

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Жигалева О.Н.¹, Ермолаев И.И.^{1,2}, Марданлы С.Г.^{1,2}, Гашенко Т.Ю.^{1,2}

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА ВИЧ-1 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является актуальной проблемой здравоохранения не только в России, но и во всем мире. Существует множество методов диагностики вируса, хотя тест полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на нуклеиновую кислоту РНК является хорошо зарекомендовавшим методом диагностики, он имеет некоторые недостатки. Большинство форм вируса ВИЧ имеют различные генетические изменения и могут продуцировать инфекционные вирионы с различной мутацией. Вирус иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) является отличным типичным примером быстро адаптирующейся популяции, характеризующейся высоким разнообразием, сильным отбором и рекомбинацией. Эволюция ВИЧ-1 в конечном итоге происходит внутри инфицированных людей. В связи с этим наблюдается возрастающая частота ложноотрицательных результатов. Существует острая необходимость в точном и быстром методе тестирования пациентов, официально подтвержденных по ВИЧ-статусу, так и бессимптомных людей для предотвращения передачи вируса и обеспечения своевременного лечения пациентов. В статье описывается разработка набора реагентов для выявления нуклеиновой кислоты РНК вируса ВИЧ-1 методом ПЦР-РВ, что позволит диагностировать пациентов на разных стадиях инфекции, определять эффективность проводимого антиретровирусного лечения. Общая диагностическая чувствительность разрабатываемого набора составляет 97% – 99%, а специфичность – 100%, взятых у 150 пациентов с подтвержденным и отрицательным результатом по ВИЧ. Данные демонстрируют потенциал использования внутреннего эндогенного образца (ЭВКО), использующего в качестве мишеней гены человека и позволяющий судить о наличии клеток человека в образце.

Ключевые слова: ВИЧ; ВИЧ-1; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени; биологический материал; разработка набора.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного обнаружения РНК вируса ВИЧ-1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (5): 298-304. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-5-298-304>

Для корреспонденции: Жигалева Ольга Николаевна, руководитель научно-производственного отдела НПО ПЦР ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: jigon@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировалось ЗАО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.04.2023

Принята к печати 17.04.2023

Опубликовано 15.05.2023

Zhigaleva O.N.¹, Ermolaev I.I.^{1,2}, Mardanly S.G.^{1,2}, Gashenko T.Yu.^{1,2}

DEVELOPMENT OF A REAGENT KIT FOR QUALITATIVE REAL-TIME DETECTION OF HIV-1 RNA BY POLYMERASE CHAIN REACTION

¹CJSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

Human immunodeficiency virus (HIV) is a pressing public health problem not only in Russia, but worldwide. There are many methods for diagnosing the virus, although the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) test for RNA nucleic acid is a well-established diagnostic method, it has some drawbacks. Most forms of HIV have different genetic changes and can produce infectious virions with different mutations. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is an excellent typical example of a rapidly adapting population, characterized by high diversity, strong selection and recombination. The evolution of HIV-1 ultimately occurs within infected individuals. Consequently, there is an increasing incidence of false negatives. There is an urgent need for an accurate and rapid method to test both patients with confirmed HIV status and asymptomatic individuals to prevent transmission of the virus and to provide timely treatment for patients. This article describes the development of a reagent kit for detection of HIV-1 RNA nucleic acid by PCR-RV which will allow to diagnose patients at different stages of infection and to determine the effectiveness of antiretroviral treatment. The overall diagnostic sensitivity of the developed kit is 97% to 99% and specificity is 100%, taken from 150 patients with confirmed and negative HIV infection. The data demonstrate the potential to use an internal endogenous sample (IES) using human genes as targets and to judge the presence of human cells in the sample.

Key words: HIV; HIV-1; real-time reverse transcription – polymerase chain reaction; biological material; kit development.

For citation: Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu. Development of the reagent kit for qualitative real-time detection of HIV-1 RNA by polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (5): 298-304 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-5-298-304>

For correspondence: Zhigaleva Ol'ga Nikolaevna, specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOLab»; e-mail: jigon@mail.ru

Information about authors:

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;
Ermolaev I.I., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>;
Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;
Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>.

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study was funded by CJSC «EKOLab».

Received 11.04.2023

Accepted 17.04.2023

Published 15.05.2023

Введение. Вирус иммунодефицита человека относится к порядку *Ortervirales* семейства *Retroviridae* подсемейству *Orthoretrovirinae* роду *Lentivirus*. По состоянию на 2021 год глобальное число людей, живущих с ВИЧ, составило 38,4 миллиона (33,9 – 43,8 млн.), по сравнению с 26,0 миллионами (22,9 – 29,7 млн.) в 2000 году [1].

ВИЧ характеризуется поражением иммунной системы с развитием синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа). Частица вируса ВИЧ-1 состоит из двойного липидного слоя, который содержит гликопротеин gp120 вирусной оболочки и трансмембранный белок gp41, и по своей структуре имеет форму икосаэдра. Под оболочкой прикреплена белковая оболочка, известная как матрикс. Внутри частицы находится капсид, который содержит две идентичные копии вирусной РНК и вирусные белки, необходимые для репликации вируса, включая ферменты, обратную транскриптазу, интегразу и протеазу [2]. ВИЧ-1, как и другие представители ретровирусов, имеет 3 структурных белка: gag (кодирует капсидные белки, включая р24), pol (кодирует обратную транскриптазу, протеазу и интегразу) и env (кодирует белки внешней оболочки вируса). Помимо перечисленных генов он включает гены *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* и *vpu*, участвующие в регуляции экспрессии других вирусных генов [3].

Ранняя диагностика ВИЧ имеет решающее значение для своевременного начала осуществления лечения. ОТ-ПЦР в реальном времени считается наиболее эффективным методом диагностики ВИЧ, в том числе, используется в качестве референсного метода при сомнительных результатах ИФА (иммуноферментный анализ) и иммуноблоттинга. Однако недавние исследования показали, что современные наборы для ОТ-ПЦР в реальном времени для диагностики ВИЧ дают большое количество ложноотрицательных результатов. Ложноотрицательный результат чрезвычайно опасен и может вызвать множество проблем в лечении и контроле над распространением вируса. Лица с ложноотрицательными результатами могут легко заразить окружающих, вызывая серьезное распространение вируса и пагубно влияя на население. Ложноотрицательные результаты объясняются не самими наборами для обнаружения, а высокой частотой спонтанных мутаций в геноме вируса ВИЧ-1 [4]. Это означает, что

всякая случайно возникшая в ходе обратной транскрипции мутация имеет большие шансы закрепиться в потомстве, что имеет важные последствия для жизни самих ретровирусов и их хозяев. В частности, одним из наиболее характерных свойств ВИЧ является его непревзойденная изменчивость (вариабельность) [5]. Результаты сравнительной частоты мутаций для гена env представлены на рис. 1, где выделенным цветом показаны области мутаций у разных людей.

Кроме того, большинство коммерческих наборов для ОТ-ПЦР в реальном времени обычно используют экзогенный ВКО. В связи с этим была разработана система диагностики ВИЧ инфекции из плазмы и сыворотки крови на основе набора реагентов для метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени, с эндогенным ВКО.

Цель исследования – разработать набор реагентов для качественного выявления РНК вируса ВИЧ-1 методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Материал и методы. При подготовке было использовано оборудование и материалы:

- Праймеры (ДНК-Синтез, Россия);
- Олигонуклеотиды (ДНК-Синтез, Россия);
- Набор для выделения (Рибо-Преп, Россия, cat#: K2-9-Et-100);
- Буфер HS-qPCR2x (Биолабмикс, Россия cat#: MN02040);
- Вода деионизированная, свободная от нуклеаз (Merck, Millipore, Германия, cat#: SIMSV00RU);
- 10-100 µL автоматические пипетки (Eppendorf, Hamburg, Германия, cat#: 3123000047);
- 20-200 µL автоматические пипетки (Eppendorf, Hamburg, Германия, cat#: 3123000055);
- 100-1000 µL автоматические пипетки (Eppendorf, Hamburg, Германия, cat#: 3123000063);
- 1,5 mL Eppendorf пробирки (Eppendorf Belgium N.V., Бельгия, art#: 0030125215);
- 2,0 mL Eppendorf пробирки (Eppendorf, Belgium N.V., Бельгия, art#: 0030123344).

Аmplификацию, детекцию и обработку результатов проводили с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаборатории» (США).

Биологический материал был получен от компании INVITRO (г. Москва) в период с 2021 по 2022

год. Из 150 поступивших образцов, часть была с подтвержденным ВИЧ-статусом, остальные были отрицательны на наличие вируса. Образцы плазмы и сыворотки крови от пациентов с ВИЧ-1 хранились при температуре -20°C .

Эндогенный внутрениий контрольный образец (ВКО) в данном наборе представляет собой ген человека *эндорибонуклеазы (РНКаза Р)*. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала (клеток из крови и плазмы крови).

Положительный контрольный образец (ПКО) содержит плазмидную ДНК (pUC19) *E.coli* со встроенными в нее специфическими фрагментами ДНК микроорганизмов урогенитальных инфекций в 0,1 М трис буфере.

Отрицательный контрольный образец не содержит специфические фрагменты к ДНК микроорганизмов урогенитальных инфекций в 0,9 % растворе хлорида натрия в деионизированной воде.

Экстракция нуклеиновых кислот для сравнительных наборов проводилась методом осаждения с последующей отмывкой («РИБО-преп», Амписенс, Россия, «РеалБест ДНК ВИЧ (ЦК)», Вектор-Бест, Россия) или любым набором для экстракции согласно инструкции по его применению.

В качестве сравнения использовался набор реагентов «РеалБест РНК ВИЧ количественный» (компания АО «Вектор-Бест») [6].

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных, в базе данных GenBank проводили с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Специфичность выбранных олигонуклеотидов изучали с помощью компьютерной программы BLAST online [7].

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008 [8].

Результаты и обсуждение. Разработан набор реагентов «ВИЧ-1 ЭК» для выявления РНК вируса ВИЧ-1 в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

По данным приводимых в литературе исследований и анализа нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank в этом исследовании были использованы различные геномы ВИЧ-1. Вирусные изоляты исследовались от пациентов, живущих в разных географических регионах. Для создания праймеров были выбраны две геномные области вируса ВИЧ-1 *gag* и *LTR*.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено для поиска консервативных нуклеотидов в последовательностях ВИЧ-1 с использованием биотехнологических программ (см. таблицу) [9, 10].

Праймеры были разработаны после определения условий реакции, таких, как GC%, температура плавления (T_m), длина праймера и их взаимосвязи между собой.

Контролем проводимых манипуляций по обнаружению вируса методом ОТ-ПЦР стало использование гена самого человека. В качестве гена-мишени был выбран ген эндорибонуклеаза (*РНКаза Р*). Человеческая рРНК проходит в методе ПЦР те же этапы, что и вирусная РНК, а именно: лизис клетки, обратную транскрипцию, амплификацию [11].

Выравнивание 200 нуклеотидных последовательностей гена Рибонуклеазы Р, взятых в базе данных GenBank, показало консервативные участки для расчета олигонуклеотидов [12].

В итоге, для создания реакционной смеси были использованы следующие компоненты: 2х ПЦР буфер (0,5 М Tris Cl, pH 8.6, 0,05 М KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Tween 20), рабочая концентрация Taq-полимеразы – 5 ед/мкл, рабочая концентрация каждого праймера

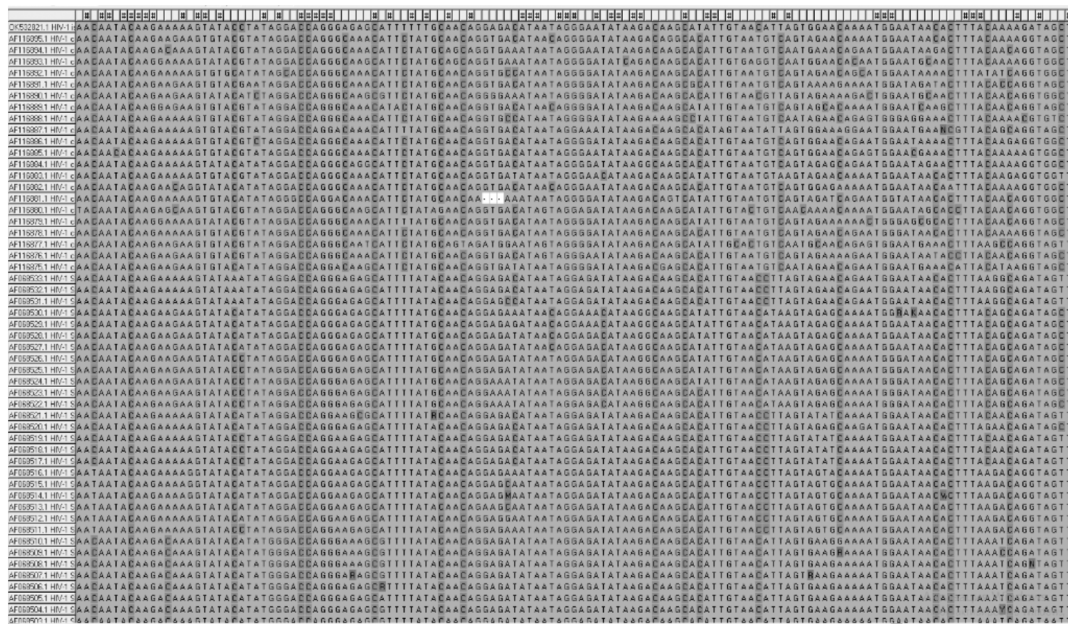


Рис. 1. Генетическая изменчивость оболочечного гена *env* вируса ВИЧ-1.

Используемые праймеры – фрагменты *gag* и *LTR*

Мишень	Ген	Последовательность (5'-3')	Ориентация праймера
ВИЧ-1	<i>gag</i>	ATGTTTTTCAGCATATCAGAAGGA	Прямой
		TGCTTGATGTCCCCCAT	Обратный
		ATAGGTCACGCAGTGC GGCCATCACGTAA	Флуоресцирующий зонд
	<i>LTR</i>	AGGCACTCATACGCATTAGTCATA	Прямой
		CATGTACCTACTAATGCTTGACTTC	Обратный
		GAAGGCTCTGCGCGCATTTGGACAATTAC	Флуоресцирующий зонд
<i>Homo sapiens РНКазы Р</i>	GGATCCATCTCACTGCAATG	Прямой	
	CCTGCTATCAAAGACTCCACA	Обратный	
	CCTCCTATTAATGTGGCGATTGACCGA	Флуоресцирующий зонд	

и зондов составляет 1 рМ/мкл, 5 % ДМСО, 0,5 % IGEPAL CA-630, 40 единиц ревертазы и 40 единиц ингибитора рибонуклеаз.

Оценка работоспособности набора реагентов проведена на биологических пробах, полученных из IN-VITRO (г. Москва). Образцы плазмы крови и сыворотки крови в объеме, соответствующему 250 мкл, помещались в чистые эппендорфы, и проводился этап выделения.

На первом этапе проведена очистка суммарной РНК. Выделение РНК с использованным набором реагентов основано на связывании нуклеиновых кислот с магнитным сорбентом в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера. Принцип анализа в приборе основан на регистрации процесса амплификации образующегося специфического фрагмента кДНК, полученный методом обратной транскрипции из РНК ВИЧ-1. Процесс проведения ПЦР заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация при 95 °С, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями при 60 °С, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой при 67 °С [13]. Регистрация прибором основана на измерении сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфического для данной кДНК гибрида зонда ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, происходит расщепление зонда и разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления реакции продукта к разгоранию сигнала флуоресценции [6]. Количество разрушенных зондов увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов.

В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) входили 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (ОКО) и положительный контроль ПЦР (ПКО).

В пробирке объемом 1,5–2 мл готовилась «Мастер Микс»:

5*(N+1) мкл смесь 1 (РНК) + 15*(N+1) смесь 2,

где: N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов. Далее «Мастер

Микс» перемешивался на вортексе, осаждался кратковременным центрифугированием и вносился по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР. В подготовленные пробирки вносили по 15 мкл экстрагированных РНК. Отрицательный и положительный контроль для постановки ПЦР вносили в отдельные пробирки в объеме 15 мкл.

Амплификация и детекция была проведена на 150 образцах биологического материала, полученных от пациентов с положительным ВИЧ-1 и отрицательным результатом по клиническим проявлениям, проверенных по ПЦР набору (набор «РеалБест РНК ВИЧ количественный», АО «Вектор-Бест»).

Включенный в тест ген РНКазы Р человека в качестве внутреннего контроля помогал оценивать качество проведенных исследований и достоверность результатов. Наличие эндогенного ВКО позволяет контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью, позволяя эффективно оценивать каждый этап проведения анализа, а также позволяет оценить качество хранения пробы, что не позволяет сделать экзогенный ВКО (рис. 2, а, б).

Для эндогенного ВКО у каждой пробы наблюдается свой выход на графике с различным уровнем флуоресценции (RFU), для синтетической конструкции наблюдается выход из одной точки, в большей части с одинаковым для всех проб (RFU).

Амплификация и детекция проводилась как отдельно для выявления ВИЧ-1 по одному каналу (моноплексное выявление), так и одновременно выявлялся ВИЧ-1 и ген человека (ВКО) по двум каналам (мультиплексное выявление) для оценки возможности конкуренции между каналами для ВКО и специфичности.

Результаты сравнительной детекции ВИЧ-1 + ген человека и ВИЧ-1 представлены на рис 3, а, б.

Конкуренции между каналами не выявлено. Все результаты по выявлению положительных и отрицательных проб совпали с набором «РеалБест РНК ВИЧ количественный» (АО «Вектор-Бест»).

Оценка результатов исследований проводилась при помощи анализа детекции РНКазы Р человека (рис 4, а, б).

Если кривые детекции РНКазы Р выходят на циклах до 28 и с хорошим разгоранием флуоресциру-

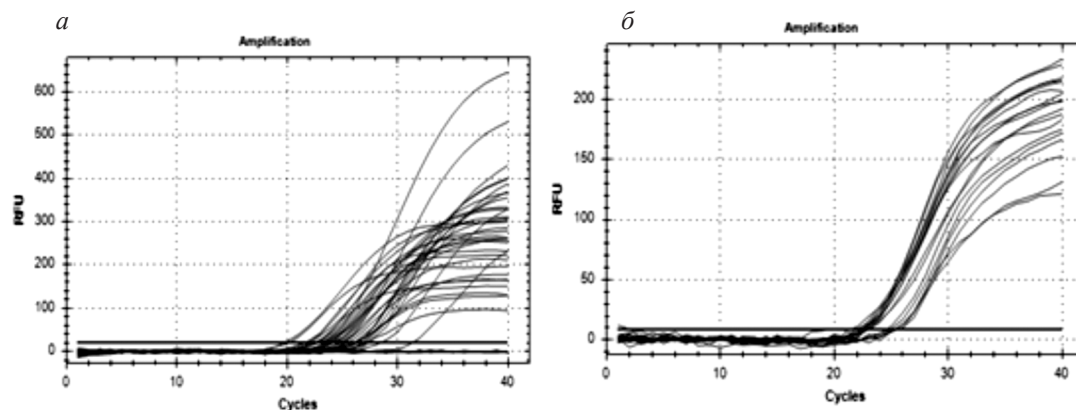


Рис. 2. Результаты сравнительной детекции эндогенного ВКО и синтетической конструкции ВКО. *а* – результаты детекции эндогенного ВКО; *б* – результаты детекции синтетической конструкции ВКО.

Здесь и на рис. 3, 4: по оси абсцисс – количество циклов (Cycles), по оси ординат – уровень флуоресценции (RFU).

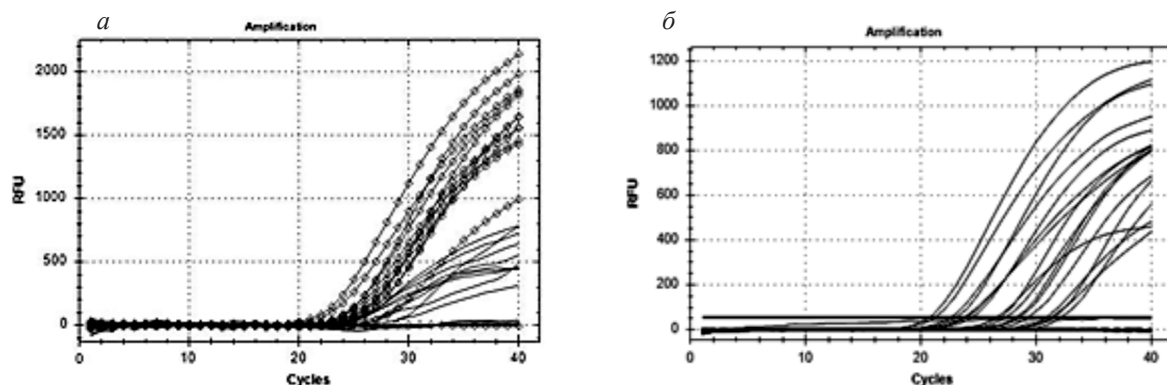


Рис. 3. Результаты сравнительной детекции ВИЧ-1 + ген человека и ВИЧ-1.

а – результаты детекции по двум каналам в ОТ-ПЦР в одной пробирке (ВИЧ-1 + эндогенный ВКО) – ромбовидные кривые – это выявление РНК ВИЧ-1 (специфика), прямые кривые – это выявление РНК гена человека (ВКО); *б* – результаты детекции по одному каналу в ОТ-ПЦР в одной пробирке (ВИЧ-1).

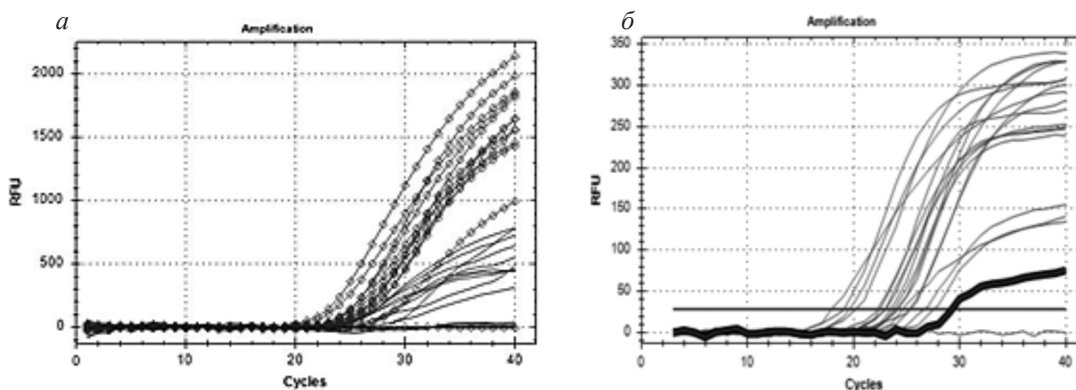


Рис. 4. Оценка результатов исследований по специфике (искомый фрагмент).

а – результаты детекции по двум каналам в ОТ-ПЦР в одной пробирке (ВИЧ-1 + эндогенный ВКО) – ромбовидные кривые – это выявление РНК ВИЧ-1 (специфика), прямые кривые – это выявление РНК гена человека (ВКО); *б* – результаты детекции по одному каналу в ОТ-ПЦР в одной пробирке эндогенного ВКО.

ющего сигнала, то это значит, что все этапы исследования прошли хорошо и результат достоверен. Если кривые детекции появлялись после 28 цикла с низким уровнем флуоресцирующего сигнала и отрицательным результатом по специфике, то такие образцы считались сомнительными и проводилась повторная экстракция с последующей амплификацией.

На практике в среднем 5% исследуемых проб имеют некачественный этап экстракции, что в последующем влияет на результат исследования

Данные проведенных исследований показали, что подобранная программа анализа (амплификации) и реакционная смесь позволяют проводить исследования ОТ-ПЦР, для выявления вируса ВИЧ-1 по двум

каналам детекции без конкуренции между ними и позволяет детектировать РНК ВИЧ за 60 минут.

Для определения чувствительности набора были созданы искусственные положительные образцы на основе плазмид для двух ВИЧ-1-специфичных фрагментов генов *gag* и *LTR*, а также синтетическая ДНК – плазида со встройкой фрагмента гена *РНКазы Р* человека. На основе полученных плазмид при проведении испытаний для оценки аналитической чувствительности (предела обнаружения) был приготовлен стандартный образец предприятия, концентрация 10^6 МЕ/мл, который последовательно разводился с шагом 10 от 10^6 МЕ/мл до 10^2 МЕ/мл. Подтверждение правильности синтеза нуклеотидной последовательности проводилось методом циклического секвенирования по Сэнгеру.

Определение концентрации приготовленных стандартных растворов, с искусственно защищенным специфическим фрагментом гена определялось спектрофотометрическим методом, с построением калибровочной кривой в амплификации.

Искусственные положительные образцы были созданы путем добавления в отрицательные образцы крови и плазмы, полученные от пациентов, в разных количествах охарактеризованного обезвреженного образца РНК вируса ВИЧ-1, т.е. плазмидная конструкция со встроенными генами с концентрациями 10 от 10^6 МЕ/мл до 10^2 МЕ/мл.

Чувствительность набора определена как 20 МЕ/мл. Повторяемость и воспроизводимость определения РНК ВИЧ-1 были установлены путем тестирования положительных и отрицательных образцов крови и плазмы крови.

Условия повторяемости включали в себя: тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации для повторяемости рассчитывался по формуле:

$$CV_p, \% = \frac{Ct \text{ (станд.отклон)}}{Ct \text{ (ср.знач.)}} \times 100 \%, \text{ и не превышал } 3\%.$$

Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов. Процедура проводилась двумя разными операторами с двумя разными наборами одной серии в разные дни.

Таким образом, воспроизводимость и повторяемость работоспособности набора реагентов составляет 100 %.

Целостность РНК-мишени, т.е. матрицы, имеет решающее значение для успешной реакции ПЦР. Однако в случае, если матричная ДНК была потеряна или разложена во время процедуры подготовки образца или в образце присутствуют вещества, ингибирующие амплификацию, ПЦР может оказаться неудачной, хотя интересующая РНК присутствует в образце. Такие сбои приводят к ложноотрицательным результатам, и их следует избегать для получения высоконадежных результатов ПЦР. Для анали-

за нежелательной потери РНК во время процедуры очистки, экзогенная РНК известной последовательности может быть добавлена к образцу перед экстракцией РНК. Эта специфическая экзогенная РНК затем должна быть обнаружена с помощью ПЦР в качестве внутреннего контроля амплификации в количествах, достаточных после экстракции, чтобы гарантировать, что ДНК была успешно очищена от образца. Использование экзогенных контролей также позволяет анализировать наличие в образце потенциальных ингибиторов ПЦР. Тем не менее, этот метод основан на добавлении фрагмента внешней ДНК и не дает информации о целостности РНК-мишени, представляющей реальный интерес.

Помимо экзогенных контролей ПЦР, можно использовать эндогенные контроли. Эндогенный ПЦР-контроль представляет собой сконструированную последовательность олигонуклеотидов с зондом, нацеленную на человеческий ген *РНКазы Р*. Выход эндогенного ПЦР-контроля позволяет сделать вывод, что РНК действительно выделена из образца, не подверглась деградации во время процедуры, и что образец ПЦР не содержит определенных веществ в количестве, препятствующем успешной амплификации РНК [14]. Использование такого вида контроля позволяет оценивать работу специалистов лаборатории в правильности и точности проведения одного из главных этапов анализа – пробоподготовки.

Выбор в качестве генетических мишеней в разрабатываемом наборе генов *gag* и *LTR* обусловлен меньшей частотой мутаций в их генотипе, относительно других генов.

Заключение. Разрабатываемый набор реагентов для качественного выявления РНК ВИЧ-1, позволит своевременно назначать лечение антиретровирусными препаратами, контролировать ход лечения заболевания, что значительно повысит выживаемость среди населения и уменьшит распространение инфекции. Использование эндогенного ВКО, позволит повысить точность проводимого анализа ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–2, 4–5, 7, 9–10, 12, 14 см. REFERENCES)

3. Фаучи Э. ВИЧ-инфекция и СПИД. В кн.: Внутренние болезни по Тинсли Р. Харрисону. Лейн К., ред. М.: Практика; 2005.
6. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения: государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (инструкция набора реагентов «РеалБест РНК ВИЧ количественный»); 2023. Режим доступа: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения 16 марта 2023).
8. Безродный С.Л., Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Помазанов В.В., Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(11): 663-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667.
11. Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Помазанов В.В. Разработка набора реагентов для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом прямой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- 2022; 67 (12): 739-43. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743.
13. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. М.: Лаборатория знаний; 2015.
-
1. World Health Organization (HIV, Estimated number of people (all ages) living with HIV) 2023. Available at: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-number-of-people--living-with-hiv> (accessed 2 April 2023).
2. Adamson C. S., Freed E. O. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.). 2007; 55: 347–87. DOI: 10.1016/S1054-3589(07)55010-6.
3. Fauci A. HIV infection and AIDS. In: Principles of Internal Medicine Tinsley R. Harrison. Lane K., ed. Moscow: Praktika; 2005. (in Russian)
4. Fabio Z., Johanna B., Lina T., Christa L., Göran B., Jan A. et al. Population genomics of inpatient HIV-1 evolution. *eLife*. 2015; 4:e11282. DOI: 10.7554/eLife.11282.
5. Li G., Piamongsant S., Faria N.R., Voet A., Pineda-Peña A-C., Khouri R. et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology*. 2015; 12(18): 1-17. DOI: 10.1186/s12977-015-0148-6.
6. Federal Service for Surveillance in Healthcare (Roszdravnadzor): state register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices (Reagent kit instructions “RealBest RNA Quantitative HIV»); 2023. Available at: <https://www.rozdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (accessed 16 March 2023). (in Russian)
7. Basic Local Alignment Search Tool 2023. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 10 March 2023).
8. Bezrodny S.L., Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Pomazanov V.V., Gashenko T.Yu. Development of a reagent kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA in naso- and oropharyngeal swabs by real-time RT-PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67 (11): 663-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667. (in Russian)
9. Irina T., Jason H., Aijing S., Jaclyn C., Helen K., David C. et al. Multiplex RT-PCR Amplification of HIV Genes to Create a Completely Autologous DC-Based Immunotherapy for the Treatment of HIV Infection. *PLoS ONE*. 2008; 3(1): 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0001489.
10. van Snippenberg W., Gleeurup D., Rutsaert S., Vandekerckhove L., De Spiegelaere W., Trypsteen W. Triplex digital PCR assays for the quantification of intact proviral HIV-1 DNA. *Methods*. 2022; 201: 41–8. DOI: 10.1016/j.ymeth.2021.05.006.
11. Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Pomazanov V.V. Development of a reagent kit for the real-time detection of SARS-CoV-2 RNA in naso- and oropharyngeal smears by direct polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67 (12): 739-43. (in Russ.). DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743. (in Russian)
12. International Nucleotide Sequence Database Collaboration 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 01 March 2023).
13. Rebrikov D.V. Real-time PCR. Moscow: Laboratoriya znaniy; 2015. (in Russian)
14. Cecilia M., Lisa O., Vicky O., Alan I., Christine K., Andreas G. et al. Development of a universal endogenous qPCR control for eukaryotic DNA samples. *Plant. Methods*. 2020; 16(53): 1-14. DOI: 10.1186/s13007-020-00597-2.