

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-212

**АДАПТАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЦИФРОВОЙ ПЦР
ДЛЯ АНАЛИЗА ПРОВИРУСНЫХ РЕЗЕРВУАРОВ У ЛИЦ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ
НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ADAPTATION AND APPLICATION OF A DIGITAL PCR-BASED MULTIPLEX SYSTEM FOR ANALYSIS
OF PROVIRAL RESERVOIRS IN PEOPLE LIVING WITH HIV IN THE RUSSIAN FEDERATION**

А. И. Мурзин, К. А. Елфимов, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова,
Д. П. Зырянова, Л. Г. Готфрид, В. Е. Екушов, М. Р. Халиков

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

A. I. Murzin, K. A. Elfimov, A. V. Totmenin, N. M. Gashnikova,
D. P. Zyryanova, L. G. Gotfrid, V. E. Ekushov, M. R. Halikov

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

✉ and.murzin1@gmail.com

Аннотация

Цифровая ПЦР является одним из наиболее перспективных методов оценки эффективности терапевтических вмешательств, направленных на элиминацию провирусных резервуаров и излечение ВИЧ-инфекции. В нашей работе мы адаптировали метод для его реализации среди геновариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации.

Abstract

Digital PCR is one of the most promising methods for assessing the effectiveness of therapeutic interventions aimed at eliminating proviral reservoirs and curing HIV infection. In our work, we adapted the method for its implementation among HIV-1 genovariants circulating in the Russian Federation.

Введение

Персистенция провирусных резервуаров ВИЧ-1 в организме инфицированного человека является главной проблемой на пути к излечению ВИЧ-инфекции [1]. Разрабатываемые терапевтические вмешательства, направленные на элиминацию провирусных резервуаров, требуют точных методов их количественной оценки [2]. Одним из таких методов является Intact Proviral DNA Assay (IPDA), изначально разработанный для субтипа В [3].

В связи с критической важностью учета генетического разнообразия ВИЧ-1 для точной количественной оценки провирусных резервуаров целью работы стала разработка и валидация метода на основе IPDA для оценки представленности и интактности провирусных резервуаров в мононуклеарах периферической крови (МПК) у наивных лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), инфицированных наиболее распространенными геновариантами ВИЧ-1 на территории РФ: субтипами А6, В и CRF63_02А6.

Материалы и методы

Цифровая ПЦР проводилась на приборе Qiagen QIAcuity dPCR. Праймеры и зонды для провирусных мишеней были сконструированы с учетом циркулирующих геновариантов ВИЧ-1 на территории РФ. Консервативность праймеров и зондов оценивалась с помощью интегрального показателя:

$$\text{Консервативность} = \text{Полная гомология (\%)} \times \alpha + \text{Гомология 3'-конца (\%)} \times \beta,$$

где $\alpha = 0,3$ для праймеров и $1,0$ для зондов, $\beta = 0,7$ для праймеров и $0,0$ для зондов.

Для предварительной валидации использовались плазмиды, содержащая полный геном ВИЧ-1, а также «дефектные» плазмиды, имитирующие дефекты в выбранных участках-мишенях. Для валидации на биологических образцах использовалась геномная ДНК (гДНК), выделенная из МПК, которые были выделены из цельной крови 104 наивных ЛЖВ из Красноярского и Приморского краев. Первичный анализ данных проводился с использованием QIAcuity Software Suite Ver. 3.0.0.0. Статистические анализы проводились с помощью GraphPad Prism version 10.4.2 for Windows.

Результаты и обсуждение

Первым шагом для достижения цели была разработка праймеров и зондов с высокой степенью консервативности среди наиболее распространенных геновариантов ВИЧ-1 на территории РФ (см. таблицу).

Интегральный показатель консервативности наборов праймеров и зондов для целевых участков-мишеней

Наборы	5'LTR/Gag			3'Pol			Env		
Геновариант	F	P	R	F	P	R	F	P	R
A6 (<i>n</i> = 197)	95,7	93,4	99,7	99,4	86,3	95,1	92,2	86,3	97,7
B (<i>n</i> = 52)	95,4	82,6	100,0	97,2	63,0	96,7	65,4	60,9	96,1
CRF63_02A6 (<i>n</i> = 30)	100,0	93,3	100,0	100,0	96,7	99,0	92,7	83,3	99,0
Всего (<i>n</i> = 279)	96,1	91,6	99,8	99,1	83,5	95,8	87,7	81,7	97,6

Затем был проведен ряд тестовых анализов на плаزمидах, чтобы оценить формирование кластеров для дефектных и интактных провирусов. Полученные нами результаты совпали с ожидаемым формированием кластеров. Поэтому следующим этапом стал расчет Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD) и DNA Shearing Index (DSI) нашего метода. Для расчета LoB были проанализированы 40 образцов гДНК от ВИЧ-отрицательных доноров. При анализе были зарегистрированы только единичные сигналы флуоресценции из кластеров, характерных для дефектных провирусов, что привело к $LoB_{\text{деф.}} = 6,72$ и $LoB_{\text{инт.}} = 0$. Для расчета LoD были проанализированы 8 последовательных 2-кратных разведений полногеномной плазмиды от 128 до 1 копии в 20 повторах для каждого разведения. LoD был определен на уровне 8 копий ($SD = 2,964$), что в совокупности с рассчитанными LoB привело к $LoD_{\text{деф.}} = 11,6$ и $LoD_{\text{инт.}} = 4,876$. Рассчитанный медианный DSI составил 0,37 (МКР: 0,35–0,40).

При анализе биологических образцов от наивных ЛЖВ медианные значения количества дефектных и интактных провирусных резервуаров составили 2532 копии/10⁶ МПК (МКР: 917–7207) и 153,3 копии/10⁶ МПК (МКР: 0–841,2) соответственно. Потеря сигнала наблюдалась в 12 из 104 случаев (11,5 %), причем все случаи были связаны с набором праймеров и зондов на участок 3'Pol.

Полученные нами результаты продемонстрировали эффективность представленного метода для исследования провирусных резервуаров в МПК у ЛЖВ, инфицированных геновариантами, циркулирующими на территории РФ.

Литература

1. Kreider E. F., Bar K. J. HIV-1 Reservoir Persistence and Decay: Implications for Cure Strategies // Curr. HIV/AIDS Rep. 2022. Vol. 19. P. 194–206.
2. Sanders-Beer B. E., Archin N. M., Brumme Z. L. et al. Current HIV/SIV Reservoir Assays for Preclinical and Clinical Applications: Recommendations from the Experts 2022 NIAID Workshop Summary // AIDS Res. Human Retroviruses. 2023. Vol. 40. P. 7–21.
3. Bruner K. M., Wang Z., Simonetti F. R. et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses // Nat. 2019. Vol. 566. P. 120–125.