

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

УДК 575:616.98-036.22

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОПИЗМА ВИЧ-1: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

²*Н.В.Матиевская, ¹Д.Е.Киреев, ²И.О.Токунова*

¹Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, Россия

²Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

METHODS FOR DETERMINATION OF HIV-1 TROPISM: THE CURRENT STATE OF THE PROBLEM

²*N.V.Matsiyevskaya, ¹D.E.Kireev, ²I.O.Tokunova*

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

²Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

© Коллектив авторов, 2016 г.

В обзоре представлено описание, принципы выполнения, преимущества и недостатки фенотипических и генотипических методов определения тропизма ВИЧ-1. Показаны результаты генотипического метода определения тропизма и субтипов ВИЧ при секвенировании петли V3 региона gp120 гена оболочки вируса у 98 пациентов. Длительное использование в клинической практике пожизненной комбинированной антиретровирусной терапии приводит к необходимости внедрения препаратов из новых групп, таких как антагонисты CCR5, и тестов по определению тропизма ВИЧ. В настоящее время к наиболее приемлемым в клинической практике относятся генотипические методы определения тропизма ВИЧ, основанные на секвенировании петли V3 gp120, которые являются информативными и доступными. Одним из преимуществ генотипического метода можно считать возможность одновременного определения тропизма и субтипа вируса по региону поверхностного гена ВИЧ. Накопление результатов прогнозирования тропизма вируса при не-B-субтипе ВИЧ позволит с течением времени повысить точность метода для пациентов, инфицированных разными субтипами ВИЧ.

Ключевые слова: ВИЧ-1, тропизм, корецептор, CCR5, CXCR4, генотипические методы, фенотипические методы, секвенирование.

The procedures, advantages, and disadvantages of the phenotyping and genotyping methods for determination of HIV-1 tropism are reviewed. The results of a genotyping determination of HIV tropism and subtypes based on sequencing of the V3 region of the gene coding for HIV envelope gp120 glycoprotein from 98 patients are presented. Lifelong use of combined anti-retroviral therapy results in the need to introduce novel classes of drugs, such as CCR5 antagonists, and novel test for HIV tropism. At present, the most convenient in the clinical practice are genotyping methods based on gp120 V3-loop sequencing, which are informative and affordable. One of advantages of genotyping is the opportunity to determine HIV tropism and subtype simultaneously. Accumulating the results of forecasting non-B HIV subtypes will make it possible, with time, to enhance the accuracy of using the method in patients infected with different HIV subtypes.

Key words: HIV-1, tropism, coreceptor, CCR5, CXCR4, genotyping methods, phenotyping methods, sequencing.

Введение. В настоящее время практически расшифрованы механизмы проникновения вируса иммунодефицита человека в клетки человека. Установлено, что связывание CD4-рецептора, расположенного на поверхности клеток, с рецептором вируса gp120 приводит к конформационным изменениям оболочки вируса, благодаря которым на ней формируется сайт связывания с хемокино-

выми рецепторами (ХР). Это позволяет комплексу CD4-gp120 взаимодействовать с ХР: CCR5 или CXCR4. Взаимодействие осуществляется посредством контакта региона V3 белка gp120 с одним из ХР в зависимости от тропизма ВИЧ. Тропизм ВИЧ определяется последовательностью аминокислот региона V3 gp120, в зависимости от которой ВИЧ классифицируют как CCR5-тропный,

СХСR4-тропный или как вирус с двойным тропизмом. Протяженность данной области составляет приблизительно 35 аминокислот. Несмотря на высокую вариабельность петли V3, признаки, позволяющие разделять вирусы разного тропизма, выявляются в сиквенсах данного региона [1, 2]. Известно, что R5-тропный вирус является доминирующим на стадии первичной инфекции, однако у 50% пациентов в динамике развития ВИЧ-инфекции происходит смена тропизма ВИЧ с R5 на X4. Количество X4-тропных вариантов увеличивается на поздних стадиях ВИЧ-инфекции и ассоциируется с прогрессией ВИЧ-инфекции, снижением уровня CD4 Т-лимфоцитов, формированием СПИДа. Вирусы с двойным тропизмом (R5X4-тропные варианты ВИЧ) представлены неоднородной группой, среди них выделяют вирусы, использующие преимущественно ССR5-корцептор (так называемые «двойные» R-тропные варианты), и вирусы, использующие преимущественно СХСR4-корцептор («двойные» X-тропные варианты). При этом «двойные» R-тропные появляются в более раннюю стадию ВИЧ-инфекции, в то время как «двойные» X-тропные появляются позже. У 50% ВИЧ-инфицированных пациентов не происходит «переключения» тропизма вируса в динамике развития ВИЧ-инфекции. У таких пациентов вплоть до развития терминальной стадии заболевания доминирующим вариантом является ССR5-тропный вирус [1–4].

Патогенность вирусов R5 и X4 в условиях *in vivo* главным образом связана с экспрессией корцепторов на поверхности различных клеток хозяина. СХСR4-корцепторы экспрессируются в основном на CD4-клетках (в том числе гемопоэтических клетках-предшественниках Т-лимфоцитов, клетках тимуса, *païve* Т-клетках и моноцитах), в то время как ССR5-корцепторы чаще встречаются в основном на клетках памяти Т-лимфоцитов и макрофагах. Таким образом, использование СХСR4-корцепторов обеспечивает доступ вируса к пулу важных целевых клеток, участвующих в онтогенезе Т-клеток, что может привести к ускоренному снижению CD4 Т-клеток. В связи с этим обнаружение появления СХСR4-тропного вируса имеет значение для прогнозирования исходов, мониторинга прогрессирования заболевания и решения вопроса выбора терапии. Внедрение методов определения тропизма в клиническую практику связано с использованием относительно новой группы антиретровирусных препаратов (АРВП) — антаго-

нистов ССR5, которые ингибируют связывание комплекса CD4–gp120 с ССR5 и тем самым «обрывают» цикл репликации ВИЧ на уровне проникновения в клетки человека. Данные препараты эффективны при инфекции R5-тропным вариантом ВИЧ, в то время как при появлении не-R5-тропных вариантов ВИЧ — X4-тропных, или вирусов с двойным тропизмом — малоэффективны или неэффективны вовсе. Исходя из этого, в настоящее время в литературе широко обсуждаются вопросы о точности прогнозирования тропизма ВИЧ при использовании различных методов [4, 5]. В настоящее время доказано, что формирующаяся резистентность к маравироку у пациентов с R5-тропным вирусом связана с наличием у таких пациентов минорных популяций X4-тропных вариантов, которые на фоне терапии маравироком становятся доминирующими. В связи с этим возможность определения минорных популяций X4-тропных вирусов (составляющих менее 5%) является одним из важнейших показателей точности методики определения тропизма ВИЧ [4–6].

Цель работы: представить описание, преимущества и недостатки фенотипических и генотипических методов определения тропизма ВИЧ-1, а также результаты определения тропизма и субтипа ВИЧ генотипическим методом по результатам секвенирования петли V3 региона gp120 гена оболочки ВИЧ.

Представлен обзор современных литературных источников по фенотипическим и генотипическим методам определения тропизма ВИЧ-1.

Представлены результаты определения тропизма и субтипа ВИЧ-1 генотипическим методом в 57 образцах плазмы и лимфоцитов ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в Гродненской области Республики Беларусь. Среди пациентов с определенным тропизмом вируса было 55 (58,1%) женщин и 41 (41,9%) мужчины, средний возраст составил 36,7+9,1 лет. По клиническим стадиям (ВОЗ, 2012) пациенты распределились следующим образом: 1 клиническая стадия — 49 (50%) пациентов, 2-я стадия — 12 (12,2%), 3-я — 27 (27,6%), 4-я — 10 (10,2%). Определение тропизма ВИЧ проводилось с помощью набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» производства ЦНИИ эпидемиологии (Россия) согласно инструкции производителя (FPR — 20%) при помощи компьютерного алгоритма на сайте <http://www.geno2pheno.org/>. Определение субтипа ВИЧ проводилось на основании нуклеотидных

последовательностей фрагмента гена белка оболочки с помощью REGA HIV-1 Subtyping Tool — Ver. 3.0.

Существующие методы определения тропизма ВИЧ можно разделить на две группы: фенотипические и генотипические. Длительное время для определения тропизма использовались фенотипические методы. Данные методы определения тропизма ВИЧ основаны на культивировании инфицированных клеток хозяина, или инженерного рекомбинантного вируса, произведенного от популяции вирусов пациента, в культуре индикаторных клеточных линий конституционно экспрессирующих CCR5, CXCR4 или оба корецептора [1, 7].

В конце 1980-х появилась первая тест-система — МТ-2-анализ, также называемый традиционным фенотипическим методом, позволявшая дифференцировать штаммы ВИЧ на синцитий индуцирующие (NSI) вирусы, которые в настоящее время известны как CCR5-тропные, и синцитий индуцирующие (SI) вирусы, известные как Х4-тропные или Х4/Р5 вирусы с двойным тропизмом. МТ-2-анализ был основан на возможности инфицирования Х4-тропным ВИЧ культуры МТ-2-клеток, которые на своей поверхности экспрессировали XP CXCR4. Таким образом, вирусы, которые не могли инфицировать МТ-2-клетки, относились к синцитий неиндуцирующим. Способность ВИЧ реплицироваться в индикаторных МТ-2-клетках ассоциировалась с выраженным слиянием клеток и формированием синцития, что доказывало наличие Х4-тропных вирусов [8, 9].

Известны две широко использовавшиеся версии МТ-2: одна, в которой клетки пациента непосредственно сокультивировались с клеточной культурой МТ-2, и другая, в которой вирусные частицы вначале выделялись из клеток пациента, а затем культивировались с ВИЧ-серонегативными фитогемагглютинин-стимулированными мононуклеарами периферической крови.

МТ-2-анализ не являлся технически сложным, однако необходимость в наличии жизнеспособных клеток пациента (свежих или криоконсервированных) и лабораторий третьего уровня биологической безопасности ограничивала его внедрение в клиническую практику.

Одним из основных недостатков данного анализа является необходимость выделения вируса из стимулированных периферических мононуклеаров крови (ПМК) пациента. Стандартная процедура выделения вируса требует совместного культивирования клеток

ВИЧ-инфицированного пациента и ВИЧ-негативного донора, стимулированных фитогемагглютинином или CD3/CD28 антителами в присутствии интерлейкина-2. Недостатком такой стимуляции является вероятность реактивации интегрированных геномов ВИЧ-1, некоторые из которых могут в момент проведения исследования находиться в нереплицирующемся (неактивном) состоянии в организме пациента. Более того, длительное культивирование образцов крови, так же как и пассаж изолятов вируса, потенциально способно накапливать вирусы, свойства которых не отражают корректно характеристики вирусной популяции *in vivo*. Свойства периферических мононуклеаров пациента, стимулированных *in vitro*, могут различаться при сравнении с циркулирующими ПМК того же пациента [10].

Еще один недостаток данного анализа связан с отсутствием возможности разделять CXCR4-тропные вирусы и вирусы с двойным тропизмом. Достаточное накопление изолятов вируса требует высокой квалификации сотрудников лаборатории, что также ограничивало широкое использование данного метода в клинических целях.

С учетом указанных трудностей традиционные фенотипические анализы, такие как МТ-2 cells, Ghost cells, U87 cell lines, U373-MAGI cell lines, не нашли широкого применения в рутинной клинической практике и в основном использовались в исследовательских лабораториях в научных целях [10].

Новое поколение фенотипических тестов представлено рекомбинантными анализами, разработанными Trofile, Phenoscript, Virco. Они позволяют определять тропизм вируса без культивирования ВИЧ, выделенного от пациента в клеточной культуре. Для системы Trofile существует наибольшее количество клинически подтвержденных данных (около 25 000 проанализированных образцов). Платформы XtackC/PhenX-R и Virco сочетают генотипические и фенотипические методы определения тропизма ВИЧ [10, 11].

Принципом рекомбинантных анализов, в отличие от традиционных, является генерирование псевдовирусов, часть генома которых представлена нуклеотидной последовательностью, полученной из вирусной популяции пациента. На первой стадии РНК ВИЧ-1, выделенная из плазмы пациента, подвергается обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК (кДНК). Затем полученная вирусная кДНК используется в качестве матрицы для амплификации региона *env* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В результате амплифицированные фрагменты ДНК, представляющие собой разнообразие нуклеотидных последовательностей региона *env* вирусов, присутствующих у пациента, клонируются в специальный вектор экспрессии. Полученный вектор позволяет генерировать белки *env*, соответствующие вирусной популяции пациента.

Наконец, для того чтобы генерировать псевдовирус, оба вектора должны быть трансформированы в клеточную линию для изготовления окончательного рекомбинантного вируса. ВИЧ-1-геномный вектор генерирует вирусные частицы и использует белки пациента, произведенные вектором *env*-последовательностей, чтобы закончить сборку псевдовирусов.

При определении тропизма, псевдовирусы используются во всех фенотипических анализах, чтобы инфицировать клетки-мишени двух линий. Эти клеточные линии экспрессируют на своей поверхности CD4-рецептор и один из XP — CXCR4 или CCR5. Тип используемых клеток зависит от применяемой тест-системы. После завершения первого цикла анализа в последующих циклах (проба мультицикл) вирусной репликации, инфицированные клетки экспрессируют интегрированный индикаторный ген, который может быть доставлен псевдовирусом или является частью клеточного гена. Результаты исследования оцениваются с помощью биолюминесцентного или колориметрического сигналов, которые используются для качественной и количественной оценки вирусных частиц, а также для определения вирусного тропизма. Контроль в определении тропизма вируса может быть подтвержден использованием специфических антагонистов рецепторов на этапе псевдовируса. Результат исследования оценивается с учетом типа инфицированных индикаторных клеток, X4-тропные вирусы инфицируют CXCR4/CD4-индикаторные клетки, в то время как CCR5/CD4-клетки остаются неинфицированными. С другой стороны, R5-тропный вирус будет преимущественно инфицировать CCR5/CD4-клетки. Популяции со смешанным тропизмом могут инфицировать обе группы клеток [10–12].

Один из самых известных фенотипических анализов — Trofile, представляет собой одноциклового рекомбинантный анализ. Этот коммерческий анализ длительное время являлся одним из наиболее используемых для определения тропизма ВИЧ-1 в клинических исследованиях. Он позволяет получить быстрые и точные результаты, отражающие свойства вируса в плазме пациента. Этот анализ

проводится у пациентов, имеющих вирусную нагрузку (ВН) выше 1000 копий/мл [12].

Trofile уже был использован в ряде оценок при клинической разработке нескольких ингибиторов проникновения. Была продемонстрирована высокая точность и приемлемая воспроизводимость результатов. Анализ может быть использован для определения тропизма у разных субтипов вируса (B, C, D, E, EA) с достаточной степенью достоверности. Одним из преимуществ Trofile является то, что для определения тропизма вируса анализируется достаточно обширный регион гена *env* размером около 2,5 kb. Этот регион амплифицируется в ПЦР и представляется на поверхность экспрессирующего вектора. В то время как другие рекомбинантные методы анализируют значительно меньшие по размеру фрагменты регионов. Несмотря на то, что петля V3 gp120 считается основным регионом, определяющим характер тропизма ВИЧ, фрагмент связывания вируса дополнительно включает в себя и другие регионы gp120. Регионы V1, V2, V4, V5 и C4 могут играть определенную роль в формировании тропизма ВИЧ. В связи с этим увеличение протяженности анализируемого региона позволяет повысить точность исследования на тропизм. В качестве индикаторных используются клетки линии U87, которые экспрессируют на своей поверхности CCR5/CD4 либо CXCR4/CD4. Достоверность исследования Trofile главным образом зависит от чувствительности и точности RT-PCR в выявлении квазивидов ВИЧ. В связи с этим важно наличие детектируемого уровня ВН ВИЧ (не менее 1000 копий/мл). Предел выявления минорных популяций вируса в соответствии с инструкцией компании-производителя Trofile составляет от 5 до 10%. К преимуществам Trofile относят безопасность в использовании рекомбинантного вектора, который не способен к репликации. Окончательно не определена точность Trofile в идентификации минорных популяций мутантных вариантов ВИЧ, таких как X4-тропные варианты при инфекции не-B-субтипом ВИЧ. Частота неопределенных результатов при использовании анализа Trofile составила от 4 до 6% на 250 000 исследований. Длительность исследования по определению тропизма ВИЧ с помощью Trofile составляет до 26 дней [1, 2, 12].

Второй распространенный фенотипический анализ для определения тропизма ВИЧ-1 — Phenoscript EnvTM (VIRalliance, Париж, Франция). Он позволяет на одной платформе определять тропизм виру-

са, а также оценивать чувствительность вируса к ингибиторам проникновения ВИЧ-1. В данном анализе используется 2180 пар нуклеотидов региона *env* для тестирования на тропизм или резистентность к препаратам. Определение тропизма проводится на основании анализа 900 пар нуклеотидов региона V1–V3. Способный к репликации *env* рекомбинантный вирус продуцируется в НЕК 293-T-клеточной культуре посредством гомологичной рекомбинации. Полученными рекомбинантными вирусами производят заражение индикаторов клеток U373MG-CD4, которые экспрессируют либо CCR5/CD4, либо CXCR4/CD4. Принцип работы Phenoscript *Env*™ подобен Trofile. Но для оценки результатов используется колориметрический метод, основанный на Tat-индуцированной экспрессии галактосидазы. Частота тропизма в образцах пациентов с ВН ВИЧ от 1000 до 10 000 копий/мл достигала 92%. При вирусной нагрузке ниже 1000 копий/мл успех определения тропизма зависит от возможности выполнения ПЦР-амплификации. Данный анализ продемонстрировал достоверность в определении тропизма при инфекции не-B-субтипом ВИЧ. Частота определения тропизма (*env* V1–V3) данным методом при тестировании 300 образцов субтипа А ВИЧ достигала от 67 до 100%. Общая частота определения тропизма для не-B-субтипа при использовании данного рекомбинантного анализа составила 71% [10, 13].

Методы XtrackC и PhenX-R (InPheno AG, Базель, Швейцария) сочетают в себе две специфические реакции: проба на основе гибридизации (XtrackC) и репликативный фенотипический анализ (PhenX-R). На первом этапе исследования XtrackC проводится быстрое тестирование методом геносортинга для идентификации R5- и X4-тропных вирусов. Для этого используются флуоресцентно-меченые зонды, специфичные для R5- и X4-тропных вирусов. Сомнительные результаты и образцы с подозрением на вирус двойного тропизма затем оценивают на второй стадии с использованием репликативного фенотипирования. В отличие от описанных одноцикловых анализов этот метод позволяет проводить репликацию рекомбинантного вируса в 3–4 циклах, ограничиваясь в общей сложности четырьмя днями. Это приводит к увеличению точности обнаружения минорных популяций ВИЧ. Добавление соответствующих классов препаратов позволяет выделить вирусы с двойным тропизмом из смешанной популяции ВИЧ во время повторных циклов репликации.

Преимуществами XtrackC и PhenX-R являются их высокая чувствительность в определении минорных

популяций вируса и сокращение продолжительности исследования за счет подключения генотипической основы: до четырех дней при использовании XtrackC и 14 дней — при PhenX-R. PhenX-R-анализ реплицирует популяцию рекомбинантных вирусов на этапах мультицикла. Это позволяет обеспечить более высокую чувствительность при обнаружении минорных квазивидов вируса и дает возможность выделить вирусы с двойным тропизмом из вирусных популяций со смешанным тропизмом. Однако приходится сталкиваться с теми же проблемами, что и в традиционных анализах, где дополнительная репликация рекомбинантных вирусов может привести к доминированию той популяции вируса, которая *in vitro* имеет более высокую способность к инфицированию клеток. Способность рекомбинантного вируса к репликации позволяет оценивать функциональные свойства вируса. При этом необходимо учитывать, что такие исследования не подходят для лабораторий с недостаточным уровнем безопасности [13–16].

Платформа определения тропизма Virco состоит из четырех анализов. Все анализы основаны на одностадийной амплификации с предварительной обратной транскрипцией области *gp120* ВИЧ-1, включающей регион от V1 до V4 (называемый NH₂–V4), который имеет длину в 1307 пар нуклеотидов.

Каждый из 4 анализов может быть выполнен отдельно, в зависимости от целей исследования: 1) предсказание тропизма на основании популяционного секвенирования V3-петли, 2) клональный генотипический анализ на основании оценки региона NH₂–V4 *gp120*, 3) клональный фенотипический анализ на основании оценки региона NH₂–V4 *gp120*, 4) популяционный фенотипический анализ на основании оценки региона NH₂–V4 *gp120*. Фенотипически тропизм определяется с помощью анализа экспрессии EGFP, используя сканирующий аргон-лазерный микроскоп. В настоящее время эта платформа используется только для исследовательских целей и в клинической практике не применяется. По предварительной оценке, этот анализ может обнаруживать менее пяти процентов минорных популяций вируса при исходной вирусной нагрузке ВИЧ выше четырех логарифмов МЕ/мл (более 10 000 МЕ/мл). Недостатком данного метода являются низкая чувствительность в выделении минорных популяций вируса при низкой вирусной нагрузке и невозможность разделить популяции вирусов с двойным тропизмом и смешанную популяцию. Кроме того, пока

не накоплен достаточный объем информации о достоверности данного метода при исследовании различных субтипов ВИЧ [10, 13–15].

Сейчас выпускается несколько усовершенствованных фенотипических тест-систем. Так, на смену первоначально лицензированной тест-системе Trofile пришла усовершенствованная тест-система Trofile-ESTA — Enhanced sensitivity tropism assay, которая в настоящее время заменила Trofile. ESTA обладает более чем в 10–100 раз превосходящей Trofile чувствительностью в определении минорных популяций X4-тропных вариантов ВИЧ. Например, в образцах, классифицированных, по результатам Trofile, как R5-тропные, при исследовании методом ESTA в 15% были выявлены как вирусы с двойным тропизмом. Эта тест-система более чувствительна в обнаружении резистентных к CCR5-антагонистам X4-тропных вирусов в случаях, когда они составляют небольшую долю в вирусной популяции, где преобладают CCR5-тропные штаммы [1, 17].

Потенциальная польза от применения новых более чувствительных тест-систем была продемонстрирована в нескольких исследованиях (Saag, 2008; Su, 2008). Однако тест-системы для фенотипирования дорогостоящи и сложны в использовании. Для проведения исследования необходима вирусная нагрузка не менее 500–1000 копий/мл. Кроме того, до получения результата проходит несколько недель. Оценка результатов требует высокой квалификации специалистов, в связи с чем существует необходимость направления результатов в референс-лабораторию. Технически метод сложно выполнить, и около 15% образцов остаются неопределенными. Это ограничивало широкое использование фенотипических методов в клинической практике. Поэтому сохранялась потребность в разработке методик, более простых для выполнения и требующих меньших затрат времени.

Генотипический метод, основанный на анализе петли V3 gp120, в настоящее время является более доступной и быстро выполнимой альтернативой фенотипическим методам. В связи с доступностью, короткими сроками получения результатов, достоверностью в определении тропизма генотипический метод нашел широкое распространение во многих европейских лабораториях. Ретроспективный анализ данным методом образцов, включенных в рандомизированные исследования по маравируку (MOTIVATE, MERIT), как и ряд других исследований, продемонстрировал достоверность генотипических методов в отборе пациентов, отвечающих

на маравирук-содержащие режимы антиретровирусной терапии (АРВТ) [2, 3, 18–20].

Например, в исследовании, включавшем 160 пациентов, которым маравирук назначался либо в качестве терапии спасения (при вирусной нагрузке ВИЧ более 50 копий/мл), либо по другим причинам — (при вирусной нагрузке ВИЧ менее 50 копий/мл). Вирусологический ответ на маравирук-содержащие режимы к 96-й неделе терапии составил 69% [21]. В исследовании, включавшем 71 пациента, маравирук назначался по результатам генотипического тестирования провирусной ДНК пациентам с недетектируемой вирусной нагрузкой ВИЧ (менее 50 копий/мл). Недетектируемый уровень вирусной нагрузкой ВИЧ сохранялся в течение 36 недель у 88% пациентов, в течение 48 недель — у 82% [22].

Оценка эффективности использования первой российской стандартизированной генотипической методики определения тропизма в лаборатории ЦНИИ эпидемиологии (Москва) проводилась в сотрудничестве с Институтом вирусологии Кёльнского университета. Вирусный тропизм определялся путем анализа плазмы крови при исследовании вирусной РНК ВИЧ и клеточной фракции при исследовании провирусной ДНК ВИЧ. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили в Центральном НИИ эпидемиологии. Каждый образец был разделен на две равные части, одна из которых анализировалась в ЦНИИ эпидемиологии, а вторая была отправлена в Германию. При сравнении результатов двух лабораторий было получено 100%-ное совпадение, когда исследовалась вирусная РНК (17 образцов). При сравнении результатов анализа провирусной ДНК получено совпадение в 93% (26 из 28 образцов). Итоговая корреляция между нуклеотидными последовательностями составила 97,8% в ходе анализа вирусной РНК и 95,9% для последовательностей, полученных с матрицы провирусной ДНК. Было показано, что исследование провирусной ДНК более эффективно, так как происходит уменьшение количества невалидных образцов [23].

В последние годы было предложено несколько рекомендаций по проведению и интерпретации результатов генотипического тестирования тропизма ВИЧ [24, 25]. В обновленных рекомендациях 2012 года выделяют 3 группы пациентов, которым показано тестирование на определение тропизма ВИЧ [1].

1-я группа — пациенты, не получающие АРВТ, так называемые «наивные» пациенты. Тропизм

ВИЧ рекомендуется исследовать в особых клинических ситуациях для решения вопроса о возможности включения маравирока в стартовую схему АРВТ. К таким ситуациям относят: первичную резистентность ВИЧ к АРВТ, индивидуальную непереносимость стандартных стартовых режимов АРВТ, предотвращение нежелательных взаимодействий АРВП с другими лекарственными средствами, которые уже получает пациент. Необходимо отметить, что в настоящее время в клинической практике такие исследования практически не выполняются, так как маравирик пока, как правило, является компонентом повторных схем АРВТ.

2-я группа — пациенты, получающие АРВТ. В случае неэффективности текущей схемы АРВТ (ВН ВИЧ более 50 копий/мл) тропизм рекомендуется определять параллельно с проведением исследования на резистентность к разным классам АРВП, для рассмотрения возможности о включении маравирока в альтернативные схемы терапии.

3-я группа — пациенты, получающие эффективную схему АРВТ (вирусная нагрузка ВИЧ — на недетектируемом уровне). Необходимость включения маравирока в схемы АРВТ у таких пациентов может быть связана с формированием нежелательных явлений или взаимодействий с другими препаратами текущих АРВП и т. п. В таком случае в качестве матрицы используется провирусная ДНК, выделенная из периферических мононуклеаров крови пациента. Допустимо также использовать РНК из плазмы, взятой накануне назначения АРВТ [1, 26, 27].

Существует несколько компьютерных алгоритмов, позволяющих по результатам секвенирования петли V3 региона gp120 ВИЧ классифицировать полученные последовательности в зависимости от тропизма вируса. К наиболее широко используемым в клинической практике относятся компьютерные алгоритмы geno2pheno и PSSM. Оба алгоритма имеют сопоставимую с Trogfile чувствительность в отборе пациентов, отвечающих на маравирик. Установлено, что конкордантность между обоими алгоритмами достигает 88%. Тем не менее, алгоритм geno2pheno значительно шире используется в клинической практике. Недостатком данного алгоритма является невозможность автоматической интерпретации тропизма вируса — R5- или X4-тропный [1, 25].

Для разделения вирусов с разным тропизмом используется FPR — False positive rate — величина, определяющая вероятность, с которой данный

вирус будет ложно определен как CXCR4-тропный. Образцы крови, имеющие показатель FPR более заданного уровня разделения, считаются инфицированными R5-тропными вирусами, при показателе ниже заданного уровня — не-R5-тропными, содержащими как вирусы с двойным тропизмом (CCR5/CXCR4), так и «чистые» CXCR4-тропные вирусы. Таким образом, чем выше показатель FPR, тем выше вероятность того, что в группе R5-тропного вируса присутствуют «чистые» CCR5-тропные вирусы. При снижении показателя возникает возможность более точного выделения CXCR4-тропных вирусов, в то время как в группу R5-тропного варианта вируса могут попадать вирусы с двойным тропизмом, которые хуже отвечают или не отвечают вовсе на терапию антагонистами CCR5. Матрицей для определения тропизма может служить вирусная РНК, выделенная из плазмы пациентов при наличии детектируемого уровня вирусной нагрузки ВИЧ. При невозможности выделить РНК (недетектируемый уровень ВН ВИЧ) матрицей может служить провирусная ДНК, полученная из клеток крови пациента. В заключение о результатах генотипического исследования образцов на тропизм рекомендуется обязательно включать величину FPR при использовании алгоритма geno2pheno[корецептор] [1].

Частота вирусологического ответа на маравирик-содержащие схемы при определении тропизма ВИЧ по однократной амплификации петли V3 при FPR равной 10% была сравнима с частотой вирусологического ответа при определении тропизма методом тройной амплификации (FPR — 5,7%). В связи с этим обновленные европейские рекомендации не требуют проведения амплификации в трех повторах [1].

В исследовании, включавшем 1221 образец, инфицированных субтипом В ВИЧ, было продемонстрировано, что очень низкие значения FPR (2% и менее) позволяют выделить пациентов с низким уровнем CD4, имеющих высокий риск развития тяжелого заболевания, инфицированных «чистыми» X4-тропными вариантами ВИЧ, не чувствительными к антагонистам CCR5. В связи с этим FPR равный 2% предлагается как суррогатный маркер иммуносупрессии. В то время как структура пациентов при FPR в пределах 2–10% крайне неоднородна и может включать популяцию, инфицированную вирусами с двойным тропизмом, преимущественно использующими CCR5-корецептор (R5+/X4-) и поэтому способными отвечать на терапию антагонистами CCR5 [28].

Считается, что общая чувствительность генетических методов для выделения Х4-тропных образцов при инфекции не-В-субтипом ниже, чем при В-субтипе. Например, при уровне FPR равном 20% чувствительность для выделения Х4-тропных образцов при В-субтипе составляла — 94%, в то время как при не-В-субтипе — 63% при сравнении с фенотипическим методом Phenoscript EnvTM. Причина более низкой точности генотипических алгоритмов при не-В-субтипе ВИЧ связана с ограниченным количеством результатов фенотипических методов определения тропизма, внесенных в статистическую базу данных алгоритма, что снижает точность результатов. В связи с этим рекомендуется дополнительно указывать в заключении по тропизму о наличии у пациента не-В-субтипа ВИЧ. Интерпретация результатов тропизма ВИЧ при не-В-субтипе проводится по тем же принципам, как и при субтипе В. Исключение составляет субтип С, для которого существует отдельная программа «matrix C» в алгоритме PSSM [1].

В алгоритме geno2pheno существует возможность повышения точности определения тропизма путем введения дополнительных данных, таких как уровень CD4 Т-лимфоцитов, ВН ВИЧ, наличие делеции в 32 нуклеотида в гене CCR5. Однако эти дополнения приемлемы лишь у пациентов, не получающих АРВТ, кроме того, они не валидированы. Поэтому в настоящее время отсутствуют рекомендации об использовании клинических данных в определении тропизма вируса [1].

Знание субтипа ВИЧ позволяет наиболее точно интерпретировать результаты генотипического метода при установлении тропизма ВИЧ. Это особенно важно для субтипа А ВИЧ, широко распространенного в странах СНГ, так как наибольшее количество исследований по определению тропизма ВИЧ выполнено для субтипа В [29]. Субтип вируса может быть определен по результатам секвенирования областей, расположенных в регионе pol, где закодированы протеаза и обратная транскриптаза, которые исследуются при определении резистентности ВИЧ к препаратам АРВТ. Анализ данного фрагмента позволяет определить субтип вируса с помощью алгоритмов Stanford, geno2pheno и других. Алгоритм REGA позволяет определить субтип по любому фрагменту вирусного генома. Для сравнения точности определения субтипа ВИЧ по регионам env с использованием geno2pheno было выполнено сравнение данного метода определения субтипа ВИЧ по сравнению

с субтипированием региона pol и env с помощью алгоритма REGA/Comet и филогенетического анализа по региону pol и env. Установлено, что совпадение результатов субтипирования, выполненного алгоритмом geno2pheno, для региона env и субтипирования региона pol, выполненного филогенетическим методом, составило 83,5% при использовании алгоритма REGA/Comet — 84,7%. Уровень совпадения субтипирования по региону env, выполненного алгоритмом geno2pheno и филогенетическим анализом, составил 90,6%, а алгоритмом Comet — 91,8%. Основным недостатком определения субтипа ВИЧ по env с использованием алгоритма geno2pheno является низкая чувствительность метода для выявления рекомбинантных форм ВИЧ. Авторы указывают, что точность определения субтипа повышается с увеличением протяженности анализируемого фрагмента генома. В то же время преимуществом данного метода можно считать возможность одновременного определения тропизма и субтипа вируса по одному региону [30].

К недостаткам генотипических методов можно отнести более низкий порог чувствительности обнаружения субпопуляции Х4-тропных вариантов ВИЧ (FPR — 15–20%), отсутствие стандартизированной методики [1–4].

Необходимо отметить, что как фенотипические, так и генотипические методы определения тропизма являются популяционными исследованиями. Такие исследования уступают по точности клональным анализам, основанным на изучении тропизма каждого вирусного квазивида [4].

Наиболее современный метод определения тропизма ВИЧ — ультраглубокое секвенирование V3-петли — основан на клональном анализе. Этот метод имеет наиболее высокую чувствительность в отношении выявления минорных популяций CXCR4-тропных вариантов ВИЧ, а также их количественной оценки. Данный метод прогнозирования вирусологического ответа на маравироко-содержащие схемы АРВТ соответствует или превышает прогностическую ценность оригинального анализа Trofile по целому ряду параметров [31, 32].

Преимуществом глубокого секвенирования по сравнению со стандартным популяционным секвенированием является то, что последнее не может надежно выявить вирусную популяцию, присутствующую в образце менее чем в 20%, тогда как глубокое секвенирование надежно выявляет минорные субпопуляции вплоть до 1% представ-

ленности. Таким образом, как и E57A, глубокое секвенирование может определять тропизм вируса с большей точностью, обнаруживая минорные не-R5-тропные варианты [33, 34].

Ультраглубокое секвенирование на GS FLX и GS Junior instruments от Roche/454 (Branford, CT) использует клональную амплификацию и секвенирование тысяч индивидуальных вариантов для каждого образца. При проведении большого ретроспективного анализа для оптимизации терапии маравироком в Viremic Antiretroviral Treatment-Experienced Patients (MOTIVATE) данным методом среди получавших маравирик было определено в два раза больше пациентов с не-R5-тропным

ния молекулярных идентификаторов (MIDs), что позволит объединять и одновременно секвенировать несколько образцов [31, 32].

Результаты определения тропизма ВИЧ в образцах материала ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в Гродненской области Республики Беларусь, были получены для 98 пациентов. Матрица для секвенирования у 40 (40,8%) пациентов с недетектируемым уровнем ВН ВИЧ была ДНК провируса, у 58 (59,2%) с детектируемым уровнем — РНК ВИЧ.

Распределение образцов плазмы крови 98 ВИЧ-инфицированных пациентов по показателю FPR представлено в таблице 1.

Таблица 1

Распределение пациентов по показателю FPR при определении тропизма ВИЧ

FPR	Кол-во пациентов (n=98)	%
0,0–2,0 (не-R5-тропный)	3	3,06
2,0–10,0 (не-R5-тропный)	14	14,29
10,0–20,0 (не-R5-тропный)	18	18,37
20,0–40,0 (R5-тропный)	25	25,51
40,0–60,0 (R5-тропный)	18	18,37
60,0–100,0 (R5-тропный)	20	20,40

вирусом, чем оригинальным Trofile-анализом. Технически чувствительность данной тест-системы может быть 0,5% или ниже, что достигается путем клональной амплификации. Однако необходимо учитывать, что в реальности чувствительность ультраглубокого секвенирования зависит от вирусной нагрузки в исследуемых образцах. В рутинной клинической практике у пациентов, имеющих низкую вирусную нагрузку, чувствительность при определении минорных X4-тропных вирусных

Как видно из таблицы 1, у 35,7% пациентов установлен не-R5-тропный вирус, представленный популяцией X4-тропного варианта и X4/R5 вируса с двойным тропизмом. В то время как у 64,3% подтверждена инфекция R5-тропным вирусом, что позволяет рассматривать таких пациентов как потенциальных кандидатов на терапию антагонистами CCR5.

Распределение пациентов по стадиям ВИЧ-инфекции (ВОЗ, 2012) в зависимости от тропизма ВИЧ представлено в таблице 2.

Таблица 2

Распределение пациентов по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ

Клинические стадии ВИЧ	R5-Тр ВИЧ (n=63; абс./%)	Не-R5-Тр ВИЧ (n=35; абс./%)	p*
1-я стадия	31/49,2	18/56,7	>0,05
2-я стадия	8/12,7	4/13,3	>0,05
3-я стадия	19/30,2	8/20,0	>0,05
4-я стадия	5/7,9	5/10,0	>0,05

* — тест χ^2 .

популяций может быть не так велика по сравнению с другими генотипическими и фенотипическими методами. При этом методики ультраглубокого секвенирования остаются дорогостоящими. В перспективе значительное снижение стоимости исследования может быть достигнуто путем использова-

Как видно из таблицы 2, наблюдаются статистически значимые различия в частоте распределения пациентов по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции, что подчеркивает отсутствие корреляции между тропизмом ВИЧ и клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции [29].

Субтип ВИЧ был определен у 94 пациентов в группе. У 91 (96,8%) пациента был установлен субтип А, у 3 — субтип В.

Примеры определения тропизма и субтипа ВИЧ у двух пациентов из группы наблюдения представлены в таблице 3.

антиретровирусной терапии приводит к необходимости внедрения препаратов из новых групп, таких как антагонисты CCR5, и тестов по определению тропизма ВИЧ. В настоящее время к наиболее приемлемым в клинической практике относятся генотипические методы определения тропизма ВИЧ,

Таблица 3

Тропизм и субтипы ВИЧ по результатам секвенирования региона петли V3 гена env ВИЧ

Матрица	FPR	Тропизм	Аминокислотная последовательность V3 env	Субтип ВИЧ
ДНК	1,5	CXCR4	TGTRTCAGRCCTKACARMAAAAAMTATAASAACAAGTATACGTATAGGACCAGGAMAAMCCTTCTATGCAACAGGTGATGTAATAGGGGACCCAA GGAAAGCAYATTGT	А
ДНК	30,1	CCR5	TGTGCAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGTATACATATAGGACCG GGGAGAGCAATGTATGCMACAGGAGACATAATAGGAGATATAAGAC AAGCACATTGT	В

Таким образом, у подавляющего большинства пациентов с определенным тропизмом вируса установлен субтип А, по результатам секвенирования региона env, что обосновывает использование показателя FPR равного 20% при определении тропизма с использованием алгоритма geno2pheno у пациентов, проживающих в Гродненском регионе Беларуси.

Заключение. Длительное использование в клинической практике пожизненной комбинированной

основанные на секвенировании петли V3 gp120, которые являются информативными и доступными. Одним из преимуществ генотипического метода можно считать возможность одновременного определения тропизма и субтипа вируса по региону поверхностного гена ВИЧ. Накопление результатов прогнозирования тропизма вируса при не-В-субтипе ВИЧ позволит с течением времени повысить точность метода для пациентов, инфицированных разными субтипами ВИЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Poveda E., Paredes R., Moreno S., Alcamí J., Córdoba J., Delgado R., Gutiérrez F., Llibre J.M., García Deltoro M., Hernández-Quero J., Pulido F., Iribarren J.A., García F. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists // *AIDS Reviews*. — 2012. — Vol. 14, № 3. — P. 208–217.
2. Sierra Saleta, Dybowski J. Nikolai, Pironti Alejandro, Heider Dominik, Güney Lisa, Thielen Alex, Reuter Stefan, Esser Stefan, Fätkenheuer Gerd, Lengauer Thomas, Hoffmann Daniel, Pfister Herbert, Jensen Björn, Kaiser Rolf. Parameters Influencing Baseline HIV-1 Genotypic Tropism Testing Related to Clinical Outcome in Patients on Maraviroc // *PLOS ONE*. — 2015. — doi:10.1371/journal.pone.0125502.
3. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*. — URL: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>.
4. *System and method for detection of HIV tropism variants* / Birgitte Binderup Simen, Orange, CT (US); Elizabeth Patricia St. John, Guilford, CT (US) / Patent US 8344123 B2. Date of Patent: Jan. 1, 2013.
5. Cann A.J., Churcher M.J., Boyd M., O'Brien W., Zhao J.-Q., Zack J., Chen I.S.Y. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism // *Journal of Virology*. — 1992. — Vol. 66, № 1. — P. 305–309.
6. Nobuaki Shimizu, Yuji Haraguchia, Yasuhiro Takeuchia, Yasushi Soda, Katsuaki Kanbe, Hiroo Hoshino. Changes in and Discrepancies between Cell Tropisms and Coreceptor Uses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Induced by Single Point Mutations at the V3 Tip of the Env Protein // *Virology*. — 1999. — Vol. 259, № 2. — P. 324–333.
7. Jones R., Nelson M. The role of receptors in the HIV-1 entry process // *European Journal of Medical Research*. — 2007. — № 12. — P. 391–396.
8. Mosier D.E. Changes in HIV-1 tropism: clinical and prognostic consequences // *European Journal of Medical Research*. — 2007. — № 12. — P. 371–374.
9. Coakley Eoin, Reeves Jacqueline D., Huang Wei, Mangas-Ruiz Marga, Maurer Irma, Harskamp Agnes M., Gupta Soumi, Lie Yolanda, Petropoulos Christos J., Schuitemaker Hanneke, van 't Wout Ange'lique B. Comparison of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tropism Profiles in Clinical Samples by the Trofile and MT-2 Assays // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. — 2009. — Vol. 53, № 11. — P. 4686–4693.
10. Braun P., Wiesman F. Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism in HIV-1 infected individuals // *European Journal of Medical Research*. — 2007. — № 12. — P. 463–472.

11. *Foeglein Á., Walter H.* Determination of HIV-1 coreceptor tropism in clinical practice // *European Journal of Medical Research.*— 2007.— № 12.— P. 473–482.
12. *Huang W., Wojcik L., Toma J., Fransen S., Parkin N.L., Whitcomb J., Strizki J., Petropoulos C.* Mutations in the coreceptor binding region of the HIV-1 envelope confer resistance to the CCR5 inhibitor SCH-C (SCH 351125) // *Antiviral Therapy.*— 2007.— № 12.— P. 134.
13. *Roulet V., Rochas S., Labernadiere J., Mammano F., Faudon J., Lebel-Binay S., Skrabal K.* Sensivity of the HIV-1 PHENOSCRIP® ENV assay for the detection of HIV X4 minority species, and determination of tropism of subtype non-B viruses // 2nd International Workshop on Targeting HIV Entry.— Boston.— 2006 [Abstract 23].
14. *de Mendoza C., Van Baelen K., Poveda E., Rondelez E., Zahonero N. et al.* Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*— 2008.— № 48.— P. 241–244.
15. *Whitcomb J.M., Huang W., Fransen S., Limoli K., Toma J. et al.* Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism // *Antimicrob. Agents. Chemother.*— 2007.— № 51.— P. 566–575.
16. *Trouplin V., Salvatori F., Cappello F., Oby V., Brelot A. et al.* Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay // *J. Virol.*— 2001.— № 75.— P. 251–259.
17. *Sánchez Victoria, Masiá Mar, Robledano Catalina, Padilla Sergio, Ramos José Manuel, Gutiérrez Félix.* Performance of Genotypic Algorithms for Predicting HIV-1 Tropism Measured against the Enhanced-Sensitivity Trofile // *Journal of Clinical Microbiology.*— 2010.— Vol. 48, № 11.— P. 4135–4139.
18. *Кравченко А.В.* Применение препарата маравирик — первого антагониста рецепторов CCR5 — в схемах терапии ВИЧ-инфекции // *Терапевтический архив.*— 2013.— № 11.— С. 125–129.
19. *Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В.* Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.*— 2012.— № 6 (Приложение).
20. *McGovern R.A., Thielen A., Mo T., Dong W., Woods C.K., Chapman D., Harrigan P.R.* Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies // *AIDS.*— 2010.— Vol. 24, № 16.— P. 2517–2525.
21. *Week 96 update on the Berlin maraviroc cohort Obermeier M., Carganico A., Cordes C.* // 10th European Meeting on HIV & Hepatitis Treatment Strategies and Antiviral Drug Resistance.— Barcelona, Spain, 2012 [Abstract 24].
22. *Bellecave P., Paredes R. & Anta L.* Determination of HIV-1 tropism from proviral HIV-1 DNA in patients with suppressed plasma HIV-1 RNA using population based-and deep-sequencing: impact of X4-HIV variants on virologic responses to maraviroc // In International Workshop on HIV and hepatitis virus drug resistance and curative strategies.— Sitges, Spain, 2012 [Abstract A53a].
23. *Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Поляков А.Н., Букин Е.К., Kaiser R., Luebke N., Куевда Д.А., Шипулин Г.А.* Первый опыт применения стандартизированной генотипической методики определения тропизма ВИЧ // *Клиническая лабораторная диагностика.*— 2013.— № 6.— С. 46–48.
24. *Vandekerckhove L.P., Wensing A.M., Kaiser R., Brun-Vézinet F., Clotet B., De Luca A., Dressler S., Garcia F., Geretti A.M., Klimkait T., Korn K., Masquelier B., Perno C.F., Schapiro J.M., Soriano V., Sönnernborg A., Vandamme A.M., Verhofstede C., Walter H., Zazzi M., Boucher C.A.* European Consensus Group on clinical management of tropism testing. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing // *Lancet Infect. Dis.*— 2011.— Vol. 11, № 5.— P. 394–407.
25. *Poveda Eva, Alcamí José, Paredes Roger, Córdoba Juan, Gutiérrez Félix, Llibre Josep Maria, Delgado Rafael, Pulido Federico, Iribarren José Antonio, Deltoro Miguel García, Quero José Hernández, Moreno Santiago, García Federico.* Genotypic determination of HIV tropism — Clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists // *AIDS Rev.*— 2010.— Vol. 12, № 3.— P. 135–148.
26. *Brown Jennifer, Burger Harold, Weiser Barbara, Pollard Richard B., Li Xiao-Dong, Clancy Lynell J., Baumann Russell E., Rogers Amy A., Hamdan Hasnah B., Pesano Rick L., Kagan Ron M.* A genotypic HIV-1 proviral DNA coreceptor tropism assay: characterization in viremic subjects // *AIDS Research and Therapy.*— 2014.— № 11.— P. 14.— doi: 10.1186/1742-6405-11-14.
27. *Swenson Luke C., Dong Winnie W.Y., Mo Theresa, Demarest James, Chapman Doug, Ellery Suzanne, Heera Jayvant, Valdez Hernan, Poon Art F.Y., Harrigan P. Richard.* Use of Cellular HIV DNA to Predict Virologic Response to Maraviroc: Performance of Population-Based and Deep Sequencing // *Clinical Infectious Diseases.*— 2013.— Vol. 56, № 11.— P. 1659–1666.
28. *Santoro M.M., Armenia D., Fabeni L., Santoro M., Gori C., Forbici F., Svicher V., Bertoli A., Dori L., Surdo M., Balestra E., Palamara G., Girardi E., Angarano G., Andreoni M., Narciso P., Antinori A., Ceccherini-Silberstein F., Perno C.F.* The lowest X4 Geno2Pheno false-positive rate is associated with greater CD4 depletion in HIV-1 infected patients // *Clin. Microbiol. Infect.*— 2012.— № 18.— P. E289–E298.— doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03905.x.
29. *Матиевская Н.В., Киреев Д.Е., Дмитриюкова М.Ю., Токунова И.О., Кондратович И.А.* Клинико-иммунологические и эпидемиологические особенности ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ-1 // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.*— 2015.— Т. 7, № 1.— С. 52–59.
30. *Дмитрюкова М.Ю., Киреев Д.Е., Лопатухин А.Э., Лаповок И.А., Шипулин Г.А.* Точность определения субтипа ВИЧ-1 на основании анализа нуклеотидных последовательностей V3 петли гена gp 120 // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.*— 2015.— Т. 7, № 1.— С. 40–44.

31. Swenson Luke C., Mo Theresa, Dong Winnie W.Y., Zhong Xiaoyin, Woods Conan K., Thielen Alexander, Jensen Mark A., Knapp David J.H.F., Chapman Douglass, Portsmouth Simon, Lewis Marilyn, James Ian, Heera Jayvant, Valdez Hernan, Harrigan P. Richard. Deep V3 Sequencing for HIV Type 1 Tropism in Treatment-Naive Patients: A Reanalysis of the MERIT Trial of Maraviroc // *Clin. Infect. Dis.*— 2011.— Vol. 53, № 7.— P. 732–742.
32. Kagan Ron M., Johnson Erik P., Siaw Martin, Biswas Pinaki, Chapman Douglass S., Su Zhaohui, Platt Jamie L., Pesano Rick L. A Genotypic Test for HIV-1 Tropism Combining Sanger Sequencing with Ultradeep Sequencing Predicts Virologic Response in Treatment-Experienced Patients // *PLoS One.*— 2012.— Vol. 7, № 9.— P. e46334.
33. Pollakis G., Kang S., Kliphuis A., Chalaby M.J., Goudsmit J., Paxton W.A. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization // *J. Biol. Chem.*— 2001.— № 276.— P. 13 433–13 441.
34. Bonjoch Anna, Pou Christian, Pérez-Álvarez Núria, Bellido Rocío, Casadellà Maria, Puig Jordi, Noguera-Julian Marc, Clotet Bonaventura, Negredo Eugènia, Paredes Roger. Switching the third drug of antiretroviral therapy to maraviroc in aviraemic subjects: a pilot, prospective, randomized clinical trial // *J. Antimicrob. Chemother.*— 2013.— doi:10.1093/jac/d.

References

1. Poveda E., Paredes R., Moreno S., Alcamí J., Córdoba J., Delgado R., Gutiérrez F., Llibre J.M., García Deltoro M., Hernández-Quero J., Pulido F., Iribarren J.A., García F. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists, *AIDS Reviews*, 2012, vol. 14, No. 3, pp. 208–217.
2. Sierra Saleta, Dybowski J. Nikolai, Pironti Alejandro, Heider Dominik, Güney Lisa, Thielen Alex, Reuter Stefan, Esser Stefan, Fätkenheuer Gerd, Lengauer Thomas, Hoffmann Daniel, Pfister Herbert, Jensen Björn, Kaiser Rolf. Parameters Influencing Baseline HIV-1 Genotypic Tropism Testing Related to Clinical Outcome in Patients on Maraviroc, *PLoS ONE*, 2015, doi:10.1371/journal.pone.0125502.
3. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents, available at: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>.
4. Birgitte Binderup Simen, Orange, CT (US), Elizabeth Patricia St. John, Guilford, CT (US), *System and method for detection of HIV tropism variants*, Patent US 8344123 B2, Date of Patent: Jan. 1, 2013.
5. Cann A.J., Churcher M.J., Boyd M., O'Brien W., Zhao J.-Q., Zack J., Chen I.S.Y. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism, *Journal of Virology*, 1992, vol. 66, No. 1, pp. 305–309.
6. Nobuaki Shimizu, Yuji Haraguchia, Yasuhiro Takeuchia, Yasushi Soda, Katsuki Kanbe, Hiroo Hoshino. Changes in and Discrepancies between Cell Tropisms and Coreceptor Uses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Induced by Single Point Mutations at the V3 Tip of the Env Protein, *Virology*, 1999, vol. 259, No. 2, pp. 324–333.
7. Jones R., Nelson M. The role of receptors in the HIV-1 entry process, *European Journal of Medical Research*, 2007, No. 12, pp. 391–396.
8. Mosier D.E. Changes in HIV-1 tropism: clinical and prognostic consequences, *European Journal of Medical Research*, 2007, No. 12, pp. 371–374.
9. Coakley Eoin, Reeves Jacqueline D., Huang Wei, Mangas-Ruiz Marga, Maurer Irma, Harskamp Agnes M., Gupta Soumi, Lie Yolanda, Petropoulos Christos J., Schuitemaker Hanneke, van 't Wout Angélique B. Comparison of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tropism Profiles in Clinical Samples by the Trofile and MT-2 Assays, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, vol. 53, No. 11, pp. 4686–4693.
10. Braun P., Wiesman F. Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism in HIV-1 infected individuals, *European Journal of Medical Research*, 2007, No. 12, pp. 463–472.
11. Foeglein Á., Walter H. Determination of HIV-1 coreceptor tropism in clinical practice, *European Journal of Medical Research*, 2007, No. 12, pp. 473–482.
12. Huang W., Wojcik L., Toma J., Fransen S., Parkin N.L., Whitcomb J., Strizki J., Petropoulos C. Mutations in the coreceptor binding region of the HIV-1 envelope confer resistance to the CCR5 inhibitor SCH-C (SCH 351125), *Antiviral Therapy*, 2007, No. 12, pp. 134.
13. Roulet V., Rochas S., Labernadiere J., Mammano F., Faudon J., Lebel-Binay S., Skrabal K. Sensivity of the HIV-1 PHENOSCRIPT® ENV assay for the detection of HIV X4 minority species, and determination of tropism of subtype non-B viruses, *2nd Internatioal Workshop on Targeting HIV Entry*, Boston, 2006, Abstract 23.
14. de Mendoza C., Van Baelen K., Poveda E., Rondelez E., Zahonero N. et al. Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2008, No. 48, pp. 241–244.
15. Whitcomb J.M., Huang W., Fransen S., Limoli K., Toma J. et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2007, No. 51, pp. 566–575.
16. Trouplin V., Salvatori F., Cappello F., Obry V., Brelot A. et al. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay, *J. Virol.*, 2001, No. 75, pp. 251–259.
17. Sánchez Victoria, Masiá Mar, Robledano Catalina, Padilla Sergio, Ramos José Manuel, Gutiérrez Félix. Performance of Genotypic Algorithms for Predicting HIV-1 Tropism Measured against the Enhanced-Sensitivity Trofile, *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, vol. 48, No. 11, pp. 4135–4139.
18. Kravchenko A.V., *Terapevticheskiy arkhiv*, 2013, No. 11, pp. 125–129.

19. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., *Epidemiologiya i infektionnihe bolezni. Aktualjnihe voprosih*, 2012, No. 6, Application.
20. McGovern R.A., Thielen A., Mo T., Dong W., Woods C.K., Chapman D., Harrigan P.R. Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies, *AIDS*, 2010, vol. 24, No. 16, pp. 2517–2525.
21. Week 96 update on the Berlin maraviroc cohort Obermeier M., Carganico A., Cordes C., *10th European Meeting on HIV & Hepatitis Treatment Strategies and Antiviral Drug Resistance*, Barcelona, Spain, 2012, Abstract 24.
22. Bellecave P., Paredes R. & Anta L. Determination of HIV-1 tropism from proviral HIV-1 DNA in patients with suppressed plasma HIV-1 RNA using population based-and deep-sequencing: impact of X4-HIV variants on virologic responses to maraviroc, *In International Workshop on HIV and hepatitis virus drug resistance and curative strategies*, Sitges, Spain, 2012, Abstract A53a.
23. Lopatukhin A.Eh., Kireev D.E., Polyakov A.N., Bukin E.K., Kaiser R., Luebke N., Kuevda D.A., Shipulin G.A., *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2013, No. 6, pp. 46–48.
24. Vandekerckhove L.P., Wensing A.M., Kaiser R., Brun-Vézinet F., Clotet B., De Luca A., Dressler S., Garcia F., Geretti A.M., Klimkait T., Korn K., Masquelier B., Perno C.F., Schapiro J.M., Soriano V., Sönnernborg A., Vandamme A.M., Verhoefstede C., Walter H., Zazzi M., Boucher C.A. European Consensus Group on clinical management of tropism testing. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing, *Lancet Infect. Dis.*, 2011, vol. 11, No. 5, pp. 394–407.
25. Poveda Eva, Alcamí José, Paredes Roger, Córdoba Juan, Gutiérrez Félix, Llibre Josep María, Delgado Rafael, Pulido Federico, Iribarren José Antonio, Deltoro Miguel García, Quero José Hernández, Moreno Santiago, García Federico. Genotypic determination of HIV tropism — Clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists, *AIDS Rev.*, 2010, vol. 12, No. 3, pp. 135–148.
26. Brown Jennifer, Burger Harold, Weiser Barbara, Pollard Richard B., Li Xiao-Dong, Clancy Lynell J., Baumann Russell E., Rogers Amy A., Hamdan Hasnah B., Pesano Rick L., Kagan Ron M. A genotypic HIV-1 proviral DNA coreceptor tropism assay: characterization in viremic subjects, *AIDS Research and Therapy*, 2014, No. 11, pp. 14, doi: 10.1186/1742-6405-11-14.
27. Swenson Luke C., Dong Winnie W.Y., Mo Theresa, Demarest James, Chapman Doug, Ellery Suzanne, Heera Jayvant, Valdez Hernan, Poon Art F.Y., Harrigan P. Richard. Use of Cellular HIV DNA to Predict Virologic Response to Maraviroc: Performance of Population-Based and Deep Sequencing, *Clinical Infectious Diseases*, 2013, vol. 56, No. 11, pp. 1659–1666.
28. Santoro M.M., Armenia D., Fabeni L., Santoro M., Gori C., Forbici F., Svicher V., Bertoli A., Dori L., Surdo M., Balestra E., Palamara G., Girardi E., Angarano G., Andreoni M., Narciso P., Antinori A., Ceccherini-Silberstein F., Perno C.F. The lowest X4 Geno2Pheno false-positive rate is associated with greater CD4 depletion in HIV-1 infected patients, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, No. 18, pp. E289–E298, doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03905.x.
29. Matievskaya N.V., Kireev D.E., Dmitryukova M.Yu., Tokunova I.O., Kondratovich I.A., *VICH-infekciya i immunosupressii*, 2015, vol. 7, No. 1, pp. 52–59.
30. Dmitryukova M.Yu., Kireev D.E., Lopatukhin A.Eh., Lapovok I.A., Shipulin G.A., *VICH-infekciya i immunosupressii*, 2015, vol. 7, No. 1, pp. 40–44.
31. Swenson Luke C., Mo Theresa, Dong Winnie W.Y., Zhong Xiaoyin, Woods Conan K., Thielen Alexander, Jensen Mark A., Knapp David J.H.F., Chapman Douglass, Portsmouth Simon, Lewis Marilyn, James Ian, Heera Jayvant, Valdez Herman, Harrigan P. Richard. Deep V3 Sequencing for HIV Type 1 Tropism in Treatment-Naive Patients: A Reanalysis of the MERIT Trial of Maraviroc, *Clin. Infect. Dis.*, 2011, vol. 53, No. 7, pp. 732–742.
32. Kagan Ron M., Johnson Erik P., Siaw Martin, Biswas Pinaki, Chapman Douglass S., Su Zhaohui, Platt Jamie L., Pesano Rick L. A Genotypic Test for HIV-1 Tropism Combining Sanger Sequencing with Ultradeep Sequencing Predicts Virologic Response in Treatment-Experienced Patients, *PLoS One*, 2012, vol. 7, No. 9, pp. e46334.
33. Pollakis G., Kang S., Kliphuis A., Chalaby M.I., Goudsmit J., Paxton W.A. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization, *J. Biol. Chem.*, 2001, No. 276, pp. 13 433–13 441.
34. Bonjoch Anna, Pou Christian, Pérez-Álvarez Nùria, Bellido Rocío, Casadellà Maria, Puig Jordi, Noguera-Julian Marc, Clotet Bonaventura, Negro Eugènia, Paredes Roger. Switching the third drug of antiretroviral therapy to maraviroc in aviraemic subjects: a pilot, prospective, randomized clinical trial, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2013, doi:10.1093/jac/d.

Статья поступила 18.06.2016 г.

Контактная информация: Матиевская Наталья Васильевна, e-mail: natamati@mail.ru

Коллектив авторов:

Матиевская Наталья Васильевна — д.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней Гродненского государственного медицинского университета, 230009, Гродно, ул. Горького, 80, +375 (152) 435301, e-mail: natamati@mail.ru;

Киреев Дмитрий Евгеньевич — к.б.н., н.с. Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, За, +7 (495) 974-96-46, доб. 2227, e-mail: dmitry.kireev@rscg.ru;

Токунова Ирина Олеговна — ассистент кафедры инфекционных болезней Гродненского государственного медицинского университета, 230009, Гродно, ул. Горького, 80, +375 (152) 435301, e-mail: tokunova.ira@gmail.com.