

УДК 616-036.22;616.9.

<http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-1-123-133>

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК ВИЧ-1, ПРОИЗВОДИМЫХ В РОССИИ

© И. А. Лаповок*, А. Э. Лопатухин, А. А. Кириченко, А. В. Мурзакова, Д. Е. Киреев

ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Роспотребнадзор, Москва, Россия

Цель: провести сравнительный анализ следующих наборов реагентов для определения концентрации РНК ВИЧ-1 российского производства: АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT, АмплиСенс ВИЧ-монитор-Duo-FL, РеалБест РНК ВИЧ количественный, ВИЧ-ГЕН количественный. **Материалы и методы.** Исследована коллекция клинических образцов плазмы крови с концентрацией РНК ВИЧ-1 в диапазоне от 590 до $2,05 \times 10^6$ копий/мл, последовательные разведения 2-го международного стандарта ВИЧ-1, а также панели субтипов и рекомбинантных форм группы М ВИЧ-1. Сходимость результатов сравнения тест-систем была определена с применением анализа корреляции Спирмана и метода Блэнда–Альтмана. **Результаты.** Для всех сравниваемых наборов реагентов был получен высокий уровень сходимости результатов измерения вирусной нагрузки (ВН) ВИЧ-1 клинических образцов ($n=76$) с величиной достоверности аппроксимации R не менее 0,85. Максимальная разница между медианными значениями результатов ВН ($0,48 \text{ lg}$, ≈3 раза) была получена для ВИЧ-Монитор-FRT и РеалБест количественный, что не превышало допустимого уровня при сравнении двух систем. Все разведения 2-го международного стандарта ВИЧ-1 были успешно определены всеми наборами реагентов со средней погрешностью от 0,16 до $0,34 \text{ lg}$ копий/мл. Все наборы выявляли большинство исследованных субтипов и рекомбинантов ВИЧ-1 со средним отклонением $0,02\text{--}0,56 \text{ lg}$ копий/мл. Самая высокая точность была получена для набора ВИЧ-ГЕН количественный, который, однако, не выявил образец ADG-рекомбинанта.

Ключевые слова: ВИЧ-1, вирусная нагрузка, субтип, рекомбинант, сходимость, погрешность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Кириченко А.А., Мурзакова А.В., Киреев Д.Е. Сравнительный анализ диагностических наборов для количественного определения РНК ВИЧ-1, производимых в России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2020. Т. 12, № 1. С. 123–133, DOI: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-1-123-133>.

Контакт: Лаповок Илья Андреевич, i_lapovok@mail.ru

COMPARATIVE ANALYSIS OF DIAGNOSTIC KITS FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HIV-1 RNA PRODUCED IN RUSSIA

©I. A. Lapovok*, A. E. Lopatukhin, A. A. Kirichenko, A. V. Murzakova, D. E. Kireev

Central Research Institute of Epidemiology Federal service for supervision in the field of protection of the rights of consumers and well-being man's, Moscow, Russia

Aim: to carry out the comparative analysis of Russian kits for HIV-1 viral load (VL) measuring: AmpliSens HIV-monitor-FRT, AmpliSens HIV-monitor-Duo-FL, RealBest RNA HIV quantitative, HIV-GEN quantitative. **Materials and methods:** we analyzed the collection of clinical blood plasma samples with VL $590\text{--}2,05 \times 10^6$ copies/ml, dilutions of HIV-1 2nd International Standard, as well as panels of subtypes and recombinant forms of HIV-1 group M. The convergence of the results was determined using the Spearman correlation analysis and the Bland-Altman method. **Results.** A high level of convergence of VL measuring results in clinical samples ($n=76$) was determined for all compared kits with the value of approximation reliability R of at least 0,85. The maximum difference between the median values of VL results ($0,48 \text{ log}$, ≈3-fold) was obtained for HIV-Monitor-FRT and RealBest quantitative, which did not exceed the acceptable discordance rate in two kits comparing. All dilutions of the 2nd international HIV-1 standard were successfully determined by all kits with middle error $0,16\text{--}0,34 \text{ lg}$ copies/ml. All kits successfully revealed the most of HIV-1 subtypes and recombinants studied with middle deviation $0,02\text{--}0,56 \text{ log}$ copies/ml. HIV-GEN quantitative demonstrated the highest accuracy, but didn't reveal ADG-recombinant.

Key words: HIV-1, viral load, subtype, recombinant, convergence, error

Conflict of interest: the authors stated that there is no potential conflict of interest.

For citation: Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kirichenko A.A., Murzakova A.V., Kireev D.E. Comparative analysis of diagnostic kits for the quantitative determination of HIV-1 RNA produced in Russia // *HIV infection and immunosuppression*. 2020. Vol. 12, No. 1. P. 123–133.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-1-123-133>.

Contact: *Lapovok Ilya Andreevich, i_lapovok@mail.ru*

Введение. Масштабы ВИЧ-инфекции в России продолжают расти. Так, по данным Федерального центра по профилактике и борьбе со СПИД в конце 2018 г. число лиц, живущих с ВИЧ, в России превысило 1 млн человек [1]. При этом наиболее сильно поражена группа социально активных граждан в возрасте от 30 до 44 лет. По данным на конец 2018 г. на антиретровирусной терапии находились 443 тыс. человека, т.е. 42,4% всех зарегистрированных ВИЧ-инфицированных пациентов¹.

Важнейшим показателем эффективности проводимой терапии является уровень вирусной нагрузки (ВН) — концентрации РНК вируса в плазме или сыворотке крови пациента. Так, ВОЗ рекомендует оценивать эффективность проводимой терапии в первую очередь на основе данных о ВН, и лишь во вторую — на основе клинической картины и подсчета числа CD4-клеток [2].

Одна из сложностей определения ВН ВИЧ-1 связана с групповой и субтиповой принадлежностью вируса. Так, если при разработке набора реагентов использовались стандартные образцы группы М определенного субтипа, есть вероятность того, что для вариантов ВИЧ-1 других субтипов и групп будет получен недостоверный результат [3]. Различные генотипы и рекомбинантные формы ВИЧ-1 выявляются разными тест-системами с различной эффективностью [4–6]. Особенно остро эта проблема встает в свете диагностики двойной инфекции ВИЧ-1, когда имеет место одновременное присутствие в организме пациента двух и более вирусных вариантов, а изменение ВН является одним из основных диагностических признаков этого события [7].

Зачастую в географическом регионе доминирует ограниченное количество вирусных вариантов, что вряд ли способно отразиться на работе применяемых тест-систем. Сложнее ситуация обстоит в странах, где отмечается циркуляция множества

вариантов вируса, относящихся как к разным субтипам и рекомбинантным формам, так и к разным группам ВИЧ-1. В этом случае очень важно оптимизировать процесс определения ВН, позволяя это делать не только эффективно, но и дешево. Так, в Камеруне был успешно апробирован прогрессивный и относительно дешевый подход для анализа образцов. На первом этапе использовался серологический тест последнего поколения, позволяющий предсказать группу ВИЧ-1 в образце. На втором этапе образцы группы М подвергались анализу ВН с использованием теста компании Biocentric, образцы групп N, O и Р исследовались с помощью более дорогого теста компании Abbott [8].

В России с середины 90-х годов прошлого века доминирует вирусный вариант IDU-A (или FSU-A), который в последние годы был выделен в отдельный субсубтип A6 [9, 10]. Исследование образцов ВИЧ-1, полученных от российских пациентов с 1987 по 2015 г., установило, что более 80% всех инфекций, выявленных в этот временной период, было обусловлено этим генетическим вариантом. В то же время к 2015 г. было отмечено увеличение доли других генетических вариантов, в том числе вируса субтипа В и рекомбинантной формы CRF63_02A1, являющейся следствием двойной инфекции вирусами ВИЧ-1 A6 и CRF02_AG [11, 12]. В связи с этим вызывают тревогу опубликованные данные о том, что разные тест-системы для оценки ВН дают дискордантные результаты при анализе образцов CRF02_AG [6]. Именно поэтому очень важным становится вопрос об эффективности применяемых в России тестов на ВН, в том числе при анализе различных вариантов ВИЧ-1.

Все тест-системы для количественной оценки ВН определяют концентрацию мишени в десятичных логарифмах (\log_{10} или просто Ig) копий в мл (copies/ml) или международных единиц (МЕ) в мл (IU/ml) с возможностью перевода этих результатов в абсолютные величины. Коэффициент пере-

¹ ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2018 г. (на 31 декабря 2018 г.). Справка. М., 2019.

счета из копий в МЕ составляет 1 МЕ = 0,58 копий или 1 копия = 1,74 МЕ [13, 14].

Говоря о точности любой диагностической системы для количественной оценки какого-либо показателя необходимо помнить о допустимой погрешности измерения. В первую очередь, погрешность измерения включает в себя величину среднеквадратичного отклонения или стандартного отклонения (standard deviation, SD). SD является наиболее наглядным показателем рассеивания полученных значений случайной величины относительно ее математического ожидания [15]. На практике, SD — максимальная погрешность, которую демонстрирует метод измерения в идеальных условиях, т.е. погрешность, на которую невозможно повлиять путем улучшения квалификации персонала лаборатории и условий проводимого исследования. В настоящее время, наиболее высокоточные системы по определению ВН дают погрешность 0,18–0,25 lg копий/мл (или МЕ/мл), т.е. в 1,5–2 раза [13, 16, 17] для большинства образцов, концентрация которых находится в рамках диапазона измерения (т.е. с концентрацией РНК ВИЧ-1, которая может быть достоверно определена набором).

Однако в реальности общая погрешность тест-системы, в том числе величина SD, может быть разной в зависимости от качества исследуемого образца, условий проведения исследования, опыта и аккуратности лабораторного сотрудника, а также — от концентрации в образце выявляемой мишени. Так, величина погрешности ВН максимальна для образцов, концентрация выявляемой мишени в которых близка к нижней границе диапазона измерения [13, 18].

По этой причине указываемые производителем показатель SD или общей погрешности часто превышает реальный, установленный экспериментально в ходе разработки и валидации набора. Так, например, для зарегистрированного в России набора реагентов Abbott RealTime HIV-1 указана величина SD в 0,25 lg, в то время как полученное в ходе экспериментов среднее значение SD составило 0,09 (0,22–0,04) [13]. Кроме того, снижение точности измерения при низких концентрациях мишени зачастую заставляет обозначать нижнюю границу диапазона измерения выше предела детекции (т.е. концентрации РНК ВИЧ-1, при которой образец вообще выявляется как положительный). Например, для тест-системы Abbott RealTime HIV-1 при анализе 1 мл образца предел детекции и нижняя граница линейного диапазона составляют соответ-

ственно 25 и 40 копий/мл. Для отечественной тест-системы «РеалБест РНК ВИЧ количественный» эти показатели определены как 11,6 и 58 копий/мл (20 и 100 МЕ/мл) соответственно.

Вполне логично, что при сравнении двух тест-систем должна учитываться погрешность обоих наборов, т.е. результаты, полученные этими системами, могут различаться на сумму погрешности обоих наборов. Например, если идеальная погрешность обоих наборов составляет 0,25 lg копий/мл, то полученные результаты для образцов с изначально неизвестной ВН могут отличаться на $0,25+0,25$ lg, т.е. на 0,5 lg (в 3,16 раза). Эту величину учитывают, когда проводят анализ сходимости результатов ВН при сравнительной оценке работы двух наборов на этапе испытаний набора реагентов. По этой причине расхождение результатов, полученных двумя диагностическими системами, в 3–3,5 раза считается допустимым.

Однако более значимым показателем при сравнении двух наборов реагентов является оценка корреляции полученных с их помощью результатов. Корреляция отражает насколько сходятся результаты анализа двумя тест-системами и, если имеется искажение результатов, насколько оно систематично. Для оценки этой систематичности важно учитывать статистическое правило нормального распределения полученных значений. В соответствии с ним при сравнении двух систем определяется величина стандартного отклонения (σ) показателя разницы (δ) полученных значений ВН. В идеальном случае в интервал \pm должно укладываться 68,2% всех полученных в исследовании значений δ , в интервал $\pm 2\sigma$ — 95,4% значений (рис. 1). Если распределение образцов близко этому показателю, то можно говорить о нормальном распределении и корреляции полученных обеими системами значений ВН [19]. Минимальная величина σ должна совпадать с суммой SD каждого набора, т.е. 0,5 lg. Однако в реальных условиях, этот показатель может быть выше. Так, при сравнении набора реагентов Aptima HIV-1 Quant Dx assay с системами Abbott RealTime HIV-1, Qiagen Artus® HI Virus-1 QS-RGQ и Roche CAP/CTM HIV-1 Test v2 величина составила 0,49; 0,8 и 0,63 lg соответственно [20]. Еще одним показателем при таком анализе является медиана значений δ , полученных обоими наборами результатов, что отражает общее завышение или занижение результатов одной тест-системы по сравнению с другой.

Наиболее широко используемыми в России наборами для количественной оценки ВН ВИЧ-1 отечественного производства являются АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии,

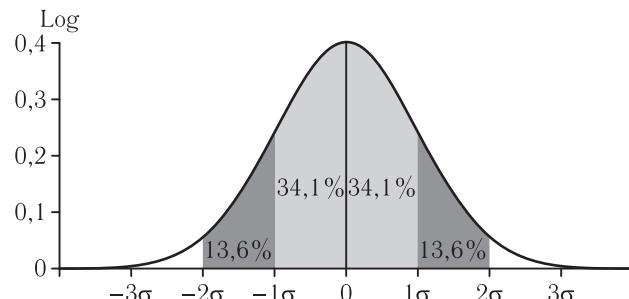


Рис. 1. График плотности вероятности нормального распределения и процент попадания случайной величины в интервалы, равные стандартному отклонению (σ) [19]

Fig. 1. Graph of probability density of a normal distribution and the percentage of a random variable falling into the intervals equal to the standard deviation (σ) [19]

Москва), РеалБест РНК ВИЧ количественный («Вектор-Бест», Новосибирск) и ВИЧ-ГЕН количественный («ДНК-технология», Москва). Данные диагностические наборы зарегистрированы в России в качестве медицинских изделий. На базе ФБУН ЦНИИ эпидемиологии недавно был разработан и зарегистрирован новый набор реагентов для количественного определения ВН АмплиСенс ВИЧ-монитор-Duo-FL, обладающий более высокими показателями чувствительности и специфичности, чем АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT. Цель данной работы — провести сравнительный анализ тест-систем АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT (Монитор-FRT), АмплиСенс ВИЧ-монитор-Duo-FL (Монитор-Дуо), РеалБест РНК ВИЧ количественный (РеалБест), ВИЧ-ГЕН количественный (ВИЧ-ГЕН) и оценить сходимость получаемых с их помощью результатов ВН.

Материалы и методы исследования.

Объем экстракции и использованные формы комплектаций. Экстракция РНК ВИЧ-1 проводилась из 100 мкл плазмы с последующей ОТ-ПЦР «в реальном времени» в соответствии с инструкцией производителя и с учетом поправки на объем экстракции. В данных условиях нижняя граница диапазона измерения для Монитор-FRT и ВИЧ-ГЕН составляла 500 копий/мл, для набора РеалБест — 588 копий/мл, а для Монитор-Дуо — 400 копий/мл.

Набор реагентов Монитор-FRT включал ПЦР-комплект, состоящий из жидких компонентов. Наборы реагентов РеалБест и Монитор-Duo

включали полностью лиофилизированные ПЦР-комплекты. Набор реагентов ВИЧ-ГЕН включал в себя как лиофилизированные, так и жидкие компоненты ПЦР-комплекта, а также жидкие компоненты для проведения предварительного этапа обратной транскрипции перед этапом ПЦР.

В соответствии с инструкциями к наборам реагентов все исследуемые в работе клинические и панельные образцы исследовались однократно в одном повторе тест-системами Монитор-FRT, РеалБест и Монитор-Дуо, и однократно, в двух повторах — набором ВИЧ-ГЕН. Все полученные результаты ВН были переведены и анализированы в дальнейшем в Ig копий/мл с учетом коэффициента пересчета МЕ в копии [13, 14].

Анализ коллекции ВИЧ-позитивных клинических образцов. Была исследована коллекция, содержащая 76 образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих медицинскую помощь в Федеральном научно-методическом Центре по профилактике и борьбе со СПИДом. Образцы цельной крови забирались в пробирки с ЭДТА и подвергались осаждению в течение 20 мин при 800–1600 g при комнатной температуре, после чего проводился отбор плазмы. Все образцы плазмы крови были однократно проанализированы набором реагентов АмплиСенс ВИЧ-монитор-FRT и разбиты на подгруппы в соответствии с полученной величиной ВН. Поскольку экстракцию проводили из 100 мкл плазмы крови, то анализируемая коллекция включала в себя образцы, концентрация РНК ВИЧ-1 в которых лежала в границах диапазона измерения всех исследуемых наборов реагентов, т.е. от 590 до $2,05 \times 10^6$ копий/мл. Каждый образец подвергался однократному размораживанию и разделению на необходимое количество аликвот для исключения возможности снижения концентрации вирусной РНК при повторном замораживании.

Статистическая обработка результатов анализа ВИЧ-позитивных клинических образцов. Результаты, полученные при тестировании клинических образцов, были использованы для построения графиков корреляции количественных результатов (анализ корреляции Спирмана [6]) с помощью пакета программ SPSS Statistics 17, формирования уравнения рассеивания количественных данных и определения величины достоверности аппроксимации R и R^2 . Определение величины σ при попарном сравнении результатов исследуемых тест-систем и оценка распределения полученных

значений delta ВН проводились по методу Блэнда–Альтмана [21, 22]. Для определения значимости различий данных ВН при попарном сравнении тестов был использован критерий Манна–Уитни с уровнем статистической значимости $p=0,05$ [23].

Анализ количественного стандарта ВИЧ-1. Был проанализирован образец 2-го международного стандарта ВИЧ-1 для ВОЗ (NIBSC код 97/650) [2nd International Standard] исходной концентрации 5,56 lg ME/мл (5,32 lg копий/мл) в разведениях в 7, 70 и 700 раз, содержащего концентрацию стандартного образца 4,48, 3,48 и 2,48 lg копий/мл. Последнее разведение стандарта содержало концентрацию РНК ВИЧ-1 ниже границы диапазона измерения, но выше предела детекции всех исследуемых наборов.

Анализ панелей субтипов и рекомбинантов ВИЧ-1. Для оценки специфичности наборов реагентов к различным субтипам и рекомбинантным формам ВИЧ-1 были проанализированы образцы из панели субтипов (NIBSC код 12/224) и из панели рекомбинантных форм (NIBSC код 13/214) ВИЧ-1. Поскольку ВИЧ-1 групп N и O не имеют эпидемиологического значения в России [9–12] анализу подвергались образцы субтипов и рекомбинантных форм наиболее распространенной в России и мире группы M (по данным международной базы данных института Лос-Аламос, <https://www.hiv.lanl.gov>). В качестве данных о ВН в образцах исследуемых панелей были взяты опубликованные данные о средних значениях ВН, полученных различными тест-системами [24, 25].

Результаты и их обсуждение.

Анализ коллекции ВИЧ-позитивных клинических образцов. Коллекция клинических образцов ($n=76$) подразделялась на 5 подгрупп на основании концентрации РНК ВИЧ-1 (в копиях/мл), полученной тест-системой Монитор-FRT: менее 1000 ($n=4$), 1000–9999 ($n=22$), 10 000–99 999 ($n=31$), 100 000–2 050 000 ($n=19$).

Сравнение количественных результатов (величины ВН), полученных всеми тест-системами с расчетом критерия Манна–Уитни с уровнем статистической значимости $p=0,05$, показало, что с вероятностью 95% значения ВН (в lg копий/мл), полученные исследуемыми системами, достоверны (U-критерий=0 при попарном сравнении всех тест-систем).

Результаты оценки корреляции результатов определения ВН, полученных всеми диагностическими наборами, представлены на рис. 2 и 3 и в табл. 1.

Для всех попарных сравнений были получены величины R не менее 0,85, что говорит о высокой сходимости количественных результатов, полученных этими системами. Это подтверждается и величиной для всех попарных сравнений, которая составила 0,36 (0,24–0,46) lg, в то время как суммарная допустимая для двух тест-систем может составлять 0,5 lg [20].

При этом для всех попарных сравнений наборов реагентов выполнялось, как минимум, одно из условий нормального распределения количественных результатов: либо в диапазон $\pm 1\sigma$ укладывалось не менее 68,2% полученных значений, либо в диапазон $\pm 2\sigma$ попадало не менее 95,4% значений. Это указывает на высокую сходимость полученных результатов и прямую корреляцию между наборами при анализе клинических образцов плазмы крови.

На основе анализа корреляции Спирмана наиболее хорошую сходимость результатов продемонстрировали тест-системы Монитор-FRT и Монитор-Duo. Относительно плохую сходимость продемонстрировало сравнение Монитор-Duo и ВИЧ-ГЕН, R^2 и R для которых составили 0,72 и 0,85 соответственно. Это также отражалось в величине σ , которая для этих наборов составила 0,46 lg. Однако в интервал $\pm 1\sigma$ и $\pm 2\sigma$ попали 71,05 и 96,05% всех результатов, что отвечает критериям нормального распределения результатов. Кроме того, при сравнении этих двух наборов был получена самая низкая величина медианы delta — 0,10.

На основании сравнения медианных значений разницы ВН для всех образцов можно сформировать порядок исследованных тест-систем от системы, дающей наиболее высокие результаты ВН, до системы, максимально занижающей их: Монитор-FRT→Монитор-Duo→ВИЧ-ГЕН→РеалБест. При этом разница между медианными значениями результатов ВН между Монитор-FRT и РеалБест достигает 0,48 lg, что не превышает 0,5 lg и допустимо при сравнении двух количественных наборов. Тем не менее вполне ожидаемыми могут быть различия в результатах полученных, например, набором РеалБест и наборами Монитор-FRT, Монитор-Duo и ВИЧ-ГЕН примерно в 3; 1,7 и 1,4 раза соответственно.

Анализ количественного стандарта ВИЧ-1. Результаты анализа разведений 2-го международного стандарта ВИЧ-1 приведены в табл. 2. Самую высокую точность продемонстрировал набор ВИЧ-ГЕН, завышающий значения ВН в среднем на 0,16 lg. Остальные наборы, напротив, продемон-

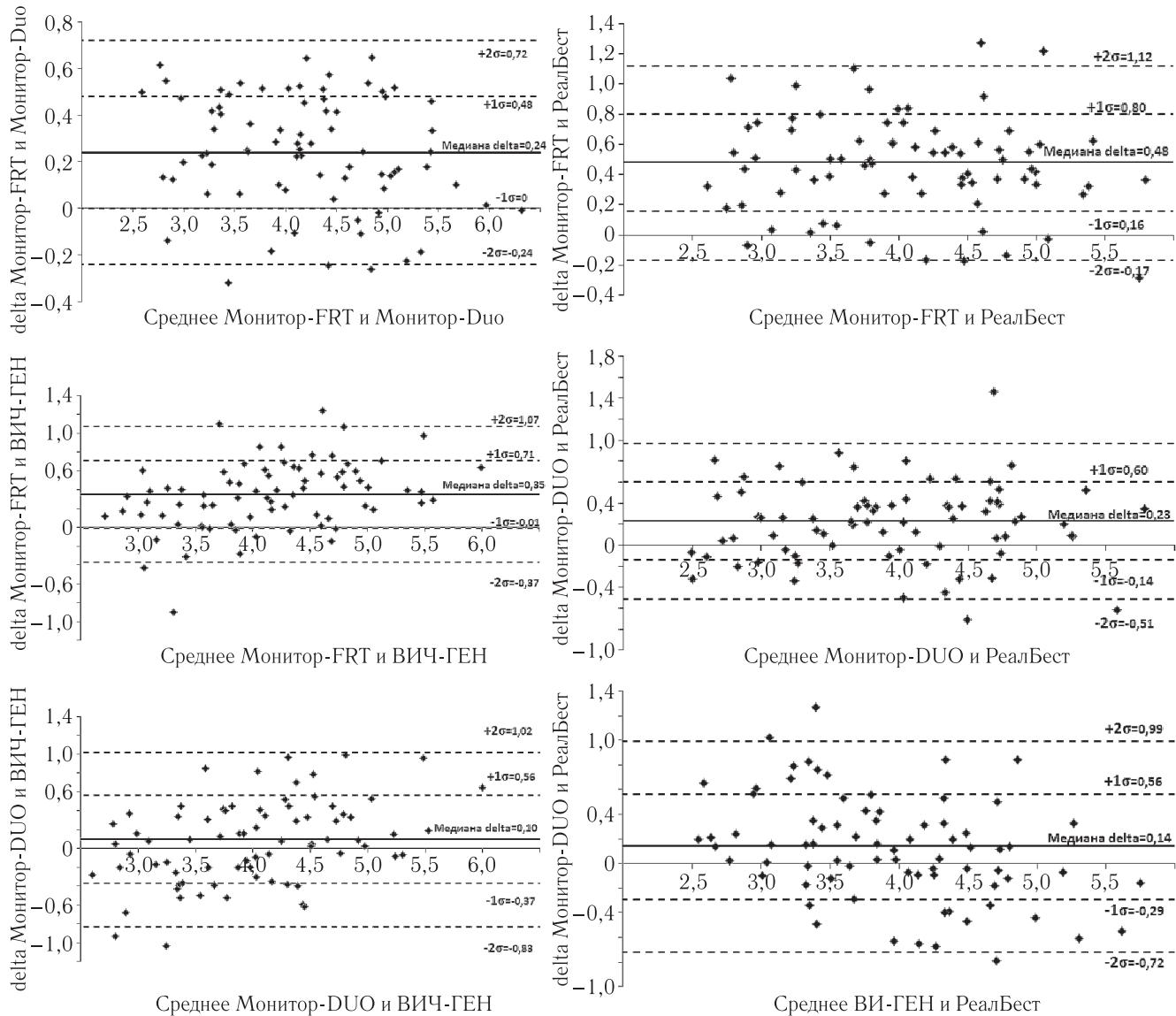


Рис. 2. Графики оценки корреляции по методу Блэнда — Альтмана результатов измерения ВН, полученных исследуемыми наборами реагентов. Медианное значение delta двух наборов и интервалы $\pm 1\sigma$ и $\pm 2\sigma$ приведены на графиках

Fig. 2. Graphs of correlation estimation by the Blend — Altman method of the results of VL measurement obtained by the studied sets of reagents. The median delta of the two sets and the intervals $\pm 1\sigma$ and $\pm 2\sigma$ are shown in the graphs

стрировали среднее занижение значений ВН относительно реальных: Монитор-Duo — на 0,19 lg, Монитор-FRT и РеалБест — на 0,34 lg. Интересно, что все наборы реагентов смогли определить концентрацию РНК ВИЧ-1 в разведении стандарта ≈ 300 (2,48 lg) копий/мл, что ниже границы диапазона измерения каждого из них. При этом отклонения полученных значений от истинных не превышали 0,38 lg. Различия в результатах анализа последовательных разведений стандартного образца ВИЧ-1 вероятнее всего связаны с калибровкой наборов реагентов, в том числе с возможностью проведения одной калибровки и дальнейшим импортом ее для каждой серии каждой формы комплектации наборов реагентов Монитор-Duo и РеалБест. Тем не менее

для всех исследуемых тест-систем среднее отклонение полученных значений от истинных не превышало 0,34 lg. Таким образом, все исследуемые диагностические системы демонстрируют высокую точность работы, в том числе — для образцов с концентрацией РНК ВИЧ-1 ниже границы их диапазона измерения.

Анализ панелей субтипов и рекомбинантов ВИЧ-1. Результаты анализа панелей субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 приведены в табл. 3. Для наборов Монитор-FRT и РеалБест отмечалось систематическое занижение результатов ВН (со средним занижением на 0,49 и 0,56 lg соответственно). При использовании тест-системы Монитор-Duo имело место как занижение (до 0,36 lg), так и завышение (до 0,49 lg) концентрации РНК

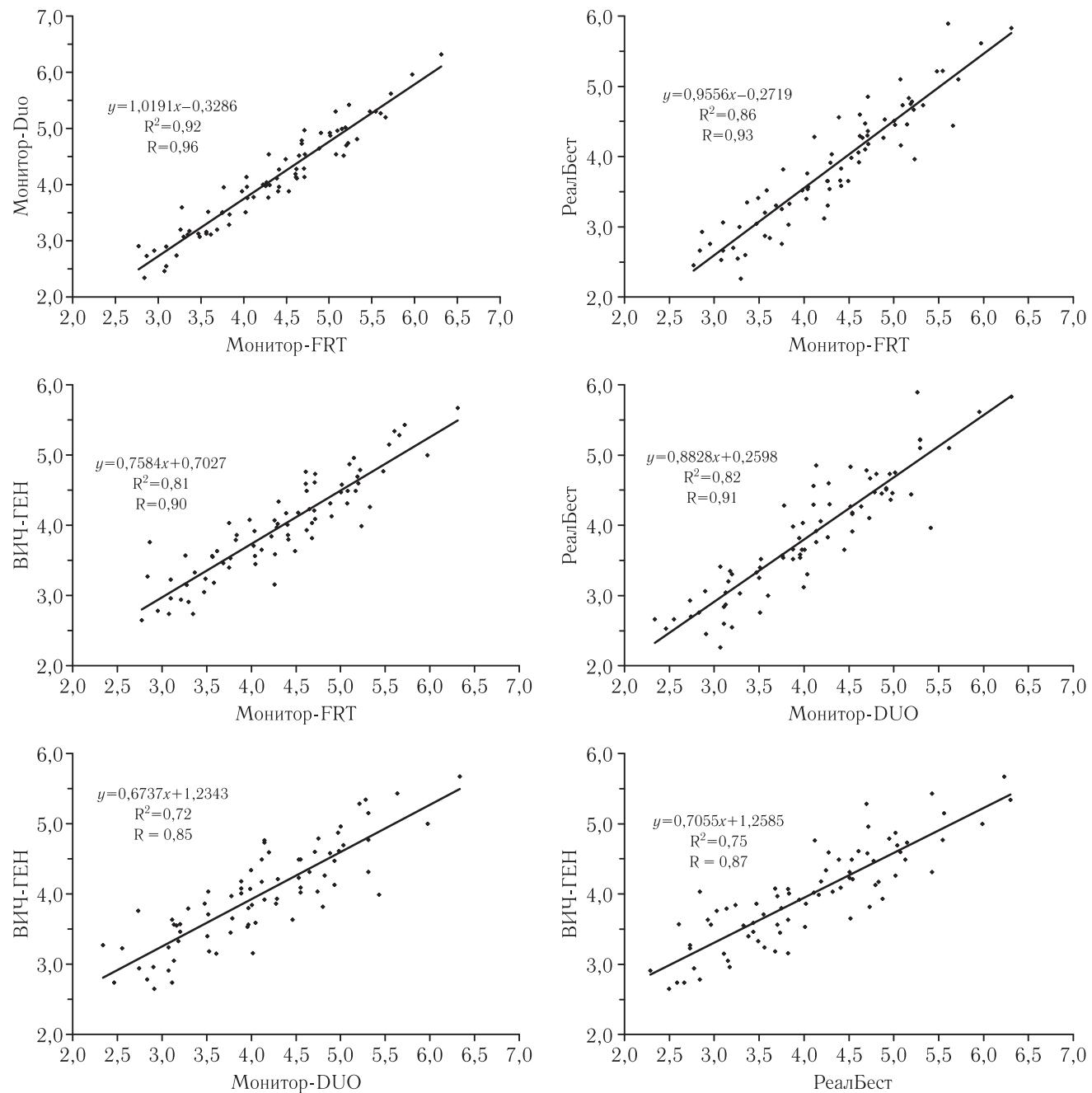


Рис. 3. Графики корреляции Спирмана результатов измерения ВН, полученных исследуемыми наборами реагентов. Уравнение рассеивания количественных данных, величина достоверности аппроксимации (R^2 и R) приведены на графиках

Fig. 3. Spearman correlation graphs of the VL measurement results obtained by the studied sets of reagents. The dispersion equation for quantitative data (R^2 and R) are shown in the graphs

ВИЧ-1 при среднем значении разницы истинной концентрации от полученной в $-0,02 \lg$. Схожий средний результат был получен для системы ВИЧ-ГЕН ($0,03 \lg$). Однако для данного набора был получен отрицательный результат для панельного образца ADG-рекомбинанта (штамм 24203, код NIBSC 11/146). Впрочем, это не противоречит заявленным характеристикам данного теста, в инструкции к которому нет прямых указаний на то, что он выявляет рекомбинантные формы вируса.

При этом ВИЧ-ГЕН завысил результат для образца субтипа В. К данному генетическому варианту относится вирус 2-го международного стандарта ВИЧ-1, для которого в этой тест-системе также был получен немного завышенный результат. С другой стороны, наборы Монитор-FRT и РеалБест показали заниженный результат для субтипа В и в панели субтипов, и в составе 2-го международного стандарта. Это свидетельствует о различной специфичности исследуемых наборов

Таблица 1
Результаты анализа delta данных ВН по методу Блэнда–Альтмана

Table 1

Blend — Altman delta analysis of VL data

Сравниваемые тест-системы	Медиана delta	σ	Доля значений, уложившихся в диапазон, %	
			$\pm 1\sigma$	$\pm 2\sigma$
Монитор-FRT vs Монитор-Duo	0,24	0,24	61,84	97,37
Монитор-FRT vs РеалБест	0,48	0,32	72,37	94,74
Монитор-Duo vs РеалБест	0,23	0,37	69,74	96,05
Монитор-FRT vs ВИЧ-ГЕН	0,35	0,36	75,00	94,74
Монитор-Duo vs ВИЧ-ГЕН	0,10	0,46	71,05	96,05
РеалБест vs ВИЧ-ГЕН	0,14	0,43	67,11	96,05

Примечание: в качестве delta приведена разность значений концентрации РНК ВИЧ-1 (в lg копий/мл) полученных тест системами, описываемыми в столбце «Сравниваемые тест-системы». Серым выделены значения, которые отвечают критериям нормального распределения при оценке сходимости количественных результатов.

Note: as delta, the difference in the values of HIV-1 RNA concentration (in lg copies / ml) obtained by the test systems described in the column «Compared test systems» is given. The gray values are those that meet the criteria for normal distribution in assessing the convergence of quantitative results.

к вирусу субтипа В, входящего в состав большинства стандартных международных образцов, или об особенностях калибровки наборов относительно этого генетического варианта.

Во многом полученные результаты связаны с естественным полиморфизмом отдельных областей генома у разных генетических вариантов и рекомбинантов, что способно повлиять на их амплификацию

Таблица 2
Результаты анализа разведений стандартного образца ВИЧ-1

Table 2

Dilutions of a standard HIV-1 sample dilution

Разведение стандарта	Истинная концентрация, lg копий/мл	Расчетная концентрация, lg копий/мл							
		Монитор-FRT	delta	Монитор-Duo	delta	Реал Бест	delta	ВИЧ-ГЕН	delta
1:7	4,48	4,12	0,36	4,38	0,10	3,87	0,61	4,53	-0,05
1:70	3,48	3,21	0,27	3,14	0,34	3,16	0,32	3,56	-0,08
1:700	2,48	2,10	0,38	2,36	0,12	2,39	0,09	2,83	-0,35
Среднее			0,34		0,19		0,34		-0,16

Примечание: концентрация разведений стандартного образца взята из паспорта на стандартный образец. Значение delta является разностью истинной и расчетной концентраций. В столбцах delta представлена разность истинной концентрации и расчетной, полученной каждым набором реагентов.

Note: the concentration of dilutions of the standard sample is taken from the passport to the standard sample. The delta value is the difference between the true and calculated concentrations. The delta columns represent the difference between the true concentration and the calculated one obtained by each set of reagents.

Полученные нами результаты согласуются с предыдущими работами. Ранее, при исследовании данных панелей (особенно рекомбинантных форм) широко используемыми зарубежными тест-системами были также получены сильно дискордантные результаты. Так, разница ВН для образцов субтипов С и F при анализе разными системами составляла 0,33 lg, а для CRF13 и CRF11 — 0,54 и 0,53 lg соответственно. Для смешанного образца AG-GH разница в ВН достигала 0,61 lg [24, 25].

в разных тест-системах [14]. Таким образом, вполне естественно, что разные диагностические наборы способны дать дискордантные результаты для разных генетических вариантов ВИЧ-1 [6], что целесообразно принимать во внимание при оценке эффективности проводимой терапии, в том числе когда известен субтип вируса у пациента.

Заключение. В ходе настоящего исследования все четыре диагностических набора продемонстрировали высокий уровень сходимости полученных данных ВН. Различия в показателях ВН могут быть

Таблица 3
Результаты анализа панелей субтипов и рекомбинантов ВИЧ-1

Table 3

HIV-1 Subtype and Recombinant Panel Analysis Results

Образец (субтип/ рекомбинант)	Панель NIBSC	Концентрация, лг копий/мл							
		Истинная	Монитор-FRT	delta	Монитор-Duo	delta	РеалБест	delta	ВИЧ-ГЕН
CRF 13	13/214	3,50	2,33	1,17	3,15	0,35	3,14	0,36	3,33
CRF 11	13/214	3,30	2,73	0,58	3,52	-0,21	3,17	0,13	2,71
CRF 24	13/214	3,50	3,05	0,46	3,34	0,16	2,67	0,83	3,46
CRF 02	13/214	3,19	2,54	0,65	3,25	-0,06	2,60	0,59	2,73
ADG Recombinant	13/214	2,94	2,50	0,45	3,43	-0,49	2,67	0,27	—
Subtype B	12/224	3,37	2,74	0,63	3,36	0,02	2,91	0,46	3,86
Subtype AG-GH	12/224	3,80	3,62	0,18	3,83	-0,02	3,12	0,68	3,79
Subtype A	12/224	3,39	3,11	0,28	3,32	0,07	2,92	0,47	3,97
Subtype D	12/224	3,33	2,81	0,52	3,12	0,21	2,93	0,40	3,38
Group F	12/224	3,51	2,81	0,70	3,74	-0,22	2,82	0,69	3,57
Subtype G	12/224	3,71	3,05	0,66	3,90	-0,19	3,33	0,38	3,75
Subtype A/E	12/224	3,33	3,13	0,21	3,10	0,23	3,04	0,29	3,27
Subtype C	12/224	3,39	2,93	0,46	3,32	0,07	2,74	0,65	3,24
Subtype J	13/214	4,21	3,75	0,46	3,86	0,36	2,63	1,58	4,12
Среднее значение				0,49		-0,02		0,56	
									0,03

Примечание: в качестве концентраций образцов исследуемых панелей использованы опубликованные средние значения ВН, полученные различными тест-системами [24; 25]. В столбцах delta представлена разность истинной концентрации и расчетной, полученной каждым набором реагентов.

Note: the published median VL values obtained by various kits [24; 25] were used as the concentrations of samples of the panels studied. The delta columns represent the difference between the true concentration and the calculated one obtained by each set of reagents.

связаны с калибровкой наборов и являются несущественными для оценки стадии ВИЧ-инфекции и эффективности терапии у пациента.

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (проект № 18-75-
10096).*

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Кириченко А.А., Киреев Д.Е., Лопатухин А.Э., Мурзакова А.В., Лаповок И.А., Ладная Н.Н., Покровский В.В. Уровень и структура лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди пациентов без опыта приема антиретровирусных препаратов с момента начала применения антиретровирусной терапии в Российской Федерации // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2019. № 11 (2) С. 75–83. [Kirichenko A.A., Kireev D.E., Lopatukhin A.E., Murzakova A.V., Lapovok I.A., Ladnaya N.N., Pokrovsky V.V. Prevalence and structure of HIV-1 drug resistance among treatment naive patients since the introduction of antiretroviral therapy in the Russian Federation. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2019, Vol. 11, No. 2, pp. 75–83 (In Russ.)]. DOI: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-2-75-83>.
2. WHO. What's new in treatment monitoring: viral load and CD4 testing. *HIV treatment and care — information note*. Geneva: World Health Organization, 2017: 2. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255891/WHO-HIV-2017.22-eng.pdf;jsessionid=8363F0E739BE52328CE3563CDD7A5D8E?sequence=1> (July 2017).
3. De Oliveira F., Mourez T., Vessiere A. et al. Multiple HIV-1/M + HIV-1/O dual infections and new HIV-1/MO inter-group recombinant forms detected in Cameroon // *Retrovirolog*. 2017. Vol. 14 (1). P. 1–11. DOI: 10.1186/s12977-016-0324-3.
4. Holmes H., Davis C., Heath A. Development of the 1st International Reference Panel for HIV-1 RNA genotypes for use in nucleic acid-based techniques // *J. Virol. Methods*. 2008. Vol. 154. P. 86–91. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.08.014.
5. WHO ECBS report WHO/BS/2013.2226. Geneva: World Health Organization, 2013: 32. URL: http://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS_2226_HIV_CRF_Panel.pdf (October 2013).
6. Avettand-Fénoël V., Mélard A., Gueudin M. et al. Comparative performance of the Biocentric Generic Viral Load, Roche CAP/CTM v1.5, Roche CAP/CTM v2.0 and m2000 Abbott assays for quantifying HIV-1 B and non-B strains: Underestimation of some CRF02 strains // *J. Clin. Virol*. 2019. Vol. 110. P. 36–41. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.12.002.

7. Janes H., Herbeck J.T., Tovanabutra S. et al. HIV-1 infections with multiple founders are associated with higher viral loads than infections with single founders // *Nat. Med.* 2015. Vol. 21, No. 10. P. 1139–1141. DOI: 10.1038/nm.3932
8. Ngo-Malabo E.T., Ngoupo T.P., Zekeng M. et al. A cheap and open HIV viral load technique applicable in routine analysis in a resource limited setting with a wide HIV genetic diversity // *Virol. J.* 2017. Vol. 14, No. 1. P. 1–7. DOI: 10.1186/s12985-017-0893-3.
9. Bobkova M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR // *AIDS Rev.* 2013. Vol. 15, No. 4. P. 204–212. PMID: 24192601.
10. Foley B.T., Leitner T., Paraskevis D., Peeters M. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review // *Infect Genet Evol.* 2016. Vol. 46. P. 150–158. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.10.018.
11. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Бобкова М.Р., Коломеец А.Н., Турбина Г.И., Шипулин Г.А., Ладная Н.Н., Покровский В.В. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. // *Терапевтический архив.* 2017. Т. 89 (11). С. 44–49. [Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Bobkova M.R., Kolomeets A.N., Turbina G.I., Shipulin G.A., Ladnaya N.N., Pokrovsky V.V. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015. *Ter. Arkh.* 2017. Vol. 89, No. 11, pp. 44–49 (In Russ.)]. DOI: 10.17116/terarkh2017891144-49.
12. Baryshev P., Bogachev V., Gashnikova N. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia // *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014. Vol. 30, No. 6. P. 592–597. DOI: 10.1089/AID.2013.0196.
13. WHO Prequalification of Diagnostics Programme PUBLIC REPORT. Product: Abbott RealTime HIV-1 (Manual). Number: PQDx 0146-027-00. Geneva: World Health Organization, 2018: 56. URL: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/180423_amended_final_pqpr_0146_027_00_v5.pdf?ua=1 (April 2018).
14. Luft L.M., Gill M.J., Church D.L. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: review of current platforms // *Int. J. Infect. Dis.* 2011; 15 (10): 661–670. DOI: 10.1016/j.ijid.2011.05.013.
15. Ивченко Г.И., Медведев Ю.И. *Математическая статистика:* учебник. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2014. 352 с. [Ivchenko G.I., Medvedev Yu.I. *Mathematical Statistics:* Textbook. Moscow: Book House «Librocom» 2014, 352 p. (In Russ.)]. ISBN: 978-5-397-04141-6.
16. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test Manual. USA 2007: 36. URL: <https://www.fda.gov/media/73824/download>
17. Artus® HI Virus-1 RG RT-PCR Kit Handbook. QIAGEN 2011: 46. URL: <https://www.qiagen.com/resourcesdetail>.
18. Hatzakis A., Papachristou H., Nair S.J. et al. Analytical characteristics and comparative evaluation of Aptima HIV-1 Quant Dx assay with Ampliprep/COBAS TaqMan HIV-1 testv2.0 // *Virol J.* 2016. Vol. 13, No. 176, pp. 9. DOI: 10.1186/s12985-016-0627-y.
19. Демидович Б.П., Кудрявцев В.А. *Краткий курс высшей математики:* учебное пособие для вузов. М.: ACT, Астrelъ, 2001, 656 с. [Demidovich B.P., Kudravcev V.A. *Short course in higher mathematics.* Textbook for universities. Moscow: AST, Astrel, 2001, 656 p. (In Russ.)]. ISBN: 5-17-004601-4.
20. Hopkins M., Hau S., Tiernan C. et al. Comparative performance of the new Aptima HIV-1 Quant Dx assay with three commercial PCR-based HIV-1 RNA quantitation assays // *J. Clin. Virol.* 2015. Vol. 69. P. 56–62. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.05.020.
21. Altman D., Bland J. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies // *The Statistician.* 1983. Vol. 32. P. 307–317. URL: <http://people.stat.sfu.ca/~raltman/stat300/AltmanBland.pdf>.
22. Brazdžionyte J., Macas A. Bland-Altman analysis as an alternative approach for statistical evaluation of agreement between two methods for measuring hemodynamics during acute myocardial infarction // *Medicina (Kaunas).* 2007. Vol. 43, No. 3. P. 208–214. PMID: 17413249.
23. Смирнихина С.А., Цаур Г.А., Чельышева Е.Ю., Яковлева Ю.А., Лавров А.В., Абдуллаев А.О., Бедрак Н.В., Шухов О.А., Соловонников А.Г., Попов А.М., Адильгереева Э.П., Фечина Л.Г., Туркина А.Г., Куцев С.И. Сравнительный анализ использования полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и автоматизированной системы Genexpert DX System для оценки экспрессии гена BCR-ABL у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, находящихся в большом и полном молекулярном ответе // *Онкогематология.* 2013. Т. 8, № 3. С. 16–21. [Smirnikhina S.A., Tsaur G.A., Chelysheva E.Yu., Yakovleva Yu.A., Lavrov A.V., Abdullaev A.O., Bederak N.V., Shukhov O.A., Solodovnikov A.G., Popov A.M., Adilgereeva E.P., Fechina L.G., Turkina A.G., Kutsev S.I. Comparative analysis of the use of real-time polymerase chain reaction and the Genexpert DX System automated system for evaluating the expression of the BCR-ABL gene in patients with chronic myeloid leukemia in a large and complete molecular response. *Oncohematology,* 2013, Vol. 8, No. 3, pp. 16–21 (In Russ.)]. ISSN: 1818–8346.
24. Report on an International Collaborative Study to Establish the 2nd WHO International Subtype Reference panel for HIV-1 NAT Assays (WHO/BS/2012.2209). Geneva: World Health Organization, 2012, 31 p. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78050> (October 2012).
25. Report on an International Collaborative Study to Establish the 1st WHO International Reference Panel for HIV-1 Circulating Recombinant Forms for NAT Assays (WHO/BS/2013.2226). Geneva: World Health Organization 2013: 32. URL: https://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS_2226_HIV_CRF_Panel.pdf (October 2013).

Поступила в редакцию: Received by the Editor: 12.09.2019 г.

Сведения об авторах:

Лаповок Илья Андреевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора»; 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А; e-mail: i_lapovok@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6328-1415>;

Лопатухин Алексей Эдуардович — научный сотрудник ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора»; 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А; e-mail: a.lopatukhin@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>;

Кириченко Алина Алексеевна — младший научный сотрудник ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора»; 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А; e-mail: kotova-kirichenko@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>;

Мурзакова Анастасия Вениаминовна — младший научный сотрудник ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора»; 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А; e-mail: murzakova_a.v@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>;

Киреев Дмитрий Евгеньевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора»; 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А; e-mail: dmitkireev@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>.