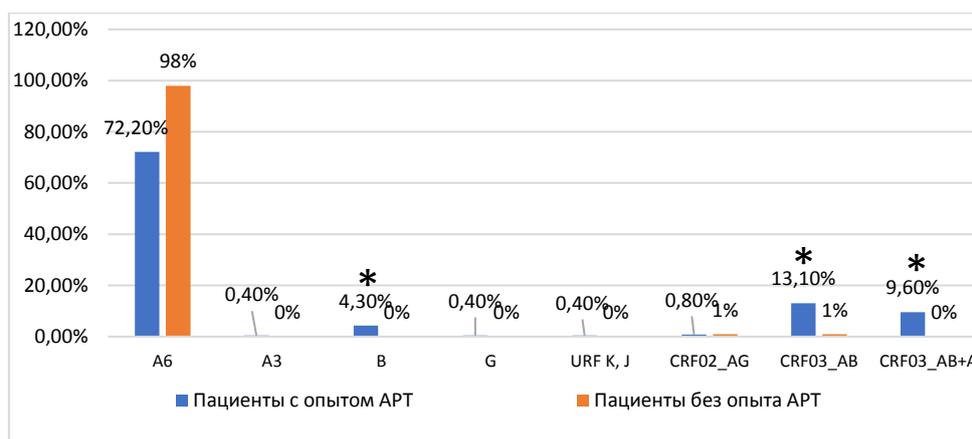


Рисунок 6. Анализ распределения субтипов ВИЧ у пациентов, получавших и не получавших лечение.

Всего 2168 образцов сыворотки крови от условно здоровых людей из Гвинеи были обследованы на наличие серологических маркеров (АГ+АТ) ВИЧ. Положительный результат был получен у 239 человек, что составило 11,02 % от полной выборки. Детектируемое количество РНК ВИЧ в плазме крови (>500 копий/мл) удалось выявить у 58 человек, что составило 24,27 % пациентов серопозитивной группы (2,68 % от общей группы). В последствии, был успешно генотипирован был ВИЧ из всех 58 образцов. Полученный результат подтверждает возможность применения используемого диагностического набора на разных геновариантах ВИЧ, в том числе отличных от циркулирующих в России субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1.

Генотипированные образцы были получены от пациентов в возрасте от 18 до 54 лет. Медианный возраст составил 36 лет. Преобладает возрастная группа 31-45 лет (62,07 %). Наиболее представлены в выборке мужчины, они составляют 63,79 % от исследуемой группы.

После проведения секвенирования удалось получить последовательности генома ВИЧ, кодирующие протеазу и участок обратной транскриптазы, от всех пациентов с детектируемой ВН.

Проведенный анализ позволил выявить следующее соотношение субтипов ВИЧ-1. Преобладает в исследуемой группе циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ CRF02_AG (41,9 %) по сравнению с А1 (29,1 %); ВИЧ А3 (12,9 %); рекомбинантом между А1 и G, но не принадлежащим к CRF02_AG (12,9 %); и генотипом G, выявленном в одном случае (3,2 %).

По результатам анализа у 25 % пациентов встречена хотя бы одна значимая мутация, приводящая непосредственно к лекарственной устойчивости ВИЧ для их субтипа вируса (таблица 4). Встреченные мутации вызывают резистентность к нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. В одном случае были встречены одновременно несколько мутаций, вызывающих устойчивость к препаратам обоих классов. Среди них мутация K65R, вызывающая устойчивость к большинству НИОТ, совместно с мутацией S68G, которая частично восстанавливает дефект репликации, связанный с K65R. Мажорных мутаций устойчивости к ингибиторам протеазы встречено не было.

Результаты проведенного анализа указывают на успешное выявление не только субтипов, характерных для территории Российской Федерации, но и редких для нее, в том числе субтипа G и циркулирующей рекомбинантной формы CRF02_AG. Обращает на себя внимание успешное выявление с помощью используемой тест-системы мутаций, характерных для редких субтипов (K20I), а также редко встречающихся мутаций (K20V, V179T, K238E), эффект которых недостаточно описан в литературе на данный момент.

Таблица 4. Встречаемость мутаций лекарственной устойчивости у пациентов без опыта АРТ из Гвинейской республики

Мутации	Встречаемость
Мутации устойчивости к ИП	
K20I	67.24%
L10I/V	29.31%
L10F	1.72%
M46L	1.72%
K20V	3.45%
N88H	3.45%
V179I	18.96%
Мутации устойчивости к ННИОТ	
S68G	10.34%
V106I	5.17%
K103N	3.45%
E138Q	3.45%
K103E/Q	1.72%
E138A	1.72%
V179T	1.72%
Y181Deletion	1.72%
K238E/T	3.44%
Мутации устойчивости к НИОТ	
M41L	3.45%
K65R(S68G)	1.72%
T74S	1.72%

Полученный результат подтверждает возможность применения используемого диагностического набора на разных геновариантах ВИЧ, в том числе отличных от циркулирующих в России субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1.

Результаты разработки базы для хранения и обработки данных мониторинга распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1.

На сегодняшний день, в связи с повышающимся распространением антиретровирусной терапии, увеличивается встречаемость вариантов ВИЧ, обладающих лекарственной устойчивостью. Это неизбежно приведет к увеличению количества исследований на резистентность ВИЧ к АРП и числа организаций, выполняющих исследование. В связи с этим, увеличивается потребность в программном обеспечении, позволяющем оптимизировать работу с массивом данных о пациентах, проходящих обследование, и о выявленных вариантах ВИЧ, обладающих лекарственной устойчивостью.

Кроме потребности в анализе фармакорезистентных изолятов ВИЧ, все более актуальным становится изучение эпидемических процессов на территории России и проведение эпидемиологических исследований случаев инфицирование с поиском возможных источников инфекции с применением методов молекулярной эпидемиологии.

Схожие задачи в России решают две основные базы, содержащие информацию о распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ. Федеральный регистр лиц, инфицированных ВИЧ, кроме прочего, содержит сведения об имеющихся у пациента случаях неэффективности лечения, смене схем лечения и о результатах исследования на лекарственную устойчивость. Так же существует Российская база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам, содержащая деперсонифицированную информации о результатах секвенирования ВИЧ с целью проведения эпидемиологического надзора за резистентностью ВИЧ на территории РФ.

Тем не менее, необходимо внедрение в работу ЛПУ системы, частично обладающей возможностями обеих названных баз данных: способную быть использованной в качестве лабораторной информационной системы и содержать информацию о пациентах, прошедших исследование на наличие фармакорезистентных вариантов ВИЧ, с возможностью обмена данной информацией между ЛПУ. Так же такая информационная система должна предоставлять возможность собирать данные о геновариантах ВИЧ с привязкой к территориям, на которых они были выявлены.

Разработанная в рамках данной работы база данных (БД) предназначена для регистрации и хранения сведений о пациентах, прошедших обследование на наличие ЛУ ВИЧ. БД может применяться для регистрации случаев неэффективности АРТ и результатов исследований на наличие вариантов ВИЧ, обладающих лекарственной устойчивостью. Использование базы позволит отслеживать случаи многократной неэффективности, сведения БД могут быть использованы для проведения исследований молекулярно-генетических особенностей ВИЧ, а также эпидемиологических исследований. БД содержит анамнестические сведения о пациентах: пол, возраст, регион проживания, схемы АРТ – а также результаты обследования пациентов на наличие мутаций ВИЧ, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к антиретровирусным препаратам.

Для формирования базы данных были использованы результаты исследований, полученные в ходе работы Северо-Западного окружного Центра по борьбе со СПИД (СЗОЦ СПИД) в ходе проведения исследований на наличие устойчивых к АРП вариантов ВИЧ у пациентов с выявленной вирусологической неэффективностью АРТ. База сформирована по типу реляционной БД с помощью инструментов Microsoft Office Access (рис. 7). В БД были включены анамнестические данные пациента, представленные в направлении на исследование, а также результаты самого исследования на резистентность ВИЧ.

База данных (БД) содержит сведения о пациентах: фамилию, имя, отчество, дату рождения, пол, регион проживания, дату первого иммунного блота, вирусную нагрузку, степень приверженности к АРТ, стадию и фазу болезни, получаемые АРП, а так же сведения о выявленных мутациях результатах лекарственной устойчивости.

«База данных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в СЗФО» представлена в формате Microsoft Access. В ее составе ряд таблиц: основная – «Пациенты» и вспомогательные – «ИП», «НИОТ», «ННИОТ», «Мутации устойчивости к ИП», «Мутации устойчивости к НИОТ», «Мутации устойчивости к ННИОТ». Кроме таблиц, для ввода данных разработан ряд форм: основная – «Пациенты» и вспомогательные – «Препараты», «Добавление мутации устойчивости к ННИОТ», «Добавление мутации устойчивости к НИОТ», «Добавление мутации устойчивости к ИП». Для упрощения работы с БД внедрены ряд запросов: «ИП Запрос», «Мутации устойчивости к ИП Запрос», «Мутации устойчивости к НИОТ Запрос», НИОТ Запрос, «ННИОТ Запрос», «Основной_Поиск», «Пациенты Запрос», «Подсчет по полу», «Подсчет по степени приверженности» - и макрос «Поиск».

Основная таблица «Пациенты». Состоит из 23 столбцов: Идентификатор (содержит порядковый номер), Дата рождения, ФИО, Шифр (ключевое поле, уникальный идентификатор пациента), пол, Вирусная нагрузка, Степень приверженности, Стадия, Фаза, Дата 1 ИБ, Регион, Дата исследования на резистентность, ИП 1-5, НИОТ 1-5, ННИОТ 1-5. Дополняет ее таблица «Мутации устойчивости», включающая в себя данные о выявленных у пациента мутаций, ассоциированных с устойчивостью к АРП.

Остальные таблицы играют вспомогательную роль – они содержат словари для полей основной таблицы и позволяют быстрее заполнять сведения о пациентах, используя стандартизированные формулировки. Дополняют вспомогательные таблицы позволяют запросы: «ИП Запрос», «Мутации устойчивости к ИП Запрос», «Мутации устойчивости к НИОТ Запрос», НИОТ Запрос, «ННИОТ Запрос».

Для ввода данных в базу используется главная форма – «Пациенты» (рис. 8), содержащая в себе поля для ввода анамнестических данных, кроме сведений об АРТ – эти

поля содержит вспомогательная форма «Препараты», включенная в форме «Пациенты в дополнительную вкладку «Получаемые препараты АРТ». Результаты исследования на лекарственную устойчивость ВИЧ содержатся во вспомогательной форме «Мутации устойчивости», расположенной во вкладке «Выявленные мутации устойчивости» основной формы. Остальные формы служат в качестве интерфейса для запросов.

С использованием основной формы «Пациенты» можно последовательно ввести персональные и анамнестические данные пациента. Сохранение данные от записи к записи происходит автоматически. Вкладки внутри основной формы позволяют перейти во вспомогательные формы, в которых, после проведения исследования, необходимо внести их результаты. С помощью формы «Мутации», посвященной результатам проведенного исследования, можно сформировать бланк результата для выдачи его врачу.

С помощью вспомогательного запроса поиска можно осуществлять поиск по базе данных и дополнять записи пациентов новыми сведениями о лекарственной устойчивости ВИЧ, если данный пациент обращался неоднократно. С помощью фильтрации в таблицах, можно исследовать записи, подходящие по определенному параметру.

После внесения данных в форму, можно получить отчет, экспортируемый в формат базы в МО Excel (рис.9), содержащую сведения о распространности мутаций, ассоциированных с резистентностью к АРП, среди изолятов ВИЧ, выделенных в Северо-Западном Федеральном округе (СЗФО).

Таблица базы данных «Профили мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, в изолятах ВИЧ из Северо-Западного Федерального округа» представлена в формате Microsoft Excel (7 вкладок по 100, 8, 147, 80, 141, 68, 144 строки, 9 и 2 колонки, соответственно).

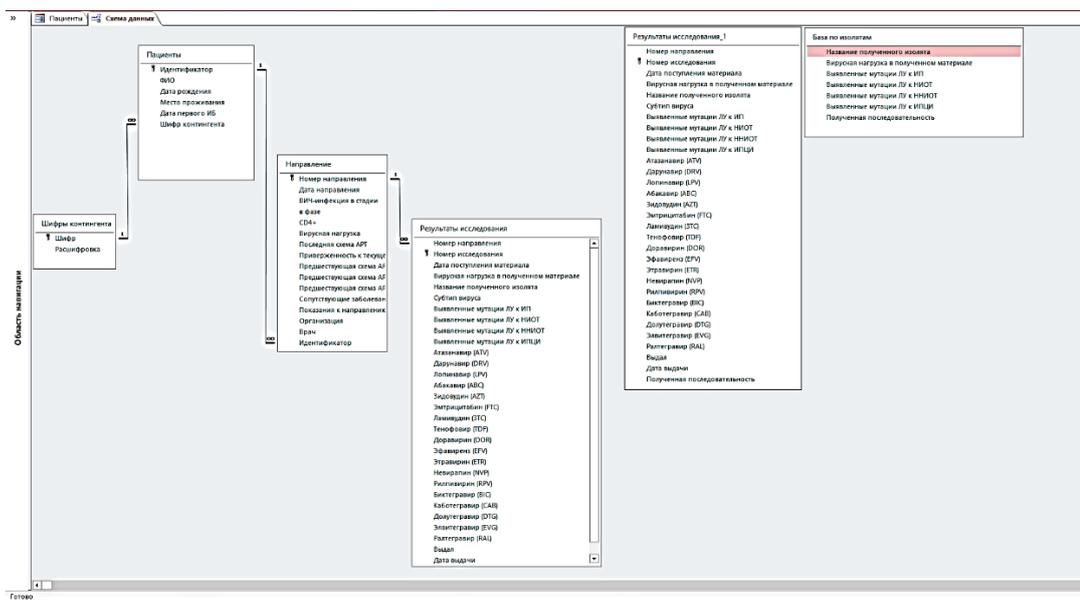


Рисунок 7. Схема взаимосвязи данных в БД МО Access.

База данных пациентов с неэффективностью АРТ

Идентификатор: [Поиск по ФИО] Введите ФИО

Идентификатор: Х0А150710

Дата рождения: XX.XX.XXXX Место проживания: Ххххххх

Дата первого ИБ: 15.07.2010 Шифр континента: 102

Направления

Идентификатор: Номер направления: Дата направления

ВИЧ-инфекция в стадии: 4Б в фазе: прогрессирующая

CD4+: 334 Вирусная нагрузка (кол/мл): 5477

Текущая схема АРТ: TDF+3TC+ATZ Приверженность к текущей схеме (%): 70-95

Предшествующая схема АРТ 1: AZT+3TC+LPV/r

Предшествующая схема АРТ 2: ABC+3TC+ATN

Предшествующая схема АРТ 3: ABC+3TC+ETR

Сопутствующие заболевания (по МКБ-10): B18.2

Показания к направлению: вирусологическая неэффективность арт

Организация: ГБУЗ ВОЦ СПИД Врач: Рогова О.Л.

Рисунок 8. Форма для внесения данных в базу.

Название полученного изолята	Вирусная нагрузка в полученном материале	Выявленные мутации ЛУ к ИП	Выявленные мутации ЛУ к НИОТ	Выявленные мутации ЛУ к ННИОТ	Выявленные мутации ЛУ к ИПЦИ	Полученная последовательность
HIV1_2022_13_VG	1940267		K70EG	K101E, G190S		>HIV1_2022_13_bag_p01_VG GGGAAGAGATGACCCCTCCCTBAACACAGGACABAAAGA GAGGAGAGAGATGACCCCTCCCTAAATTCCTCAAAATCTCT 5HIV1_2022_12_bag_p01_VG TTTTAGGGAGACTTGGCCCTCCAGCAAAAGGAAGGCCAGGG AATTTCTCAGAGCAGACAGAACCATCAGCCGACGACG >HIV1_2022_11_bag_p01_VG GGCTATTTTTAGGGAGACTTGGCCCTCCACAAAGGGA GGCCAGGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACGACGACG >HIV1_2022_10_bag_p01_VG AATTTTATGGGAGAAATTTGGCCCTTAGCAAGGGAGGCC AGGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCATCAGCCGACG TTAGGGAGAAATTTGGCCCTCCCAAGGGAGGCCAGGAA ATTTCTCAGAGCAGACAGAACCATCAGCCGACGACGACG >HIV1_2022_9_bag_p01_VG CAGGAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCATCAGCCGACG CAGGAGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCATCAGCCCTC GACAGGCTATTTTTAGGGAGAAATTTGGCCCTCCAGCAAA GGGAGGCCAGGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCAT >HIV1_2022_8_bag_p01_VG GACAGGCTATTTTTAGGGAGAAATTTGGCCCTCCAGCAAA GGGAGGCCAGGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCAT >HIV1_2022_7_bag_p01_VG CAGGGTTATTTTTAGGGAGAAATTTGGCCCTCCAGCAAGGG AAGGCTAGGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCATCA >HIV1_2022_6_bag_p01_VG TAGACAGGCTAATTTTATGGGAGAAATTTGGCCCTCCAGCA AAGGAGGCTAGGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCAT >HIV1_2022_5_bag_p01_VG TTAGACAGGCTAATTTTATGGGAGAAATTTGGCCCTCCAGCA AAGGAGGCTAGGAAATTTCTCAGAGCAGACAGAACCAT >HIV1_2022_4_bag_p01_VG GATGACCCCTCCAGCAAGAACAGCAAGAGCAGGGAA CAGAGGCTTCTAATTTCTCAAAATCTCTTTGGCAGC >HIV1_2022_3_bag_p01_VG TTCTCAGAGCAGACAGAACCATCAGCCGACGACGAGCA AATCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCAGTCTCTCTTGA
HIV1_2022_12_VG	85731		L74V, Y115F, M184V	K101E, Y181C, G190S, H221Y		
HIV1_2022_11_VG	154365		D67N, K70R, T215I, K219E	V108I, Y181C, G190A	E157Q	
HIV1_2022_10_VG	346915					
HIV1_2022_9_VG	16382		K65R, Y115F, M184V	K103N, Y181C, G190A, K238T		
HIV1_2022_8_VG	28659		K65R	Y181C, G190S		
HIV1_2022_7_VG	49498			K103N, E138G, P225H	E157Q	
HIV1_2022_6_VG	0			G190S		
HIV1_2022_5_VG	21662		K65R, V75I, M184V	E138Q, V179E, Y181C		
HIV1_2022_4_VG	55802		A62V, K65R, M184V	K101P, K103S	E157Q	
HIV1_2022_3_VG	127486			K103N	E157Q	
HIV1_2022_2_VG	1321			K238T	E157Q	
HIV1_2022_1_VG	6018 150L		L74V, Y115F, M184V, K219E	L100I, K103N		

Рисунок 9. Данные об изолятах ВИЧ из базы данных, выгруженные в базу Excel.

База данных, выгруженная в Excel, позволяет отслеживать глобальное разнообразие и региональных особенностей изолятов ВИЧ, для научных исследований в области эпидемиологии, при генетическом анализе и в системе эпидемиологического надзора.

Ее основу составляют генетические последовательности с присвоенными названиями, несущими информацию о дате получения последовательности и регионе, откуда был получен образец, содержащий исследованный вирус. Так же, база содержит информацию о мутациях ЛУ, содержащихся в каждом изоляте, и о субтипе вируса. С помощью фильтрации можно получить сведения об изолятах, полученных за определенное время или в определенной местности, что позволяет использовать содержащиеся в базе последовательности в качестве референсных при проведении эпидемиологических исследований.

Поскольку данные во второй базе данных обезличены, их можно использовать неограниченно в научных целях, ЛПУ смогут предоставлять другим организациям сведения о распространенности мутаций лекарственной устойчивости по запросу.

Выводы

1. Изучена структура мутаций, ассоциированных с ЛУ ВИЧ у пациентов с неэффективностью АРТ в СЗФО. В подавляющем большинстве исследованных изолятов (61 %) встречались мутации ЛУ к препаратам классов НИОТ+ННИОТ, мутации, ассоциированные с устойчивостью к ингибиторам протеазы встречены лишь в 6 % случаев. В 4 % случаев встречены МЛУ сразу к трем классам препаратов. Наиболее часто встречающимися мутациями лекарственной устойчивости к НИОТ являлись: M184V – 57,4 %; L74V – 14,1 %; K65R – 13,3 %; к ННИОТ – G190S – 26,6 %; K103N – 19,8 %; K101E – 19,3 %.

2. В результате изучения структуры и разнообразия МЛУ ВИЧ у пациентов без опыта терапии отмечается тенденция увеличения встречаемости первичной ЛУ ВИЧ. Высокая распространенность передающейся лекарственной устойчивости указывает на необходимость проведения исследования на наличие устойчивых вариантов ВИЧ до начала терапии. Сравнительный анализ результатов исследования на наличие лекарственной устойчивости у пациентов из Гвинеиской Республики без опыта АРТ указывает на преобладание роли передающейся лекарственной устойчивости в формировании группы пациентов с первичной ЛУ ВИЧ.

3. Основным фактором, влияющим на формирование мутационного профиля у пациентов с неэффективностью АРТ являются препараты последней использовавшейся схемы АРТ, однако значительное влияние на формирование мутаций оказывает субтип вируса, в связи с наличием у некоторых субтипов и рекомбинантных форм часто встречающихся полиморфных мутаций, влияющих на устойчивость вируса к АРП.

4. На протяжении всех лет проведения исследования преобладали мутации лекарственной устойчивости к НИОТ к ННИОТ. Наиболее распространенными мутациями являлись M184V, G180S, K103N. Тем не менее, за изученный период встречаемость мутаций ЛУ к ингибиторам протеазы и аналогам тимидина сократилась 2 и 1,5 раза соответственно.

5. Зарегистрированная для применения на территории Российской Федерации отечественная тест-система для диагностики ЛУ ВИЧ валидна при выявлении мутаций лекарственной устойчивости к АРП на территориях с высокой генетической гетерогенностью вируса, в том числе для субтипов, редко встречающихся или не встречающихся на территории РФ, и позволила установить распространенность первичной лекарственной устойчивости ВИЧ в Гвинеиской республике.

6. Разработанная база данных результатов лабораторных исследований успешно применена в работе лаборатории база данных пациентов с неэффективностью АРТ. БД позволила систематизировать имеющиеся сведения о пациентах, обратившихся для диагностики лекарственной устойчивости ВИЧ, и повысить эффективность обработки и анализа массива данных.

Практические рекомендации

1. Лечащим врачам, врачам инфекционистам рекомендуется обследовать на наличие фармакорезистентных вариантов вируса всех пациентов с неэффективностью АРТ, особое внимание необходимо уделить пациентам с субоптимальным уровнем приверженности.

2. Лечащим врачам, врачам-инфекционистам рекомендуется назначать исследование на наличие у пациента вариантов ВИЧ, обладающих лекарственной устойчивостью, перед назначением АРТ.

3. Специалистам КДЛ, лечащим врачам, врачам-инфекционистам рекомендуется использовать современное программное обеспечение для оптимизации работы с данными об изолятах ВИЧ, обладающих лекарственной устойчивостью.

Перспектива дальнейшей разработки темы

Полученные данные дополняют сведения о генетическом разнообразии ВИЧ в России и мире и позволяют оценить частоту встречаемости лекарственной устойчивости вируса на территориях с разной генетической структурой вирусной популяции. Разработанная база данных позволяет усовершенствовать алгоритмы диагностики лекарственной устойчивости ВИЧ. В качестве перспектив разработки темы можно рассматривать дальнейшее совершенствование подходов к изучению генетической структуры вирусной популяции ВИЧ-1, а также улучшение существующих алгоритмов диагностики ЛУ ВИЧ в регионах России.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований:

1. Щемелев А. Н. Характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека среди пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ из Гвинеической Республики / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева, Т.А.L. Balde, А. В. Семенов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 3. – С. 118-124. – DOI 10.21055/0370-1069-2019-3-118-124.
2. Останкова Ю.В. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области / Ю.В. Останкова, А.Н. Щемелев, Е.Б. Зуева, М.А. Чурина, Д.Э. Валутите, А.В. Семенов // ВИЧ инфекция и иммуносупрессии. – 2019. – Том 11. № 4. – с. 65-72. <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-79-90>
3. T. Ingabire. Primary HIV drug resistance among newly HIV type-1 diagnosed patients in St. Petersburg / T. Ingabire, A. V. Semenov, E. V. Esaulenko, E. B. Zueva, A. N. Schemelev // HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. – 2021. – Vol. 13. – No 1. – P. 70-79. – DOI 10.22328/2077-9828-2021-13-1-70-79.
4. Т.А.L. Balde. Сравнительный анализ вертикального риска передачи некоторых гемоконтактных инфекций в Гвинеической Республике / Т. А. L. Balde, S. Boumbaly, Е. Н. Серикова, Д.Э. Валутите, А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, Е.Б. Зуева, А.В. Семенов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 1. – С. 87-94. – DOI 10.21055/0370-1069-2021-1-87-94.
5. Щемелев А. Н. Генетическое разнообразие и мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Ленинградской области / А. Н. Щемелев, А.В. Семенов, Ю.В. Останкова, Е.Б. Зуева, Д.Э. Валутите, Д.А. Семенова, В.С. Давыденко, А.А. Тотолян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99. – № 1. – С. 28-37. – DOI 10.36233/0372-9311-216.
6. Shchemelev, A.N. Detection of Patient HIV-1 Drug Resistance Mutations in Russia's Northwestern Federal District in Patients with Treatment Failure. / A.N. Shchemelev, Y.V. Ostankova, E.B. Zueva, A.V. Semenov, A.A. Totolian // Diagnostics. – 2022. – 12. – С. 1821. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12081821>
7. Щемелев А. Н. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской области / А.Н. Щемелев, А.В. Семенов, Ю.В. Останкова, Е.В. Найденова, Е.Б. Зуева, Д.Э. Валутите, М.А. Чурина, П.А. Виролайнен, А.А. Тотолян // Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67. – № 4. – С. 310-321. – DOI 10.36233/0507-4088-119.
8. Останкова Ю.В. Определение тропизма ВИЧ у лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области / Ю.В. Останкова, В.С. Давыденко, А.Н. Щемелев, Е.Б. Зуева, П.А. Виролайнен, Арег А. Тотолян // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – №3. – С.120–128. –DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-120-128.
9. Shchemelev, A. N. Prevalence of drug resistant HIV-1 forms in patients without any history of antiretroviral therapy in the Republic of Guinea. / A. N. Shchemelev, S. Boumbaly, Y. V. Ostankova, E. B. Zueva, A. V. Semenov, A. A. Totolian // J Med Virol. – 2022 - 95:e28184. doi:10.1002/jmv.28184

Тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов:

1. Shchemelev, A. N., The prevalence of HIV-1 drug resistance mutations in patients with low adherence to antiretroviral therapy in the Leningrad region / A. N. Shchemelev, Yu. V. Ostankova, D. E. Valutite // Abstracts of international conference. Russian Journal of Infection and immunity. – Saint Petersburg – 2018 – С. 592 doi 10.15789/2220-7619-2018-4-7.13

2. Щемелев, А. Н., Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека-1 на территории Северо-Западного Федерального Округа в 2016-2018 годах. / А. Н. Щемелев, А. В. Семенов, Ю. В. Останкова // Материалы Международной научно-практической конференции Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции – Санкт-Петербург –2019 - с. 402-403
3. Щемелев, А.Н., Встречаемость маркеров энтеральных и парентеральных гепатитов среди населения Гвинейской Республики / А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, А.В. Семёнов, Е.В. Эсауленко // Материалы научно-практических конференций в рамках V российского конгресса лабораторной медицины. – Москва - 2019. - С. 161-162.
4. Щемелев, А.Н., Распространенность энтеральных и парентеральных гепатитов в регионах Гвинейской Республики. / А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, А.В. Семёнов, Е.В. Эсауленко // Материалы научно-практических конференций в рамках V российского конгресса лабораторной медицины. – Москва - 2019. - С. 162-163.
5. Щемелев, А.Н., Серологические и молекулярные маркеры ВИЧ в Гвинейской Республике / А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, А.В. Семёнов // Материалы научно-практических конференций в рамках V российского конгресса лабораторной медицины. – Москва - 2019. - С. 163
6. Щемелев, А.Н., Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека-1 на территории Северо-Западного федерального округа в 2016-2018 годах / А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, А.В. Семёнов // Материалы научно-практических конференций в рамках V российского конгресса лабораторной медицины. – Москва - 2019. - С. 255
7. Щемелев, А. Н., Разнообразие субгенотипов ВГС у пациентов с ВИЧ-инфекцией на территории Вьетнама / А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, Е.Н. Серикова, А.В. Семёнов // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы. – Москва - 2019 - С. 88
8. Щемелев, А. Н., Встречаемость серологических и молекулярных маркеров ВГС и ВГВ у пациентов с ВИЧ-инфекцией на территории Вьетнамской Социалистической Республики / А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, Е.Н. Серикова, А.В. Семёнов // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы. – Москва - 2019 - С. 85-86
9. Щемелев, Генетическое разнообразие ВГВ у пациентов с ВИЧ-инфекцией на территории Вьетнамской социалистической Республики / А.Н. Щемелев, Ю.В. Останкова, Е.Н. Серикова, А.В. Семёнов // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы. – Москва - 2019 - С. 87-88
10. Останкова, Ю. В., Распространенность серологических и молекулярно-биологических маркеров вируса гепатита В среди детей и подростков в Гвинейской республике / Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева, А. Н. Щемелев, А. В. Семенов // Журнал инфектологии. Материалы Всероссийского ежегодного конгресса "Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика" - СПб - 2019 - С. 104-105
11. Boumbaly, S. Prevalence des mutations de resistance aux medicaments du vih-1 dans le district federal Nord-ouest de la Russie entre 2016 et 2018 / S. Boumbaly, T.A.L. Balde, A. Shchemelev, A. Semenov, Yu. Ostantkova // Congres de la societe Guineenne de pathologie infectieuse et tropicale – Conakry - 2019
12. Boumbaly, S. Mutations de la pharmaco-resistance du vih chez les femmes sous arv en echec virologique dans le district federal du nord-ouest de la russie / S. Boumbaly, T.A.L. Balde, A. Shchemelev, A. Semenov, Yu. Ostantkova.// Congres de la societe Guineenne de pathologie infectieuse et tropicale – Conakry - 2019

13. Щемелев, А. Н. Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека-1 на территории Северо-Западного федерального округа в 2016-2018 годах / А. Н. Щемелев // Санкт-Петербургские научные чтения-2019 : Тезисы VIII международного молодежного медицинского конгресса, Санкт-Петербург, 04–06 декабря 2019 года. – Санкт-Петербург: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова - 2019. – С. 160. – EDN PTYZRY.
14. Щемелев, А. Н. Разработка метода выявления клинически значимых мутаций вируса иммунодефицита человека с использованием таргетного массивированного параллельного секвенирования / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева, А. В. Семенов // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 152. – EDN FRLLIB.
15. Щемелев, А. Н. Встречаемость первичной лекарственной устойчивости ВИЧ у пациентов Санкт-Петербурга и Ленинградской области / А. Н. Щемелев // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены : Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, 21–22 октября 2020 года / Под редакцией А.Ю. Поповой, А.К. Носкова. – Ростов-на-Дону: Общество с ограниченной ответственностью "Мини Тайп", 2020. – С. 436-438. – EDN ZIMFRR.
16. Щемелев, А. Н. Мутации лекарственной устойчивости ВИЧ во Вьетнаме у детей, принимавших АРВТ в рамках профилактики передачи вируса от матери к ребенку / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева [и др.] // Инфекционные болезни в современном мире: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика : Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 07–09 сентября 2020 года / Под ред. В.И. Покровского. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Медицинское Маркетинговое Агентство", 2020. – С. 257-258. – EDN RHJJTE.
17. Щемелев, А. Н. Мутации лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека у женщин с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Северо-Западном федеральном округе / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева, А. В. Семенов // Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Охрана здоровья матери и ребенка : международная научно-практическая конференция, Санкт-Петербург, 14–15 сентября 2020 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2020. – С. 206-207. – EDN LEXFVO.
18. Щемелев, А. Н. Мутации лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека у детей с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Северо-Западном федеральном округе / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева, А. В. Семенов // Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Охрана здоровья матери и ребенка : международная научно-практическая конференция, Санкт-Петербург, 14–15 сентября 2020 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2020. – С. 205-206. – EDN EVRDFZ.
19. Щемелев, А. Н. Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека, в Северо-Западном федеральном округе / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева, А. В. Семенов // Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Охрана здоровья матери и ребенка: международная научно-практическая конференция, Санкт-Петербург, 14–15 сентября 2020 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2020. – С. 204-205. – EDN HNNBGN.
20. Щемелев, А. Н. Распространенность лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека у пациентов, не получавших терапию, в Санкт-Петербурге / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева // Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23. – № 2. – С. 166. – EDN SUWYYA.
21. Щемелев, А. Н. Встречаемость и структура мутаций фармакорезистентности вируса иммунодефицита человека-1 на территории Северо-Западного федерального округа

в 2019 г / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева // Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23. – № 2. – С. 166. – EDN HWNNKN.

22. Щемелев, А. Н. Встречаемость лекарственной устойчивости ВИЧ в Санкт-Петербурге и Ленинградской области у пациентов с неэффективностью терапии и не принимавших лечения / А. Н. Щемелев // Гигиена, экология и риски здоровью в современных условиях : Материалы XI межрегиональной научно-практической интернет - конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора с международным участием, Саратов, 14–16 апреля 2021 года. Том I. – Саратов: Общество с ограниченной ответственностью Издательство «КУБиК», 2021. – С. 201-203. – EDN CHVRZC.

23. Щемелев, А. Н. Структура мутаций фармакорезистентности ВИЧ у детей с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в СЗФО / А. Н. Щемелев, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева // Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Охрана здоровья матери и ребенка: МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ, Санкт-Петербург, 31 мая 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2021. – С. 216-217. – EDN ULMBAW.

24. Shchemelev, A.N. Prevalence of drug resistant HIV-1 forms in patients without any history of art in the Republic of Guinea / A.N. Shchemelev, Yu.V. Ostankova, E.B. Zueva, A.V. Semenov // Фундаментальная наука в современной медицине - 2022: материалы науч.-практич. конф. студентов и молодых учёных под ред. С.П. Рубниковича, В.А. Филонюка, Ф.И. Висмонта, Т.В. Горбачевой - Минск: БГМУ - 2022 – с. 279-282

25. Shchemelev, A.N. Genetic diversity and HIV-1 drug resistance mutations in Leningrad region / A.N. Shchemelev, Yu.V. Ostankova, E.B. Zueva, A.V. Semenov // Фундаментальная наука в современной медицине - 2022: материалы науч.-практич. конф. студентов и молодых учёных под ред. С.П. Рубниковича, В.А. Филонюка, Ф.И. Висмонта, Т.В. Горбачевой - Минск: БГМУ - 2022 – с. 289–292

26. Shchemelev, A.N. Human immunodeficiency virus drug resistance mutations in children with virological failure of antiretroviral therapy in the Leningrad region / A.N. Shchemelev, Yu.V. Ostankova, E.B. Zueva // Сборник тезисов Национального Конгресса по инфекционным заболеваниям – Ташкент - 2022 г. - С 18

27. Shchemelev, A.N. Diversity of HIV drug resistance mutations in women with virological failure of antiretroviral therapy in the Northwestern federal district in 2019 / A.N. Shchemelev, Yu.V. Ostankova, E.B. Zueva // Сборник тезисов Национального Конгресса по инфекционным заболеваниям – Ташкент - 2022 г. - С 19

28. Shchemelev, A.N. The structure of HIV drug resistance mutations in children with virological failure of antiretroviral therapy in the Northwestern federal district / A.N. Shchemelev, Yu.V. Ostankova, E.B. Zueva // Сборник тезисов Национального Конгресса по инфекционным заболеваниям – Ташкент - 2022 г. - С 19

29. Shchemelev, A.N. Genetic diversity and HIV-1 drug resistance mutations in Leningrad region / A.N. Shchemelev, Yu.V. Ostankova, E.B. Zueva, A.V. Semenov // Международная научно-практическая конференция «Современные технологии диагностики, лечения, профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (Бухара, 21–22 апреля 2022 г.): сборник материалов. – Бухара - 2022. – С.39

30. Shchemelev, A.N. Prevalence of drug resistant HIV-1 forms in patients without any history of art in the Republic of Guinea / A.N. Shchemelev, Yu.V. Ostankova, E.B. Zueva, A.V. Semenov // Международная научно-практическая конференция «Современные технологии диагностики, лечения, профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (Бухара, 21–22 апреля 2022 г.): сборник материалов. – Бухара - 2022. – С.39

31. Щемелев А. Н. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 в Калининградской области / А. Н. Щемелев, А. А. Черкасова, Ю. В. Останкова, Е. Б. Зуева // Трансляционная медицина. Научно-практический рецензируемый медицинский журнал. Приложение №2

Тезисы V инновационного петербургского медицинского форума, Алмазовского молодежного медицинского форума Санкт-Петербург – 2022 г. – С. 248

32. Shchemelev, A.N. Formation of HIV-1 drug resistance in patients with multiple therapy failure formation of HIV-1 drug resistance in patients with multiple therapy failure / A. N. Shchemelev, Yu. V. Ostankova // Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2022: сборник тезисов докладов LXXVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных под. ред. С.П. Рубникова, В.А. Филонюка – Минск, БГМУ - 2022 – С. 464

33. Shchemelev, A.N. Peculiarities of patterning of HIV-1 drug resistance mutations in isolates of the Northwestern federal district of Russia / A. N. Shchemelev, Yu. V. Ostankova // Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2022: сборник тезисов докладов LXXVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных под. ред. С.П. Рубникова, В.А. Филонюка – Минск, БГМУ - 2022 – С. 464

Список используемых сокращений

CRF — циркулирующая рекомбинантная форма (Circulating Recombinant Form);

Pol – полимеразы (polymerase).

TAM – мутация устойчивости к аналогам тимидина (Thymidine analog mutation);

URF — уникальная рекомбинантная форма (unique recombinant form);

АРТ — антиретровирусная терапия;

АРП – антиретровирусный препарат

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека;

ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения;

ВП — вирусная протеаза;

ВН – вирусная нагрузка

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИН — интегразы;

ИП — ингибиторы протеазы;

КСР — работники коммерческого секса;

ЛЖВ — люди, живущие с ВИЧ;

ЛУ – лекарственная устойчивость

МЛУ – мутации лекарственной устойчивости

МСМ — мужчины, имеющие секс с мужчинами;

НИОТ — нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы;

ННИОТ — ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы;

ОТ — обратная транскриптаза;

ПИН — потребители инъекционных наркотиков;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;