

ОБМЕН ОПЫТОМ

УДК 616-036.21

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОВРЕМЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИЧ-1, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ ОСНОВНЫЕ РОССИЙСКИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА

¹Н.В.Богачева, ¹Н.А.Бледных, ¹А.В.Тотменин, ²Ф.О.Мирджамалова, ²Ю.В.Соколов, ¹Н.М.Гашникова¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия²ГБУЗ НСО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Новосибирск, Россия

© Коллектив авторов, 2017 г.

Целью работы являлась отработка методик выделения изолятов ВИЧ-1 из клинического материала периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов, создание коллекции первичных изолятов ВИЧ-1, изучение биологических особенностей современных генетических вариантов ВИЧ-1 субтипов А, В и циркулирующей рекомбинантной формы CRF63_02A1. Выделение изолятов ВИЧ-1 и изучение их биологических свойств крайне важны для более глубокого понимания биологии вируса и мониторинга характеристик распространяющихся вариантов ВИЧ-1. Материалы и методы. Выделение МПК проводили центрифугированием цельной крови (325 g, 30 мин) на градиенте Ficoll 1,077–1,080 г/мл (MPBiomedicals, USA) с последующей двукратной отмывкой средой RPMI-1640. Стимуляцию донорских МПК проводили в среде RPMI-1640. Отобранную культуральную жидкость анализировали на содержание вирусного белка p24 и криоконсервировали. Репродукцию вируса определяли по накоплению вирусспецифического белка p24 в культуральной жидкости, концентрацию которого выявляли с использованием тест-системы «ВИЧ-1 p24-антиген-ИФА-БЕСТ». Вирусную РНК выделяли из плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов. Для выделения РНК использовали наборы «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», «Вектор-Бест», Россия. «ОТ-ПЦР» — «РеалБест Мастер микс ОТ», «Вектор-Бест», Россия, «ПЦР» — «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)», «Билабмикс», Россия. Генетическую характеристику выделенных изолятов осуществляли методом определения нуклеотидных последовательностей фрагментов генома ВИЧ-1, кодирующих области гена *pol* и основного белка оболочки (ген *env*). Для определения и анализа нуклеотидной последовательности гена *pol* использовали наборы BigDyeTerminatorv31, USA. Выделено и описано 67 инфекционных вариантов ВИЧ-1: CRF63_02A1, субтипа А, ВиCRF02_AG.

Ключевые слова: изоляты ВИЧ-1, генетические варианты ВИЧ-1, коллекция ВИЧ-1.

CREATING A COLLECTION OF UP-TO-DATE HIV-1 ISOLATES INCLUDING MAJOR RUSSIAN GENETIC VARIANTS OF VIRUS

¹N.V.Bogacheva, ¹N.A.Blednyh, ¹A.V.Totmenin, ²F.O.Mirdzhamalova, ²J.V.Sokolov, ¹N.M.Gashnikova¹State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia²GBUZZAT «Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases», Novosibirsk, Russia

Study objectives: Fine-tuning of techniques for HIV-1 isolation from HIV patient blood samples; developing a collection of primary HIV-1 isolates; and investigating the biological features of currently circulating genetic variants of HIV-1 subtypes A and B and of their recombinant form CRF63_02A1. These objectives are important for better knowing of HIV-1 biology and for monitoring the characteristics of the spreading HIV-1 variants. Materials and methods: PBMC were isolated by whole blood centrifuging at 325 g for 30 min in 1,077 to 1,080 g/mL Ficoll gradient (MP Biomedicals, USA) followed by two washings with RPMI-1640. Donor PBMC were stimulated in RPMI-1640. The culture fluid was sampled, tested for viral p24 protein, and cryopreserved. HIV-1 reproduction was assessed by the accumulation of the viral protein in culture medium using an ELISA kit provided by Vector Best (Russia). Viral DNA was isolated from HIV patient blood plasma using RealBest DeltaMag kits and RT-PCR MasterMix kits (Vector Brest, Russia) and PCR BioMaster HS-Tag PCI-Color kits (Bilabmix, Russia). HIV-1 isolates were characterized genetically by sequencing *env* and *pol* genes using BigDyeTerminatorv31 kits (USA). Sixty-seven infectious variants of HIV-1 subtype A and B recombinants CRF63_02A1 and CRF02AG strain have been isolated and characterized.

Key words: HIV-1 isolates, genetic variants of HIV-1, HIV-1 collection.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2017-9-1-65-76>

Введение. Инфекция вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) до сих пор является одной из самых острых и актуальных проблем человечества. Несмотря на то, что непрерывно ведется изучение ВИЧ-1 и разработка терапевтических и профилактических препаратов, во многих регионах мира вирус продолжает распространяться, увеличивается количество ВИЧ-инфицированных пациентов. По-прежнему нет препарата, способного полностью излечить человека от ВИЧ-инфекции. Высокая изменчивость и скорость накопления мутаций в геноме приводит к образованию видового разнообразия ВИЧ, а также квазивидов в организме одного человека, что препятствует созданию эффективной вакцины. На территориях с неблагоприятной ситуацией по ВИЧ-инфекции, где находятся индивидуумы, инфицированные различными генетическими вариантами ВИЧ, может происходить рекомбинация вирусов, что приводит к появлению новых рекомбинантных форм вируса [1–6]. Возникающие в различных регионах мира новые варианты ВИЧ-1 зачастую обладают рядом биологических свойств, приводящих к их преобладанию в популяции, таких, как скорость эволюции вируса и прогрессирования заболевания, скорость репликации, они также могут иметь преимущества при некоторых путях трансмиссии вируса [7–12]. Наибольшая трудность в преодолении ВИЧ-инфекции, в том числе в создании вакцины, заключается в большом генетическом разнообразии ВИЧ-1. По этой причине современные работы по выделению изолятов и изучению биологических и генетических свойств ВИЧ-1 направлены на исследование субтип-специфических особенностей вирусов различных генетических вариантов [12–15].

В нашей стране ситуация с ВИЧ-инфекцией за последние годы сильно усложнилась. С каждым годом увеличивается количество ВИЧ-инфицированных, возрастает генетическое разнообразие российских ВИЧ-1 [16–19]. В некоторых регионах России и ближнего зарубежья распространяются новые рекомбинантные формы, вытесняя ранее циркулировавшие варианты ВИЧ-1 [20–23]. Задачей настоящей работы было выделение изолятов ВИЧ-1 современных российских вариантов вируса и изучение их генетических и биологических свойств. Анализируя выделенные изоляты, мы выявили наиболее распространенные генетические варианты популяции ВИЧ-1, циркулирующей в Сибирском регионе. Данная коллекция позволит создать новые модели для изучения субтип-специ-

фических свойств ВИЧ, для испытания вакцинных и терапевтических препаратов, актуальных для нашей страны.

Целью работы являлась отработка методик выделения изолятов ВИЧ-1 из клинического материала периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов, создание коллекции первичных изолятов ВИЧ-1, изучение биологических особенностей современных генетических вариантов ВИЧ-1 субтипов А, В и циркулирующей рекомбинантной формы CRF63_02A1.

Материалы и методы. Выделение МПК проводили центрифугированием цельной крови (325 g, 30 мин) на градиенте Ficoll 1,077–1,080 г/мл (MPBiomedicals, USA) с последующей двукратной отмывкой средой RPMI-1640. Стимуляцию донорских МПК проводили трое суток в среде RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (КРС) фирмы Gibco, USA, 150 мг/мл глутамина, 300 мг/мл линкомицина, 4% гентамицина, 5 мкг/мл ФГА (Sigma, USA) при концентрации лимфоцитов $1-2 \times 10^6$ кл/мл. Для сокультивирования смешивали $4-6 \times 10^6$ МПК пациента с $8-12 \times 10^6$ МПК донора в 10 мл среды RPMI-1640, содержащей 20% КРС, 100 е.а./мл IL-2 (рекомбинантный, человеческий интерлейкин-2 (Sigma, USA), 150 мг/мл глутамина, 300 мг/мл линкомицина и 4% гентамицина. На 7, 15, 22-й и 29-й день культивирования после замены культуральной среды к оставшимся инфицированным клеткам добавляли $4-6 \times 10^6$ ФГА-стимулированных донорских МПК. Отобранную культуральную жидкость анализировали на содержание вирусного белка р24 и криоконсервировали [24]. Репродукцию вируса определяли по накоплению вирусспецифического белка р24 в культуральной жидкости, концентрацию которого выявляли с использованием тест-системы «ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ» в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Вирусную РНК выделяли из плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов и/или культурального супернатанта на 11–18-й день сокультивирования. Для выделения РНК использовали наборы «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», «Вектор-Бест», Россия. «ОТ-ПЦР» — «РеалБест Мастер микс ОТ», «Вектор-Бест», Россия, «ПЦР» — «БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2×)», «Биолаб-микс», Россия. Генетическую характеристику выделенных изолятов осуществляли методом определения нуклеотидных последовательностей фраг-

ментов генома ВИЧ-1, кодирующих области гена *pol* и основного белка оболочки (ген *env*). Для определения и анализа нуклеотидной последовательности гена *pol* использовали наборы BigDye Terminator v3.1, USA. Последующий филогенетический анализ и определение субтипа вирусного изолята осуществляли с помощью программы, представленной на интернет-сайте Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu>). Определение тропности изолята к клеточным хемокиновым корецепторам проводили с помощью доступных на интернет-сайтах программ Geno2pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de>) и WebPSSM и (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm>).

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с помощью программы Microsoft Excel 7.0.

Результаты и их обсуждение. Выделение изолятов ВИЧ-1 и изучение их биологических характеристик крайне важны для более глубокого понимания биологии вируса и развития инфекции ВИЧ-1.

Основной целью нашего исследования было создание коллекции инфекционных изолятов ВИЧ-1. Первым этапом работы являлась отработка методики изоляции ВИЧ-1 из клинического материала.

Отбор периферической крови проводился у ВИЧ-инфицированных пациентов на базе ГБУЗ НСО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» медицинским работником в вакуумированные пробирки типа Vacutainer.

Для отработки методики культивирования ВИЧ-1 нами были рассмотрены и апробированы два метода выделения вируса с использованием донорских МПК, рекомендованных методиками Всемирной организации здравоохранения. Первый метод выделения проводился посредством адсорбции вируса из плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов на первичные лимфоциты, отобранные из крови 2-х здоровых доноров и предварительно стимулированные к росту в среде с ФГА в течение трех суток. Адсорбция проводилась с разными временными интервалами для установления оптимального показателя времени адсорбции: в течение 1-го часа, 2-х часов и 1-х суток при температуре 37° С в СО₂-инкубаторе. После отмывки инфицированные клетки культивировали в среде с IL-2 с последующим подсевом чистых донорских лимфоцитов. Однако данный метод не привел к росту вируса при

первичном заражении. Метод с адсорбцией вирус-содержащей суспензии показал свою эффективность впоследствии и при пассировании клеточной культуры, и после криоконсервации вирусного супернатанта. Оптимальное время адсорбции при рекультивировании вируса было показано: 1 час. Причиной неудачи первичной адсорбции вируса из плазмы пациента, вероятно, является недостаточно высокая концентрация ВИЧ-1.

Удачным для первичного инфицирования чистой культуры клеток оказался второй метод выделения изолятов, который проводился посредством сокультивирования клеток периферической крови ВИЧ-инфицированного пациента с клетками 2-х здоровых доноров в равных количествах. Процесс сокультивирования клеток чистого и инфицированного донора, по-видимому, сопровождался тесными клеточными взаимодействиями, что способствовало быстрому распространению вируса в культуре клеток и, соответственно, его высокой репродукции. В результате сокультивирования МПК был показан рост вируса уже на 4–7-е сутки культивирования.

При подборе оптимальных условий для культивирования проводилось наблюдение за кривой роста вирусных изолятов. Как известно, наилучшим временем для криоконсервации является выход скорости репродукции ВИЧ-1 в логарифмическую фазу, перед достижением так называемого плато роста. У изолятов ВИЧ-1 с разными ростовыми характеристиками достижение данной точки было различным. Уровень репродукции, роста вируса в культуре, определяли по накоплению белка p24. В соответствии со скоростью и уровнем накопления p24 классифицировали изоляты вируса по ростовым качествам. Изоляты ВИЧ-1, быстро накапливающие в культуральной жидкости высокие концентрации белка p24, относили к типу быстро реплицирующихся, или rapid/high ВИЧ-1. В нашей коллекции они включали большинство изолированных вирусов (n=49). Изоляты вируса с медленным темпом репродукции и низкими концентрациями — к типу медленно реплицирующихся, или slow/low ВИЧ-1 (n=19). Критерием, определяющим изолят ВИЧ-1 как тип slow/low, являлось накопление p24 менее 100 000 пкг/мл, как rapid/high — более 100 000 пкг/мл. Изоляты rapid/high показывали быстрый выход в логарифмическую фазу, не требовали многочисленных подсевок чистых клеток (рис. 1).

При выделении вируса обнаруживались варианты ВИЧ-1, характеризующиеся медленным, но неуклонным ростом p24, достигающие с течением

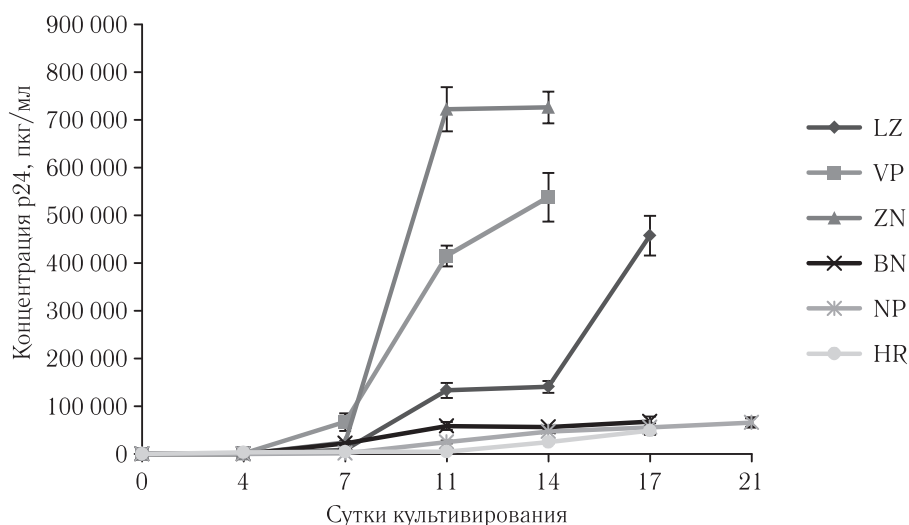


Рис. 1. Динамика накопления р24 для изолятов ВИЧ-1 rapid/high (ZN, VP, LZ) и slow/low (NP, HR, BN)

времени высоких концентраций в культуре клеток (на 17–31-е сутки). Для части исследованных ВИЧ-1 характерна описанная динамика репродукции. Данные изоляты относили к типу rapid/high, так как при втором пассаже они часто показывали более быструю репликацию, чем при первичном выделении (рис. 2), что, вероятно, связано с различием уровня концентрации вируса в вирусосодержащей жидкости. Slow/low изоляты ВИЧ-1, показавшие в первый раз медленную скорость роста и низкую продукцию вируса после длительного культивирования, при адсорбции супернатантом с более высокой концентрацией вируса не показывали более активную динамику роста на втором пассаже.

лятов с высокой скоростью репродукции длительное время наблюдали несколько возрастающих пиков концентрации р24, после чего следовал спад репродукции (рис. 3). При вторичном пассировании вируса с использованием аликвот вирусного супернатанта, отобранного на более поздних сроках культивирования, отмечались более низкие темпы репродукции, чем с использованием аликвот супернатанта, отобранных на ранних сроках культивирования. В дальнейшем при культивировании вируса посчитали целесообразным, при достаточно высоком росте ВИЧ-1 в культуре, прерывать культивирование на 11–17-е сутки с последующей криоконсервацией вирусосодержащего супернатан-

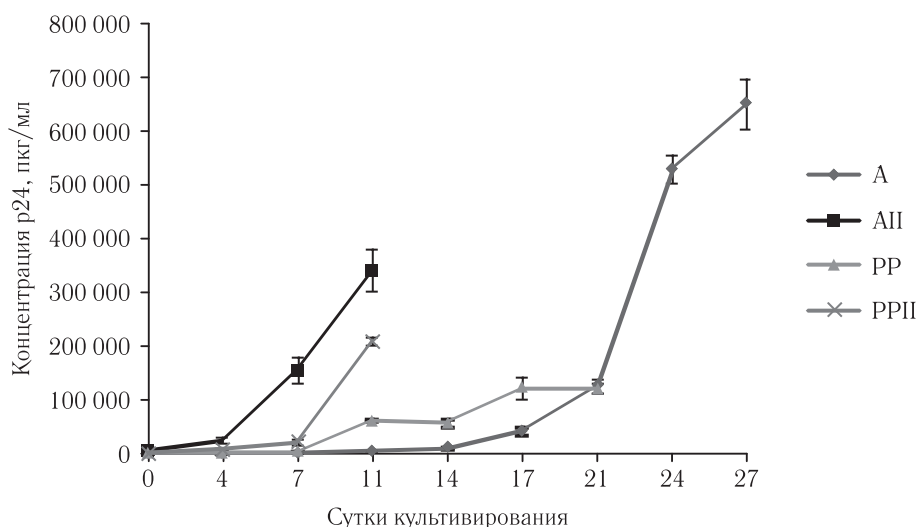


Рис. 2. Изменение динамики роста ВИЧ-1 rapid/high при первом (А, РР) и втором (АII, РРII) пассажах

В течение первого года работ применялось длительное культивирование (до 27–31 суток) с заморозкой отбираемых аликвот вирусного стока при каждой замене среды. При культивировании изо-

та. Для изолятов rapid/high время выхода в логарифмическую фазу роста было определено как наиболее продуктивное для последующего инфицирования клеток и пассирования ВИЧ-1.

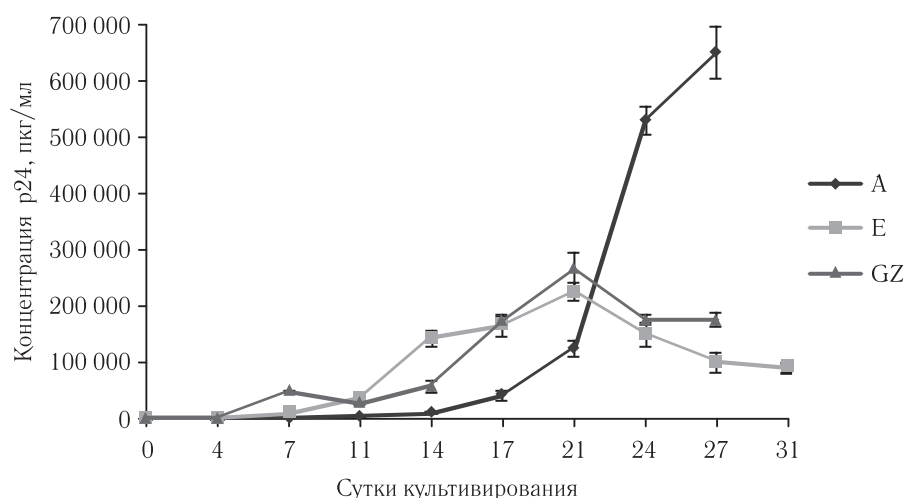


Рис. 3. Динамика накопления вирусного белка при длительном культивировании изолятов ВИЧ-1. Выбранные изоляты ВИЧ-1 демонстрируют разные варианты репродукции, характерные для высокорепродуктивных вирусов

Изоляты ВИЧ-1, вошедшие в коллекцию, были выделены от пациентов на различных стадиях ВИЧ-инфекции с преобладанием случаев изоляции вируса от пациентов в стадии инфекции 2А (острой начальной) или через 1–2 месяца после сероконверсии. Образцы от хронически инфицированных пациентов на 2Б, 2В и 3А стадиях инфекции (в том числе от пациентов, подвергавшихся антиретровирусной терапии — АРВТ) отбирались нами для изоляции с целью дальнейшего изучения возникновения мутаций устойчивости ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам. Информация о мутациях устойчивости к АРВТ важна для последующей коррекции терапии ВИЧ-инфицированных пациентов. В зависимости от стадии инфекции у пациента наблюдались различия биологических свойств ВИЧ-1. Для изолятов, выделенных в стадии 2А — острой начальной, или 3Б и 4 — терминальной стадии ВИЧ-инфекции, был характерен быстрый взрывной рост и высокие концентрации p24. Успех выделения ВИЧ-1 в этот период достаточно высокий. Эффективность выделения вируса от пациентов в острой стадии инфекции составила 62%. Для изолятов ВИЧ-1, выделенных от пациентов на бессимптомных стадиях развития инфекции, в большинстве случаев были характерны умеренные темпы прироста p24. Необходимо подчеркнуть, что некоторые из пациентов подвергались лечению антиретровирусными препаратами. Применение АРВТ снижает уровень концентрации вируса в крови, блокирует репродукцию ВИЧ-1. Вероятно, в ряде случаев неэффективность выделения вируса из таких клинических образцов также связана со снижением количества клеток крови, содержащих ВИЧ-1. В случаях изоляции ВИЧ-1 от ВИЧ+ лиц в хронической стадии заболевания,

имеющих низкую концентрацию РНК ВИЧ-1 в крови, сложность изоляции вируса, возможно, вызвана низкими репликативными характеристиками ВИЧ-1. Известно, что существует корреляция между уровнем вирусной нагрузки и скоростью репликации вируса в клеточной культуре [25, 26], что в свою очередь может привести к неудаче в процессе выделения или к низкой медленной репродукции вируса на культуре МПК. Эффективность выделения вируса из образцов крови пациентов с хроническим течением инфекции составила 33%. От пациентов в острой начальной стадии заболевания наиболее часто выделяли изоляты CRF63_02A1 ВИЧ-1. Анализ 51 образца плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов, поступивших на исследование и выделение в 2011–2014 годы, показал, что из 33 образцов CRF63_02A1 только 9 были получены от пациентов с хроническим течением заболевания на стадиях 2Б, 2В, 3А. Напротив, большее количество изолятов ВИЧ-1 субтипа А (9 из 13 образцов) было выделено от пациентов на более поздних стадиях заболевания 3Б, 4.

В результате работ по выделению изолятов ВИЧ-1 с 2009-го по 2014 год из 141 образца плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов в острой начальной стадии (70% образцов) и в стадии хронической инфекции (30% образцов) было выделено 67 современных инфекционных вирусных изолятов.

В процессе выделения изолятов проводилась охарактеризация биологических свойств ВИЧ-1, таких как репродуктивность (накопление p24 в супернатанте), цитопатическое действие вируса на культуру клеток (синцитиеобразование, цитодеструкция). Для вирусов заранее были определены

генетические показатели: генетический вариант и тропность к клеточным корецепторам. Коллекция включает основные генетические варианты ВИЧ-1, циркулирующие на территории России и ближнего зарубежья.

В таблице 1 представлена краткая характеристика выделенных ВИЧ-1.

Выраженность цитопатического действия на клетки — свойство изолятов вируса, имеющее субтип-специфические особенности. Синцитиеобразование на культуре клеток является прогностическим признаком, определяющим стадию ВИЧ-инфекции. Цитопатическое действие вируса анализировали визуально при микроскопировании инфици-

Таблица 1

Краткая характеристика первичных изолятов ВИЧ-1

Генетический вариант изолятов ВИЧ-1	Уровень репродукции		Тропность			
	rapid/high	slow/low	CCR5	СХХ4	CCR5/СХХ4	Нет данных
A (n=17)	13	4	8	5	1	3
CRF63_02A1 (n=38)	27	11	36	—	—	2
B (n=9)	3	6	7	1	—	1
CRF02_AG (n=3)	3	—	1	1	—	1

В коллекцию вошли изоляты ВИЧ-1, максимальное накопление белка р24 у которых превысило отметку 10 000 пкг/мл. Данный параметр был обусловлен минимальным показателем р24, необходимым для продуктивного заражения клеточной культуры при адсорбции вирусным супернатантом после хранения вирусосодержащей жидкости в азоте. Изоляты ВИЧ-1, накапливающие в культуре меньшее количество р24, признавались слабо репродуцирующимися и исключались из коллекции. Высокими репродуктивными свойствами обладали CRF63_02A1 ВИЧ-1, эффективность выделения которых составила 68%. Эффективность выделения нового рекомбинантного варианта ВИЧ-1 была достаточно высока за весь наблюдаемый период. Среди вирусов субтипа А чаще встречались изоляты slow/low, часть из которых слабо культивировалась на МПК (<10 000 пкг/мл) и была исключена из коллекции, выделенные изоляты составили 53% от всех поступивших образцов крови инфицированных ВИЧ данного субтипа. Эффективность выделения субтипа А снижалась в течение наблюдаемого периода, что можно объяснить соответственным снижением его выявляемости среди вновь инфицированных пациентов и вовлечением в исследование лиц на более поздних стадиях заболевания. Как было показано выше, вирусы от пациентов в острой фазе инфекции выделяются более эффективно. Лица, инфицированные субтипом В и CRF02_AG ВИЧ-1, встречались редко, поэтому данные генетические варианты в коллекции представлены в малом количестве. Эффективность выделения изолятов ВИЧ-1 субтипа В за весь период наблюдения была одинакова и составила 50%.

цированной культуры лимфоцитов периферической крови. Основные изменения, производимые вирусом на культуру клеток, — синцитиеобразование, цитодеструкция, изменение формы и структуры клеток, появление клеточного дебриса, грануляция цитоплазмы клеток (рис. 4). Синцитий является нежизнеспособным образованием, и клетки, вовлеченные в него, неспособны выполнять свою функцию [27]. Однако синцитии способствуют более активному распространению вируса в культуре клеток. Наиболее часто признаки синцитиеобразования наблюдаются в культурах клеток, инфицированных ВИЧ-1, обладающих тропностью к CXCR4-клеточному корецептору [28–30]. Появление синцитиев — неблагоприятный прогностический признак, как правило, сопровождающийся переходом вируса от использования рецептора CCR5 к CXCR4 и ухудшением состояния пациента. В некоторых случаях наблюдалось появление единичных синцитиев в культуре МПК для изолятов ВИЧ-1 с тропностью к клеточным рецепторам CCR5. Многочисленное образование синцитиев на культуре клеток при культивировании первичных изолятов вируса было характерно лишь для ВИЧ-1 с тропностью к клеточным рецепторам CXCR4.

Чрезмерная цитодеструкция клеток вместе с повышенным уровнем синцитиеобразования иногда сопровождалась низкой репродукцией вируса, независимо от его субтипа. Возможно, слишком активное цитопатическое действие вируса может быть неблагоприятным фактором, влияющим на его репродуктивные свойства. Вероятно, клеточная культура быстро деградирует, и вирус не успевает размножиться и накопиться. Чаще такая кар-

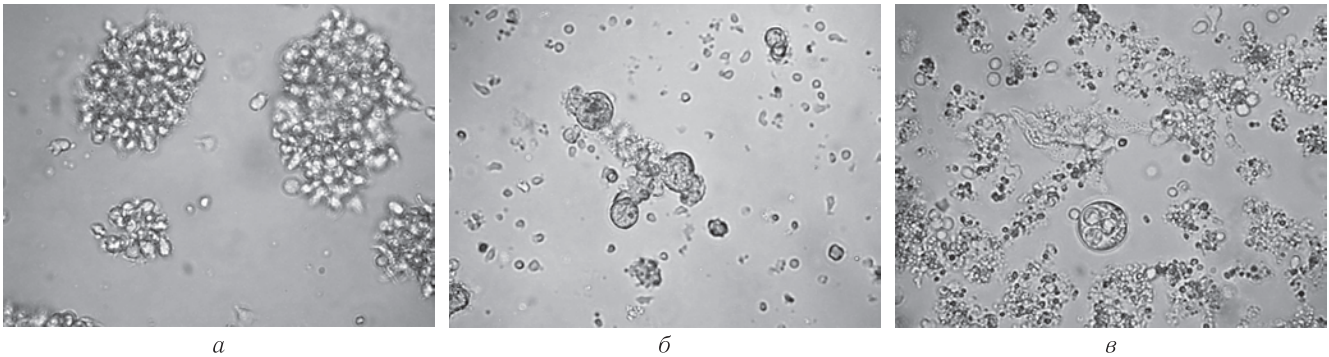


Рис. 4. Развитие клеточных синцитиев при культивировании первичных изолятов ВИЧ-1: *а* — чистые (не инфицированные ВИЧ-1) культуры лимфоцитов периферической крови; *б* — множественные синцитии (+++) в культуре МПК, инфицированных ВИЧ-1; *в* — высокий уровень ЦПД (+++) и единичный синцитий в культуре МПК, инфицированных ВИЧ-1 (увеличение изображения в 300 раз)

тина была характерна для ВИЧ-1, культивирование которых не закончилось успешным выделением, несмотря на регулярный подсев свежих МПК. Напротив, наибольшая репродукция и быстрое размножение ВИЧ-1 наблюдалось при умеренной цитодеструкции клеток. При изоляции ВИЧ-1 CRF63_02A1 наблюдалось описанное выше умеренное воздействие на культуру МПК (табл. 2).

В процессе выделения, а также при пассировании ВИЧ-1 проводилась оценка биологических свойств ВИЧ-1, таких как скорость и уровень репродукции вируса, цитопатический эффект на культуру МПК.

На рисунках 5–8 представлены изоляты, показавшие наибольшую стабильность репродукции при рекультивировании и после криоконсервации в жидком азоте. Графики с изолятами *rapid/high* (рис. 5, 7) представляют группы ВИЧ-1, выделенные от пациентов в стадии 2А с тропностью к ССR5-рецепторам клеток. Данные изоляты ВИЧ-1 могут использоваться в дальнейшем для оценки нейтрализующих свойств вакцинных и терапевтических препаратов.

Биологические особенности ВИЧ-1 субтипа А.

Для ВИЧ-1 субтипа А были характерны высокие темпы роста и накопления концентрации вирусно-

Таблица 2

Изоляты ВИЧ-1	Цитопатическое действие ВИЧ-1 (% изолятов)				Синцитиеобразование на МПК (% изолятов)			
	–	+	++	+++	–	+	++	+++
А	0	23	62	15	39	15	31	15
CRF63_02A1	7	36	53	4	57	29	14	0
В	0	50	50	0	50	25	25	0

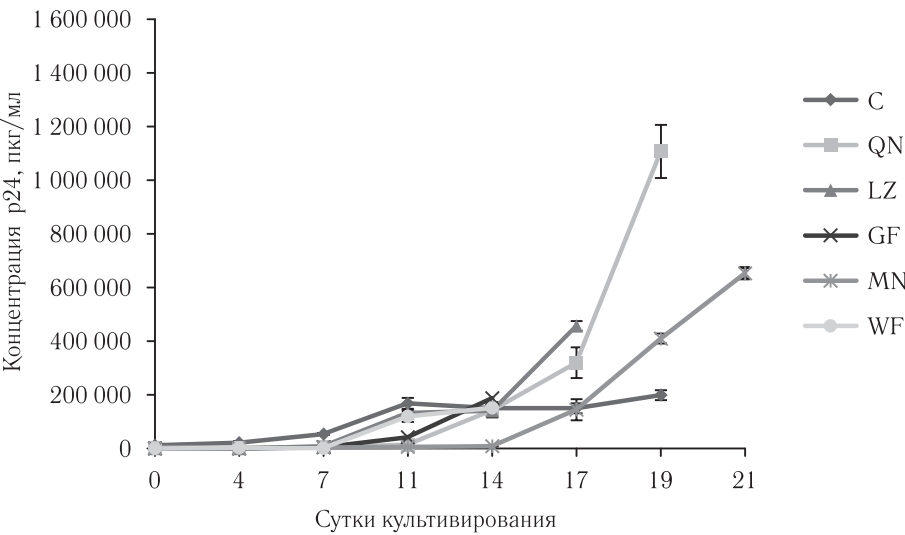


Рис. 5. Динамика накопления белка р24 в процессе культивирования изолятов ВИЧ-1 субтипа А фенотипа *rapid/high*, ССR5-тропности. ВИЧ-1 выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов в острой начальной (2А) стадии инфекции

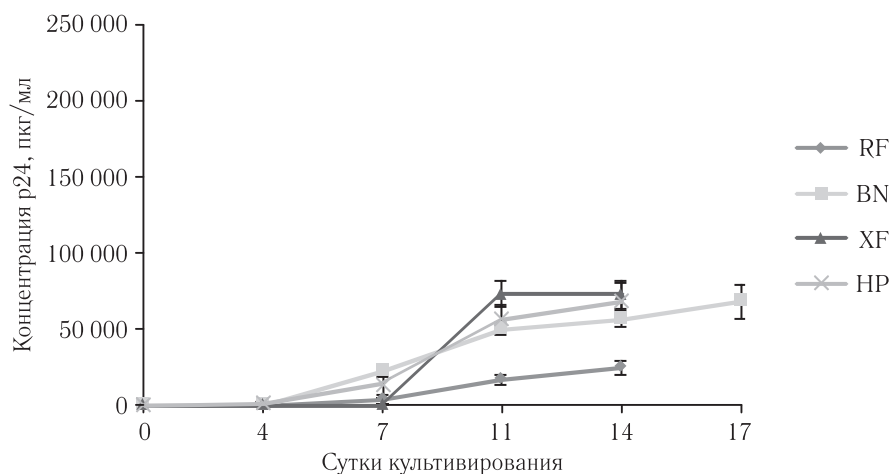


Рис. 6. Динамика накопления вирусспецифического белка р24 в процессе культивирования изолятов ВИЧ-1 субтипа А фенотипа slow/low. ВИЧ-1 выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадиях: BN, HP — хроническая, RF, XF — нет данных

го белка р24. По динамике накопления р24 наблюдался широкий диапазон скорости выхода в логарифмическую фазу роста. При фенотипе rapid/high для изолятов вируса был характерен скачок репродукции, чаще на 11–14-е сутки культивирования. Для slow/low вирусов, напротив, медленный плавный темп прироста белка р24, не достигающий высоких показателей. Максимальное накопление белка р24 для субтипа А ВИЧ-1 колебалось между

пом CXCR4 были обнаружены у 5 из 17 изолятов вируса субтипа А. Вошедшие в коллекцию ВИЧ-1 с тропностью к CXCR4 были выделены от пациентов в острой терминальной стадии инфекции.

Оценка цитопатического действия ВИЧ-1 субтипа А на культуру мононуклеаров периферической крови показала, что у части ВИЧ-1 при их изоляции на культуре клеток обнаруживались множественные синцитии. Этот признак был особенно

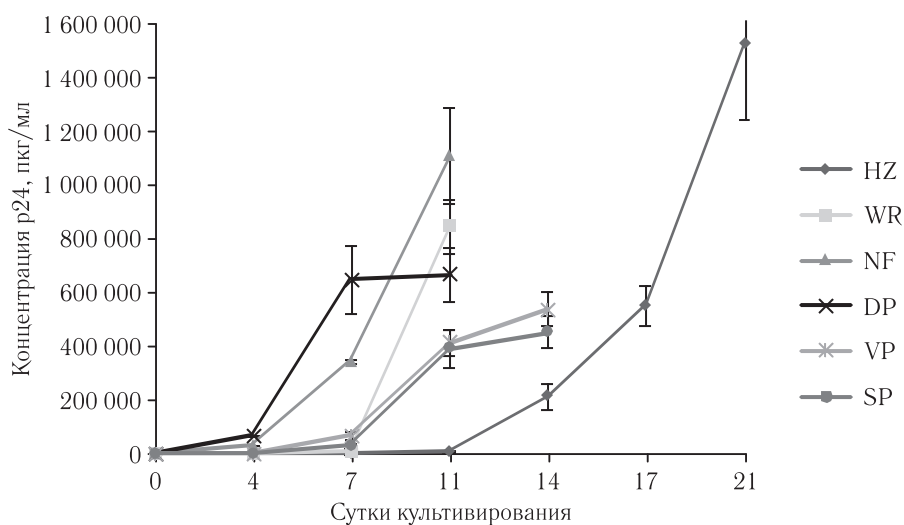


Рис. 7. Динамика накопления вирусного белка р24 в процессе культивирования изолятов ВИЧ-1 CRF63_02A1 фенотипа rapid/high, CCR5-тропности. ВИЧ-1 выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов в острой начальной (2А) стадии инфекции

17-ми и 27-ми сутками культивирования (у 12 из 17 изолятов), наибольший уровень накопления р24, превышающий 500 000 пкг/мл, был зарегистрирован у 5 из 17 изолятов вируса (рис. 5, 6).

Анализ гена *env*, определяющий тропность к корецепторам клетки ВИЧ-1 субтипа А, показал, что для большинства изолированных ВИЧ-1 субтипа А характерен генотип CCR5, вирусы с геноти-

ярко выражен для ВИЧ-1 с тропностью к корецептору CXCR4. При успешном культивировании на МПК данные вирусы также наиболее успешно культивировались в культуре клеток МТ-4, демонстрируя множественное синцитиеобразование и активную репродукцию. Изоляты ВИЧ-1 с CCR5-тропностью, за некоторым исключением, не отличались высокими репродуктивными харак-

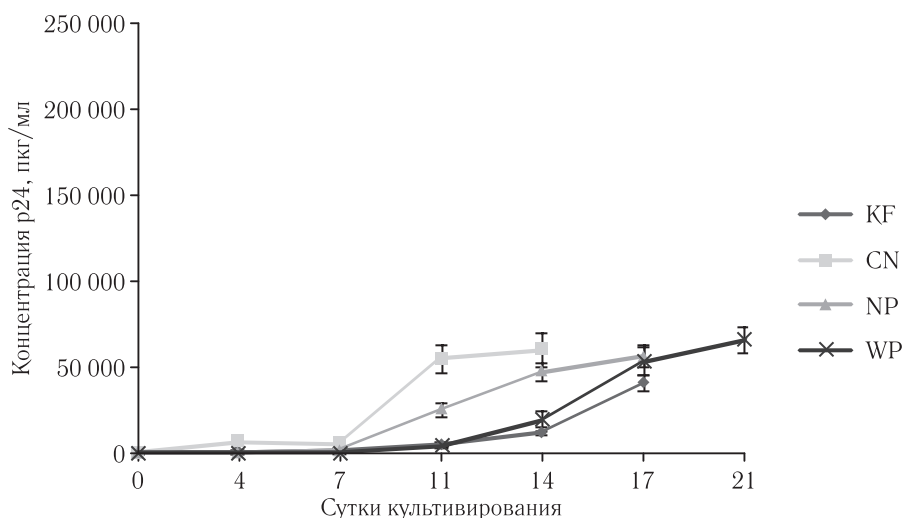


Рис. 8. Динамика накопления вирусного белка р24 в процессе культивирования изолятов ВИЧ-1 CRF63_02A1 фенотипа slow/low, CCR5-тропности. ВИЧ-1 выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов на стадиях: NP, WP — начальная острая (2A), KF, CN — нет данных

теристиками и не образовывали синцитии на МТ-4. В отдельных случаях при изоляции вирусов на культуре первичных лимфоцитов регистрировались единичные синцитии.

Таким образом, показано, что для вирусов субтипа А с тропностью к CCR5-рецепторам при культивировании на МПК наблюдалась цитодеструкция среднего уровня и высокого уровня для CXCR4-тропных вирусов, проявляющаяся в виде гибели клеток, клеточного пикноза, образования клеточного дебриса, грануляции цитоплазмы клеток и синцитиеобразования. Для части изолятов субтипа А наблюдалась выраженная деградация клеточной культуры. При чрезмерной картине ЦПД изоляты ВИЧ-1 показывали слабую репродукцию вируса. Клеточная культура не успевала поддерживать свою численность на уровне, достаточном для активной репродукции вируса, несмотря на регулярный подсев свежих донорских МПК.

Биологические особенности ВИЧ-1 CRF63_02A1.

Изоляты CRF63_02A1 ВИЧ-1 характеризовались высоким темпом и быстрым выходом в логарифмическую фазу роста. Для изолятов вируса rapid/high наблюдались активная репродукция на ранних сроках культивирования (5–11-е сутки) и дальнейший активный прирост белка р24. Максимальное накопление р24 происходило на 11–17-е сутки культивирования (24 изолята из 38) с достижением максимальных концентраций, превышающих 500 000 пкг/мл у 8 изолятов из 38. Часть вирусов показывала медленное, но устойчивое накопление белка р24 до высоких концентраций в первом пассаже, при вторичном пас-

сировании накопление происходило более динамично. Для части изолятов ВИЧ-1 slow/low было характерно полное отсутствие динамики роста на начальных сроках культивирования, но в дальнейшем вирус нарабатывался в достаточной для криоконсервации концентрации (рис. 7, 8).

На культуре клеток, инфицированных CRF63_02A1 ВИЧ-1, синцитии обнаруживались единично, ЦПД при изоляции большинства вирусов проявлялся слабо в виде изменения формы клеток, грануляции цитоплазмы, разрыхлении и распаде клампов клеток, характерных клеточных образований при культивировании МПК.

Все изоляты CRF63_02A1 ВИЧ-1 обладали тропностью к рецептору CCR5. Известно, что вирусы, использующие CCR5-рецептор, в большинстве случаев не образуют синцитии в культуре клеток. Этим можно объяснить преобладание NSI вариантов вируса среди изолированных вариантов CRF63_02A1. Тот факт, что для изолированных CRF63_02A1 была характерна только тропность к CCR5, может быть результатом того, что большая часть пациентов, инфицированных этим вирусом, находилась не в терминальной стадии инфекции [28–30]. Этот вопрос требует дополнительных наблюдений за дальнейшей динамикой развития инфекции, вызванной циркулирующей рекомбинантной формой 63_02A1, сопровождающихся анализом области гена *env*, отвечающей за проявление тропности, наблюдением за появлением синцитиев на культуре клеток.

Характерное для ВИЧ-1 CRF63_02A1 мягкое ЦПД, вероятно, позволяет вирусу наиболее активно

нарабатываться и распространяться в клеточной культуре, поражая клетки, не приводя к их разрушению. Известно, что вирусы с тропностью к рецепторам CCR5 обладают меньшей выраженностью цитопатического действия на клетки [29–32]. Учитывая данную особенность ВИЧ-1, для анализа цитопатических свойств вируса различных генетических вариантов рассматривали изоляты ВИЧ-1 только с CCR5-тропностью.

Так как изоляты субтипа В и CRF02_AG ВИЧ-1 представлены в коллекции в меньшем количестве, мы не приводим подробное описание свойств данных вариантов ВИЧ-1. Однако следует отметить, что максимальное накопление вирусного белка р24 при культивировании ВИЧ-1 субтипа В происходило на 11–24-е сутки их культивирования, максимальное накопление р24 превышало 500 000 пкг/мл у 1 из 9 изолированных ВИЧ-1.

Данные проведенных исследований показали, что при культивировании CRF63_02A1 ВИЧ-1 наблюдается менее выраженное цитопатическое действие на МПК и быстрый выход вируса в логарифмическую фазу роста. Данные особенности CRF63_02A1 ВИЧ-1 на культуре МПК *in vitro*, возможно, могут играть определенную роль и значимость при объяснении его быстрого распространения в популяции *in vivo*. В работах по изучению генетических и биологических свойств CRF02_AG ВИЧ-1, прародительского генетического варианта для рекомбинантного вируса CRF63_02A1 также отмечено преобладание его распространенности над другими генетическими вариантами ВИЧ-1 на исследованных территориях [10, 14]. Изучение причин быстрого распространения вариантов ВИЧ-1 является одной из важных научных задач современной эпидемиологии.

Заключение. Создана представительная коллекция современных инфекционных изолятов ВИЧ-1 различных генетических вариантов, наиболее распространенных в России и странах ближнего зарубежья. Исследованы биологические особенности первичных изолятов вируса, проанализи-

рованы субтип-специфические особенности наиболее значимых для российской эпидемии генетических вариантов ВИЧ-1.

Среди циркулирующих на территории Сибири после 2011 года генетических вариантов инфекционных изолятов ВИЧ-1 CRF63_02A1 получили наибольшее распространение, они чаще выделялись из крови недавно инфицированных ВИЧ пациентов. Для новой рекомбинантной формы в системе *in vitro* характерны высокие темпы репродукции и эффективность выделения на МПК, при культивировании CRF63_02A1 регистрировалось умеренное цитопатическое действие на культуру первичных лимфоцитов.

Изучение особенностей репродукции инфекционных вариантов ВИЧ-1 субтипа А, ответственного за развитие эпидемии на большинстве территорий России, показало, что для них были характерны высокий уровень репродукции, выраженный цитопатический эффект на культуре лимфоцитов.

В процессе создания коллекции отработана методика выделения инфекционных изолятов ВИЧ-1, учитывающая репродуктивные особенности вируса, подобраны оптимальные условия и сроки криоконсервации. Вирусы, включенные в состав коллекции, обладают репродуктивными характеристиками, позволяющими осуществлять их воспроизводство при культивировании на МПК, сохраняют свои свойства при пассивировании и после хранения в жидком азоте. Наличие постоянно пополняющейся коллекции биологически и генетически охарактеризованных инфекционных изолятов ВИЧ-1, выделенных от пациентов, находящихся на разных стадиях развития инфекционного процесса, дает возможность осуществлять исследование противовирусной активности создаваемых анти-ВИЧ препаратов; изучение широты и спектра вируснейтрализующих свойств образцов сывороток крови инфицированных ВИЧ-1 лиц для поиска широко нейтрализующих ВИЧ-антител или образцов сывороток вакцинированных добровольцев и др.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Беляков Н.А., Рахманова А.Г. Вирус иммунодефицита человека — медицина // Балтийский медицинский образовательный центр, 2011. 656 с. [Belyakov N.A., Rakhmanova A.G. HIV — medicine. Saint-Petersburg: The Baltic Medical Education Center, 2011, 656 p. (In Russ.).]
2. Саухат С.Р., Шемшур А.Б., Колпаков Д.С., Кучеренко И.Б., Кудря Е.В., Свечникова Л.В., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. Выявление случаев инфицирования рекомбинантными формами 02_AG ВИЧ-1 на территории ЮФО и СКФО РФ // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 1–2. С. 423. [Saukhat S.R., Shemshura A.B., Kolpakov D.S., Kucherenko I.B., Kudrya E.V., Svechnikova L.V., Tokmenin A.V., Gashnikova N.M. Identifying infections 02_AG recombinant forms of HIV-1 on the territory of the southern Federal district and North Caucasus Federal district of the Russian Federation. *Infection and Immunity*, 2012, Vol. 2, No. 1–2, pp. 423 (In Russ.).]

3. Butler I.F., Pandrea I., Marx P.A. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr. HIV Res.*, 2007, Vol. 5, pp. 23–45.
4. Zhang M., Foley B., Schultz A.K., Macke J.P., Bulla I., Stanke M., Morgenstern B., Korber B., Leitner T. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*, 2010, Vol. 7, pp. 25.
5. Nora T., Charpentier C., Tenaillon O., Hoede C., Clavel F., Hance A.J. Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, pp. 7620–7628.
6. Hemelaar J., Gouws E., Ghys P.D., Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*, 2006, Vol. 20, pp. 13–23.
7. Abecasis A.B., Vandamme A.M., Lemey P. Quantifying differences in the tempo of human immunodeficiency virus type 1 subtype evolution. *J. Virol.*, 2009, Vol. 83, pp. 12917–12924.
8. Easterbrook P.J., Smith M., Mullen J., O'Shea S., Chrystie I., de Ruiter A., Tatt I.D., Geretti A.M., Zuckerman M. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J. Int. AIDS Soc.*, 2010, Vol. 13, pp. 13–14.
9. Fernández-García A., Cuevas M.T., Muñoz-Nieto M., Ocampo A., Pinilla M., García V., Serrano-Bengoechea E., Lezaun M.J., Delgado E. Development of a panel of well-characterized human immunodeficiency virus type 1 isolates from newly diagnosed patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2009, Vol. 25, pp. 93–102.
10. Njai H.F., Gali Y., Vanham G., Clybergh C., Jennes W., Vidal N., Butel C., Mpoudi-Ngolle E., Peeters M., Ariën K.K. The predominance of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02 (CRF02_AG) in West Central Africa may be related to its replicative fitness. *Retrovirology*, 2006, Vol. 3, pp. 3–40.
11. Kouri V., Khouri R., Alemán Y., Abrahantes Y., Vercauteren J., Pineda-Peña A.C., Theys K., Megens S., Moutschen M., Pfeifer N. CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*, 2015, Vol. 2, No. 3, pp. 244–254.
12. Esbjörnsson J., Månsson F., Martínez-Arias W., Vincic E., Biague A.J., da Silva Z.J., Fenyö E.M., Norrgren H., Medstrand P. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease-indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology*, 2010, Vol. 22, pp. 2.
13. Brown B.K., Darden J.M., Tovanabutra S., Oblander T., Frost J., Sanders-Buell E., de Souza M.S., Bix D.L., McCutchan F.E., Polonis V.R. Biologic and genetic characterization of a panel of 60 human immunodeficiency virus type 1 isolates, representing clades A, B, C, D, CRF01_AE, and CRF02_AG, for the development and assessment of candidate vaccines. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, pp. 6089–6101.
14. Konings F.A., Burda S.T., Urbanski M.M., Zhong P., Nadas A., Nyambi P.N. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02_AG (CRF02_AG) has a higher in vitro replicative capacity than its parental subtypes A and G. *J. Med. Virol.*, 2006, Vol. 78 (5), pp. 523–534.
15. Fischetti L., Opare-Sem O., Candotti D., Lee H., Allain J.P. Higher viral load may explain the dominance of CRF02_AG in the molecular epidemiology of HIV in Ghana. *AIDS*, 2004, Vol. 18, pp. 1208–1210.
16. Гашникова Н.М., Сафронов П.Ф., Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А., Богачев В.В., Барышев П.Б., Тотменин А.В., Букин Е.К., Бочаров Е.Ф., Черноусова Н.Я., Ставский Е.А. Изучение свойств изолятов CRF02_AG ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 3. С. 38–43. [Gashnikova N.M., Safronov P.F., Nikonorova Yu.V., Unagaeva N.V., Lapteva T.A., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Bukin E.K., Bocharov E.F., Chernousova N.Ya., Stavsky E.A. the study of the properties of isolates of CRF02_AG HIV-1 circulating on the territory of Novosibirsk region. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, No. 3, pp. 38–43 (In Russ.)].
17. Коломеец А.Н., Довгополюк Е.С., Сергеева И.В. Анализ распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Сибирского федерального округа // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011. Т. 3, № 4. С. 51–56. [Kolomeets A.N., Dovgopolyuk E.S., Sergeeva I.V. The Analysis of the prevalence of drug resistance HIV-1 in regions of the Siberian Federal district. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2011, Vol. 3, No. 4, pp. 51–56 (In Russ.)].
18. Bobkova M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR. *AIDS Rev.*, 2013, Vol. 15 (4), pp. 204–212.
19. Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л., Корнилаева Г.В., Пронин А.Ю., Жернов Ю.В., Томсон М.М., Бобкова М.Р., Карамов Э.В. Стремительное распространение циркулирующей рекомбинантной формы CRF02-AG ВИЧ-1 на территории России и сопредельных стран // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60 (6). С. 14–19. [Moskalyuk F.F., Laga V.Yu., Delgado E., Vega I., Fernandez-Garcia A., Perez-Alvarez L., Kornilaeva G.V., Pronin A.Yu., Zhernov Yu.V., Thompson M.M., Bobkova M.R., Karamov E.V. The Rapid expansion of circulating recombinant form, CRF02-AG HIV-1 on the territory of Russia and adjacent countries. *Problems of Virology*, 2015, Vol. 60 (6), pp. 14–19 (In Russ.)].
20. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia. *Arch. Virol.*, 2012, Vol. 157 (12), pp. 2335–2341.
21. Gashnikova N.M., Safronov P.F., Nikonorova Yu.V., Unagaeva N.V., Lapteva T.A. Properties CRF02_AG isolates of HIV-1 circulating in the Novosibirsk Region. *Journal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*, 2011, Vol. 3, pp. 38–43.

22. Gashnikova N.M., Astakhova E.M., Gashnikova M.P., Bocharov E.F., Petrova S.V., Pun'ko O.A., Popkov A.V., Totmenin A.V. HIV-1 Epidemiology, Genetic Diversity, and Primary Drug Resistance in the Tyumen Oblast, Russia. *BioMed Research International*, 2016, Vol. 2016, pp. 13.
23. Gashnikova N.M., Zyryanova D.P., Astakhova E.M., Ivlev V.V., Gashnikova M.P., Moskaleva N.M., Aikin S.S., Bulatova T.N., Pustynnikov S.V., Bocharov E.F., Totmenin A.V. Predominance of CRF63_02A1 and multiple patterns of unique 3 recombinant forms of CRF63_A1 among individuals with newly 4 diagnosed HIV-1 infection in Kemerovo Oblast, Russia. *Arch. Virol.*, 2017, Vol. 162, pp. 379–390.
24. WHO-UNAIDS Guidelines for Standard HIV Isolation and Characterization Procedures. *Second Edition, Produced by WHO-UNAIDS HIV Vaccine Initiative*, 2002.
25. Quinones-Mateu M.E., Ball S.C., Marozsan A.J., Torre V.S., Albright J.L., Vanham G., van Der Groen G., Colebunders R.L., Arts E.J. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. *J. Virol.*, 2000, Vol. 74, pp. 9222–9233.
26. Troyer R.M., Collins K.R., Abraha A., Fraundorf E., Moore D.M., Krizan R.W., Toossi Z., Colebunders R.L., Jensen M.A., Mullins J.I. Changes in human immunodeficiency virus type 1 fitness and genetic diversity during disease progression. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, pp. 9006–9018.
27. Хантов Р.М., Игнатьева Г.А. СПИД. М.: Народная академия культуры и общечеловеческих ценностей, 1992. С. 329. [Khaitov R.M., Ignatyeva G.A. AIDS. Moscow: National Academy of culture and universal values, 1992, pp. 329 (In Russ.).]
28. Blaak H., Van't Wout A.B., Brouwer M. In vivo HIV-1 infection of CD45RA⁺ CD4⁺ T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4⁺ T cell decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, Vol. 97, pp. 1269–1274.
29. Koot M., Keet I.P., Vos A.H., de Goede R.E., Roos M.T., Coutinho R.A., Miedema F., Schellekens P.T., Tersmette M. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4⁺ cell depletion and progression to AIDS. *Ann. Intern. Med.*, 1993, Vol. 118, pp. 681–688.
30. Kwa D., Vingerhoed J., Boeser-Nunnink B., Broersen S. Cytopathic effects of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing Human Immunodeficiency Virus type 1 variants on different cd4⁺ T-cell subsets are determined only by coreceptor expression. *J. Virol.*, 2001, Vol. 75, pp. 10455–10459.
31. Björndal A., Deng H., Jansson M., Fiore J.R., Colognesi C., Karlsson A., Albert J., Scarlatti G., Littman D.R., Fenyö E.M. Coreceptor usage of primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J. Virol.*, 1997, Vol. 71, pp. 7478–7487.
32. Хофман К., Рокштро Ю.К. Лечение ВИЧ-инфекции. М.: Р.Валент, 2011. С. 736. [Hoffman K., Rockstroh Yu.K. Treatment of HIV infection. Moscow: R.Valent, 2011, pp. 736 (In Russ.).]

Статья поступила 17.01.2017 г.

Контактная информация: Богачева Наталья Владимировна, e-mail: unagaeva_nv@vector.nsc.ru

Коллектив авторов:

Богачева Наталья Владимировна — м.н.с. отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, +7 (383) 363-48-40, 630559, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, e-mail: unagaeva_nv@vector.nsc.ru;
 Бледных Наталья Анатольевна — м.н.с. отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;
 Тотменин Алексей Владимирович — начальник лаборатории отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, +7 (383) 363-48-40, 630559, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, e-mail: totmenin_av@vector.nsc.ru;
 Мирджамалова Феруза Одилжоновна — врач-инфекционист ГБУЗ НСО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», +7 383 336-72-74, 630049, Новосибирск, ул. Дуси Ковальчук, 272/2, офис 202, e-mail: fra2709dobs@mail.ru;
 Соколов Юрий Владимирович — зам. главного врача ГБУЗ НСО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», +7 (383) 336-75-10, 630049, Новосибирск, ул. Дуси Ковальчук, 272/2, офис 202, e-mail: topnsk@mail.ru;
 Гашникова Наталья Матвеевна — к.б.н., зав. отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, +7 (383) 363-48-40, 630559, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, e-mail: ngash@ngs.ru, ngash@vector.nsc.ru.