

ISSN 2305-2198 (Print)  
ISSN 2309-4842 (Online)

# ЛАБОРАТОРНАЯ СЛУЖБА

Том 6



3'2017

**МАТЕРИАЛЫ  
III РОССИЙСКОГО КОНГРЕССА  
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Научно-практический журнал

Основан в 2012 г.

МЕДИА  СФЕРА

Издательство Медиа Сфера

Ассоциация специалистов и организаций  
лабораторной службы “Федерация лабораторной  
медицины”

“Лабораторная служба” — научно-практический  
рецензируемый медицинский журнал.

Печатное издание Ассоциации специалистов  
и организаций лабораторной службы  
“Федерация лабораторной медицины”  
www.fedlab.ru

Выходит 4 раза в год.  
Основан в 2012 году.

“Laboratornaâ služba” (Laboratory Service)

is a quarterly peer-reviewed medical journal  
published by MEDIA SPHERA Publishing Group.  
Founded in 2012.

Журнал представлен в следующих международ-  
ных базах данных и информационно-справочных  
изданиях: РИНЦ (Российский индекс научного  
цитирования), Ulrich's Periodicals Directory, Google  
Scholar.

Издательство Медиа Сфера:

127238 Москва,  
Дмитровское ш., д. 46, корп. 2, этаж 4.  
Тел.: (495) 482-4329  
Факс: (495) 482-4312  
E-mail: info@mediasphera.ru  
www.mediasphera.ru

Адрес для корреспонденции:

127238 Москва, а/я 54, Медиа Сфера  
Отдел рекламы: (495) 482-0604  
E-mail: reklama@mediasphera.ru  
Отдел подписки: (495) 482-5336  
E-mail: zakaz@mediasphera.ru

Редакция не несет ответственности за содержание  
рекламных материалов. Точка зрения авторов мо-  
жет не совпадать с мнением редакции. К публика-  
ции принимаются только статьи, подготовленные  
в соответствии с правилами для авторов. Направ-  
ляя статью в редакцию, авторы принимают усло-  
вия договора публичной оферты. С правилами для  
авторов и договором публичной оферты можно  
ознакомиться на сайте: www.mediasphera.ru. Пол-  
ное или частичное воспроизведение материалов,  
опубликованных в журнале, допускается только с  
письменного разрешения издателя — издательства  
«Медиа Сфера».

Адрес редакции:

127238 Москва,  
Дмитровское ш., д. 46, корп. 2, этаж 4.  
Тел.: (495) 482-4329  
E-mail: labs@mediasphera.ru

Оригинал-макет изготовлен издательством  
Медиа Сфера

Компьютерный набор и верстка:

Г.В. Кременчуцкая, М.Л. Калужнин,  
В.В. Карасева

Корректоры: А.К. Балихина, Г.И. Федоровская

Индексы по каталогу агентства “Роспечать”

84559 — для индивидуальных подписчиков

84562 — для предприятий и организаций

Подписано в печать

Формат 60×90 1/8. Тираж 3000 экз.

Усл. печ. л.

Заказ

Отпечатано в ООО «ТИПОГРАФИЯ КС-ПРИНТ»

# ЛАБОРАТОРНАЯ СЛУЖБА

МАТЕРИАЛЫ III РОССИЙСКОГО КОНГРЕССА

Том 6

ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ

3'2017

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор: А.В. Мошкин, к.м.н. (Москва)

Ответственный секретарь: О.В. Лянг, к.б.н., доц. (Москва)

Председатель редакционной коллегии: А.Г. Кочетов, д.м.н., проф.  
(Москва)

Редакционная коллегия

А.Ж. Гильманов, д.м.н., проф. (Уфа)

М.А. Годков, д.м.н., проф. (Москва)

Т.И. Долгих, д.м.н., проф. (Омск)

Б.Н. Изотов, д.х.н., проф. (Москва)

Ю.А. Захарова, д.м.н., доц. (Пермь)

А.В. Индутный, д.м.н., проф. (Омск)

О.В. Козина, д.м.н., проф. (Петропавловск-Камчатский)

В.Н. Малахов, д.б.н. (Москва)

О.В. Островский, д.м.н., проф. (Волгоград)

Е.В. Просекова, д.м.н., проф. (Владивосток)

И.С. Тартаковский, д.б.н., проф. (Москва)

С.В. Цвиренко, д.м.н., проф. (Екатеринбург)

В.Л. Эмануэль, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург)

Председатель редакционного совета: И.А. Ольховский, к.м.н.  
(Красноярск)

Редакционный Совет:

С.П. Алпатов, к.м.н. (Москва)

А.А. Архипкин, к.б.н. (Москва)

И.А. Зализняк, к.м.н. (Красноярск)

П.Н. Золотарев, к.м.н. (Самара)

И.С. Мамедов, к.м.н. (Москва)

Е.В. Печковский, к.б.н. (Новосибирск)

Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ журнал «Лабораторная служба» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендована публикация основных результатов диссертационных исследований на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Издательство МЕДИА СФЕРА Москва · MEDIASPHERA Publishing Group Moscow

Приветствие президента Ассоциации ФЛМ и Конгресса	<b>4</b>	Association FLM and Congress President's greeting
<b>ВСТУПЛЕНИЕ К НОМЕРУ</b>		
<i>Годков М.А.</i> Лабораторная диагностика в эпоху научно-технической революции. Закат или рассвет?	<b>5</b>	<i>Godkov M.A.</i> Laboratory diagnostics in the era of scientific and technical revolution. Sunset or sunrise?
<b>ТЕЗИСЫ III РОССИЙСКОГО КОНГРЕССА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ</b>		
Автоматизация современной лаборатории	<b>9</b>	Automatization for the modern laboratory
Актуальные аспекты изучения антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов	<b>11</b>	Relevant aspects of the study of antibiotic resistance of pathogens
Актуальные вопросы обеспечения качества клинической лабораторной диагностики	<b>17</b>	Topical issues of quality assurance in clinical laboratory diagnostics
Бактериофаги и их роль в диагностике и профилактике внутрибольничных инфекций	<b>25</b>	Bacteriophages and their role in the diagnosis and prevention of nosocomial infections
Вопросы обеспечения эпидемиологической безопасности деятельности центров КДЛ	<b>25</b>	The issues of ensuring epidemiological safety of activity of CDL centers
Инфекции с пищевым путем передачи. Современное состояние проблемы, перспективы диагностики и профилактики	<b>26</b>	Food infections. Current state of the problem, opportunities for diagnostics and prevention
Информатизация лабораторной службы	<b>28</b>	Informatization of laboratory services
Клиническая значимость показателей лабораторной экспресс-диагностики при критических состояниях	<b>29</b>	Clinical importance of the indicators of rapid laboratory diagnostics in critical conditions
Клинические аспекты лабораторной диагностики в структуре доказательной медицины	<b>34</b>	Clinical aspects of laboratory diagnostics in the structure of evidence-based medicine
Клиническая цитология. Основы, организация и методы. Жидкостная цитология	<b>49</b>	Clinical Cytology. Foundations, organization and methods. Liquid-based Cytology
Конверсия фундаментальных научных знаний и умений в лабораторной диагностике	<b>56</b>	Conversion of fundamental scientific knowledge and skills in laboratory diagnostics
Лабораторная диагностика внутрибольничных инфекций	<b>63</b>	Laboratory diagnostics of nosocomial infections
Лабораторная диагностика социально значимых вирусных инфекций	<b>65</b>	Laboratory diagnostics of socially significant viral infections
Лабораторная диагностика туберкулеза, микобактериоза, микозов и паразитарных заболеваний	<b>77</b>	Laboratory diagnostics of tuberculosis, mycobacteriosis, fungal infection and parasitic diseases
Медицина 5 «П»: настоящее и будущее	<b>86</b>	Medicine 5 P: present and future
Микробиологическая диагностика инфекций в акушерстве и неонатологии	<b>86</b>	Microbiological diagnosis of infections in obstetrics and neonatology
Микробиота человека и способы ее коррекции	<b>87</b>	Human microbiota and ways of its correction
Молекулярная диагностика инфекционных болезней	<b>92</b>	Molecular diagnostics of infectious diseases
Молекулярно-генетические маркеры в диагностике и прогнозе опухолей	<b>101</b>	Molecular genetic markers in diagnosis and prognosis of tumors
Нерешенные вопросы при оценке статуса витамина D	<b>113</b>	Unresolved issues in assessing the status of vitamin D
Образование. Профессиональные стандарты. Кадровое обеспечение	<b>114</b>	Education. Professional standards. Staffing
Особенности лабораторного обследования лиц пожилого и старческого возраста	<b>117</b>	Features of a laboratory examination of persons of elderly and senile age
Особенности микробиологической диагностики у пациентов с муковисцидозом	<b>120</b>	Features of microbiological diagnosis in patients with mucoviscidosis
Перспективы клинической гематологии	<b>121</b>	Prospects of clinical hematology
Разработка и применение высокотехнологичных молекулярно-генетических исследований в лабораторной практике	<b>125</b>	Development and application of high-tech molecular genetic studies in laboratory practice

Роль микробиологической диагностики при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта	<b>137</b>	Role of microbiological diagnostics in inflammatory diseases of the gastrointestinal tract
Сепсис: междисциплинарные проблемы диагностики и мониторинга лечения	<b>138</b>	Sepsis: an interdisciplinary problem diagnosis and monitoring of treatment
Современные технологии <i>in vitro</i>	<b>146</b>	Modern technologies <i>in vitro</i>
Социально-психологические аспекты лабораторной медицины: взаимодействие пациента с лабораторной подсистемой здравоохранения	<b>149</b>	Socio-psychological aspects of laboratory medicine: the interaction of the patient with laboratory subsystem of healthcare
Трансляционная медицина в гемостазиологии	<b>150</b>	Translational medicine in hemostasis
Централизация лабораторных исследований: проблемы финансирования	<b>154</b>	Centralization of laboratory tests: funding
Эволюция концепции лабораторного тестирования «brain-to-brain loop»	<b>157</b>	Evolution of the concept laboratory testing «brain-to-brain loop»
Разное	<b>158</b>	Other

#### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Николаев Н.С., Прищепа Н.П., Вуймо Т.А., Добровольская Н.Ю., Борисова Л.В., Николаева А.В., Григорьева Е.В.*  
Сравнительный анализ лабораторных показателей гемостаза при использовании различных схем антикоагулянтной профилактики при эндопротезировании тазобедренных суставов

*Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А.*  
К вопросу о валидации метода определения соматических мутаций в генах янускиназы-2 (JAK2V617F), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL) в образцах сухих капель крови

*Багирова Н.С., Дмитриева Н.В.*  
Кандидемия у онкологических больных: таксономическая структура и резистентность к флуконазолу и вориконазолу *in vitro*

*Чурюмова Ю.А., Вавилова Т.В., Вохмянина Н.В.*  
Совершенствование алгоритма неонатального скрининга на наследственные болезни обмена с помощью технологии секвенирования следующего поколения

*Соснин Д.А., Островский О.В., Веровский В.Е.*  
Лабораторные показатели повреждения почек при неполной обструктивной уропатии, вызванной доброкачественной гиперплазией предстательной железы

*Свещинский М.Л., Кокарева Т.С., Плюснина С.В., Черных С.В.*  
Оценки использования лабораторных исследований в учреждениях первичной медико-санитарной помощи

#### СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ

*Соснин Д.Ю., Ненасьева О.Ю., Шевчук В.В., Денисов С.А.*  
Различная динамика тиреоглобулина после экстирпации щитовидной железы в зависимости от тиреоидного статуса

#### ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ АССОЦИАЦИИ ФЛМ

##### КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ

Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции

##### НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Профессиональный стандарт врача-биохимика

#### ORIGINAL INVESTIGATIONS

**170** *Nikolaev N.S., Prischepa N.P., Vuimo T.A., Dobrovolskaya N.Y., Borisova L.V., Nikolaeva A.V., Grigorieva E.V.*  
Comparative analysis of laboratory parameters of hemostasis while using different schemes of anticoagulant prophylaxis in case of hip replacement

**178** *Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Olkhovskiy I.A.*  
On the issue of validation of the method for somatic mutations determining in Janus kinase-2 (JAK2V617F), calreticulin (CALR) and receptor of thrombopoietin (MPL) genes in the dry blood drops

**182** *Bagirova N.S., Dmitrieva N.V.*  
Candidemia in cancer patients: taxonomic structure and resistance to fluconazole and voriconazole *in vitro*

**190** *Churyumova Y.A., Vavilova T.V., Vokhmyanina N.V.*  
Improvement of neonatal screening algorithm for inherited metabolic disorders using NGS technology

**198** *Sosnin D.A., Ostrovskiy O.V., Verovskiy V.E.*  
Laboratory indicators kidney injury in patients with partial obstructive uropathy caused by benign prostate hyperplasia

**206** *Sveshchinskiy M.L., Kokareva T.S., Plyusnina S.V., Chernykh S.V.*  
Analysis of the use of laboratory tests in primary care in the Russian region

#### CASE REPORT

**214** *Sosnin D.Yu., Nenasheva O.Yu., Shevchuk V.V., Denisov S.A.*  
Different dynamics of thyroglobulin after thyroid extirpation, depending on the thyroid status

#### ACTIVITY OF ASSOCIATION FLM

##### GUIDELINES

**217** Analysis of HIV drug resistance

**238** Laboratory diagnosis of influenza and other acute respiratory viral infections by polymerase chain reaction

##### NORMATIVE DOCUMENTS

**268** Professional standard for biochemical doctor

<https://doi.org/10.17116/labs2017633-?>

## Клинические рекомендации «Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ»

ОДОБРЕНЫ НА II РОССИЙСКОМ КОНГРЕССЕ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ  
12—14 ОКТЯБРЯ 2016 Г., МОСКВА

### ТИП КЛИНИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ: ИНТЕРПРЕТАЦИЯ И ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В клинических рекомендациях описаны основные ситуации, требующие назначения генотипирования ВИЧ, условия и показания к применению анализа мутаций лекарственной устойчивости, алгоритм действий перед назначением анализа, процедура взятия и фракционирования образцов крови для проведения лабораторных исследований, условия транспортировки и хранения образцов, а также возможности врача по самостоятельной интерпретации результатов генотипирования и современные средства для подбора оптимальных схем антиретровирусной терапии с учетом данных о геноме ВИЧ. В основу положены современные международные и национальные рекомендации по лечению ВИЧ-инфекции.

Клинические рекомендации предназначены в помощь врачам-инфекционистам, осуществляющим наблюдение и лечение ВИЧ-инфицированных лиц, включая антиретровирусную терапию, заведующим и специалистам клиничко-диагностических лабораторий специализированных лечебно-профилактических учреждений (центров СПИД) и организаторам здравоохранения.

В рекомендациях рассмотрены главным образом преаналитическая и постаналитическая стадии генотипирования ВИЧ. По вопросам организации лабораторных помещений и собственно процедуры выполнения генотипирования ВИЧ следует обращаться к специализированным лабораторным руководствам и инструкциям [3, 6].

#### Авторы-составители:

**Бобкова Марина Ридовна** — заведующая отделом общей вирусологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, доктор биологических наук

**Грезина Лилия Анатольевна** — заведующая клиничко-диагностической лабораторией ГБУЗ «Ямало-Ненецкий окружной Центр по профилактике и борьбе со СПИД», кандидат медицинских наук

**Дементьева Наталья Евгеньевна** — старший врач отдела молекулярно-биологических исследований лаборатории Санкт-Петербургского Центра СПИД, кандидат медицинских наук

**Зайцева Наталья Николаевна** — и.о. руководителя Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, кандидат медицинских наук

**Казеннова Елена Валерьевна** — ведущий научный сотрудник ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, доктор биологических наук

**Киреев Дмитрий Евгеньевич** — руководитель группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, кандидат биологических наук

**Шемшур Андрей Борисович** — врач клинической лабораторной диагностики, ГБУЗ «Клинический центр профилактики и борьбы со СПИД» МЗ Краснодарского края, кандидат медицинских наук

**Ответственный разработчик: Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»**

#### Рецензенты:

**Годков Михаил Андреевич** — руководитель отдела лабораторной диагностики, ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского», доктор медицинских наук, Москва

**Зверев Сергей Яковлевич** — заведующий диагностической лабораторией ГКУЗ ПК «Пермский краевой Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», доктор медицинских наук, Пермь

**Сизова Наталья Владимировна** — заместитель главного врача СПб ГУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», доктор медицинских наук, Санкт-Петербург

**Скляр Лидия Федоровна** — профессор кафедры инфекционных болезней, Владивостокский государственный медицинский университет, доктор медицинских наук, Владивосток

#### Список сокращений

АРТ — антиретровирусная терапия

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека

ВН — вирусная нагрузка

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ — ингибиторы интегразы

ИН — интегразы (integrase)

ИП — ингибиторы протеазы

ЛПУ — лечебно-профилактическое учреждение

НИОТ — нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ННИОТ — ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ОТ — обратная транскриптаза (reverse transcriptase)

ПР — протеаза (protease)

ПЦР — полимеразная цепная реакция АВС — абакавир

AZT — азидотимидин

ddI — диданозин

d4T — ставудин

dNTPs — дезоксинуклеотидтрифосфаты (deoxynucleotide triphosphate)

FPR (false positive rate) — уровень допустимости ложноположительных результатов

FTC — эмтрицитабин

MVC — маравирик

TAMs — мутации к аналогам тимидина (thymidine analog mutations)

TDF — тенофовир

ЗТС — ламивудин

Причиной возникновения лекарственно-устойчивых (**резистентных**) вариантов ВИЧ считается высокая скорость размножения вируса (около 10 млн. новых вирусных частиц ежедневно) в сочетании с исключительно высокой частотой ошибок, происходящих в ходе обратной транскрипции. Ошибки приводят к появлению мутаций в составе генома ВИЧ, в том числе и в области гена *pol*, кодирующей ферменты ВИЧ — объекты **антиретровирусной терапии (АРТ)**. Эта особенность ВИЧ, лежащая в основе его беспрецедентной изменчивости, не связана с лечением и является природным свойством ВИЧ, однако некоторые мутации в составе гена *pol* могут приводить к снижению чувствительности ВИЧ к лекарствам.

В присутствии лекарственных препаратов штаммы ВИЧ, имеющие такие мутации, получают преимущества в сравнении с чувствительными («дикими») штаммами. В результате микроэволюционных событий через некоторый промежуток времени в популяции вируса (т.е. в совокупности вирусов, циркулирующих в организме пациента) начинают преобладать резистентные формы ВИЧ. Проявлением этого становится подъем вирусной нагрузки (ВН), отражающий репликацию устойчивого варианта и регистрируемый как **вирусологический неуспех АРТ**.

Скорость возникновения и характер мутаций определяются несколькими факторами, среди которых находятся механизм действия и эффективность препарата, генетический барьер лекарства, степень приверженности пациента, особенности генома человека, а также вклад каждой из мутаций в снижение чувствительности и изменение способности вируса к размножению (**репликативной способности**).

В случаях подтверждения наличия резистентности ВИЧ к одному или нескольким препаратам схемы необходимо произвести замену тех лекарств, к которым вирус выработал устойчивость, либо всей схемы целиком в зависимости от сочетания мутаций. Выбор последующей схемы лечения может осложняться наличием **перекрестной устойчивости**. Многократный неуспех терапии может сопровождаться формированием **множественно устойчивых** вариантов вируса, что существенно снижает возможности для длительного подавления размножения ВИЧ.

Анализ генома (**генотипирование**) ВИЧ выполняется в клинико-диагностических и научно-исследовательских лабораториях и может быть проведен как с практической целью **оптимизации схем лечения** у «наивных» и получающих АРТ пациентов, так и в порядке исследований, посвященных молекулярному мониторингу эпидемии ВИЧ-инфекции и слежению за распространением генетических вариантов ВИЧ — подтипов и рекомбинантных форм. В данном руководстве основное внимание будет уделено «прикладным» вопросам — генотипированию ВИЧ

с целью оценки наличия и характера лекарственной устойчивости, связанной с мутациями в геноме, условиям и срокам проведения анализа, действиям после получения результата, а также способам интерпретации генотипа ВИЧ.

#### **Уровень доказательности рекомендаций**

В клинических рекомендациях рассматриваются и упоминаются по ходу изложения несколько групп пациентов и основных практических ситуаций, в которых встает вопрос о необходимости анализа генома ВИЧ и порядке его назначения. Каждое утверждение, касающееся необходимости и порядка выполнения анализа, сопровождается экспертной оценкой, суммирующей оценки нескольких международных экспертных групп.

Данные об уровне доказательности того или иного утверждения используют общепринятую буквенно-цифровую градацию:

**A** — строго рекомендовать, **B** — внимательно рассмотреть, **C** — рассмотреть с учетом доказательной базы;

**I** — данные, основанные хотя бы на одном проспективном рандомизированном исследовании с использованием суррогатных маркеров, например вирусной нагрузки;

**II** — данные, основанные хотя бы на одном ретроспективном исследовании;

**III** — мнение экспертов, основанное на научных данных, полученных в процессе любых других клинических и *in vitro* наблюдений.

В отдельных случаях указывается доля экспертов, согласных с тем или иным утверждением (консенсус), в процентах.

#### **Методология анализа лекарственной устойчивости ВИЧ**

Для анализа резистентности ВИЧ разработаны и применяются два вида тестов: генотипические и фенотипические. Методы эти принципиально различаются как способами исследования, так и характером получаемых результатов [1, 14].

**Фенотипические** методы используют прямой подход к изучению чувствительности ВИЧ, осуществляя измерение репликации ВИЧ под действием лекарственного препарата. Таким образом, результаты фенотипирования дают возможность оценить не только факт наличия, но и степень снижения чувствительности ВИЧ (**кратность резистентности**), т.е. являются **количественными**. Методология фенотипических исследований постоянно совершенствуется, и современные тесты основаны не на культивировании вируса, а на применении сложных генно-инженерных технологий, позволяющих ускорить анализ [1].

Методы фенотипирования не определяют индивидуальные мутаций (при этом не следует забывать,

что в основе фенотипических проявлений устойчивости всегда лежат изменения генома), но зато позволяют оценить их совокупный вклад в резистентность вируса и дают наиболее приближенный к действительности результат, поэтому они считаются **«золотым стандартом»** определения резистентности ВИЧ.

В практике диагностических лабораторий во всем мире фенотипические тесты применяются тогда, когда надежность результата имеет критическое значение, т.е., как правило, у пациентов, испытавших неуспех АРТ неоднократно (СИ). У пациентов с большим опытом терапии круг поиска эффективных препаратов значительно сужен, и количественный показатель кратности резистентности может сыграть решающую роль при выборе относительно эффективного лекарства. Для рутинного анализа эти тесты не используют по причине их высокой стоимости и длительности выполнения. В настоящее время в России ни один из фенотипических тестов не зарегистрирован и не применяется, поэтому далее в данном руководстве будут обсуждаться только вопросы генотипирования ВИЧ.

**Генотипирование** основано на непрямой оценке резистентности путем выявления мутаций генома ВИЧ, ассоциированных с устойчивостью в случаях вирусологического неуспеха лечения. Такие методы используются широко благодаря относительной дешевизне, скорости и простоте выполнения, и рекомендованы к применению в большинстве рутинных клинических ситуаций (А1), однако эти достоинства сочетаются с существенно меньшей надежностью тестов, составляющей 85—90%.

Для анализа генотипа ВИЧ применяют подход, основанный на **сравнении** полученных последовательностей РНК с уже известными генотипами ВИЧ (последовательностями РНК ВИЧ), хранящимися в специальных базах данных (см. далее). Каждая из таких последовательностей получена, как правило, от пациентов, испытавших неуспех терапии теми или иными препаратами, и содержит определенный набор мутаций в геноме ВИЧ.

Поиск наиболее близкой последовательности в базе данных составляет центральную задачу интерпретации результатов генотипирования, при этом в силу огромной изменчивости ВИЧ ориентироваться всегда приходится не на идентичный, а на ближайший похожий вариант. В большинстве случаев этого оказывается достаточно, и у пациентов, имеющих одинаковый набор мутаций, характер устойчивости ВИЧ тоже оказывается одинаковым, однако так бывает не всегда, и именно поэтому часть (10—15%) случаев анализа генотипа дают **расхождения** с данными фенотипирования.

Применяемые на практике тест-системы для генотипирования ВИЧ включают анализ последовательностей генома ВИЧ, кодирующих белки группы *pol* — обратную транскриптазу (ОТ), протеазу (ПР),

интегразу (ИН), а также оболочечный белок *Erv gp120*, т.е. все известные мишени АРТ. В стандартной ситуации рекомендуется анализировать ОТ и ПР, мишени препаратов классов ингибиторов интегразы (ИИ)/присоединения исследуют только в том случае, если схема лечения включала/будет включать эти лекарства (А1).

В практике встречается также термин **«виртуальное фенотипирование»**. Этот подход представляет собой вариант генотипирования, в котором для интерпретации данных используют специальную базу данных, включающую только **парные данные генотип—фенотип**.

Поскольку в этой базе данных есть информация о кратности резистентности, анализ дает возможность на основании последовательности генома «вычислить» количественный «виртуальный» результат, построенный на аналогии с результатами истинных фенотипических исследований. В России тесты для «виртуального фенотипирования» применения не получили. Генотипические и фенотипические методы рассчитаны на анализ плазмы крови с вирусной нагрузкой от 100—1000 копий (А1) (в России от **500 копий РНК/мл**), при этом содержание устойчивого вируса должно составлять **не менее 20%** (поскольку оценить этот показатель на практике нельзя, следует всегда проводить анализ в момент потенциального преобладания резистентных вариантов ВИЧ у пациента, т.е. на фоне неуспешной терапии, см. далее).

#### Общие принципы назначения генотипирования ВИЧ

Факт наличия резистентных штаммов ВИЧ является показанием к замене неэффективных средств лечения, однако для подтверждения этого факта необходимо провести ряд действий для того, чтобы убедиться в отсутствии других причин неуспеха терапии. Смысл этих действий определяется совокупностью научных представлений о феномене устойчивости ВИЧ и многолетними практическими наблюдениями, сделанными врачами в ходе проведения АРТ.

Одно из таких представлений касается репликативной способности (**фитнеса**) устойчивых вирусов. Известно, что **основные** (major) мутации, возникающие в активном центре фермента ВИЧ, часто приводят к снижению фитнеса вируса, что выражается в более низких значениях вирусной нагрузки, наблюдаемых у пациентов с лекарственной устойчивостью на фоне приема препарата. Это же явление объясняет возвращение чувствительных вирусов после отмены препарата, когда в отсутствие селективного давления преимущества оказываются на стороне «диких» вариантов с более высоким фитнесом. Поскольку срок такого возвращения может сильно варьировать и прогнозировать его нельзя, рекомендуется назначать анализ генотипа ВИЧ **на фоне про-**

должения неуспешной терапии, т.е не отменяя препарат до тех пор, пока резистентный вирус находится в большинстве и его можно выявить с применением существующих тестов. В Национальном руководстве [2] для анализа допускается срок 2—4 нед после отмены препарата, однако следует помнить о том, что его нельзя считать оптимальным.

Другое важное наблюдение относится к феномену **латентности ВИЧ**. Известно, что в ходе размножения ВИЧ часть Т-клеток, в которых находится провирусная ДНК, способна переходить из активированного состояния (в котором они наиболее уязвимы для ВИЧ) в состояние латентности. Латентные Т-клетки, среди которых большинство составляют клетки памяти, обладают способностью к митотическому делению и, таким образом, поддерживают свое существование в организме неограниченно долго. Время от времени происходит реактивация таких клеток с образованием полноценных вирусных частиц, способных заражать новые клетки. В ходе размножения резистентных вирусов всегда образуется популяция латентных клеток, содержащих провирусную ДНК с мутациями устойчивости — так называемый **«архив» резистентных вариантов ВИЧ**. Выявить такие мутации обычными методами нельзя, так как все применяемые тесты рассчитаны на анализ РНК ВИЧ, содержащейся в плазме крови и отражающей состояние последнего поколения размножающихся вирусов.

В практическом отношении это означает, что после отмены препарата АРТ, к которому зарегистрированы мутации лекарственной устойчивости, и замены схемы лечения в организме человека всегда остается **резервуар устойчивых вариантов**. В случае повторного применения неуспешных препаратов «архив» в короткие сроки способен дать начало новой популяции устойчивых вариантов ВИЧ, получающих в такой ситуации селективные преимущества. Именно по этой причине **повторное использование** лекарств при условии когда-либо прежде подтвержденной устойчивости к ним категорически **не рекомендуется**, несмотря на то что анализ генома может уже не выявлять мутации в составе РНК ВИЧ. Новая схема всегда основывается на препаратах, устойчивость к которым никогда не была зарегистрирована (за исключением случаев перекрестной устойчивости), либо препаратах нового класса.

Еще одна группа соображений касается способности устойчивых вариантов ВИЧ передаваться при заражении любым способом. Это явление, получившее название **передающейся устойчивости ВИЧ**, достаточно широко распространено, например, в большинстве стран Западной Европы доля пациентов, зараженных устойчивыми вирусами, составляет около 9% [15, 16], однако в некоторых европейских странах этот показатель достигает значений более 18%. После заражения устойчивым вариан-

том ВИЧ в течение срока от нескольких месяцев до нескольких лет может произойти замещение этого варианта «диким» штаммом в результате микроэволюционных процессов. Это означает, что в составе РНК ВИЧ мутации устойчивости (например, к препаратам первой схемы) через неопределенный срок после заражения могут быть не выявлены, при этом в «архиве» вируса сохранятся «устойчивые» провирусы.

Наличие мутаций устойчивости к препаратам первой схемы АРТ у «наивного» пациента может ограничивать эффект от ее применения, хотя и не всегда, поэтому в ряде случаев необходимо проводить анализ генома ВИЧ перед назначением лечения (этот вопрос будет более подробно рассмотрен далее).

Вопрос о назначении генотипирования ВИЧ в клинической практике возникает в четырех основных ситуациях — анализ генотипа ВИЧ сразу после постановки диагноза «ВИЧ-инфекция», впервые назначаемая терапия (у «наивных» пациентов), замена схемы в случае наличия признаков вирусологического неуспеха и замена вирусологически успешной схемы. Чаще всего реализуется третья ситуация, которая в данном руководстве будет рассмотрена в первую очередь.

#### **Лабораторные признаки возможной лекарственной устойчивости ВИЧ**

В ходе наблюдения ВИЧ-инфицированного пациента его состояние оценивается множеством параметров, как общеклинических, так и специальных. Для решения вопроса о начале терапии и слежения за ее эффективностью особенно важны два из них — **число CD4<sup>+</sup>-Т-клеток и вирусная нагрузка**, оценивающие соответственно состояние иммунной системы и интенсивность репликации вируса. Если перед назначением лечения для решения о его начале имеют значение абсолютные показатели, то после назначения АРТ роль их измерения меняется: улучшение иммунной функции измеряется приростом числа клеток, а целью определения вирусной нагрузки является достижение **неопределяемого уровня** (как правило, <40—50 копий РНК/мл). Все случаи наличия детектируемой вирусной нагрузки на фоне достаточно продолжительного лечения будут считаться вирусологическим неуспехом.

Оба показателя одинаково значимы для оценки клинического эффекта лечения, однако к резистентности может иметь прямое отношение **только вирусная нагрузка**, которая непосредственно реагирует на лекарственное воздействие. Случаи иммунологического неуспеха, проявляющегося отсутствием повышения или снижением числа CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, в сочетании с неопределяемой вирусной нагрузкой обычно не дают оснований заподозрить лекарственную устойчивость ВИЧ.



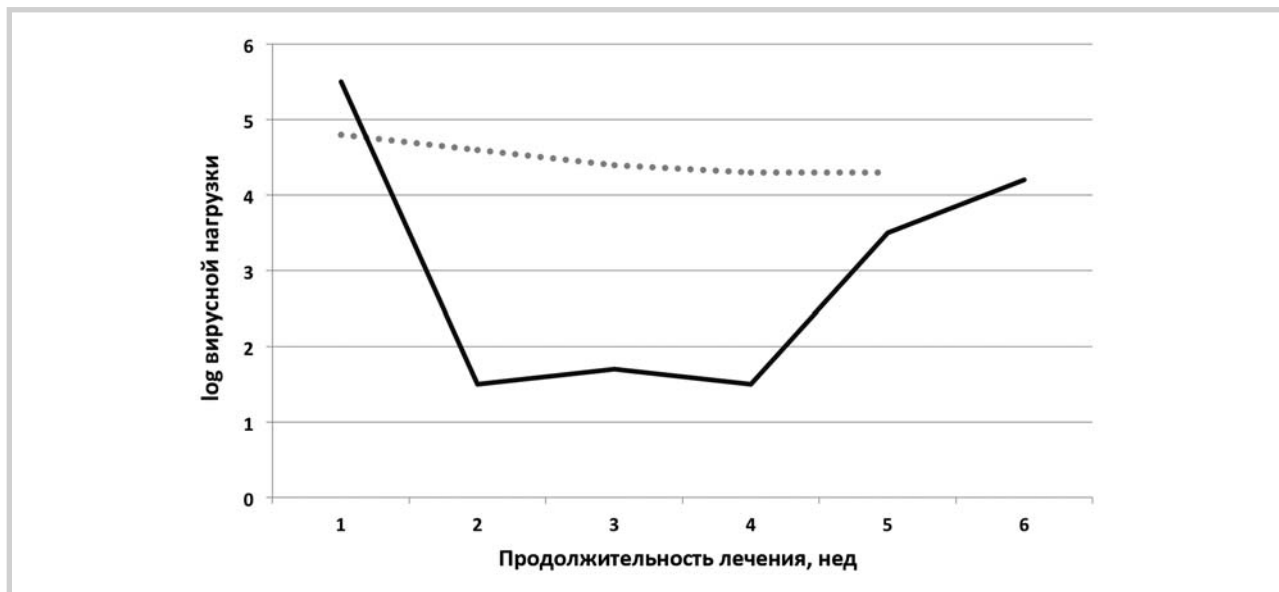


Рис. 1. Признаки возможной лекарственной устойчивости ВИЧ.

Понятие «**вирусологический неуспех**» описывает две ситуации: 1) лечение не приводит к снижению ВН до неопределяемого уровня в течение 24 нед либо 2) начальный период недетектируемости ВИЧ сменяется возвращением виремии, превышающей уровень 200 копий РНК/мл [9] (ВН в интервале 50—200 копий РНК/мл, см. с. 224) (рис. 1).

**Через месяц** после начала лечения рекомендуется провести анализ вирусной нагрузки для первичной оценки эффективности схемы (она должна снижаться). В качестве промежуточной точки до окончательного решения об успехе терапии используют **8 нед** от начала терапии, при этом эффективным на этот момент считается снижение нагрузки не менее чем на два порядка.

**Практические рекомендации по мониторингу вирусной нагрузки**

- **Всегда выполнять исследование в одной квалифицированной лаборатории, желательно с большим объемом исследований**
- **При возможности использовать только один вид тестов у каждого пациента**
- **Проводить анализ в рекомендуемые сроки с соблюдением интервалов**
- **Проводить забор крови желательно в одно и то же время суток и день недели**
- **Тщательно соблюдать правила забора и транспортировки плазмы крови**
- **Не назначать анализ вскоре после перенесенной инфекции (например, респираторной) или вакцинации**
- **Все необычные результаты (например, неожиданно высокие или низкие значения) следует проверить повторно**

Неуспех АРТ не всегда связан с резистентностью. На практике случаи истинной устойчивости ВИЧ составляют не более 30—40% от всех неуспешных историй лечения, поэтому любая возможность выявить причину неуспеха АРТ, не связанную с наличием мутаций устойчивости, позволяет избежать назначения заведомо бесполезного и дорогостоящего анализа генома ВИЧ.

Среди наиболее частых **причин повышения вирусной нагрузки** — перерывы в приеме препаратов (28—40%), нарушения фармакокинетики препаратов и лекарственные взаимодействия. Внешне вирусологический неуспех во всех этих случаях проявляется одинаково, вот почему, прежде чем назначить тест на резистентность ВИЧ, следует внимательно изучить все обстоятельства повышения нагрузки и действовать методом последовательного исключения. Иными словами, все случаи стабильного повышения вирусной нагрузки следует трактовать как вирусологический неуспех, однако действия врача будут неодинаковы в зависимости от обстоятельств его проявления, а также степени повышения нагрузки. Некоторые **типичные сценарии вирусологического неуспеха** и соответствующие алгоритмы исследования резистентности приводятся далее.

**«Подскоки» вирусной нагрузки**

Прежде всего, не каждый подъем вирусной нагрузки следует расценивать как вирусологический неуспех.

Феномен «**подскока**», или «всплеска» (blip) — это явление **однократного** подъема ВН до **низких** значений, заканчивающееся возвращением к неопределяемому уровню (рис. 2). Согласно точке зрения экспертов [9, 12], низким в данном контек-

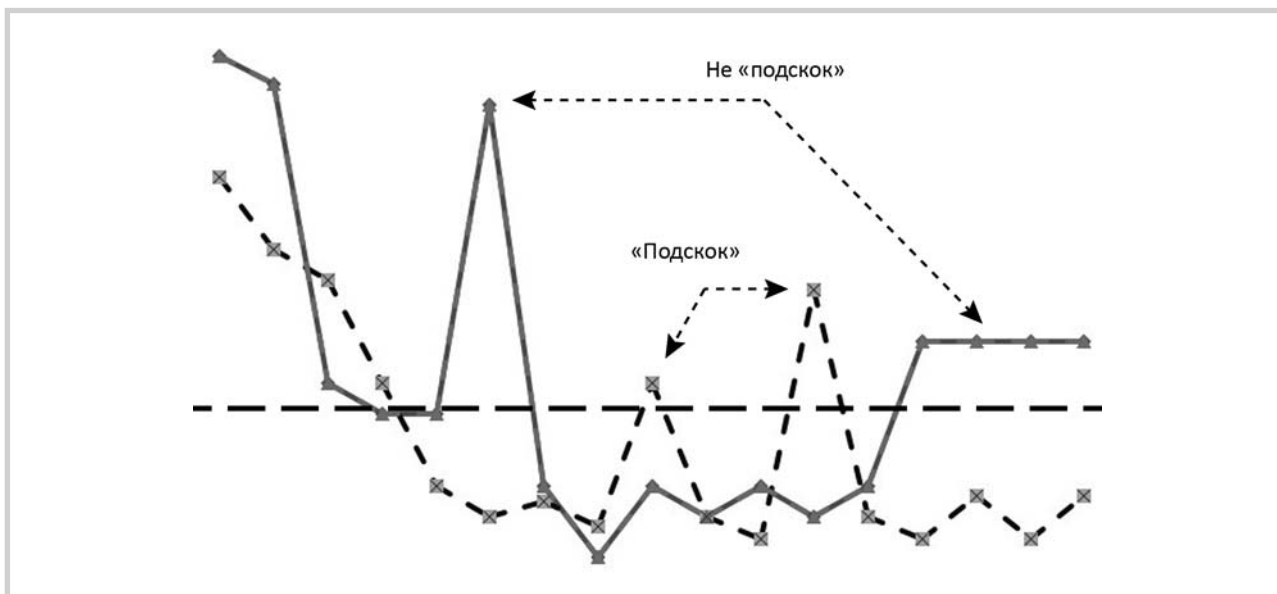


Рис. 2. «Подскоки» вирусной нагрузки ВИЧ.

сте следует считать уровень 40—200 копий РНК/мл. Этот феномен наблюдается довольно часто: среди вполне успешных пациентов «подскоки» отмечаются, по разным данным, у 20—40% и могут объясняться как биологическими флуктуациями, так и статистическими погрешностями измерения ВН. Причины «подскока» разнообразны и включают неоптимальную приверженность, недавно перенесенные инфекционные заболевания или вакцинацию, краткосрочные нарушения диеты и др.

Основная задача, связанная с появлением «подскока», состоит в том, чтобы определить, однократный ли это подъем или начало истинного неуспеха, а для этого должен быть проведен **повторный анализ**. Продолжительность истинного «подскока» составляет обычно менее 3 нед, и этот срок достаточен для повторения анализа.

*Если по истечении 2—3 нед вирусная нагрузка возвращается к неопределяемому уровню, анализа резистентности и замены терапии не требуется (АП).*

*Если повторный анализ указывает на все еще имеющуюся нагрузку, «подскоком» это назвать уже нельзя, и следует отнестись к такому результату как к указанию на недостаточную эффективность терапии, постаравшись выяснить ее причины.*

Явление «подскока» не требует анализа резистентности и замены схемы АРТ (ВИ), однако не является безразличным для успеха лечения в целом. Известно, что пациенты, у которых «подскоки» отмечаются часто, имеют более **высокий риск развития резистентности** в будущем [9, 14] и, следовательно, повышенную вероятность вирусологического не-

успеха лечения, при этом наибольший риск связан с показателями ВН более 1000 копий РНК/мл.

От истинного «подскока» следует отличать однократные значительные повышения ВН (10 000—100 000 копий РНК/мл), связанные, как правило, с относительно краткими перерывами в приеме лекарств. После возобновления приема АРТ при повторном анализе, как и в случае «подскока», ВН возвращается к недетектируемому уровню, что свидетельствует о сохранении чувствительности вируса. В таких случаях, когда причина подъема ВН очевидна, следует вновь указать пациенту на необходимость повышения приверженности.

#### «Низкая виремия»

«Подскоки» следует отличать от **повторяющихся значений ВН** в интервале 50—1000 копий РНК/мл, получивших название «**низкой виремии**» (low level viremia). Поддержание виремии даже на уровне <200 копий РНК/мл является предиктором вирусологического неуспеха и эволюции лекарственной устойчивости; с повышением ВН вероятность этих последствий увеличивается.

Происхождение «низкой виремии» продолжает оставаться предметом обсуждения и, вероятно, может быть следствием продолжающейся репликации либо реактивации латентно инфицированных клеток.

*— Если нагрузка находится в интервале 40—200 копий РНК/мл, выполнить анализ резистентности с применением стандартных тестов не удастся; рекомендуется проводить анализ нагрузки каждые три месяца, чтобы не пропустить момент формирования устойчивых вариантов ВИЧ (АПП)[12].*

— При значениях вирусной нагрузки более 200 копий РНК/мл можно сделать попытку анализировать генотип ВИЧ [16, 12], особенно если нагрузка превышает 500 копий РНК/мл, однако успех тестирования не гарантирован.

— При стабильных значениях вирусной нагрузки 500—1000 копий РНК/мл тест назначают всегда, убедившись, что иные причины отсутствуют.

Заявленная чувствительность всех применяемых в России тестов для анализа мутаций лекарственной устойчивости составляет 500—1000 копий РНК/мл, однако при наличии значительного опыта нередко удается выполнить тест и в образцах с существенно меньшими нагрузками (150—300 копий РНК/мл). Пренебрегать этой возможностью не следует, тем более, что в большинстве образцов, действительно содержащих резистентные вирусы, нагрузки высокими не бывают и исчисляются сотнями—тысячами копий РНК/мл.

Явление стабильной «низкой вирусемии» всегда трактуется как вирусологический неуспех АРТ [12], при этом вопрос о назначении анализа резистентности ВИЧ зависит от уровня вирусной нагрузки (рис. 3).

В любой из описанных выше ситуаций анализ причин повышения ВН следует начинать с оценки уровня приверженности пациента (АИ). Последующие шаги должны быть направлены на последовательное исключение причин повышения ВН, не связанных с резистентностью, то есть анализ возможных лекарственных взаимодействий, оценку

переносимости и соответствия диетическим требованиям для приема схемы АРТ. Если других причин не выявлено, следует действовать в соответствии с алгоритмом, представленным на рис. 3.

При вирусемии <200 копий РНК/мл, как правило, резистентность отсутствует, и замены курса терапии в подавляющем большинстве случаев не требуется (АИ).

У пациентов с ВН от 200 до 1000 копий РНК/мл, напротив, резистентность встречается часто, особенно при ВН >500 копий РНК/мл, поэтому необходимо сделать все возможное для того, чтобы выполнить тест на резистентность [12]. Если результаты теста все же не удалось получить, решение врача о замене схемы зависит от совокупности факторов [12] и в большинстве случаев является отсроченным.

Если мутации выявлены, ситуация требует замены схемы АРТ, при этом следует руководствоваться стандартными рекомендациями [7] и правилами, которые будут обсуждаться далее. Аналогично следует действовать и при ВН >1000 копий РНК/мл (см. рис. 3).

Сценарий, при котором мутации не выявляются при ВН >1000 копий РНК/мл, почти всегда ассоциирован с недостатком приверженности (СПП). Следует провести тщательный анализ причин этого явления, переносимость препаратов, сроки, в течение которых приверженность была снижена. Если лекарственные взаимодействия отсутствуют, а переносимость достаточна, можно возобновить прием прежней схемы и через 2—4 нед повторить анализ

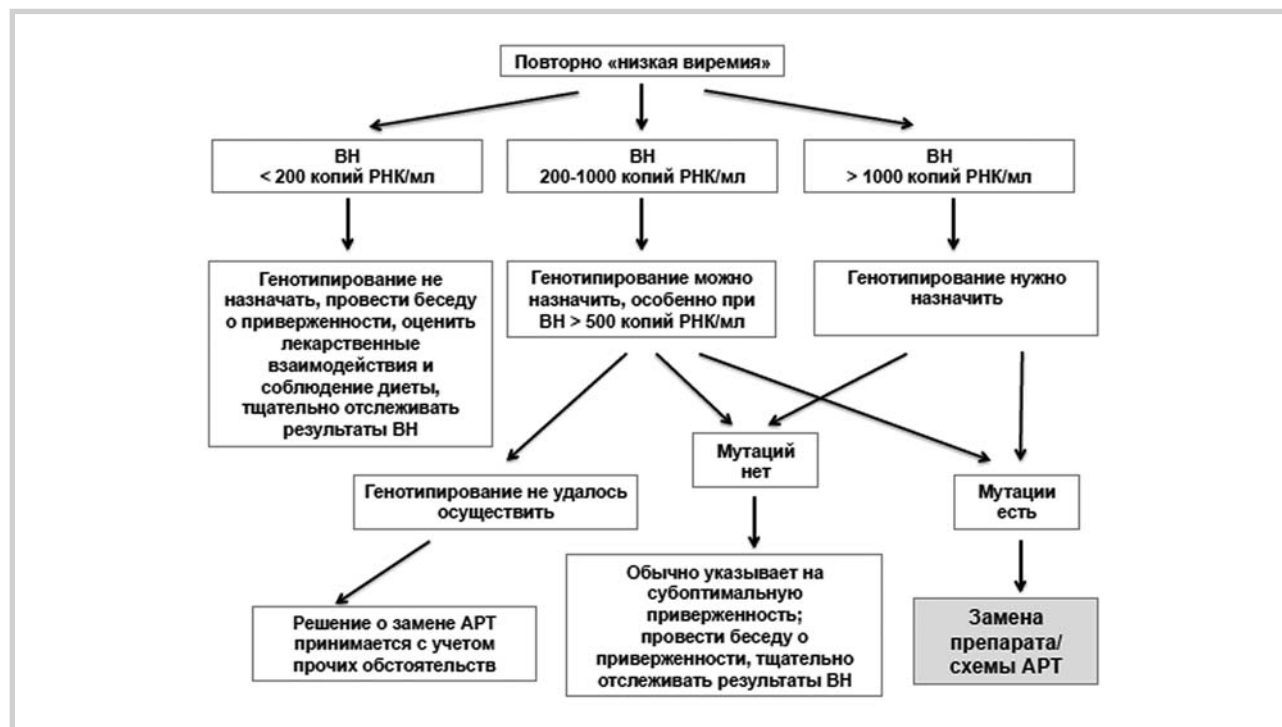


Рис. 3. Алгоритм назначения генотипирования ВИЧ при «низкой вирусемии».

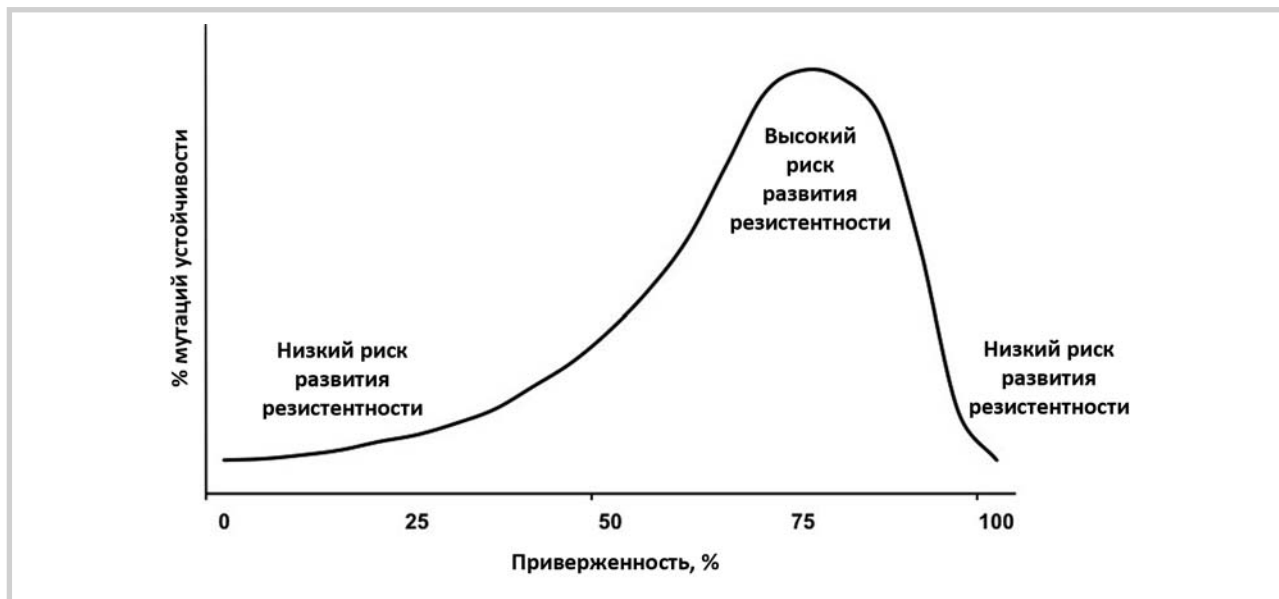


Рис. 4. Зависимость между приверженностью и вероятностью резистентности ВИЧ.

ВН; если есть проблемы, которые могут быть причиной «низкой вирусемии», следует обсудить вопрос о замене АРТ.

У пациентов с зарегистрированной «низкой вирусемией» в любом интервале значений рекомендуется проводить анализ ВН не реже одного раза в три месяца (АП) [9, 12].

#### Приверженность и вероятность резистентности ВИЧ

Приверженность (adherence) пациента режиму приема лекарственных препаратов определяют как **степень соответствия** потребления препаратов назначениям врача. **Мерой** приверженности пациента обычно является доля доз лекарственных препаратов, принятых пациентом в течение определенного периода времени (обычно месяца), по отношению к прописанному, выраженная в процентах.

Недостаток этого определения в том, что оно не учитывает таких важных составляющих приверженности, как число ежедневных доз, время приема, диетические соответствия и др. Тем не менее даже приблизительный подсчет показателя приверженности вместо его качественной оценки может быть полезен для решения вопроса о вероятности развития резистентности ВИЧ.

Среди **причин нарушения приверженности** в развитых странах лидируют большое количество таблеток, необходимость соблюдения числа приемов и т.д., в России к ним следует добавить нарушения сроков поставки препаратов в центры их распределения. **Способы**, применяемые для измерения приверженности, разнообразны и включают оценку слов пациента, подсчет использованных и остав-

шихся таблеток, записи в картах, измерение уровня лекарственных препаратов в крови и др. **К методам повышения приверженности** относятся, прежде всего, психологическая подготовка, а также применение специальных средств, включая таймеры, электронные приспособления и Интернет-ресурсы. Более подробную информацию можно найти в рекомендациях, посвященных этому вопросу [7, 12].

Необходимость строгого следования режиму приема антиретровирусных препаратов обусловливается двумя очевидными причинами:

— **вирусологический успех** прямо зависит от приверженности, которая непосредственно определяет концентрации препаратов АРТ в плазме и клетках крови;

— вероятность развития **резистентности ВИЧ** и приверженность связаны между собой теснейшим образом; показано, что продолжительное подавление репликации ВИЧ (т.е. отсутствие детектируемой ВН) практически полностью предотвращает формирование лекарственно-устойчивых штаммов.

Характер связи между приверженностью и частотой формирования резистентности ВИЧ иллюстрирован на **рис. 4**. Кривая, описывающая эту зависимость, имеет куполообразный характер и является **усредненным результатом** для всех существующих схем терапии, включающих три препарата; кривые для индивидуальных препаратов могут быть сдвинуты в обе стороны по оси абсцисс, иногда существенно [1]. Как видно из графика, при уровнях приверженности менее 70% и более 95% риск развития резистентности невелик, в то время как в промежутке между этими значениями риск многократно возрастает. Легко понять, что именно этот интервал соот-

ветствует **субоптимальным значениям** содержания лекарственных препаратов в клетках крови, благоприятствующим формированию резистентности ВИЧ.

Таким образом, **максимальный риск** развития устойчивости наблюдается не при низких, а при **промежуточных** (70—95%) значениях приверженности. Показано, что именно пациенты со средним уровнем приверженности являются основным источником передачи устойчивых штаммов.

На практике это означает, что при выявлении уровня приверженности <50—70% назначение анализа мутаций резистентности ВИЧ не имеет смысла, поскольку практически всегда в таких случаях результат генотипирования бывает отрицательным. Вместо этого рекомендуется сделать все возможное для восстановления приверженности, назначить анализ ВН через 3—4 нед и после этого решать вопрос о необходимости исследования генотипа.

При уровне приверженности >70% возможность наличия мутаций заметно выше, однако и в этом случае необходимо исключить прочие причины повышения ВН, прежде чем назначить генотипирование. Резистентность, выявляемая при высокой (>90%) приверженности, как правило, бывает следствием существования других причин вирусологического неуспеха — наличием взаимодействия лекарственных препаратов, нарушениями их абсорбции или внутриклеточного метаболизма, связанного с факторами генетики человека.

#### **Нарушения фармакокинетики и взаимодействие лекарств**

Термин «фармакокинетика» утвердился во врачебной практике как краткий заменитель понятия метаболизма лекарств — так называется необратимая трансформация лекарственного начала с образованием метаболитов, подверженных выведению сначала из клеток и затем из организма. Внутриклеточный этап особенно важен для эффективного воздействия лекарственных препаратов на репликацию ВИЧ, происходящую внутри чувствительных клеток [1].

Все механизмы метаболизма препаратов АРТ функционируют в клетке одновременно и способны вступать во взаимоотношения со всеми поступающими в клетку препаратами. Соответственно, применение комбинированных схем АРТ в сочетании с другими препаратами может сказываться на фармакокинетики каждого из препаратов АРТ положительным или отрицательным образом.

**Взаимодействия препаратов** способны снизить или повысить эффект АРТ, причем если повышение этого эффекта часто сопряжено с **токсичностью**, то снижение действенной концентрации препарата — одна из наиболее распространенных причин развития **резистентности ВИЧ**. В большой степени это справедливо и в отношении другого вида взаи-

модействий — между лекарством и пищевыми продуктами.

— *Самым известным из инструментов является сайт Ливерпульского университета, специально посвященный АРТ-препаратам (University of Liverpool, <http://www.hiv-druginteractions.org/Interactions.aspx>).*

— *Другой полезный инструмент можно найти на сайте HIV InSite (Database of Antiretroviral Drug Interactions, <http://www.hivinsite.com/insite?page=ar-00-02&post=1>).*

— *Информация о возможном влиянии растительных препаратов на эффект применения антиретровирусных, а также других средств находится на сайте Natural Product/Drug Interaction Checker (<http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/nd/Search.aspx?s=ND&cs=&pt=7&rli=1&sh=>).*

Проблема выяснения причин повышения вирусной нагрузки никогда не решается, таким образом, без ответа на вопрос о возможности взаимодействия препаратов. С повышением возраста пациентов эта проблема усложняется, так как возрастает число привычно употребляемых препаратов.

Для оценки возможности и характера взаимодействия лекарственных и нелекарственных препаратов разработаны специальные **on-line инструменты**, которые позволяют быстро выяснить характер всех лекарственных взаимодействий из списка препаратов, употребляемых пациентом.

Во всех случаях выявления лекарственных взаимодействий алгоритм последующих действий один и тот же — необходимо исключить одновременный прием взаимоограничивающих препаратов, продолжить терапию по прежней схеме и повторить анализ ВН через 2—4 нед [9, 11, 12]. Если совместить препараты АРТ с другими необходимыми назначениями нельзя, следует обсудить замену схемы АРТ.

#### **Алгоритм действий перед назначением генотипирования ВИЧ**

С учетом вышеизложенных пояснений научно обоснованный алгоритм обследования пациента с применением генотипирования ВИЧ, утвердившийся в странах, давно использующих эту методологию, включает в себя следующий порядок действий [1, 16] (**рис. 5**):

— при обнаружении детектируемой вирусной нагрузки (т.е. выше уровня детекции, обычно >40—50 копий РНК/мл) следует **повторить анализ** через 2—4 нед для подтверждения результата и исключения «подскока»; только двукратное обнаружение вируса в плазме крови может служить сигналом для обсуждения вопроса о назначении генотипирования;

— в течение периода ожидания повторного анализа вирусной нагрузки необходимо провести тща-

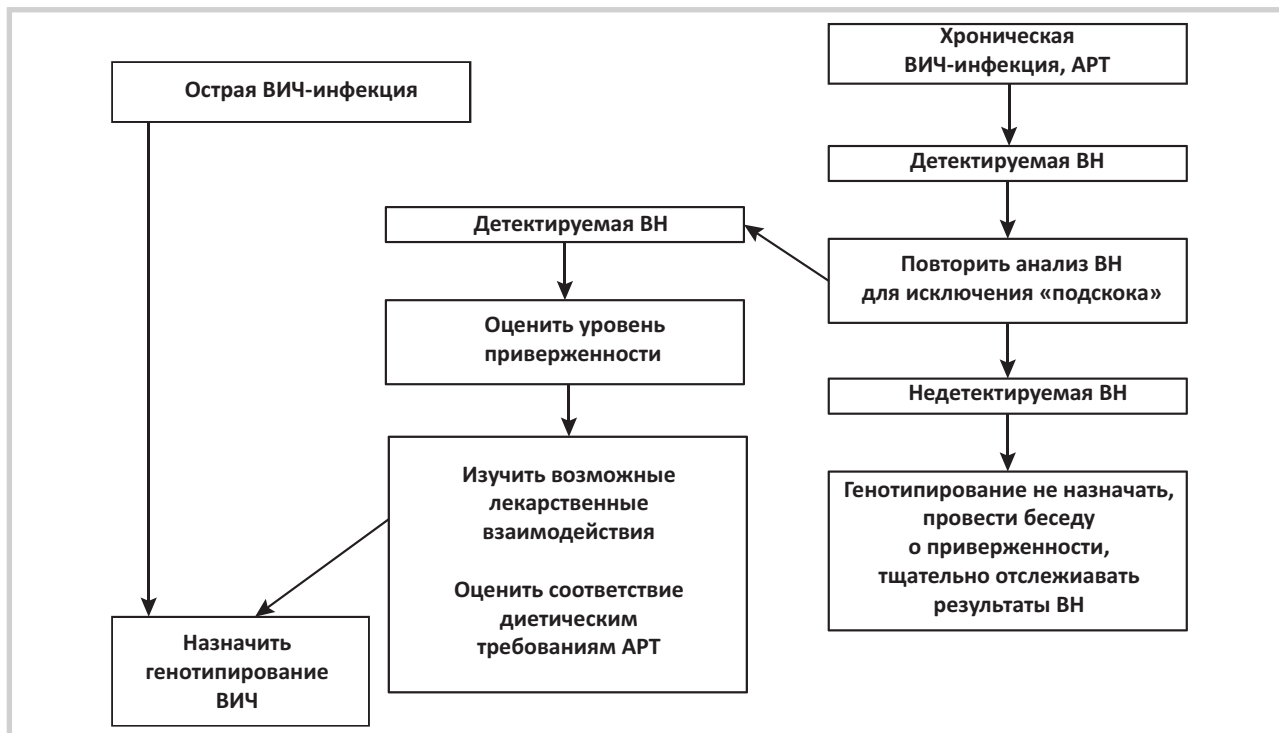


Рис. 5. Алгоритм действий перед назначением анализа мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ.

тельный анализ **приверженности** пациента; в случае выявления недостаточной дисциплины не назначать генотипирование, а сделать все возможное для того, чтобы вернуть пациента к нормальному режиму приема препаратов схемы, и затем повторить определение вирусной нагрузки;

— в течение того же периода провести анализ наличия побочных эффектов, **лекарственных взаимодействий** и диетических погрешностей для того, чтобы выявить все возможные причины недостаточного усвоения и нарушения метаболизма препаратов, способные привести к неэффективности АРТ. В случае выявления хотя бы одной из причин не назначать генотипирование до ее устранения, после этого повторить анализ вирусной нагрузки;

— наиболее **типичными** для случаев лекарственной устойчивости ВИЧ являются значения вирусной нагрузки, исчисляемые сотнями—тысячами копий РНК/мл; значения выше 10 000 копий РНК/мл в большинстве случаев не связаны с наличием мутаций устойчивости, а объясняются другими причинами, и среди них чаще всего сниженной приверженностью пациента курсу терапии;

— приверженность менее **70%** редко приводит к формированию лекарственной устойчивости ВИЧ; наиболее типичными условиями для ее возникновения являются показатели приверженности в интервале **70—95%**;

— при «низкой вирусемии» принять во внимание показатели ВН;

— назначение анализа генотипа ВИЧ провести **на фоне продолжения терапии** с применением неуспешной схемы с целью повышения надежности выявления лекарственно-устойчивых штаммов вируса; после отмены лечения устойчивые штаммы могут не выявляться, причем срок их «исчезновения» не поддается прогнозированию и может составлять от двух недель до нескольких лет;

— после выявления мутаций лекарственной устойчивости произвести соответствующих препаратов с учетом прогноза приверженности, лекарственных взаимодействий и соблюдения диеты, при этом в случае первой замены в новой схеме должно быть **не менее трех**, а при последующих заменах — не менее двух активных препаратов (т.е. лекарств, к которым не выявлено ни одной мутации);

— рекомендации по **интерпретации мутаций и прогнозированию эффективности** схем АРТ ниже; целесообразно выполнять этот этап работы **совместно с врачом-вирусологом**;

— при условии правильного назначения генотипирования (пациентам, которым действительно показан анализ, в требуемые сроки с соблюдением всех правил забора и транспортировки) средний показатель выявляемости мутаций лекарственной устойчивости при неуспехе АРТ составляет **60—80%** от всех исследованных образцов;

— в **отсутствии возможности** выполнения анализа мутаций устойчивости ВИЧ при неуспехе первой схемы АРТ заменить **всю схему** в соответствии с ре-

**Таблица 1. Наиболее часто встречающиеся мутации лекарственной устойчивости ВИЧ при применении стандартных схем АРТ**

НИОТ в неуспешной схеме АРТ	Мутации
AZT/d4T+3TC	
AZT+3TC+ABC	M184V
TDF+3TC/FTC	K65R и/или M184V
ABC+3TC	L74V, реже K65R и M184V
AZT/d4T+ddI	TAMs, Q151M, T69ins
TDF+ABC/ddI	K65R

комендациями [7]. Наиболее вероятные мутации в зависимости от базовой схемы НИОТ представлены в табл. 1 [1, 11, 14];

— чем **быстрее** производится замена в случае подтвержденной резистентности ВИЧ и чем ниже **ВН** в этот момент, тем больше **шансов на успех** последующей схемы. Задержка на этом этапе может создать условия для дальнейшего эволюционирования резистентных вирусов и формирования множественной лекарственной устойчивости [11].

### Острая ВИЧ-инфекция

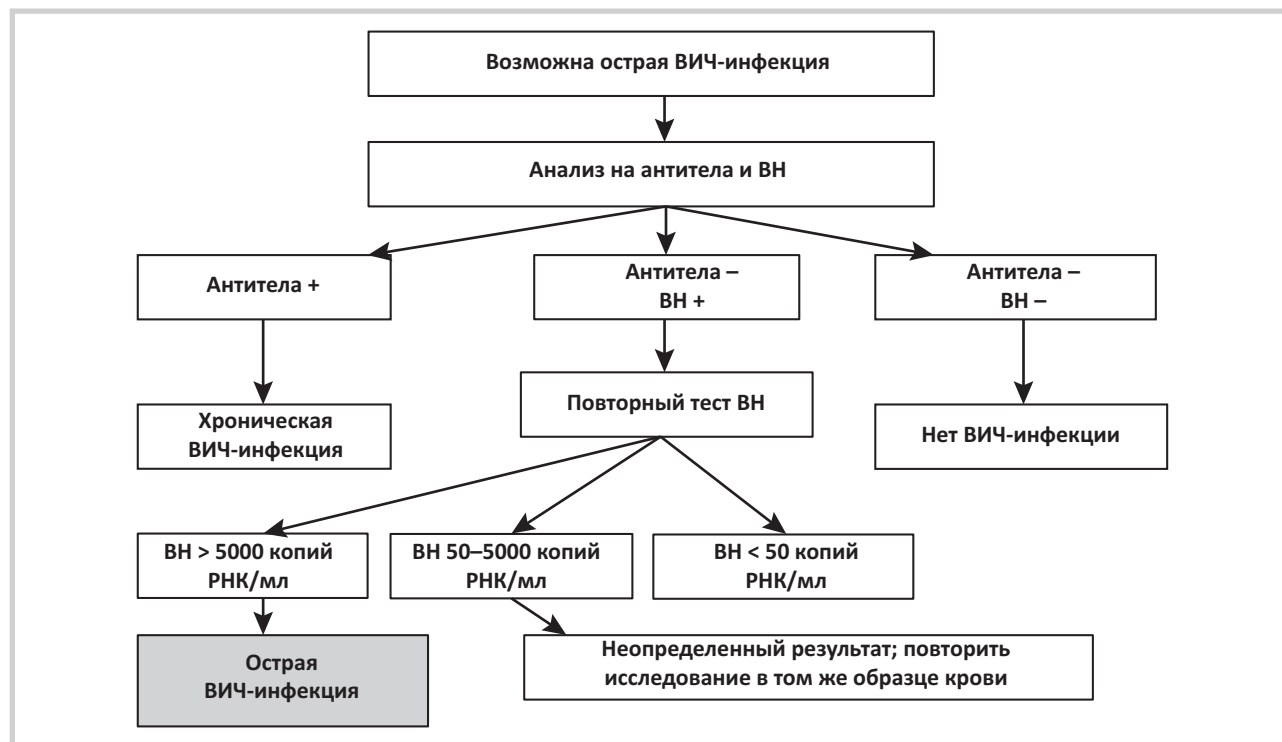
Смысл такого анализа заключается в поиске мутаций, которые могли присутствовать у вируса, вызвавшего **заражение**, например, вследствие неэффективности АРТ у инфицированного партнера. Обнаружение устойчивых вирусов перед назначением первой схемы позволяет оптимизировать ле-

чение с самого начала [16]. В экономически развитых странах анализ генотипа ВИЧ непосредственно после установления диагноза рекомендуется всем пациентам (AI—AII, 96%) [9, 12, 16]; в случаях, когда выполнение анализа затруднено, рекомендуется сохранить наиболее ранний образец плазмы крови пациента для того, чтобы выполнить генотипирование перед назначением первой схемы терапии [11].

В России анализ генотипа ВИЧ сразу после установления диагноза, так же, как и перед назначением первой схемы АРТ, **не включен** в перечень обязательных исследований, **за исключением ситуации острой ВИЧ-инфекции (рис. 6)**. Объясняется это тем, что в стадии острой инфекции вероятность обнаружения устойчивых вирусов максимальна, и поэтому такое исследование может быть клинически и экономически **эффективно**.

В Национальных рекомендациях [7] проведение теста на резистентность ВИЧ при острой ВИЧ-инфекции показано, «если заражение ВИЧ произошло от партнера с неэффективной АРВТ», однако на практике источник заражения трудно бывает определить, и исследование проводят у всех пациентов с подтвержденной острой инфекцией.

Острая ВИЧ-инфекция в клинической практике встречается относительно редко, в эпидемиологическом анамнезе обычно имеет высокий риск заражения в последние 6 месяцев и сопровождается клиническими симптомами в 40—90% случаев [11]. Диагноз острой ВИЧ-инфекции должен быть подтвержден **данными лабораторного анализа**, включая



**Рис. 6. Алгоритм установления диагноза «острая ВИЧ-инфекция».**

наличие p24 и/или РНК ВИЧ (как правило, наблюдаются высокие значения ВН) в сочетании с признаками отсутствия сформированного серологического ответа (отрицательный ИФА и/или отрицательный/неопределенный иммуноблот) [14] (см. рис. 6). Если значения ВН находятся в интервале 500—5000 копий РНК/мл, следует исключить ложноположительный результат путем повторения анализа [14].

Помимо понятия острой ВИЧ-инфекции, в зарубежной литературе используется более широкий термин «**ранняя инфекция**», описывающий период окончательного формирования иммунного ответа на ВИЧ в течение 6 месяцев с момента появления первых антител [11, 12, 14]. Периоды острой и ранней ВИЧ-инфекции объединяются названием «**первичная**» (primary) инфекция, генотипирование рекомендуется в обоих случаях (АП) [12].

Если в геноме ВИЧ в периоде первичной инфекции обнаружены мутации устойчивости, состав схемы лечения должен учитывать их наличие независимо от того, когда будет назначена АРТ. Подбор оптимальной схемы производят на основании национальных рекомендаций так же, как при неэффективности первой схемы [7]. Повторный анализ генотипа непосредственно перед началом терапии не требуется, за исключением случаев возможной суперинфекции или самолечения (СП) [9].

Ожидание результата генотипирования ВИЧ не должно быть причиной задержки начала лечения в указанных случаях (АПП); в случае необходимости схему лечения корректируют с учетом данных анализа мутаций лекарственной устойчивости [12].

#### **Хроническая ВИЧ-инфекция перед назначением АРТ и профилактика резистентности**

Этот анализ также направлен на выявление устойчивых вариантов ВИЧ, которые могли вызвать первичное заражение, при этом сложность заключается в том, что с течением времени **устойчивые вирусы могут быть замещены чувствительными**, и тогда тест на резистентность окажется отрицательным. Период времени, в течение которого такая вероятность существует, не определен; известно, что передающиеся резистентные варианты несколько более стабильны, чем сформировавшиеся в ходе АРТ [12]. По этой причине обнаружение устойчивых вирусов, вызвавших заражение, бывает возможно в течение нескольких лет после заражения, что делает анализ генотипа ВИЧ целесообразным даже при хронической инфекции.

В России анализ генотипа ВИЧ перед назначением первой схемы лечения **не входит в перечень обязательных тестов** [7], хотя за рубежом он уже давно считается необходимым (АП, 96%). Оптимальным считается проведение генотипирования сразу после диагностирования ВИЧ-инфекции, однако если это не удалось, общий принцип заключается в

том, чтобы выполнить это исследование в наиболее раннем образце плазмы крови для того, чтобы минимизировать вероятность реверсии устойчивого варианта вируса к «дикому» [11].

Если данные генотипирования ВИЧ перед назначением АРТ имеются, их следует интерпретировать и применять так же, как в случае неуспеха терапии.

Если мутаций не обнаружено или тест не проводили, назначают стандартные схемы в соответствии с национальными рекомендациями [2, 7], при этом в целях профилактики резистентности делают это с учетом **прогноза приверженности** пациентов. При наличии риска недостаточной приверженности пациентам назначают схемы, наименее уязвимые к субоптимальным концентрациям АРТ (например, бустированные ИП), пациентам с высоким уровнем дисциплины приема препаратов могут быть назначены препараты с низким генетическим барьером (например, ННИОТ) [7].

Тест на **тропизм ВИЧ**, согласно рекомендациям [7], проводят **непосредственно** перед началом применения маравирока (AI, 100%); результаты этого анализа, полученные ранее (например, в момент диагностирования ВИЧ-инфекции), позднее становятся неактуальными, поскольку тропизм ВИЧ с течением времени может измениться естественным образом [7, 9, 12, 14].

#### **Оптимизация успешной схемы АРТ**

Вирусологически успешной считают схему АРТ, результатом применения которой является **отсутствие детекции ВН** (<40—50 копий РНК/мл) в течение 6 месяцев и более [7]. Очевидно, что в таких обстоятельствах репликация ВИЧ полностью подавлена, причины замены схемы лечения не связаны с лекарственной устойчивостью вируса, и анализа генотипа ВИЧ не требуется.

Наиболее частыми **причинами замены** успешно работающих препаратов являются токсические побочные эффекты (включая отдаленные), неблагоприятные взаимодействия лекарственных препаратов, планируемая беременность, стремление пациента к упрощению режима приема схемы и облегчению диетических требований. В конечном счете замена схемы лечения в этом случае, как правило, ведет к повышению приверженности, что является безусловным достижением с точки зрения лекарственной устойчивости.

Основные **правила по профилактике лекарственной устойчивости ВИЧ**, которыми следует руководствоваться при замене эффективных препаратов, направлены на недопущение возобновления репликации ВИЧ и создания условий, в которых может начаться формирование резистентных вирусов (AI) [11, 12]:

— у пациентов, ранее **не имевших** лекарственно-устойчивых вирусов и эпизодов неуспеха АРТ, риск



возникновения резистентных вариантов при переводе на одну из рекомендуемых схем первой линии **невысок**;

— замена одного препарата схемы на другой с **тем же генетическим барьером** обычно бывает безопасна, если прежде никогда не отмечалась резистентность ВИЧ;

— если ранее у пациента регистрировали эпизоды неуспешной терапии, перевод на другую схему следует проводить с особой осторожностью, избегая применения в новой схеме препаратов с более низким генетическим барьером, чем в предыдущей. Для этого следует тщательно анализировать **историю лечения и резистентности ВИЧ** пациента (AI); конкретные указания по замене препаратов содержатся в национальных рекомендациях [7];

— замена препаратов у пациентов с ранее выявленной, особенно множественной, лекарственной устойчивостью проводится **при участии специалиста-вирусолога (ВИП)**;

— перед формированием новой схемы следует провести анализ возможных **лекарственных взаимодействий**;

— после назначения новой схемы через 4 нед и в последующие 3 мес [11, 12] провести анализ ВН и оценить эффект замены препаратов (AIII).

#### **Профилактика резистентности ВИЧ при прерывании АРТ**

Рекомендации международных и российских экспертов [7, 9, 11, 12, 14] сходятся в категорическом мнении о **недопустимости прерывания АРТ**, если на это нет серьезных причин (AI). Лечение современными средствами ВИЧ-инфекции должно быть пожизненным, поскольку прерывание терапии может привести к:

- повышению вирусной нагрузки;
- снижению числа CD4 Т-клеток;
- повышению риска клинического прогрессирования инфекции, включая оппортунистические заболевания;
- повышению риска передачи ВИЧ;
- созданию условий для формирования новых мутаций резистентности.

Тем не менее, на практике ситуации, требующие временного перерыва АРТ, продолжают возникать, при этом среди них можно выделить **внезапные и прогнозируемые**. Среди условий, требующих **немедленной отмены лечения**, выделяют серьезные побочные действия препаратов, угрожающие жизни пациента (нейропатии, нарушения почечной функции, хирургические вмешательства, несовместимые с пероральным приемом лекарств), а также перебои с поставками препаратов. Все эти обстоятельства способны с высокой вероятностью повлечь за собой развитие устойчивости ВИЧ, однако возможности снизить эту вероятность, как правило, не существу-

ет, поэтому в urgentных случаях схему отменяют сразу без учета ее состава и возможных последствий для резистентности.

Иные возможности предоставляет ситуация, когда непродолжительный перерыв (несколько дней) в лечении можно **запланировать**. У вирусологически успешных пациентов это чаще всего связано с особыми жизненными обстоятельствами или наличием преходящих заболеваний. Для таких случаев разработаны рекомендации, помогающие минимизировать риск формирования мутаций резистентности ВИЧ и сохранить опции для будущего лечения.

Основу такого риска составляет **неодинаковая скорость** выведения лекарств из организма, при этом при одновременной отмене всей схемы препаратов создается ситуация, когда по мере выведения трех препаратов вирус вначале оказывается под действием двух из них (битерапия), а впоследствии и одного (монотерапия). Эти условия являются благоприятными для формирования устойчивых форм ВИЧ, при этом чем дольше продолжается репликация вируса в присутствии субоптимальных концентраций лекарств, тем выше вероятность его превращения в устойчивый.

Наиболее опасными в этом отношении являются препараты группы **ННИОТ** (невирапин, эфавиренц), период полувыведения которых составляет до нескольких месяцев. Препараты группы ИП сравнимы по скорости выведения с НИОТ (несколько дней), при этом бустированные ИП имеют дополнительную «подстраховку» в виде высокого барьера резистентности. Таким образом, тактика прерывания терапии у пациентов, получавших схемы с ННИОТ или ИП, различна [7]:

— при прерывании АРТ на основе **ИП** все препараты схемы отменяют **одновременно**;

— при прерывании АРТ на основе **ННИОТ** выбирают один из следующих вариантов:

1) за месяц до прерывания терапии заменяют препарат из группы **ННИОТ на ИП**, затем отменяют всю схему;

2) продолжают прием **двух препаратов из группы ННИОТ** в течение 7—14 дней, после чего прерывают терапию.

У пациентов с детектируемой ВН, детей и беременных прерывание АРТ следует производить с особой осторожностью и только при крайней необходимости [7].

Краткосрочное прерывание АРТ (не более 2 дней) **не требует** изменения схемы лечения [12].

#### **Рекомендации по сбору, транспортировке и хранению материала для исследования лекарственной устойчивости ВИЧ**

Качество процедуры сбора материала для анализа генотипа ВИЧ является критическим факто-

ром надежности его результатов. В ходе получения и обработки плазмы крови все усилия должны быть направлены на сохранение **целостности и количества РНК ВИЧ**, тем более, что в образцах, полученных от пациентов с лекарственно-устойчивыми вирусами, ВН обычно бывает невысокой.

Основные правила заключаются в следующем [7, 19]:

- во избежание гемолиза крови не рекомендуется использование слишком тонких игл для забора крови;

- при использовании шприца для забора крови следует перенести кровь через канюлю шприца в пробирку с ЭДТА в стерильных условиях; «протыкание» крышки пробирки иглой не допускается;

- для сбора крови используются только **ЭДТА-пробирки** — вакутейнеры, которые содержат хелатирующий агент, предотвращающий активность РНКаз-ферментов, которые разрушают РНК. Гепаринизированная плазма непригодна для этого вида анализа, так как гепарин способен ингибировать ферменты, использующиеся на этапе ПЦР;

- повышенный уровень **липидов, билирубина и продуктов гемолиза** эритроцитов по той же причине снижает качество плазмы для последующих процедур анализа;

- для избегания последствий гемолиза и действия лизосомальных РНКаз, попадающих в плазму после разрушения клеток, следует как можно быстрее (**не дольше 2 ч**) нужно отделить плазму от клеток крови путем центрифугирования;

- если по каким-либо причинам это нельзя сделать немедленно после забора крови, следует до центрифугирования оставить кровь при **комнатной температуре**, чтобы избежать холодового гемолиза [8];

- требования противоэпидемической безопасности к условиям транспортировки аналогичны применяемым для перевозки инфекционного материала;

- транспортировка **цельной крови** в вакутейнере с ЭДТА осуществляется при комнатной температуре в течение не более 48 ч [3];

- после получения плазмы крови ее следует перенести в пробирки типа Эппендорф; минимальный объем плазмы для хранения — 1 мл; для предотвращения высыхания образцов при длительном хранении рекомендуются пробирки типа Эппендорф с винтовой крышкой, имеющей силиконовую прокладку;

- пробирки должны быть маркированы с применением водостойкого маркера или иным способом, исключающим «смывание» надписи; желательно поместить пробирки в герметически закрытый полиэтиленовый пакет;

- транспортировка **замороженной плазмы** осуществляется с применением хладоэлементов или (при возможности) в сухом льду;

- образцы **плазмы крови** хранят в холодильнике не больше **12—24 ч**, если анализ производят в тот же день, в других случаях замораживают;

- срок хранения образцов плазмы при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  составляет несколько недель, при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  — несколько лет;

- размораживать плазму следует непосредственно перед началом процедуры генотипирования; после размораживания плазму можно использовать для анализа только один раз, **повторное размораживание не допускается** [8];

- все образцы, направляемые на анализ генотипа ВИЧ, должны сопровождаться направлением по утвержденной форме [7], при этом в обязательном порядке должны быть разборчиво и корректно заполнены все поля формы.

### **Принцип метода генотипирования ВИЧ и применяемые тесты**

Анализ мутаций лекарственной устойчивости производится на основе технологии прямого секвенирования генома (РНК) ВИЧ. Для генотипирования вирусов в более широком смысле могут использоваться и другие молекулярные методики (гибридизация, реал-тайм ПЦР и др.), но в данном контексте речь будет идти лишь о **популяционном секвенировании**, то есть анализе всей совокупности разнородных вирусов в организме одного пациента. Этот принцип заложен в основу всех применяемых в настоящее время тестов.

**Общая процедура генотипирования** включает несколько обязательных этапов, среди которых выделение РНК, амплификация полученного генетического материала и собственно секвенирование. Подробное описание техники и правил выполнения процедуры можно найти в руководствах по работе в ПЦР-лабораториях и инструкциях к тест-системам [3, 5, 6].

При возможности на первом этапе для выделения РНК используют ту же порцию плазмы, в которой был повторно обнаружен повышенный уровень вирусной нагрузки в ходе количественного анализа РНК ВИЧ.

На втором этапе полученную РНК подвергают амплификации для того, чтобы получить достаточное количество ДНК-матрицы для работы на последующих этапах; обычно для этого используют хорошо всем знакомую технику ОТ-ПЦР. Для повышения чувствительности используют протокол, включающий предварительное ультрацентрифугирование плазмы с целью концентрации вирусных частиц.

Наконец, третий этап посвящен собственно анализу наличия мутаций лекарственной устойчивости в составе генома ВИЧ. Для этого производят секвенирование участка генома, кодирующего ферменты ВИЧ, потенциально устойчивые к действию

лекарственных препаратов, то есть области гена *pol*, кодирующей обратную транскриптазу, протеазу и интегразу, либо (при анализе тропизма) фрагмента гена *env*.

В России разрешены к применению два вида **коммерческих тестов** для генотипирования ВИЧ — Viroseq HIV-1 («Abbott Laboratories») и АмплиСенс HIV-Resist-Seq (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Эти тесты очень похожи между собой по принципу работы и порядку выполнения.

В основе обоих лежит принцип так называемого **циклического секвенирования**, который напоминает полимеразную цепную реакцию (ПЦР): в составе реакционной смеси, кроме матрицы — исследуемой ДНК (продукта реакций ОТ и ПЦР), также находятся дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs), праймеры, фермент ДНК-полимераза и буфер. Принципиальное отличие заключается в том, что, кроме dNTPs, к смеси в небольшом количестве добавлены так называемые дидезокситрифосфаты нуклеотидов (**ddNTPs**), которые при этом помечены флюоресцентной меткой.

Эти молекулы — производные dNTPs способны присоединяться к последнему нуклеотиду строящейся цепочки ДНК, однако потенциальная связь для присоединения следующего нуклеотида у них отсутствует, и после встраивания любого из ddNTPs синтез новой цепи ДНК прекращается (терминируется), поэтому ddNTPs получили название **терминаторов**. В результате продолжительной циклической реакции успевают синтезироваться все варианты фрагментов ДНК — от самого короткого до самого длинного, соответствующего всей длине ампликона. Полный комплект фрагментов становится объектом дальнейшего анализа методом **электрофореза** в полиакриламидном геле, т.е. разделения фрагментов в электрическом поле в зависимости от их длины. Регистрация **флюоресцентной метки** позволяет установить порядок фрагментов после их электрофоретического разделения и на этом основании определить порядок нуклеотидов в исходной молекуле ДНК.

Для анализа мутаций устойчивости обычно применяют не нуклеотидную, а **аминокислотную** последовательность, полученную путем трансформации последовательности ДНК (обычно эту процедуру автоматически производит программное обеспечение).

Мутации устойчивости в протеазе (ПР) и обратной транскриптазе (ОТ) сосредоточены в позициях 10-93 и 41-236, соответственно (отсчет производится от начала последовательности каждого из белков-ферментов). Оба теста анализируют все эти позиции, однако несколько различаются координатами исследуемых участков.

Тест **Viroseq** определяет полную последовательность участка, кодирующего ПР (с 1 по 99 аминокислоту), а также секвенирует ОТ с самого начала до 335-й аминокислоты. **АмплиСенс** не только способен

анализировать мутации в ПР (1—99) и ОТ (30—265), но также в зависимости от комплектации может включать в себя набор для секвенирования области, кодирующей интегразу (ИН) (91—288), а при необходимости дополнительно анализировать участок гена *env*, кодирующий петлю V3 gp120, с целью определения тропизма ВИЧ.

Каждая из тест-систем имеет собственное программное обеспечение для анализа, редактирования и интерпретации результатов генотипирования, который формируется в форме отчета. Кроме того, они также позволяют получать последовательности в форматах, пригодных для последующего дополнительного изучения с применением инструментов on-line (\*.txt, \*.fasta) и научных исследований.

### **Рекомендации по интерпретации результатов генотипирования ВИЧ**

Завершающим этапом процедуры генотипирования становится **интерпретация** данных о геноме вируса. Смысл ее заключается в поиске **корреляции между генотипом вируса и его фенотипом** (чувствительностью к индивидуальным препаратам) в целях прогнозирования эффективности новой схемы терапии. Независимо от используемой системы интерпретации, основой для такого поиска являются обширные сведения, полученные в ходе исследований *in vitro*, клинических испытаний и наблюдений.

Каждая из применяемых в России тест-систем включает в себя программное обеспечение, способное сформировать **отчет о результатах анализа**, включающий в себя элементы интерпретации [4, 18]. В отчете содержится информация о мутациях ВИЧ, выявленных у пациента, а также перечень препаратов АРТ с указанием чувствительности/устойчивости к ним.

Кроме того, существуют инструменты интерпретации генотипа ВИЧ в свободном доступе on-line (так называемые **академические**); они позволяют получить дополнительную информацию, необходимую для окончательного решения о составе новой схемы АРТ. Для работы с этими системами необходимо, помимо отчета, получить из лаборатории последовательность РНК ВИЧ в формате \*.txt или \*.fasta.

Для интерпретации **последовательность РНК изучаемого вируса** вводят в соответствующее окно алгоритма, который автоматически сравнивает ее с аналогичной последовательностью вируса «дикого» (чувствительного) типа, и выявляют позиции, связанные с изменением чувствительности к лекарственным препаратам (**мутации**). На основании полученных данных делают выводы о причинах вирусологического неуспеха и прогнозируют эффективность альтернативных препаратов.

Генотипические алгоритмы интерпретации можно разделить на две группы в зависимости от принципа, заложенного в их работу (**табл. 2**).

**Таблица 2. Наиболее известные Интернет-ресурсы для интерпретации результатов генотипирования ВИЧ**

Название	Система интерпретации	Интернет-адрес	Комментарий
HIVdb version 8.2	Rules-based	<a href="https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/">https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/</a>	Возможно совмещение с ANRS и REGA
geno2pheno [resistance] 3.4	Data-based	<a href="http://www.geno2pheno.org">http://www.geno2pheno.org</a>	«Виртуальный фенотип» (количественная оценка)
geno2pheno [coreceptor] 2.5	Data-based	<a href="http://coreceptor.geno2pheno.org/index.php">http://coreceptor.geno2pheno.org/index.php</a>	Анализ тропизма ВИЧ
HIV-GRADE version 06/2016	Rules-based	<a href="http://www.hiv-grade.de/grade/deployed/grade.pl?program=hivalg">http://www.hiv-grade.de/grade/deployed/grade.pl?program=hivalg</a>	Возможно совмещение с HIVdb и REGA
ANRS (HIV1&2)	Rules-based	<a href="http://www.hivfrenchresistance.org">http://www.hivfrenchresistance.org</a>	Необходима регистрация
EuResist prediction system	Data-based	<a href="http://engine.euresist.org">http://engine.euresist.org</a>	Возможно формирование и прогнозирование новых схем; есть русско-язычный интерфейс
HIV-TRePS v7.5.3.0	Data-based	<a href="https://www.hivrdi.org/treps/">https://www.hivrdi.org/treps/</a>	Возможно формирование и прогнозирование новых схем на основании генотипа и/или истории лечения; нужна регистрация

Алгоритмы **первой группы** (rules-based) основываются на объединенном мнении международных экспертов, которое, в свою очередь, базируется на глубоком анализе всей информации, касающейся связи между мутациями генома ВИЧ, с одной стороны, и их фенотипическими и клиническими проявлениями, с другой стороны. Все эти сведения объединяются с целью выработки **правил**, реализующихся в виде количественного показателя (**баллов**). Примером может служить Стэнфордская база данных, используемая в составе программного обеспечения упомянутых тест-систем.

**Другой подход** к анализу информации о генотипе ВИЧ использует базы данных, включающие только парные данные **генотип—фенотип**, полученные в одном и том же образце. В ходе интерпретации машинный алгоритм ищет наиболее близкий к исследуемому вариант генотипа; примером такого алгоритма является ресурс geno2pheno, связывающий данные о мутациях с фенотипами ВИЧ (т.е. включающий количественную оценку резистентности ВИЧ). Эта группа способов интерпретации (machine-learning, или **data-based**) немногочисленна, однако имеет очевидные преимущества, особенно в случаях множественной лекарственной устойчивости.

Среди on-line систем более других известна Стэнфордская база данных **HIVdb**, особенностью которой является возможность получения дополнительной информации в виде так называемых баллов (drug penalty score), характеризующих вероятность резистентности ВИЧ для каждой из мутаций. В ходе анализа с применением этого ресурса следует использовать **таблицу баллов**, формирующуюся в конце отчета, для сравнения препаратов новой схемы, и осуществлять выбор среди набравших минимальную сумму баллов (подробнее см. [1]).

Другие широко используемые системы — ANRS, Франция (<http://www.hivfrenchresistance.org>), geno2pheno, Германия (<http://www.geno2pheno.org>) и другие. Все они бесплатны, регулярно обнов-

ляются и сравнимы по способности предсказывать клинический результат мутаций в геноме ВИЧ.

### Рекомендации по анализу тропизма ВИЧ

Принцип анализа тропизма ВИЧ методом генотипирования полностью аналогичен описанному выше принципу анализа гена *pol*, при этом в роли объекта исследования выступает участок гена *env*, кодирующий так называемую **V3-петлю** размером около 100 аминокислот (АИ).

Выполнение этого теста проводится тогда и только тогда, когда врачом принято решение о назначении пациенту препарата из группы ингибиторов присоединения, в единственном числе представляющем класс антагонистов корецепторов — **маравирока (MVC) (СИИ)** [1].

Помимо основного рецептора ВИЧ — CD4, расположенного на поверхности клеток-мишеней, для взаимного распознавания и обеспечения дальнейших этапов слияния вируса и клетки необходим еще один компонент-корецептор. В этом качестве могут быть использованы два клеточных белка — родственные друг другу **хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR4**; в зависимости от того, какие корецепторы используют вирусы, их классифицируют как R5- и X4-тропные. Участок, связывающий корецепторы, расположен в составе V3-петли гликопротеина gp120; именно он определяет **тропизм вируса**.

В ходе развития патогенеза ВИЧ-инфекции на **ранних** этапах в популяции вируса, как правило, преобладают **R5-тропные** варианты, заражающие преимущественно макрофаги, на поверхности которых обширно представлены CCR5-рецепторы. На более **поздних** стадиях у 50—60% пациентов происходят изменения вируса, приводящие к смене его тропизма с преобладанием **X4-тропных** вариантов, когда основной мишенью становятся Т-клетки, поверхность которых обогащена CXCR4-рецепторами; этот момент часто совпадает с началом прогрессирования инфекции, хотя и не у всех пациентов. Ве-

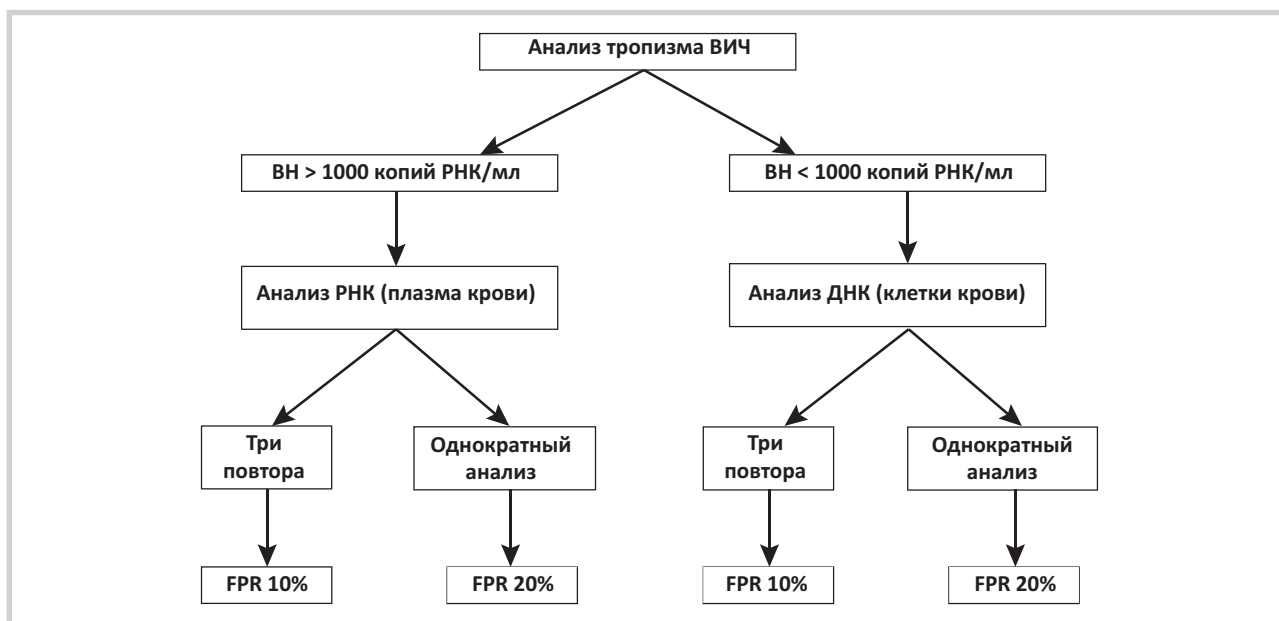


Рис. 7. Алгоритм анализа тропизма ВИЧ.

роятность «переключения» и его сроки являются индивидуальными и не подлежат прогнозированию.

Объектом воздействия маравирика (MVC) является CCR5, но не CXCR4; связывая молекулу ко-рецептора, лекарственный препарат конкурирует как с его природными лигандами, так и с ВИЧ, тем самым блокируя проникновение вируса в клетку. Принимая решение о назначении пациенту MVC, необходимо убедиться в том, что X4-вирусов у него нет, иначе лечение будет **заведомо неэффективно**, так как в этом случае для размножения вирус способен использовать другие рецепторы — CXCR4.

Анализ тропизма ВИЧ производят непосредственно перед его назначением (АП); ранее полученный результат не имеет смысла, так как тропизм ВИЧ может измениться на любой стадии развития инфекции.

В условиях клинической лаборатории анализ последовательности V3-петли проводится с использованием специально разработанных программ, основанных на базах данных вариантов ВИЧ с известным тропизмом. Наиболее широко используемая программа содержится в составе известного сайта **geno2pheno** (<http://coreceptor.geno2pheno.org>).

Проблема интерпретации результатов секвенирования V3-петли связана с тем, что различия ее структуры у R5- и X4-штаммов не носят отчетливого характера, и при оценке тропизма всегда наблюдается «**перекрытие**», т.е. часть истинных R5-вариантов регистрируется как X4 и наоборот. Результатом анализа генома ВИЧ на сайте geno2pheno становится показатель **FPR** (false positive rate), в русскоязычной литературе обозначаемый как «**уровень допустимости ложноположительных результатов**»; этим термином обозначают долю R5-вирусов, ошибочно интерпре-

тированных как X4-тропные. Например, если FPR у вируса, выделенного от пациента, равен 0,5%, это означает, что, скорее всего, это X4-тропный вирус, потому что вероятность ошибки очень маленькая. Напротив, если FPR равняется 90%, предсказание X4-тропизма на 90% ошибочно, и вирус, по всей видимости, принадлежит к группе R5-тропных.

Окончательное решение о назначении маравирика принимается с учетом выбранного cut-off, или критического показателя FPR: если показатель, полученный при анализе вируса у пациента, выше cut-off, его признают R5-тропным, если ниже, вирус считают X4-тропным и маравирик не назначают. Cut-off можно устанавливать произвольно непосредственно в момент анализа последовательности на сайте, однако большинство специалистов предпочитает его не варьировать, а ориентироваться на некоторые рекомендуемые постоянные значения (**чаще всего 10%**) [17].

Указанные выше сложности служат поводом для повторения анализов тропизма ВИЧ — обычно рекомендуются **три повтор анализа** в одном и том же образце (СИ) [3, 17]; надежность результата при этом повышается. В случае однократного анализа рекомендуется повысить критический **FPR до 20%** (ВІІІ) [17].

Назначение маравирика не всегда производится в условиях повышенной ВН, иногда причиной его применения становится токсичность препаратов прежней схемы и другие обстоятельства. При низких показателях вирусной нагрузки (менее 1000 копий РНК/мл) или ее отсутствии трехкратный анализ **провирусной ДНК** (ВІІІ) может служить равноценной заменой РНК [3, 17], при этом критический FPR остается прежним (**рис. 7**).

## Рекомендации по подбору схем для замены терапии

Все описанные выше инструменты интерпретации генома ВИЧ предоставляют информацию об устойчивости ВИЧ, однако рекомендаций по формированию и потенциальной эффективности новых схем лечения они не дают. Определенную помощь здесь могут оказать расчетные алгоритмы, подобные описанной выше балльной системе Стэнфордской базы данных, однако успешности новых схем они также не прогнозируют.

В последние годы разработаны два специальных **on-line ресурса**, позволяющих создавать и прогнозировать успех трехкомпонентных схем лечения индивидуальных пациентов на основании данных о генотипе ВИЧ и/или истории их лечения.

Одним из них является инструмент **EuResist** (<http://www.euresist.org>), находящийся в бесплатном доступе и не требующий предварительной регистрации для пользователя. Система запрашивает генотип ВИЧ и (по возможности) совокупность клинических и лабораторных данных и выдает **прогноз эффективности десяти подобранных индивидуально схем терапии** с оценкой вероятности их успеха (см. табл. 2).

На сайте имеется возможность выбрать русскоязычный вариант интерфейса. При вводе данных предусмотрена опция **выбора препаратов** для новой схемы из числа **реально имеющихся** в распоряжении клинициста; в этом случае система выдает двойной ответ — схемы оптимального выбора из всех потенциальных комбинаций препаратов АРТ и перечень лучших комбинаций в зависимости от возможностей пациента и врача. По окончании работы формируется **отчет в формате \*.pdf** (более подробно см [1]). Наиболее эффективно система зарекомендовала себя в случаях сложного выбора при множественной лекарственной устойчивости.

Второй бесплатный ресурс — HIV Treatment Response Prediction System (**HIV-TRePS**, <https://www.hivrdi.org/treps/>) располагает возможностью для прогнозирования успешных схем терапии как при наличии данных о генотипе ВИЧ, так и в его отсутствие — в этом случае информацией для составления прогноза является история лечения пациента. Основой для функционирования ресурса является обширная объединенная база данных, включающая результаты наблюдений за пациентами в клиниках и исследовательских программах, а также все данные об испытаниях препаратов фармацевтическими компаниями.

Система запрашивает генотип ВИЧ и/или историю АРТ, а также ВН и число CD4 клеток и желаемый период прогноза (от 4 до 52 нед) и выдает предсказание эффективности **пяти подобранных индивидуально схем терапии** с оценкой вероятности их успеха. Лечение считается успешным, если ВН <50 копий РНК/

мл достигается в течение заданного пользователем срока. Имеется возможность подбора нескольких альтернативных схем АРТ либо оценка схемы, предварительно составленной врачом. По окончании работы формируется отчет в формате \*.pdf.

## Контроль качества анализа генотипа ВИЧ

Для эффективного применения результатов генотипирования ВИЧ и прогнозирования успеха терапии врач должен быть уверен в надежности и достоверности результатов анализа, обеспечиваемых наличием в лаборатории контроля качества. Система контроля качества генотипирования ВИЧ для анализа мутаций лекарственной устойчивости должна, как и любой другой вид лабораторного анализа, включать в себя комплекс мер внутрилабораторного контроля и внешней оценки качества.

Целью программ по **внешней оценке качества** является анализ соответствия критериям качества всей процедуры исследования в целом. В исследованиях программ внешней оценки принимают участие все/несколько лабораторий, при этом главной задачей является стандартизация исследования в масштабах всей лабораторной сети.

Одним из способов (но не единственным) внешней оценки является использование **стандартной панели образцов** с последующей оценкой соответствия полученных результатов истинным характеристикам контрольных образцов (применительно к генотипированию ВИЧ — последовательности РНК ВИЧ либо перечню выявленных мутаций). Помимо этого, внешняя оценка качества должна включать в себя оценку правильности назначения генотипирования ВИЧ (отбор пациентов), забора и хранения образцов биологического материала, а также интерпретации результатов и формирования рекомендаций по их применению.

В России система внешней оценки качества генотипирования ВИЧ **пока не создана**, однако рекомендации международных экспертов [8, 13, 19] на этот счет существуют и будут далее кратко описаны. В этих условиях особенно важна роль мер, направленных на обеспечение качества всех процедур анализа на всех его этапах в индивидуальных лабораториях.

На **преаналитической и аналитической** стадиях исследования генотипа ВИЧ внимание следует уделять тем же процедурам, которые требуют его во всех видах лабораторных исследований. К наиболее распространенным на этих стадиях ошибкам относятся неправильная маркировка пробирок, нарушение температурного режима, герметизации и сроков транспортировки образцов и хранения тест-систем, а также контаминация продуктов амплификации (табл. 3). Одним из наиболее эффективных способов преодоления этих недостатков является разработка и неукоснительное применение **стандартных**

**Таблица 3. Некоторые распространенные ошибки в ходе выполнения анализа мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ**

Стадия исследования	Наименование этапа исследования	Типичные проблемы	Способы устранения
Преаналитическая	Забор крови	Гемолиз, хилез, сгустки крови	Использование вакутейнеров, соблюдение условий подготовки пациента к исследованию
	Маркировка	Отсутствие или ошибка маркировки	Использование несмываемых маркеров Корректное и полное заполнение формы направления
	Хранение образцов Транспортировка образцов Хранение тест-систем	Нарушение температурного режима, герметизации и сроков транспортировки образцов и хранения тест-систем	Соблюдение условий транспортировки Контроль температурного режима транспортировки и хранения образцов биологического материала Контроль условий и сроков хранения тест-систем
	Организация лаборатории	Контаминация на преаналитической стадии	Реорганизация помещений лаборатории Повышение квалификации и сертификация персонала
Аналитическая	Выделение РНК	Нарушение порядка движения материала Ошибки пипетирования	Контроль критериев отбора образцов перед началом работы (ВН >500 копий РНК/мл) Применение СОП для всех процедур анализа Применение всех контрольных образцов, включая внутрилабораторный контрольный образец Своевременное обслуживание приборов и инструментария на всех этапах анализа
	ОТ-ПЦР	Контаминация отрицательных контролей Отсутствие продукта амплификации Ошибки пипетирования Нарушения сроков и условий хранения реагентов	Выполнение требований по ограничению контаминации Возможна низкая вирусная нагрузка в опытном образце, использовать положительный контроль Повышение квалификации и сертификация персонала Соблюдение инструкций по хранению реагентов и тест-систем
	Секвенирование	Невалидные результаты	Применение внутрилабораторного контрольного образца
Постаналитическая	Интерпретация результатов генотипирования ВИЧ	Использование невалидных результатов Анализ последовательностей ДНК, не прошедших контроль качества тест-системы Ошибки в записях	Строгое следование инструкции по интерпретации результатов Обязательный анализ контроля качества последовательностей ДНК Тщательная проверка идентификационных номеров перед выдачей результата Сохранение полученных результатов секвенирования в формате fasta или txt Сохранение результатов дополнительного анализа в формате pdf Участие в программе внешней оценки качества

**операционных процедур (СОП)** для всех этапов анализа [8, 13, 19].

Первичные мероприятия по контролю качества результатов секвенирования (**постаналитическая стадия**) включены в описание процедуры исследования каждой из тест-систем и включают в себя использование отрицательного (ВИЧ-отрицательная плазма) и положительного контрольных образцов, валидацию результатов, полученных в опытных образцах, а также обязательный этап контроля качества последовательности ДНК. Подробное описание критериев валидности и принципов контроля качества геномных последовательностей приводятся в инструкциях к тест-системам и рекомендациях [4, 8, 18, 19].

В качестве дополнительной меры повышения качества эксперты ВОЗ [8, 19] предлагают вводить в каждое исследование **три дополнительных контроля**: 1) образец без РНК/ДНК; если на этапе ПЦР обнаруживают наличие продукта в этом образце, делают вывод о наличии контаминации и дальнейшие этапы анализа отменяют; 2) внутрилабораторный контрольный образец (ВИЧ-положительная плазма крови) [19], содержащий вирус с известным набором мутаций; 3) образец ДНК ВИЧ с низким содержанием материала на этапе ПЦР.

В условиях ограниченного финансирования рекомендовать в России указанные меры не представляется возможным, однако в случаях возникновения проблем в исследовании генома ВИЧ они могут

**Таблица 4 . Критерии оценки качества оказания медицинской помощи по группам заболеваний или состояний**

Группа заболеваний или состояний	Болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)	
Код/коды по МКБ-10	B20-B24	
Возрастная категория	Любая	
Формы оказания медицинской помощи	Плановая медицинская помощь, которая оказывается при проведении профилактических мероприятий, при заболеваниях и состояниях, не сопровождающихся угрозой жизни пациента, не требующих экстренной и неотложной медицинской помощи, и отсрочка оказания которой на определенное время не повлечет за собой ухудшение состояния пациента, угрозу его жизни и здоровью	
Виды оказания медицинской помощи	Специализированная, в том числе высокотехнологичная, медицинская помощь	
Условия оказания медицинской помощи	Амбулаторно (в условиях, не предусматривающих круглосуточного медицинского наблюдения и лечения), в том числе на дому при вызове медицинского работника В дневном стационаре (в условиях, предусматривающих медицинское наблюдение и лечение в дневное время, но не требующих круглосуточного медицинского наблюдения и лечения) Стационарно (в условиях, обеспечивающих круглосуточное медицинское наблюдение и лечение)	
Фаза заболевания или другие характеристики	Исследование назначается пациентам, имеющим признаки неэффективности антиретровирусной терапии, либо пациентам на стадии острой инфекции	
Событийные (смысловые, содержательные, процессные) критерии качества	Подготовлено направление на лабораторное исследование лекарственной устойчивости ВИЧ, все поля формы корректно заполнены	да нет
	Биологический материал доставлен на исследование с соблюдением температурных условий (цельная кровь — при комнатной температуре, плазма крови — с использованием хладоэлементов/сухого льда)	да нет
	Вирусная нагрузка в образце плазмы крови не менее 500 копий РНК/мл	да нет
Временные критерии качества	Биологический материал от пациента собран на фоне неуспешной схемы АРТ или (в виде исключения) не позднее 2 нед после ее отмены	да нет
	Биологический материал доставлен на исследование с соблюдением сроков транспортировки (цельная кровь — не более 48 ч, плазма крови охлажденная — не более 24 ч)	да нет

оказаться полезными в выяснении причин неуспеха (табл. 4).

После получения нуклеотидных последовательностей рекомендуется проведение проверки **отсутствия спорадической контаминации**. Она осуществляется в два этапа путем проведения филогенетического анализа и расчета генетических дистанций для всех образцов постановки. Подробные указания, касающиеся этого этапа лабораторного исследования, приводятся в специальной литературе [10, 19].

При разработке **панели контрольных образцов** для проведения внешней оценки качества, согласно рекомендациям ВОЗ [8], следует придерживаться правил, разработанных специально для поддерживаемой ВОЗ сети лабораторий, выполняющих анализ резистентности ВИЧ. В частности, образцы панели должны быть получены путем разведения плазмы

крови либо при размножении ВИЧ в культуре клеток; в панели должны быть представлены вирусы с мутациями во всех областях генома ВИЧ, а также «дикие» вирусы, принадлежащие к разным подтипам ВИЧ; панель следует валидировать на всех применяемых коммерческих тест-системах и т.д.

Контрольная рассылка панели производится **не реже одного раза в год**. Оценка результатов каждой из лабораторий-участников проводится путем сравнения с **консенсусной последовательностью**, полученной на основании всех сравниваемых последовательностей. Более подробные указания по оценке результатов внешней оценки качества приводятся в руководствах [8, 13, 19].

*При подготовке публикации использованы средства гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00050).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бобкова М.Р. *Лекарственная устойчивость ВИЧ*. Москва: Человек; 2014.
2. *ВИЧ-инфекция и СПИД*. Национальное руководство под ред. В.В. Покровского. Москва: Гэотар-Медиа; 2013.
3. Инструкция по применению набора реагентов для определения тропизма и выявления мутаций устойчивости ВИЧ-1 «АмплиСенс HIV-Resist-Seq». 2012; Available at: [http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/d96/hiv\\_resist\\_seq\\_zaregistr\\_la\\_280316.pdf](http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/d96/hiv_resist_seq_zaregistr_la_280316.pdf)
4. Методические рекомендации по анализу и интерпретации результатов исследования, проведенного с использованием набора реагентов для определения тропизма и выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в клиническом



- материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «амплисенс HIV-Resist-seq» АмплиСенс. 2016; Available at: [http://www.interlab-service.ru/upload/iblock/6ea/hiv\\_resist-seq-\\_metodich.-rekomendatsii\\_la\\_280316.pdf](http://www.interlab-service.ru/upload/iblock/6ea/hiv_resist-seq-_metodich.-rekomendatsii_la_280316.pdf)
5. Молекулярно-биологическое исследование «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови». Клинические рекомендации. 2014.  
Available at: [http://www.fedlab.ru/upload/medialibrary/7d0/kochetov-ag.-klin-rek\\_-kld.-molekulyarno\\_biologicheskoe-issledovanie-\\_opredelenie-kontsentratsii-rnk-vich-v-plazme-krovi\\_-2014.pdf](http://www.fedlab.ru/upload/medialibrary/7d0/kochetov-ag.-klin-rek_-kld.-molekulyarno_biologicheskoe-issledovanie-_opredelenie-kontsentratsii-rnk-vich-v-plazme-krovi_-2014.pdf)
  6. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. Методические указания МУ 1.3.2569-09. 2009.  
Available at: [http://mibio.ru/docs/110/mu\\_1.3.2569-09\\_amplifikatsii\\_nukleinovih\\_kislot\\_pri\\_rabote\\_s\\_materialom.pdf](http://mibio.ru/docs/110/mu_1.3.2569-09_amplifikatsii_nukleinovih_kislot_pri_rabote_s_materialom.pdf)
  7. Покровский В., Юрин О., Кравченко А. и др. Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016;6(приложение).
  8. Bertagnolio S, Derdelinckx I, Parker M, et al. World Health Organization/HIVResNet Drug Resistance Laboratory Strategy Antivir Ther. 2008;Suppl.2:49-57. Available at: [http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hiv\\_reslab\\_strategy.pdf?ua=1](http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hiv_reslab_strategy.pdf?ua=1)
  9. BHIVA guidelines on the routine investigation and monitoring of HIV-1-positive adults 2016.  
Available at: <http://www.bhiva.org/documents/Guidelines/Monitoring/2016-BHIVA-Monitoring-Guidelines.pdf>
  10. Ebbert MT, Mallory MA, Wilson AR, et al. Application of a new informatics tool for contamination screening in the HIV sequencing laboratory. *J Clin Virol*. 2013;57(3):249-253.
  11. European AIDS Clinical Society (EACS), Guidelines, Version 8.0. 2015.  
Available at: [http://www.eacsociety.org/files/guidelines\\_8.1-english.pdf](http://www.eacsociety.org/files/guidelines_8.1-english.pdf)
  12. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of health and human services. 2016. Available at: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>
  13. HIV drug resistance laboratory training package. 2009. Available at: [http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/lab\\_training/en/](http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/lab_training/en/)
  14. HIV 2015/16. Под ред. Hoffmann C, Rockstroh J. Available at: <https://hivbook.files.wordpress.com/2016/04/hiv-2015-16-complete.pdf>
  15. Hofstra LM, Sauvageot N, Albert J, et al. Transmission of HIV drug resistance and the predicted effect on current first-line regimens in Europe. *Clin Infect Dis*. 2016;62(5):655-663.
  16. Vandamme AM, Camacho RJ, Ceccherini-Silberstein F, et al. European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev*. 2011;13(2):77-108.
  17. Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(5):394-407.
  18. ViroSeq HIV-1 Genotyping System. Инструкция для пользователей. 2011.
  19. WHO/HIVResNet HIV drug resistance laboratory strategy. 2010.  
Available at: [http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hiv\\_reslab\\_strategy.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hiv_reslab_strategy.pdf)