

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
«ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
(ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

На правах рукописи

Есьман Анна Сергеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ
ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ
НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID–19)
НА ОСНОВЕ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ**

3.2.2 Эпидемиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук,
академик РАН, профессор,
Акимкин Василий Геннадьевич

Москва — 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Общая характеристика SARS–CoV–2	18
1.2. Молекулярная эпидемиология новой коронавирусной инфекции (COVID–19)	28
1.3. Методы лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции (COVID–19) и определения вариантов SARS–CoV–2	35
1.4. Молекулярно-генетический мониторинг за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19) на территории Российской Федерации	39
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
ГЛАВА 3. ДИНАМИКА УРОВНЯ И СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID–19 В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ И Г. МОСКВЕ В 2020–2022 ГГ.	59
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ СКРИНИНГОВОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВАРИАНТОВ DELTA И OMICRON SARS–COV–2.....	91
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ СУБЛИНИЙ ВАРИАНТА OMICRON SARS–COV–2.....	101
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ДИНАМИКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВАРИАНТОВ SARS–COV–2 НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ И Г. МОСКВЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДИК ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ ВАРИАНТОВ И СУБЛИНИЙ SARS–COV–2 В 2021–2022 ГГ.	114

ГЛАВА 7. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID–19) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДИК В 2021–2022 ГГ.	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	138
ВЫВОДЫ	148
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	151
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	152
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	154

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В декабре 2019 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) проинформирована о вспышке «неизвестной пневмонии» в Китае. Первый случай заболевания, вызванный новым коронавирусом зарегистрирован 17 ноября 2019 года в провинции Ухань. Новый коронавирус получил название Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Стремительное распространение вируса привело к чрезвычайной ситуации международного значения в области общественного здравоохранения к концу января 2020 года, а к 11 марта 2020 года — пандемии [Попова А.Ю., 2021].

Данное заболевание получило название COVID-19 (*англ. COronaVirusDisease 2019*), представляет собой тяжёлую острую респираторную инфекцию, которую вызывает новый тип коронавируса.

В Российской Федерации первые два случая новой коронавирусной инфекции зафиксированы 31 января 2020 года (граждане КНР) [Попова А.Ю., 2021].

Во всем мире в апреле 2024 года официально зарегистрировано более 704 миллионов случаев заболевания (летальных исходов более 6,58 млн.), в Российской Федерации — свыше 24 миллионов случаев заболевания (381 тыс. летальных исходов) [Mathieu E., 2024].

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (Роспотребнадзор) оперативно ответила на объявленную в мире пандемию COVID-19: «...четкое межведомственное взаимодействие, превентивность противоэпидемических мероприятий, направленных на снижение пиковой нагрузки на медицинские организации, активный научный поиск эффективных средств профилактики и лечения, а также разработка и внедрение в практику в максимально сжатые сроки диагностических препаратов для массового тестирования позволяют снизить

количество пострадавших и уменьшить социальные и экономические потери» [Попова А.Ю., 2021].

SARS-CoV-2, возбудитель COVID-19, относится к РНК-содержащим вирусам семейства *Coronaviridae*, рода *Betacoronavirus*. Геном представлен одноцепочечной (+) РНК, расшифрован и находится в открытом доступе (GenBank). «Уханьский» вариант SARS-CoV-2, явившийся причиной начала пандемии COVID-19, с появлением новых вариантов обозначен как «дикий тип» (номер GenBank Wuhan MN908947, RefSeq NC_045512).

Появление в конце 2020 года новых вариантов SARS-CoV-2 привело к созданию классификации, включающей три группы:

- «варианты, вызывающие опасения» (англ. *VOC — Variants of Concern*),
- «варианты, вызывающие интерес» (англ. *VOI — Variants of Interest*),
- «варианты, требующие наблюдения» (англ. *VUM — Variants Under Monitoring*),
- «варианты VOC под мониторингом» (англ. *VOC-LUM — VOC lineages under monitoring*) включены в классификацию в октябре 2022 года.

К VOC-вариантам в сентябре 2021 года относились Alpha, Beta, Gamma, Delta; в список VOI-вариантов — Lambda, Mu, а к VUM-вариантам — около 14 вариантов SARS-CoV-2 [Черкашина А.С., 2021].

Создание системы молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) позволило своевременно выявлять новые варианты и корректировать ограничительные мероприятия для снижения уровня заболеваемости. Данная система учитывает рекомендации Технической консультативной группы по эволюции вирусов (ВОЗ) и локальные особенности циркулирующих вариантов.

Следует отметить, что организация молекулярно-генетического мониторинга на территории 85 субъектов Российской Федерации привела к созданию платформы VGARus (Платформа агрегирования результатов расшифровок генома возбудителей инфекционных и паразитарных

заболеваний), для координации работы по сбору результатов секвенирования и их анализу несколькими десятками научных учреждений различной ведомственной принадлежности.

На территории Российской Федерации в 2020–2022 гг. заболеваемость новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) можно охарактеризовать несколькими периодами: **с марта 2020 года по январь 2021 года** (в данный период времени проводились противоэпидемические и ограничительные мероприятия, направленные на разрыв механизма передачи инфекции, отмечалась неоднородность взаимодействующих популяций возбудителя и человека), **с января 2021 года — по настоящее время** (период обусловлен изменением биологических свойств SARS–CoV–2 и проведением активной вакцинопрофилактики) [Акимкин В.Г., 2022; Jones I., 2021; Logunov D.Y., 2020].

Период до декабря 2021 года характеризовался циркуляцией Wuhan MN908947 SARS–CoV–2 («дикий тип»), а также нескольких крупных линий SARS–CoV–2 — Alpha, Beta, Gamma, Delta.

В декабре 2021 года на территории Российской Федерации появился вариант Omicron (B.1.1.529) SARS–CoV–2, впервые обнаруженный в Ботсване и ЮАР и отличающийся от Wuhan MN908947 большим числом мутаций (более 30). ВОЗ отметила повышенную контагиозность данного варианта (ВОЗ, 2021).

В январе 2022 года зарегистрирован резкий рост заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) — более 203 тысяч случаев в сутки, с положительной динамикой до 50,7% новых случаев в сутки. При этом происходила быстрая смена доминирующего варианта Delta на Omicron SARS–CoV–2 [Esman A., 2022].

С целью оценки рисков для системы здравоохранения связанных с распространением нового геноварианта возбудителя, а также своевременного выявления контактных лиц потребовалось оперативно икратно увеличить объем исследуемых в рамках молекулярно-генетического мониторинга образцов.

В результате активного распространения нового варианта Omicron SARS–CoV–2 основное внимание в комплексе противоэпидемических и

профилактических мер стало уделяться тестированию и отслеживанию контактов зараженных лиц.

В 2020–2022 гг. на территории Российской Федерации для отслеживания распространения различных вариантов SARS–CoV–2 применялись только методы секвенирования (полногеномное и секвенирование отдельных участков генов по методу Сэнгера). Эти методы позволяли полноценно отслеживать появление новых вариантов вируса. При дальнейшей эволюции вируса для осуществления полноценного мониторинга за вариантами SARS–CoV–2 корректно применение только полногеномного секвенирования [ВОЗ, 2021].

Система эпидемиологического надзора, используя полученные данные о генетическом «пейзаже» циркулирующего вируса, оперативно и быстро среагировала введением ряда ограничительных мер и разработкой профилактических мероприятий. Однако, в периоды резкого роста заболеваемости, связанного с появлением новых вариантов, требовалось увеличение объёма исследований.

Значительное повышение количества исследуемых изолятов произошло за счет увеличения количества секвенирующих лабораторий и повышения их загрузки, а также оптимизации преаналитического этапа исследования. Однако, такое масштабирование ощутимо повысило материальные затраты на проведение дорогостоящего секвенирования и часто ограничено производительностью лабораторного оборудования. Оптимальной альтернативой этому послужило использование методов генотипирования, не связанных с секвенированием, проводимых на широко распространенном лабораторном оборудовании и отличающихся меньшей себестоимостью [ВОЗ, 2021].

Таким образом, возникла необходимость внедрения в практическую деятельность методического подхода к организации молекулярно-генетического мониторинга с учетом разработки инновационных методик, основанных на создании скринингового метода типирования SARS–CoV–2 с учетом

генетических особенностей циркулирующих вариантов возбудителя на территории Российской Федерации.

Степень разработанности темы исследования

На момент написания данной диссертационной работы существовал ряд зарегистрированных отечественных и зарубежных тест-систем для определения вариантов SARS-CoV-2. Однако, ранее скрининговые методы типирования возбудителя на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в системе молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в масштабе страны не применялись.

Продолжаются дискуссии о целесообразности разработки ПЦР-РВ методик для скринингового типирования SARS-CoV-2. В качестве аргумента против разработки, как правило, выдвигается высокая генетическая изменчивость возбудителя, что приводит к быстрому устареванию методик, однако, как показано в диссертационном исследовании, социально-экономическая значимость информации, полученной за счет оперативного вовлечения в работу по молекулярно-генетическому мониторингу региональных ПЦР-лабораторий, весьма высока.

Цель исследования

Совершенствование молекулярно-генетического мониторинга вариантов возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) путем внедрения в практику метода скринингового типирования.

Задачи исследования

1. Провести анализ динамики уровня и структуры заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в Российской Федерации, Московской области и г. Москве в 2020–2022 гг.
2. Разработать лабораторные методики для скринингового типирования вариантов SARS-CoV-2, основанные на обнаружении значимых мутаций в геноме.
3. Провести молекулярно-генетический анализ циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 за период 2021–2022 гг. на всей территории Российской Федерации.
4. Разработать алгоритм молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) с использованием скрининговых лабораторных методик для определения вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2, а также сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2, основанных на ПЦР-РВ.

Научная новизна результатов исследования

Получены новые научные данные о развитии эпидемического процесса, связанного с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) на территории Российской Федерации и отдельных субъектов.

Разработаны новые лабораторные методики для типирования вариантов SARS-CoV-2 и субвариантов Omicron SARS-CoV-2 при помощи метода ПЦР-РВ, основанные на обнаружении значимых мутаций.

Лабораторные методики позволили увеличить оперативность определения генотипической принадлежности вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2 (диагностическая специфичность анализа и диагностическая чувствительность $\approx 100\%$), а также субвариантов Omicron SARS-CoV-2 (диагностическая специфичность анализа и диагностическая чувствительность

также $\approx 100\%$), в образцах биологического материала с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2.

Сформирована научная основа для практического совершенствования способов молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) и оптимизации его системы за счёт применения скрининговых методов типирования, основанных на ПЦР-РВ.

Использованные при разработке методик подходы могут быть использованы для широкого перечня возбудителей не только вирусной природы, а в целом для изучения других патогенов и маркеров лекарственной устойчивости.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в получении актуальных научных сведений об уровне и структуре заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) на территории Российской Федерации и отдельных субъектов в период с 2020 по 2022 гг. с учетом определения циркуляции вариантов SARS-CoV-2.

В период эпидемиологического неблагополучия в 2021–2022 гг., обусловленного увеличением циркуляции варианта Omicron SARS-CoV-2, при использовании специалистами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека разработанных методик оперативного скрининга циркулирующих вариантов в формате ПЦР-РВ, оптимизированы параметры существующей системы молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Методики применены во всех субъектах Российской Федерации, путем расширения лабораторных возможностей Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при использовании метода ПЦР-РВ, а также за счет включения в исследование образцов, непригодных для секвенирования.

В результате проведенного исследования установлено, что внедренные в практическую деятельность организаций Роспотребнадзора методики позволили:

- оптимизировать деятельность учреждений Роспотребнадзора в рамках молекулярно-генетического мониторинга без использования сложного высокотехнологичного оборудования для секвенирования, что значительно расширило перечень лабораторий, вовлеченных в диагностическую работу по определению вариантов SARS-CoV-2;
- сократить до нескольких часов сроки исследования от взятия биологического материала до получения лабораторного результата в целях своевременного начала и корректировки противоэпидемических мероприятий;
- оптимально сочетать выбранные генетические мишени (мутации вируса) в зависимости от циркулирующего варианта и появляющихся новых мутаций, что позволило использовать скрининговые методики как универсальные, в качестве набора отдельных инструментов;
- усовершенствовать систему молекулярно-генетического мониторинга за циркуляцией вариантов возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) при внедрении скрининговых методов типирования вариантов SARS-CoV-2, основанных на ПЦР-РВ.

Полученные результаты показывают, что молекулярно-генетический мониторинг за разнообразием и эволюцией патогенов, может быть быстрым, экономически эффективным и максимально приближенным к практическому звену санитарно-эпидемиологической службы и пациенту, что подчеркивает научную и практическую значимость диссертационного исследования.

Методология и методы исследования

Планирование исследования осуществлялось в соответствии с поставленной целью и результатами литературного обзора по теме диссертационной работы, а также с учетом рекомендаций Всемирной

организации здравоохранения по использованию скрининговых методов при типировании патогена.

Этапы исследования направлены на последовательное решение обозначенных задач. В работе использованы следующие основные методы: эпидемиологический, молекулярно-биологический и статистический.

Данные проанализированы, систематизированы и представлены в главах, посвящённых собственным исследованиям. На основе полученных результатов сформулированы выводы, а также разработаны и утверждены практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. Рост уровня заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) за 2020–2022 гг. ассоциирован с появлением на территории Российской Федерации и отдельных её субъектах новых доминирующих вариантов возбудителя. Различия в динамике заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) возрастных групп населения Российской Федерации значительны и должны учитываться при разработке профилактических и противоэпидемических мероприятий.

2. Методики скринингового типирования образцов, с подтвержденным наличием РНК SARS–CoV–2, основанные на выявлении мутаций вариантов Delta и Omicron SARS–CoV–2, позволяют дифференцировать варианты Delta и Omicron SARS–CoV–2 и субварианты Omicron SARS–CoV–2 (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4/BA.5), отличаются простотой использования в сравнении с методом секвенирования, не уступая в надежности и точности.

3. Молекулярно-генетический анализ циркулирующих на территории Российской Федерации вариантов SARS–CoV–2 выявил, что периоды доминирования отдельных сублиний варианта Omicron SARS–CoV–2 на территории Московской области и г. Москвы, а также Российской Федерации, в целом, полностью совпадают. При сравнении месячного распределения

удельного веса сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 на территории Московской области и г. Москвы установлено, что среди сублиний, имевших наибольшие доли в структуре варианта Omicron SARS-CoV-2, восемь имели приоритетное распространение в обоих субъектах (BA.5.2, BA.1.1, BA.2, BA.5.1, BF.5, BA.1, BA.1.15, BE.1.1) — более 84%.

4. Обосновано внедрение в систему молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) актуальных молекулярно-биологических методик на опыте использования скринингового типирования циркулирующих вариантов SARS-CoV-2, основанного на ПЦР-РВ, на территории Российской Федерации.

Внедрение в практику

Результатом научного исследования явилось Распоряжение Правительства Российской Федерации от 10 февраля 2022 года № 213-р о массовом промышленном выпуске комплекта реагентов для молекулярно-генетического типирования вариантов SARS-CoV-2 на базе Научно-производственной лаборатории ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (более 150 000 определений).

На основании Поручения Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 20 января 2022 года №02/1167-2022-27 подготовлены Методические Рекомендации МР 3.1.0302-22 от 10 октября 2022 года «Методика определения геновариантов Омикрон и Дельта SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени», утвержденные Руководителем Роспотребнадзора.

Получено 6 патентов на изобретение, предполагаемых к защите патентным правом на территории Российской Федерации:

– Патент на изобретение 2791958 С1, 14.03.2023. Заявка № 2022126136 от 06 октября 2022 года. Олигонуклеотиды для определения мутации S: N501Y SARS-CoV-2.

– Патент на изобретение 2795014 С1, 27.04.2023. Заявка № 2022126124 от 06 октября 2022 года. Олигонуклеотиды для определения мутации S: DELHV69–70 SARS–CoV–2.

– Патент на изобретение 2795016 С1, 27.04.2023. Заявка № 2022126130 от 06 октября 2022 года. Олигонуклеотиды для определения мутации S: DELVYY143–145 SARS–CoV–2.

– Патент на изобретение 2795017 С1, 27.04.2023. Заявка № 2022126133 от 06 октября 2022 года. Олигонуклеотиды для определения мутации S :INS214EPE SARS–CoV–2.

– Патент на изобретение 2795018 С1, 27.04.2023. Заявка № 2022126134 от 06 октября 2022 года. Олигонуклеотиды для определения мутации S: L452R SARS–CoV–2.

– Патент на изобретение 2795019 С1, 27.04.2023. Заявка № 2022126137 от 06 октября 2022 года. Олигонуклеотиды для определения мутации S: P681R SARS–CoV–2.

Методика внедрена в деятельность региональных Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора на территории 85 субъектов Российской Федерации и в рутинную практику Научной группы генной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при выполнении работ по молекулярно-генетическому мониторингу за вариантами новой коронавирусной инфекции (COVID–19) в 2021–2022 гг.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом проанализированных данных, корректным применением статистических методов для их анализа и использованием современных молекулярно-биологических методов, соответствующим поставленной цели и задачам.

В ходе выполнения работы материалы диссертационного исследования представлены на следующих научно-практических мероприятиях:

– On-line семинар «Лабораторная диагностика новой коронавирусной инфекции (COVID–19) в эпидемиологии и клинике» (16 марта 2022, г. Москва);

– III Всероссийская конференция молодых ученых, посвященная 55-летию со дня основания НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева (15 апреля 2022, г. Санкт-Петербург);

– Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022» (27–28 апреля 2022, г. Москва);

– VIII Межведомственная научно-практическая конференция «Инфекционные болезни — актуальные проблемы, лечение и профилактика» (19 мая 2022 г. Москва);

– Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (22 июня 2022, г. Москва);

– On-line семинар «Опасные и особо опасные инфекции: совершенствование методов лабораторной диагностики, анализа генома и протеома патогенных микроорганизмов» (28 июля 2022, г. Ставрополь);

– VIII Российский Конгресс лабораторной медицины (7 сентября 2022, г. Москва);

– IX Научная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OPENBIO-2022 (27–30 сентября 2022, Научоград Кольцово);

– Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Взаимодействие науки и практики. Опыт и перспективы», посвященная 100-летию со дня образования государственной санитарно-эпидемиологической службы России (6–7 октября 2022, г. Екатеринбург);

– Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2023» (27–28 апреля 2023, г. Москва).

Диссертационная работа представлена и рекомендована к защите на заседании апробационного совета Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора от 11 июня 2024 года, протокол № 82.

Соответствие диссертационного исследования паспорту научной специальности

Диссертационная работа является завершенной научно-квалификационной работой, научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.2.2 «Эпидемиология». Результаты исследования соответствуют области исследования, специальности, конкретно пунктам 2, 5, 7 паспорта специальности «Эпидемиология».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных статей: 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертации, 2 в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (библиографических базах — Scopus, SCIE (Web of Science), PubMed).

Личный вклад

Автором самостоятельно в полном объеме выполнены все спланированные виды эпидемиологических и молекулярно-биологических и статистических исследований. Диссертационное исследование выполнено на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-

исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в 2021–2022 гг.

Автором разработан дизайн исследования, разработаны методики определения мутаций SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ. Разработка методики осуществлена в Лаборатории молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов и Научной группе генной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Проведение исследований разработанной методикой на больших выборках образцов биологического материала, клонирование ампликона в плазмидный вектор pGEM-T для создания положительного контроля ПЦР исследования выполнено совместно с Научной группой генной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Масштабирование и внедрение на производство осуществлено совместно со специалистами научно-производственного комплекса ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 172 странице. Включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список используемых сокращений, список литературы. Список литературы включает 48 отечественных и 108 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 32 рисунками и 15 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика SARS–CoV–2

Новая коронавирусная инфекция (*англ. Coronavirus disease, COVID–19*) – инфекционная болезнь, вызываемая новым типом коронавируса — Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (2019–nCoV, устоявшееся сокращенное название *англ. SARS–CoV–2*).

Определена следующая таксономическая принадлежность, с учетом таксономической классификации вирусов Международного комитета по таксономии вирусов ICTV (*англ. International Committee on Taxonomy of Viruses*) [11]:

- группа — *Viruses*,
- реалм — *Riboviria*,
- царство — *Orthornavirae*,
- тип — *Pisuviricota*,
- класс — *Pisoniviricetes*,
- порядок — *Nidovirales*,
- подпорядок — *Cornidovirineae*,
- семейство — *Coronaviridae*,
- подсемейство — *Orthocoronavirinae*,
- род — *Betacoronavirus*,
- подрод — *Sarbecovirus*,
- вид — *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*,
- международное научное название — *SARS–CoV–2* (синоним — *2019–nCoV*).

По классификации Д. Балтимора SARS–CoV–2 относится к IV классу: вирусам, содержащим одноцепочечную (+) РНК. Коронавирусы имеют самый большой геном среди всех РНК-содержащих вирусов. Размер генома SARS–CoV–2 составляет ~30 000 п.н. [12].

Подсемейство *Orthocoronavirinae* содержит четыре рода *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* и *Gammacoronavirus*. Коронавирусы инфицируют птиц (*Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*) и несколько видов млекопитающих (в основном *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus*), включая человека [13].

Коронавирусы животных известны более 80 лет и включают в себя: вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV) свиней, коронавирус крупного рогатого скота (BCoV) и коронавирус кошек (FCoV) [14].

Два коронавируса человека (HCoV): HCoV-229E и HCoV-OC43 известны до эпидемии SARS-CoV. Два дополнительных коронавируса, HCoV-NL63 и HCoV-NKU1, обнаружены в 2004–2005 гг. в клинических образцах [15, 16]. Перечисленные вирусы произошли от животных и, в основном, вызывают респираторные заболевания у людей. Считается, что все коронавирусы человека имеют происхождение от летучих мышей, за исключением линии A beta-CoV, которые могут иметь резервуары у грызунов [17]. Филогенетические отношения HCoV и других коронавирусов (CoV) животных обобщены на **рисунке 1** [18].

SARS-CoV (англ. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*), вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) и **MERS-CoV** (англ. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*) вызывающий Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) также относятся к семейству *Coronaviridae* [19].

В начале XXI века, в 2003 году, мир столкнулся с серьёзной угрозой в виде вспышки тяжёлого острого респираторного синдрома, вызванного SARS-CoV. Эта инфекция распространилась более чем по 30 странам, причём наибольшее количество случаев было зафиксировано в Китае, Канаде и Сингапуре. В общей сложности было зарегистрировано свыше 7 000 случаев заболевания, из которых более 600 закончились летальным исходом [20, 21].

Примерно через девять лет после этого, в 2012 году, новый коронавирус MERS-CoV начал распространяться на Ближнем Востоке. Согласно данным

Всемирной организации здравоохранения, смертность от этого заболевания была крайне высока и составила около 50% от числа заражённых [15].

Инфекция передавалась людям при контакте с верблюдами, а также через предметы, загрязнённые вирусом, в быту и на фермах. Кроме того, были зафиксированы случаи передачи вируса от человека к человеку при тесном контакте. Исследования показали, что летучие мыши являются естественным резервуаром как для SARS-CoV, так и для MERS-CoV [22].

Оба этих вируса, а также возбудитель новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, относятся к роду *Betacoronavirus* согласно таксономической классификации [23]. SARS-CoV-2, вызвавший пандемию новой коронавирусной инфекции (COVID-19), оказался более вирулентным, чем его предшественники, и генетически ближе к SARS-CoV, который впервые идентифицирован в конце 2002 года. Это подчёркивает важность мониторинга и исследования коронавирусов, учитывая их потенциал к вызову серьёзных заболеваний у человека [24].

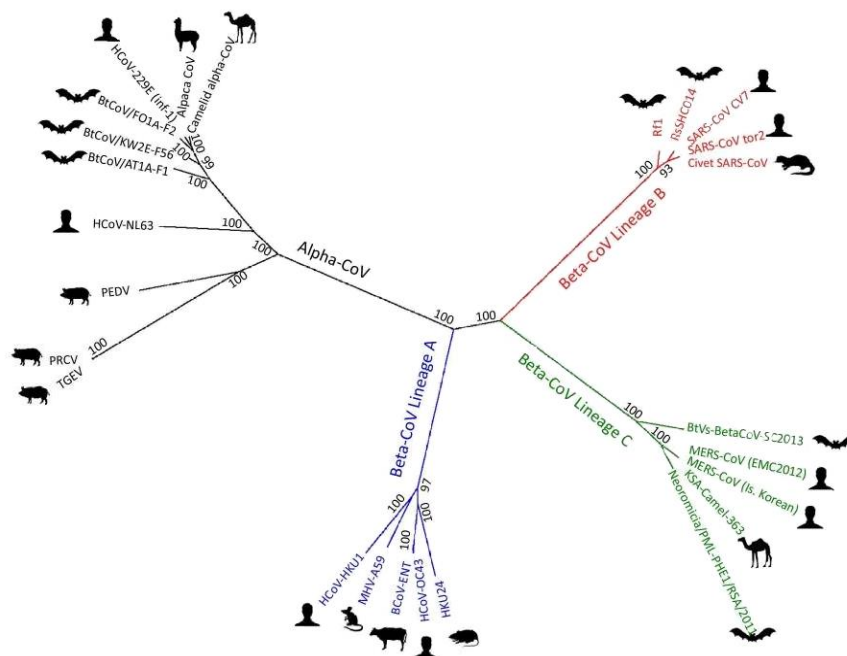


Рисунок 1 — Филогенетические отношения коронавирусов человека и животных [18]

По данным, указанным в исследованиях, SARS-CoV-2 возник как результат естественных природных процессов. Согласно этим данным, формирование вируса произошло в период с октября по ноябрь 2019 года на территории Китая. В ходе эволюции SARS-CoV-2 получил ключевую способность — эффективно связываться с рецептором ACE2 в человеческом организме, что позволило ему успешно распространяться среди населения [25, 26].

В течение последних двух десятилетий было идентифицировано семь коронавирусов, способных вызывать заболевания у людей [27]. К ним относятся: HCoV-229E и HCoV-NL63, принадлежащие к роду *Alphacoronavirus*, а также HCoV-OC43, HCoV-NKU1, MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2, которые являются частью рода *Betacoronavirus*. Каждый из этих вирусов имеет свою историю и особенности: MERS-CoV вызвал вспышку ближневосточного респираторного синдрома в Саудовской Аравии в 2012 году и в Южной Корее в 2015 году; SARS-CoV стал причиной эпидемии атипичной пневмонии в Китае в период с 2002 по 2003 год; наиболее недавний из них, SARS-CoV-2, обнаружен в 2019 году и вызвал глобальную пандемию новой коронавирусной инфекции, известной как COVID-19. 5 мая 2023 года Всемирная организация здравоохранения сделала объявление о завершении режима чрезвычайной ситуации, связанного с COVID-19, и официально отменила статус пандемии, что стало важным этапом в истории борьбы с этим заболеванием [28].

Все семь человеческих коронавирусов имеют зоонозное происхождение, связанное с летучими мышами, мышами или домашними животными [29–31]. SARS-CoV-2 отличается от предшественника скоростью и быстротой распространения, а также тяжестью заболевания, демонстрирующей снижение летальности [24].

На **рисунке 2** представлена схема вириона SARS-CoV-2. Вирус является оболочечным, на 5'-конце генома SARS-CoV-2 находятся вирусные белки, участвующие в транскрипции вирусной РНК и репликации, на 3'-конце

происходит кодирование структурных и группоспецифических вспомогательных белков [32–34]:

1. **Мембранный М-белок** имеет в составе 230 аминокислот, молекулярная масса 25–35 кДа. Формирует вирион и имеет сходство по строению с М-белками MERS-CoV и SARS-CoV на 39,2% и 90,1% соответственно [35].

2. **Ген S, кодирующий шиповидный белок коронавируса**, содержит несколько ключевых структурных компонентов, каждый из которых выполняет определённые функции в жизненном цикле вируса. В начале гена расположен сигнальный пептид, который находится на N-конце и необходим для правильной ориентации белка в процессе его синтеза. Далее следует субъединица S1, которая играет важную роль в связывании вируса с клетками хозяина. Она включает в себя внеклеточный N-терминальный домен (NTD) и рецептор-связывающий домен (RBD), обеспечивающие узнавание и присоединение к рецептору ACE2 на поверхности человеческих клеток.

Субъединица S2 отвечает за процесс слияния вирусной и клеточной мембран, что позволяет вирусу внедрить свой генетический материал в клетку. В её состав входят гибридный пептид (FP), последовательности HR1 и HR2, которые участвуют в процессе слияния, трансмембранный домен (TMD), обеспечивающий встраивание белка в мембрану, и домен цитоплазмы, который взаимодействует с другими компонентами клетки [36].

3. **Е-белок** (оболочечный), имеет меньший размер, содержит от 74 до 109 аминокислот, и имеет молекулярную массу в диапазоне от 8,4 до 12 кДа. Играет важную роль в сборке и выходе новых вирионов из заражённой клетки, участвуя в формировании вирусной оболочки и высвобождении вирусных частиц.

4. **N-белок** (нуклеокапсидный).

Вирионы SARS-CoV-2 имеют сферическую или эллипсоидальную форму со средним диаметром 108 ± 8 нм [37].

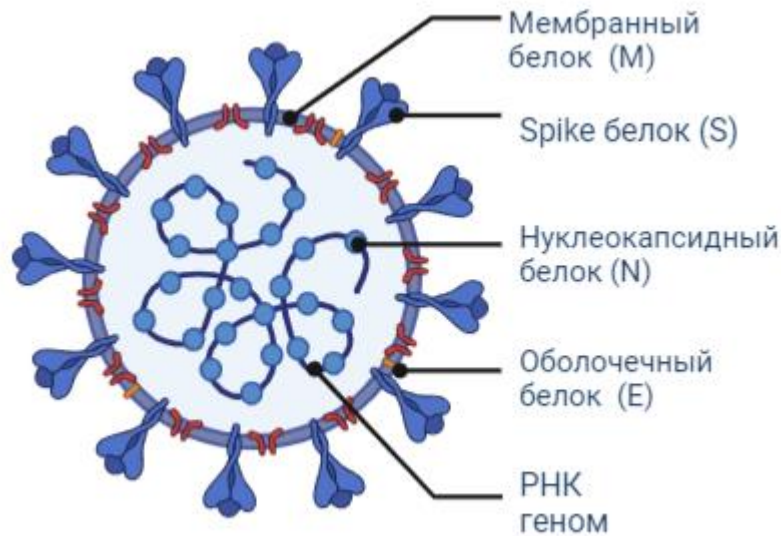


Рисунок 2 — Схема строения вириона SARS-CoV-2 (изображение создано при помощи BioRender.com)

Белок S связывается с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) клеточной поверхности через RBD, что является важным шагом для слияния мембран [38].

SARS-CoV-2 состоит из 13–15 открытых рамок считывания (*англ. Open Reading Frame (ORF)*). GC-состав генома составляет 38%. Генетическое расположение ORF подобно SARS-CoV и MERS-CoV [39]. На **рисунке 3** схематично представлено строение генома SARS-CoV-2.

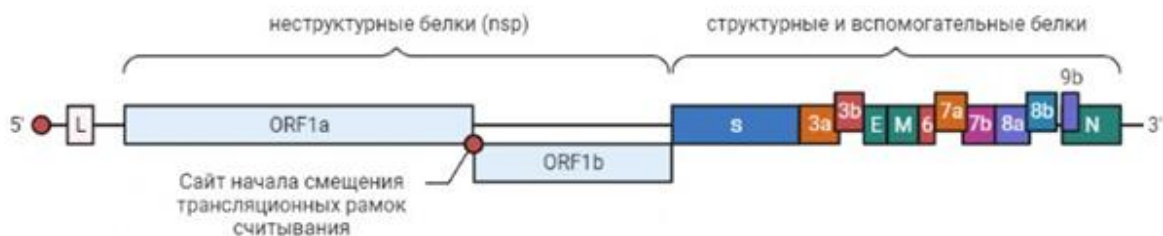


Рисунок 3 — Схема строения генома SARS-CoV-2 (изображение создано при помощи BioRender.com)

Вирусные частицы SARS-CoV-2 соединяются с клеточным рецептором ACE2 и сериновой протеазой клеточной поверхности TMPRSS2, что облегчает проникновение вируса в клетку и его слияние с клеточной или эндосомальной мембраной [40]. С учетом того, что ACE2 экспрессируется в различных типах тканей: в легких на уровне альвеол, кишечнике, гонадах, почках и т.д. [41, 42], считается, что вирусная РНК может детектироваться не только в биоматериале из дыхательных путей, но и в других биологических жидкостях (фекалии, моча, кровь) [43].

Как видно из **рисунка 4**, после проникновения вирусных частиц в клетку происходит освобождение и разворачивание геномной РНК. Затем следует её трансляция с помощью двух больших открытых рамок считывания — ORF1a и ORF1b. Полипротеины pp1a и pp1ab, которые образуются после трансляции, подвергаются ко- и посттрансляционной обработке, в результате чего получают отдельные неструктурные белки (nsps). Эти белки формируют комплекс, необходимый для репликации и транскрипции вируса. После этапа трансляции сформированные структурные белки перемещаются в мембраны эндоплазматического ретикулума (ER). Взаимодействие структурных белков с РНК, находящейся в нуклеокапсиде происходит после прохождения через промежуточные везикуло-тубулярные структуры ER-to-Golgi (ERGIC). Выход вирионов из инфицированной клетки происходит за счет экзоцитоза отпочковыванием вирусных частиц.

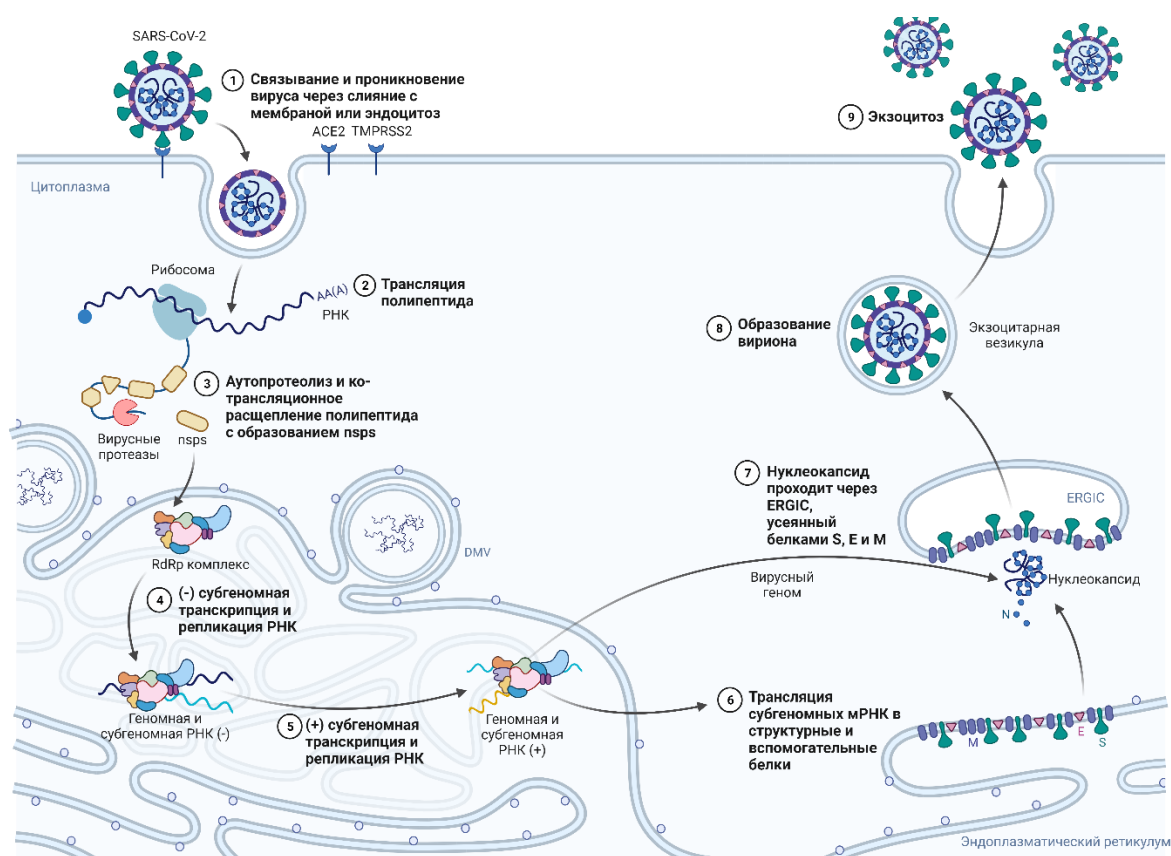


Рисунок 4 — Жизненный цикл SARS-CoV-2 (изображение создано при помощи BioRender.com)

COVID-19, заболевание, вызванное новым коронавирусом SARS-CoV-2, классифицировано как социально значимое и опасное для общества из-за его высокой заразности и потенциальной угрозы здоровью населения [44]. Основные механизмы передачи инфекции — воздушно-капельный, воздушно-пылевой и контактный (подразумевает проникновение вируса через слизистые оболочки глаз, носа, носо- и ротоглотки) [45, 46].

Симптомы заболевания варьируют от лёгкой респираторной инфекции, до проявления системного заболевания, с гипервоспалением и цитокиновым штормом, поражающим органы за пределами дыхательной системы, включая сердце, почки, печень и мозг [47, 48].

Исследования показали, что вирус SARS-CoV-2 обладает способностью длительно сохраняться в окружающей среде. На поверхностях при комнатной температуре, которая колеблется от +20 до +25 °C, вирус может оставаться

активным в высушенном состоянии до трёх суток. Если вирус находится в жидкой среде, его активность сохраняется до семи суток. Стабильность вируса также зависит от уровня рН среды. В диапазоне рН от 5 до 9 вирус остаётся стабильным до шести дней, тогда как при более крайних значениях рН 4,0 и 11,0 — его стабильность сокращается до двух дней. Температурные условия оказывают значительное влияние на жизнеспособность вируса. При низкой температуре в +4 °С вирус сохраняет свою стабильность более 14 дней. Однако при повышении температуры до +37 °С вирус полностью инактивируется в течение одного дня, при +56 °С — за 45 минут, и при +70 °С — всего за 5 минут. Кроме того, SARS-CoV-2 чувствителен к ультрафиолетовому излучению. Доза ультрафиолета не менее 25 мДж/см² эффективно инактивирует вирус. Также вирус поддается действию дезинфицирующих средств, которые используются в соответствующих рабочих концентрациях для обеспечения безопасности и предотвращения распространения инфекции [49].

Инкубационный период заболевания длится 1–14 дней, в среднем 5–7 дней (у детей 9,6 дня) [50–52]. Считается, что вирусная нагрузка при заражении во многом определяет тяжесть заболевания. Кроме того, установлено, что высокая вирусная нагрузка связана с увеличением частоты случаев вторичного инфицирования и повышением риска развития манифестных форм болезни [53].

При лабораторном исследовании образцов биологического материала выявлено, что вирусная нагрузка максимальна в носоглотке и ротоглотке — верхних дыхательных путях — на начальной стадии развития инфекции, обычно достигая пика в первую неделю болезни. Затем она увеличивается в нижних дыхательных путях, в мокроте. После проявления симптомов вирусная нагрузка уменьшается. Показано, что элиминация вируса у людей без симптомов происходит быстрее, чем у людей с симптомами [54]. По данным исследований, пациенты с ослабленным иммунитетом могут быть источником инфекции на протяжении как минимум двух месяцев [55].

Алгоритм обследования пациентов, методы лабораторной диагностики, принципы лечения пациентов с установленным диагнозом «COVID–19» и профилактика заболевания представлены во временных методических рекомендациях «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID–19)» (рекомендации постоянно обновляются, на момент написания диссертационной работы актуальной является версия от 26 октября 2023 года).

При интерпретации показателей лабораторных исследований образцов биологического материала на SARS–CoV–2 и специфические антитела следует опираться на следующие данные, представленные в **Таблице 1**.

Таблица 1 — Соответствие присутствия РНК SARS–CoV–2 в образцах биологического материала и обнаружения специфических антител фазе заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID–19).

Результат исследования			Интерпретация результата исследования
РНК	IgM/ IgA	IgG	
-	-	-	Отсутствие COVID–19 и ранее перенесенного заболевания
+	-	-	Острая фаза заболевания. Серонегативный период.
+	+	-	Острая фаза заболевания. Начало развития иммунного ответа
+	+	+	Острая фаза заболевания
-	+	+	Поздняя фаза заболевания или выздоровление, выраженный иммунный ответ
-	-	+	Перенесенное заболевание в прошлом или период выздоровления. Сформирован иммунитет к SARS–CoV–2

На **рисунке 5** представлена классификация новой коронавирусной инфекции (COVID–19) в зависимости от тяжести течения. Постановка диагноза «COVID–19, вирус идентифицирован» (код U07.1, МКБ-10) [56] осуществляется

на основе сочетания лабораторных методов исследования и анализа клинической картины.



Рисунок 5 — Классификация новой коронавирусной инфекции (COVID–19) по степени тяжести [57]

ЧДД — частота дыхательных движений

КТ (РГ) — компьютерная томография/рентгенография

SpO_2 — насыщение крови кислородом

СРБ — С-реактивный белок

qSOFA — шкала прогноза критического состояния

$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ — респираторный индекс

АД — артериальное давление

1.2. Молекулярная эпидемиология новой коронавирусной инфекции (COVID–19)

SARS–CoV–2 является достаточно быстро развивающимся РНК-содержащим вирусом: накапливает нуклеотидные мутации в течение относительно коротких периодов времени, что вместе с другими механизмами приводит к появлению различных вариантов вируса.

Генетическая последовательность вируса SARS-CoV-2, полученная из образцов биологического материала от пациентов, которые были госпитализированы в городе Ухань в конце 2019 года, служит основой для всех последующих исследований и сравнений вариантов вируса. Этот исходный вариант, известный как референсный геном Wuhan MN908947 или «дикий тип» [58], представляет собой стандарт, к которому относятся все последующие данные, полученные в результате геномного секвенирования.

Для мониторинга разнообразия вирусных вариантов проводится секвенирование с последующим депонированием последовательностей в базы данных. Базы данных геномов SARS-CoV-2 GISAID (*англ. A global initiative on sharing avian flu data*) [59] и GenBank [60] находятся в открытом доступе.

Появление новых мутаций является ожидаемым, и большинство из них синонимичные, однако также присутствуют несинонимичные мутации, приводящие к фенотипическим изменениям [61–65].

Для проведения филогенетического анализа SARS-CoV-2 исследователи используют сервисы Nexstrain [66] и Pangolin [67].

Первым вариантом, получившим статус VOC (по классификации ВОЗ), стал вариант B.1.1.7, впоследствии обозначенный как **Alpha**. Вариант **Alpha SARS-CoV-2**, обнаруженный в октябре 2020 года в Великобритании, получил широкое распространение, составив более 95% случаев в первые месяцы 2021 года.

Распространение варианта **Alpha** в Великобритании сопровождалось ростом заболеваемости [68, 69]. Наибольшее распространение варианта Alpha на территории Российской Федерации наблюдалось в 2021 году. Характерными мутациями в гене S-белка для данного варианта являлись N501Y, delHV69–70, delY144, A570D, P681H, T716I, S982A и D1118H.

Также летом 2020 года в Российской Федерации циркулировали редко встречающиеся в других странах вариант **V.1.1.317** с мутациями D138Y и S477N и субварианты **V.1.1**, включая вариант **V.1.1.397** [70].

Мутация E484K, обнаруженная 2 февраля 2021 года, встречалась в образцах биологического материала вместе с N501Y. Варианты с данной комбинацией мутаций отнесены к вариантам **501.V2** или B.1.351, **Beta** и **B.1.1.248, P.1 Gamma**; данные линии не получили заметного распространения в Российской Федерации.

Считается, что **вариант B.1.1.523** с набором мутаций F306L, S494P и E484K, тесно связанным с низкой иммунной нейтрализацией [71] и **вариант B.1.1.370.1/AT.1**, содержащий мутации P9L, D215G, delC-Y136-144, H245P, E484K, D614G, N679K, ins679GIAL, E780K в S-белке [72] могли иметь Российское происхождение. Кроме того, в Российской Федерации наблюдалась циркуляция других минорных вариантов, например, **B.1.1.129, B.1.1.407, B.1.1.373, B.1.1.397** и **B.1.1.152** [73].

B.1.617.2, **вариант Delta SARS-CoV-2**, обнаруженный в октябре 2020 года, отнесен ВОЗ к группе VOC 11 мая 2021 года. В Российской Федерации, начиная с второй половины апреля 2021 года, наблюдалось активное распространение варианта Delta SARS-CoV-2. Этот вариант быстро стал преобладающим среди всех циркулирующих и сохранял своё доминирующее положение вплоть до января 2022 года [74]. Повышенная трансмиссивность варианта Delta SARS-CoV-2 связана с мутациями в S-белке, такими как L452R, P681R и T478K и эффективность вакцин против инфекции, вызванной данным вариантом, снижена по сравнению с другими VOC, такими как Alpha и Beta [75].

24 ноября 2021 года ВОЗ сообщили о варианте **B.1.1.529 SARS-CoV-2**, обнаруженном в Южной Африке. Вариант B.1.1.529 отнесен ВОЗ к группе VOC с названием **Omicron** [76]. Первый случай заболевания, вызванный Omicron SARS-CoV-2 подтвержден в ЮАР 9 ноября 2021 года. С появлением варианта Omicron SARS-CoV-2 количество зарегистрированных случаев заболевания в этой стране резко возросло, что вызвало всеобщую обеспокоенность [56].

На территории Российской Федерации 6 декабря 2021 года выявлены первые случаи варианта Omicron SARS-CoV-2. К 20 января 2022 года в Российской Федерации наблюдалась быстрая смена доминирующего варианта

коронавируса: вариант Delta SARS-CoV-2 уступал место новому варианту Omicron SARS-CoV-2. Этот переход сопровождался значительным увеличением числа новых случаев заболевания, достигая пиковых значений, когда в день фиксировалось свыше 200 тысяч заражений. Доля варианта Delta SARS-CoV-2 при этом составила 56%, а варианта Omicron SARS-CoV-2 — 43% от всех выявленных случаев заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). К началу февраля 2022 года вариант Omicron SARS-CoV-2 стал доминирующим на территории Российской Федерации [77].

Вариант Omicron SARS-CoV-2 содержит более 30 мутаций в гене S-белка и 15 мутаций в рецептор-связывающем домене (RBD), по некоторым данным повышающие контагиозность вируса и снижающие эффективность специфических антител [56]. Значительные отличия в генетической последовательности возбудителя позволили именно в этот период времени выявить основные мишени для его дифференцирования от предыдущих вариантов.

Дальнейшая эволюция варианта Omicron SARS-CoV-2 и его деление на сублинии к ноябрю 2022 года определила субвариант BA.5 как преобладающий не только на территории Российской Федерации, но и во многих других странах, однако, с появлением рекомбинантных вариантов XBB SARS-CoV-2, его доля стала постепенно снижаться.

Подлинии варианта Omicron SARS-CoV-2 содержат сложный профиль мутаций, обеспечивающий лучшее сродство к рецептору. Появление новых сублиний и рекомбинантных вариантов Omicron SARS-CoV-2, таких как XD, XE, XF, XL, XN, XP, XQ, XU и XV, свидетельствует об активном процессе эволюции вируса. Появление новых подвариантов Omicron SARS-CoV-2 прогнозируется и в дальнейшем, до появления варианта, значительно отличающегося от циркулирующего в настоящее время [78].

По сравнению с другими VOC- вариантами SARS-CoV-2, вариант Omicron SARS-CoV-2 и его сублинии проявляют повышенную трансмиссивность и иммунное ускользание от нейтрализующих антител,

выработанных в результате предыдущей инфекции или вакцинации, и вызывают повторные случаи заболевания, а также манифестные формы среди вакцинированных [79].

На **рисунке 6** показаны филогенетические отношения клад SARS-CoV-2. Первоначально Omicron SARS-CoV-2 включал в себя три основные изолированные подлинии (BA.1, BA.2 и BA.3), обнаруженные почти одновременно.

Позднее выявлены еще две обширные сублинии - BA.4 и BA.5, а также множество новых подвариантов внутри BA.1 и BA.2.

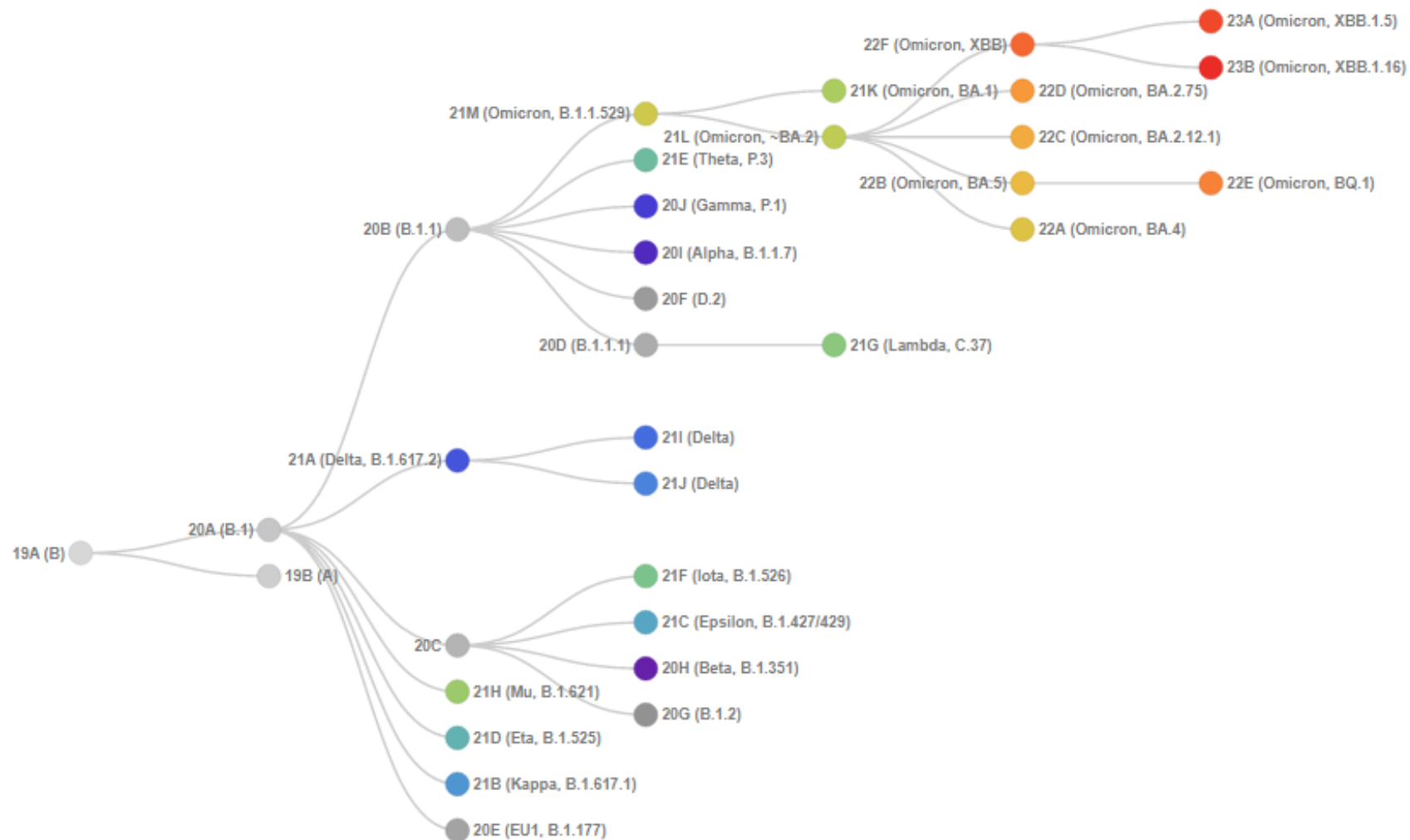


Рисунок 6 — Филогенетические отношения клад SARS-CoV-2 в 2020-2022 гг., определенные при помощи сервиса CoVariants [80]

ВА.4 и ВА.5 происходят от ВА.2, и их профили мутаций в гене белка S наиболее тесно связаны с этим вариантом. В дополнение к мутациям, характерных для ВА.2, ВА.4 и ВА.5 имеют дополнительные мутации, delHV69–70, L452R, F486V и аминокислоту дикого типа в положении Q493 [81]. ВА.4 и ВА.5 имеют сходный мутационный паттерн в 5'-области генома (от ORF1ab до E), но имеют расхождение в 3'-области (от M до 3'-конца генома) [82].

Предполагается, что ВА.4 и ВА.5 могли дивергироваться в результате рекомбинации с разрывом между генами E и M [82]. Важно отметить, что, несмотря на идентичность последовательности гена S-белка, различия в других областях генома, по-видимому, придают трансмиссивное преимущество варианту ВА.5, который фактически вытеснил ВА.4 во всем мире.

Количество сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 (B.1.1.529), впервые выявленного в ноябре 2021 года в ЮАР, стремительно растет: по состоянию на ноябрь 2022 года в мире выявлено более 320 (данные GISAID), в Российской Федерации — более 250. В Российской Федерации, как и в других странах, в этот период времени чаще всего встречалась субвариант ВА.5 SARS-CoV-2, при этом его доля постепенно снижалась.

Изменения в нуклеотидной последовательности генома SARS-CoV-2 могут быть идентифицированы различными способами. Методы секвенирования следующего поколения являются основным инструментом для обнаружения и отслеживания вариантов SARS-CoV-2, позволяя с помощью секвенирования всего генома получить наиболее полную информацию [83]. Во время вспышек инфекционных заболеваний с неизвестной этиологией применяются технологии секвенирования, позволяющие определить все известные вирусные патогены [84]. Однако, в случае низкой вирусной нагрузки в образцах биологического материала, чувствительность данных методов может быть снижена, также этот подход может быть достаточно трудоемким, требует дорогостоящего оборудования и реагентов и может занимать много времени.

Стратегия использования секвенирования фрагментов гена (например, секвенирования по методу Сэнгера) [84] или скрининговых методов, основанных

на ПЦР–РВ для классификации подтипов вируса, зарекомендовала себя успешной [85–87].

1.3. Методы лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции (COVID–19) и определения вариантов SARS–CoV–2

В настоящее время метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией вирусной РНК считается «золотым стандартом» диагностики новой коронавирусной инфекции [88, 89], [90]. Также важен широкий охват молекулярно-генетическим тестированием населения для эффективного проведения противоэпидемических мероприятий [91, 92].

По состоянию на 24 июля 2020 года в Российской Федерации зарегистрировано 136 наборов реагентов для выявления SARS–CoV–2 и антител к нему [93].

Учреждениями Роспотребнадзора и медицинскими организациями на 12 ноября 2022 проведено более 318,4 миллионов лабораторных исследований на наличие нового коронавируса в материале от людей [94].

Лабораторная диагностика новой коронавирусной инфекции (COVID- 19) в Российской Федерации проводится в соответствии с МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID–19» от 30 марта 2020 года и МР 3.1.2.0304-22 «Лабораторная диагностика острых респираторных инфекций, в том числе гриппа и COVID–19 в условиях их смешанной циркуляции».

В соответствии с классификацией патогенности, представленной в приложении № 1 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» возбудитель новой коронавирусной инфекции классифицируется как агент II группы патогенности.

Это означает, что исследования, направленные на выявление антигенов данных микроорганизмов в крови человека, которые проводятся без цели

накопления самого возбудителя или антител к нему, относятся к работам с патогенными биологическими агентами III группы патогенности. Таким образом, лаборатории, выполняющие такие тесты, должны соответствовать требованиям СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» от 1 августа 2009 года.

Кроме того, процедуры забора диагностического материала, его упаковки, маркировки и транспортировки должны проводиться в строгом соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

В качестве образцов биологического материала используют:

- мазки из носоглотки и ротоглотки, а также мокроту, эндотрахеальный аспират или бронхоальвеолярный лаваж. Сочетание мазков из носоглотки и ротоглотки одного и того же пациента значительно увеличивает вероятность обнаружения вирусов, тем самым повышая точность и достоверность диагностических результатов [94],
- сыворотка крови используется для проведения серологических исследований, для выявления антител, указывающих на иммунный ответ организма на инфекцию,
- аутопаты легких, трахеи и селезенки отбираются при посмертной диагностике.

Основными сложностями, влияющими на результат при проведении исследований, могут являться ошибки преаналитического (подготовка пациента к исследованию, сбор, маркировка образцов биологического материала, транспортировка и хранение) [95], аналитического (наличие контаминации в лаборатории [96], технические ошибки) и постаналитического этапов (запись результатов и их интерпретация) [97].

Для лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции (COVID–19) применяются разнообразные методы, которые позволяют

определить наличие вируса и стадию инфекционного процесса у пациента. Среди них выделяются:

непрямые методы (включают иммунохимические анализы, которые обнаруживают иммуноглобулины классов IgA, IgM и IgG, специфичные к вирусу SARS-CoV-2, позволяющие определять различные фазы инфекционного процесса):

- серонегативная фаза — начальный период, когда антитела еще не образовались или их уровень слишком низок для обнаружения,
- активная фаза — характеризуется обнаружением повышенного уровня IgA и/или IgM в одном образце или увеличением уровня IgG в парных сыворотках, взятых с интервалом в 2-4 недели,
- фаза реконвалесценции — отмечается снижение концентрации IgA и IgM при одновременном сохранении уровня IgG,
- перенесенная инфекция — стойкое присутствие IgG без увеличения их уровня в последующих образцах сыворотки и отсутствие IgA и IgM.

прямые методы включают в себя:

- ПЦР, которая позволяет обнаружить РНК вируса SARS-CoV-2,
- иммунохроматографический анализ для выявления антигенов SARS-CoV-2,
- метод петлевой изотермической амплификации нуклеиновых кислот (LAMP), для обнаружения РНК SARS-CoV-2 в образцах биологического материала.

Также при проведении эпидемиологических исследований применяется секвенирование, не являющееся рутинным методом исследования.

Как видно из **рисунка 7**, при лабораторном тестировании следует учитывать день заболевания, т.к. ПЦР-тестирование эффективно при начальных стадиях. РНК SARS-CoV-2 может обнаруживаться в течение 5-10 дней от начала заболевания, однако не исключены также случаи длительного выделения возбудителя в обоих легких в течение четырех месяцев и в желудочно-кишечном тракте в течение двух месяцев [98, 99].

Антитела к коронавирусу начинают вырабатываться через 1-2 недели от начала заболевания, достигая максимальных уровней на 3-4 неделе.

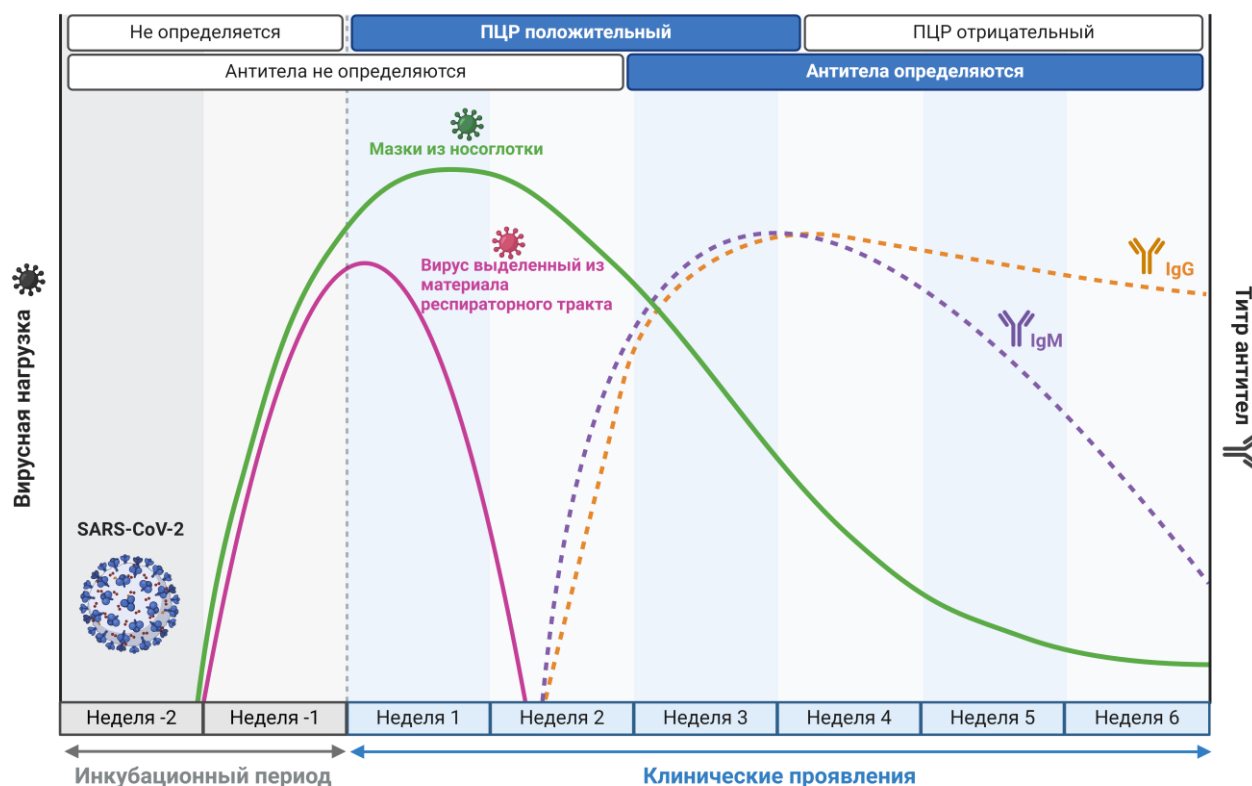


Рисунок 7 — Динамика лабораторных маркеров при развитии заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) (изображение создано при помощи BioRender.com)

На момент написания диссертационной работы имеются сведения о нескольких зарегистрированных наборах реагентов, предназначенных для генотипирования SARS–CoV–2 (набор для выявления SARS–CoV–2 генетических линий Alpha, Beta / Gamma и Delta «АмплиТест SARS–CoV–2 VOC v.2» (ФГБУ "ЦСП" ФМБА России); РеалБест РНК SARS–CoV–2/Омикрон (АО «Вектор-Бест», Россия) и др.), также опубликованы результаты работы в данном направлении, как отечественных авторов [100–102], так и зарубежных [86, 87].

В период разработки лабораторной методики, которая включала идентификацию шести ключевых мутаций SARS–CoV–2, не было доступно

широкомасштабной информации о применении подобных методов. Для разработки выбраны две мутации S-белка варианта Delta (B.1.617.2) SARS-CoV-2: L452R и P681R, а также четыре мутации S-белка варианта Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2: delHV69–70, N501Y, delVYY143–145, Ins214EPE.

Отсутствовали данные о том, как методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР–РВ), используемые для типирования различных вариантов SARS-CoV-2, применяются в молекулярно-генетическом мониторинге на практике [74].

1.4. Молекулярно-генетический мониторинг за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19) на территории Российской Федерации

Развитие эпидемиологического надзора и контроля связано с опасностью развития эпидемий новых и вновь возникающих инфекций (*англ. emerging-reemerging infectious diseases*), которые часто характеризуются внезапным появлением, высоким уровнем смертности и отсутствием специфической терапии и диагностики, что приводит к необходимости разработки новых подходов к организации эпидемиологического надзора и эпидемиологического контроля [5], [103, 104].

Эпидемиологический надзор является важнейшим аспектом теории и практики эпидемиологической науки. Отечественные специалисты, анализируя и систематизируя накопленные данные и результаты теоретических исследований, внесли значительный вклад в понимание основных аспектов эпидемического процесса. Среди их достижений — теория механизма передачи возбудителей инфекций Л.В. Громашевского (1941 г.), [105] учение о природной очаговости инфекционных болезней Е.Н. Павловского (1939 г.) [106], теория саморегуляции паразитарных систем В.Д. Белякова (1985 г.) [107], социально-

экологическая концепция Б.Л. Черкасского (1988 г.) [108] и научные положения В.И. Покровского [109].

Л.В. Громашевский обозначил эпидемический процесс как попеременное взаимодействие возбудителя инфекции с организмом хозяина и циркуляцией во внешней среде. Подобное взаимодействие возникает и поддерживается только при наличии трех составляющих: источника инфекции, механизма передачи возбудителя и восприимчивости популяции к этому возбудителю.

Теория академика В.Д. Белякова предлагает уникальный взгляд на механизмы, лежащие в основе развития эпидемических процессов. Согласно этой теории, ключевую роль играют фазовые изменения в гетерогенности биологических характеристик, возникающие в результате взаимодействия между популяциями возбудителя болезни и человеческими популяциями. Эти изменения являются основой для «теории саморегуляции паразитарных систем», которая подчеркивает важность обратных связей в процессе саморегуляции. Эти связи не являются статичными; они динамично изменяются под влиянием различных социальных и природных факторов, что позволяет системе адаптироваться и реагировать на внешние и внутренние вызовы [107].

В.Д. Беляков обозначал эпидемиологический надзор как управленческую систему, при которой подразумевается динамическая оценка тенденций развития эпидемического процесса в пространстве и времени. Данный подход позволяет своевременно вмешиваться в ход эпидемического процесса, для снижения заболеваемости среди населения и ликвидации отдельных инфекций [110]. В этом определении цели эпидемиологического надзора совпадают с целями противоэпидемической системы в целом.

Согласно определению Б.Л. Черкасского, эпидемиологический надзор представляет собой систему непрерывного и комплексного отслеживания эпидемического процесса конкретной болезни в определённом регионе, целью которого является улучшение и повышение эффективности профилактических и противоэпидемических мер [108].

По определению В.И. Покровского, эпидемиологический надзор — это система сбора и использования информации для профилактики инфекционных заболеваний, которая позволяет всесторонне отслеживать эпидемический процесс и его детерминанты (скрининг) и оперативно реагировать на любые изменения в его развитии (мониторинг) [109].

Современная концепция эпидемиологического надзора опирается на теорию о механизме саморегуляции паразитарных систем. В данной концепции эпидемиологический надзор определяется как непрерывная оценка состояния и тенденций развития эпидемического процесса для своевременного принятия управленческих решений, обеспечивающих проведение адекватных ситуации мероприятий.

В целом, имеется много совпадений основ алгоритмов эпидемиологического надзора между российскими и зарубежными специалистами, однако имеются и расхождения. Так, например, ВОЗ определяет эпидемиологический надзор как систематический и непрерывный процесс сбора, сопоставления, анализа данных и своевременного распространения информации среди заинтересованных сторон для принятия обоснованных решений [111]. В Российской Федерации эпидемиологический надзор считается инструментом изучения эпидемического процесса, представляющего собой совокупность биологических, природных и социальных факторов.

Объектом надзора может быть не только инфекционная заболеваемость, но и другие нарушения здоровья населения, а также обуславливающие их факторы (санитарно-эпидемиологический надзор, эпидемиологический надзор за неинфекционными заболеваниями и т.д.).

Цель эпидемиологического надзора заключается в сборе достаточного количества объективных данных, которые необходимы для эффективного планирования, реализации и адаптации мер по контролю за инфекционными (паразитарными) заболеваниями.

Задачами эпидемиологического надзора являются:

- мониторинг установленных параметров надзора, сбор и учёт информации,
- постепенное движение информации «снизу-вверх» (от нижестоящих к вышестоящим уровням),
- процесс обмена информацией между участниками одного уровня (предоставление данных заинтересованным органам, учреждениям и отдельным лицам),
- анализ эпидемиологической ситуации и оценка данных,
- оценка эпидемиологической обстановки и формулирование эпидемиологического диагноза,
- анализ результативности и действенности реализуемых профилактических и противоэпидемических мер,
- разработка прогноза развития эпидемиологической ситуации,
- обмен информацией в форме обратной связи, при которой данные передаются от высших уровней контроля к низшим,
- внесение изменений в программы эпидемиологического надзора.

В настоящее время специалисты в области эпидемиологии применяют следующие структуры систем эпидемиологического надзора. Система, представленная В.Д. Беляковым, делит систему эпидемиологического надзора на три взаимосвязанные подсистемы:

- информационную (сбор информации о текущей ситуации и особенностях развития эпидемического процесса, а также о факторах, которые способствуют его распространению на определённой территории),
- диагностическую (эпидемиологическая диагностика и прогнозирование эпидемиологической ситуации),
- управленческую (на основе оценки результатов эпидемиологической диагностики встраиваются соответствующие управленческие решения, такие как приказы, постановления, информационные письма, разрабатываются планы мероприятий и др.).

Структура системы эпидемиологического надзора, предложенная Б.Л. Черкасским, рассматривает эпидемиологический надзор как отдельную подсистему в системе управления эпидемическим процессом, представленной на рисунке 8.



Рисунок 8 — Схематическое изображение механизма управления эпидемическим процессом, согласно Б.Л. Черкасскому

Эпидемиологическая диагностика (по Б.Л. Черкасскому) — это раздел эпидемиологии отражающий последовательные этапы процесса оценки эпидемиологической ситуации и методы, применяемые при этом. Процесс определения эпидемиологического диагноза производится через анализ и синтез эпидемиологических данных. Эпидемиологическая диагностика показывает причины, условия и механизмы появления эпидемиологической ситуации в определенный период времени, на конкретной территории, среди установленных групп населения. Эпидемиологическая диагностика проводится для повышения эффективности профилактических и противоэпидемических мероприятий, составления прогноза развития эпидемиологической ситуации, оптимизации профилактических и противоэпидемических мер, а также для разработки эпидемиологического прогноза.

Во время эпидемиологической диагностики используют описательные (дескриптивные) методы для изучения проявлений эпидемического процесса:

- ретроспективный эпидемиологический анализ,
- оперативный эпидемиологический анализ, позволяющий установить структуру, интенсивность, динамику заболеваемости, а также выявить территории, время, группы и контингенты эпидемиологического риска.

Таким образом, результаты эпидемиологического анализа позволяют выдвинуть гипотезы о причинах и условиях развития эпидемического процесса и являются обязательным элементом надзора.

В соответствии с Глобальной стратегией геномного эпидемиологического надзора за возбудителями болезней, обладающих пандемическим и эпидемическим потенциалом (2022–2032 гг.), составленной ВОЗ, требуется усиление мер по готовности к чрезвычайным ситуациям, наращивание потенциала и соответствующей инфраструктуры для проведения лабораторных исследований. В настоящее время только треть стран мира, включая Российскую Федерацию, могут проводить геномное секвенирование и регулярно используют эту технологию. Остальные страны должны развивать свои возможности для осуществления геномного эпидемиологического надзора за возбудителями инфекций [112].

ВОЗ разработала стратегию эпидемиологического надзора на 2022–2032 гг., опираясь на опыт борьбы с пандемией COVID–19. Эта стратегия подчёркивает важность геномики для системы общественного здравоохранения, поскольку результаты геномных исследований можно применять в разных областях медицины.

Стратегия не фокусируется на одном конкретном источнике заболевания или определённой эпидемиологической опасности. Задача при этом — создать общий подход к применению геномики как вспомогательного средства для достижения целей общественного здравоохранения в области обеспечения готовности и реагирования на широкий спектр пандемий и эпидемий.

В 2022 году определены основные векторы развития санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, принимающие во внимание изменения в подходах к эпидемиологическому надзору и контролю.

Создание системы молекулярно-генетического мониторинга в период пандемии COVID–19 организовано под руководством главы Роспотребнадзора А. Ю. Поповой. Благодаря чётко поставленным задачам и богатому опыту борьбы с эпидемиями, в Российской Федерации успешно применена стратегия быстрого реагирования на распространение коронавируса. Это позволило избежать перегрузки системы здравоохранения, сохранить множество жизней и минимизировать широкомасштабные негативные последствия для всех аспектов жизни общества.

В соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 23 марта 2021 года №448 «Об утверждении Временного порядка предоставления данных расшифровки генома возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19)» для обеспечения оперативной оценки динамики распространения вариантов SARS–CoV–2, как известных, так и новых, циркулирующих на территории страны, создана и введена в практику Российская Платформа агрегации информации о геномах вирусов (Virus Genome Aggregator of Russia — VGARus), содержащая информацию о нуклеотидных последовательностях SARS–CoV–2 и их мутациях, распространённых в субъектах Российской Федерации, и может быть использована для хранения, систематизации и выборки данных для выявления мутаций и определения вариантов вируса. Программное обеспечение, интегрированное в платформу VGARus, позволяет анализировать результаты секвенирования, определять вероятный вариант вируса, формировать стандартизированные отчёты, загружать образцы, предназначенные для дальнейшего секвенирования. Платформа VGARus позволяет непрерывно отслеживать мутации SARS–CoV–2, обеспечивая важную информацию для идентификации новых вариантов и анализа их распространения в России.

Актуальная информация о циркуляции возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19) и использование данных платформы VGARus позволяют проводить оперативный и ретроспективный анализ распространения генетических вариантов SARS–CoV–2.

Создан научный Консорциум, в состав которого вошли организации из Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения Российской Федерации и других учреждений. На данный момент в системе работает более 150 организаций, многие из которых занимаются массовым секвенированием геномов SARS-CoV-2 и загружают полученные последовательности в VGARus. Перед этим проводится оценка качества образцов, которая обычно включает в себя ПЦР-анализ для определения вирусной нагрузки и проверки пригодности образца для полногеномного секвенирования нового поколения (NGS).

Алгоритмы базы данных анализируют мутации и классифицируют варианты SARS-CoV-2 в каждой загруженной последовательности в автоматическом режиме с проверкой корректности. Для обработки геномной информации используют программы Pangolin и V-TRACE, разработанные специалистами ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Анализ проводится автоматически с последующей обработкой данных методами биоинформатики.

В системе каждый образец представлен не только нуклеотидной последовательностью и техническими данными, но и информацией о месте и времени сбора биологического материала. Кроме того, для каждого обследованного человека указываются следующие данные: пол, регион проживания, возраст, статус вакцинации, предполагаемое количество контактов, наличие сопутствующих заболеваний, зарубежные поездки и прочая информация. Эти данные важны для эпидемиологического анализа, поскольку они позволяют оценивать ситуацию как оперативно, так и ретроспективно.

При внесении образцов в базу данных им автоматически присваивается внутренний регистрационный номер. Затем в данные по образцу можно внести информацию о последовательности генома SARS-CoV-2. Кроме того, регистрируются технические подробности: информация об учреждениях, занимавшихся сбором и подготовкой образцов, дата отправки и получения пробы, дата добавления сведений и создания текущей записи в системе. В настоящее время национальная база данных VGARus, включающая обширный

набор последовательностей SARS-CoV-2, является инструментом для мониторинга и анализа эволюции пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19) [112].

Пандемия COVID-19 не только указала на недостатки систем здравоохранения большинства стран, но и ускорила научный прогресс во множестве областей медицинских и биологических наук. Распространение новой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, привело к созданию инновационных инструментов и технологий в различных сферах деятельности и ускорило внедрение геномных исследований в практику общественного здравоохранения.

Вышеизложенное подчёркивает актуальность разработки новых подходов к организации эпидемиологического анализа и прогнозирования развития эпидемического процесса новой коронавирусной инфекции (COVID-19) с применением инновационных платформенных решений и цифровых технологий, что обусловлено значимостью проведения данного исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационное исследование выполнено на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в 2021–2022 гг. в рамках НИР АААА–А21–121011890131–4 «Научно-методическое обоснование системы эпидемиологического надзора и профилактики заболеваний, вызываемых SARS-подобными коронавирусами», Поручения Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 20 января 2022 года №02/1167-2022-27 «О молекулярно-генетическом мониторинге штаммов новой коронавирусной инфекции» и Распоряжения Правительства Российской Федерации от 10 февраля 2022 года № 213–р.

В работе осуществлен анализ данных официальной статистики Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В диссертационной работе использованы эпидемиологический, молекулярно-биологические и статистические методы, представленные в **таблице 2.**

Таблица 2 - Материалы и методы исследования

Направление исследования	Материалы исследования	Количество	Методы и инструменты исследования
<p>– Оценка уровня и структуры заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) на территории Российской Федерации,</p> <p>– Молекулярно-генетический мониторинг распространения изолятов SARS–COV–2</p>	Случаи заболевания населения	21 600 553	<p>– Эпидемиологический метод (ретроспективное описательное эпидемиологическое исследование),</p> <p>– Статистические методы (методы описательной статистики,</p> <p>– кросскорреляционный анализ, регрессионный анализ (Microsoft Excel, онлайн калькулятор EPITOOLS, Matplotlib))</p>
	Отчет Роспотребнадзора №970 «Информация о случаях инфекционных заболеваний у лиц с подозрением на новую коронавирусную инфекцию»	764 формы	
	Отчет о результатах молекулярно-генетического мониторинга изолятов SARS–CoV–2 на территории Российской Федерации	379 формы	
	Отчётная форма 1248 «Результаты молекулярно-генетического мониторинга изолятов SARS–CoV–2»	361 форма	
	Аналитические материалы о результатах молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции, циркулирующих в Российской Федерации	67 форм	
	Эпидемиологический анализ заболеваемости COVID–19 и структуры циркулирующих	64 формы	

	геновариантов SARS–CoV–2 на территории Российской Федерации		
	Эпидемиологический анализ заболеваемости COVID–19 и структуры циркулирующих геновариантов SARS–CoV–2 на территории Центрального федерального округа	35 форм	
Разработка лабораторных методик для дифференцирования вариантов Delta и Omicron SARS–CoV–2 и субвариантов Omicron SARS–CoV–2	Выбор оптимальных условий амплификации и валидация методик	Более 200 экспериментов	– Молекулярно-биологические методы (ПЦР в режиме реального времени, пиросеквенирование, секвенирование фрагментов генов по методу Сэнгера, полногеномное секвенирование), – Статистические методы (методы описательной статистики (Microsoft Excel, онлайн калькулятор EPITOOLS))
	Апробация методик на образцах биологического материала с подтвержденным наличием РНК SARS- CoV- 2	1604 образца биологического материала	
	Постановка исследований региональными лабораториями с использованием разработанных методик	150 000	

Эпидемиологический метод

В диссертационной работе проведено ретроспективное описательное эпидемиологическое исследование. Приняты во внимание работы отечественных учёных-эпидемиологов: Черкасского Б.Л. [113], Белякова В.Д. [114] и Покровского В.И. [115], [21].

Ретроспективный эпидемиологический анализ

Для изучения проявлений эпидемического процесса проведен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) с 30 марта 2020 года по 26 декабря 2022 года в Российской Федерации, с зарегистрированными 21 600 553 случаями заболевания населения. В исследовании использованы материалы Платформы агрегирования результатов расшифровок генома возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний (VGARus) [116].

Информация о пациентах (возраст, пол, форма заболевания, дата заболевания) получена из базы данных, сформированной на основе материалов формы отчета Роспотребнадзора № 970 «Информация о случаях инфекционных заболеваний у лиц с подозрением на новую коронавирусную инфекцию». Все результаты, занесенные в базу данных, подтверждены лабораторно с постановкой диагноза «COVID–19, вирус идентифицирован» (МКБ-10 код U07.1), независимо от тяжести клинических признаков или симптомов. Сведения о тяжести заболевания и формах заболевания получены из отчетной формы №1035 «Мониторинг о количестве заболевших коронавирусной инфекцией, в том числе внебольничными пневмониями, и летальных исходов». В систему мониторинга включены все территории субъектов Российской Федерации.

В рамках исследования изучались показатели заболеваемости, темпы роста новых случаев, распределение показателей заболеваемости по полу и возрасту, тяжесть заболевания и клинические формы новой коронавирусной инфекции (COVID–19) среди населения Российской Федерации с учетом циркулирующего варианта SARS–CoV–2.

Расчет заболеваемости проводили по формуле:

$$\text{Заболеваемость COVID-19 на территории РФ} = \frac{\text{Число подтвержденных случаев COVID-19}}{\text{Численность населения}} \times 100\,000 \quad (1)$$

Абсолютный прирост заболеваемости рассчитывался как разность между последующим и предыдущим уровнем. Темп прироста рассчитывался как отношение абсолютного прироста (снижения) к предыдущему уровню, умноженным на 100%.

Для расчета коэффициента корреляции использовали метод Пирсона. Сильная связь представлена коэффициентом от 0,7 до 0,99, средняя — от 0,3 до 0,69, слабая — до 0,29. При нулевом значении коэффициента связи отсутствуют.

Для построения линии тренда использовали регрессионный анализ с использованием функций Microsoft Excel. Линия тренда построена по линейному уравнению:

$$y = ax + b, \text{ где} \quad (2)$$

x — нумерация временных отрезков,

b — ожидаемый показатель заболеваемости, согласно уравнению аппроксимации, при ($x = 0$),

a — коэффициент наклона линии тренда.

Описательно-аналитические методы

Для решения поставленных задач проведен анализ следующих форм, представленных в **таблице 3**. В исследовании учтены такие параметры как: уровни заболеваемости, распределение показателей по понедельно, характеристика групп по возрастам, распределение заболевших по полу и тяжести заболеваемости.

Таблица 3 — Источники данных и их количество при использовании описательно- аналитических методов

Наименование	Количество
Отчет Роспотребнадзора № 970 «Информация о случаях инфекционных заболеваний у лиц с подозрением на новую коронавирусную инфекцию»	764 формы
Отчет о результатах молекулярно-генетического мониторинга изолятов SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации	379 формы
Отчётная форма 1248 «Результаты молекулярно-генетического мониторинга изолятов SARS-CoV-2»	361 форма
Аналитические материалы о результатах молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции, циркулирующих в Российской Федерации	67 форм
Эпидемиологический анализ заболеваемости COVID-19 и структуры циркулирующих геновариантов SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации	64 формы
Эпидемиологический анализ заболеваемости COVID-19 и структуры циркулирующих геновариантов SARS-CoV-2 на территории Центрального федерального округа	35 форм

Молекулярно-биологические методы

Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции (ОТ)

В рамках данного исследования для выделения РНК SARS-CoV-2 из мазков/отделяемого носоглотки и ротоглотки использовали набор реагентов РИБО-преп (Amplisens®, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, Россия).

Для идентификации SARS-CoV-2 с использованием метода ПЦР-РВ использовали набор реагентов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® COVID-19-FL. Выявление и количественное определение РНК SARS-CoV-2» (Amplisens®, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, Россия).

Реакцию ОТ проводили с использованием набора реагентов РЕВЕРТА–L (Amplisens®, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, Россия).

Комплементарная ДНК (кДНК), полученная после выделения РНК и проведения реакции ОТ получена от Лаборатории Молекулярных Методов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для разработки методик в данном исследовании получены обезличенные образцы биологического материала, взятые с потоковых исследований. Образцы для исследования отбирались только с подтвержденным наличием РНК SARS–CoV–2.

Определение первичной нуклеотидной последовательности методами секвенирования

Образцы, с подтвержденным наличием выбранных мутаций S-гена SARS–CoV–2 методом секвенирования нового поколения (*англ.* next generation sequencing, NGS) получены от Лаборатории геномных исследований ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

При проведении полногеномного секвенирования использовали модифицированную панель ARTIC v.3.0, модифицированную с учетом новых геномных изменений, а также панель праймеров для секвенирования только гена S-белка [117]. Для указанных исследований использованы коммерческие решения, такие как набор для подготовки библиотеки РНК ATOPlex от MGI и набор Midnight от ONT (Oxford Nanopore Technologies, Оксфорд, Великобритания).

Образцы с подтвержденным наличием выбранных мутаций S-гена SARS–CoV–2 методом секвенирования фрагментов генов по методу Сэнгера получены от Научной группы генной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Секвенирование фрагментов генов проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе 3500× Genetic Analyzer (Applied Biosystems,

Waltham, MA, США) с использованием реагентов, рекомендованных производителем.

Для данной работы использована панель праймеров для амплификации фрагментов S-гена SARS-CoV-2, разработанная А.С. Черкашиной [118]. Характерные аминокислотные замены вариантов SARS-CoV-2 определяли при секвенировании следующих фрагментов гена S-белка от 21 574 до 22 115 п.н. (5–185 а.о.) и от 22 790 до 23 302 п.н. (410–580 а.о.).

Для классификации вариантов использовали Pangolin [119]. Анализ полученных последовательностей проводился с использованием программного обеспечения GEM: CoV-2 (данное программное обеспечение предназначено для анализа и обработки фрагментов нуклеотидных последовательностей для выявления мутаций в геноме SARS-CoV-2) и с применением инструментов платформы VGARus [4].

Программное обеспечение GEM: CoV-2 анализирует хроматограммы последовательности и создает список мутаций по сравнению с эталонной последовательностью Wuhan MN908947.

Пиросеквенирование для валидации разработанных методик проведено непосредственно автором в Лаборатории молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора на приборе PyroMark Q24 (QIAGEN, Hilden, Germany) с использованием реагентов, рекомендованных производителем.

Метод ПЦР–РВ

Генотипирование вариантов SARS-CoV-2 Delta и Omicron проводили при помощи разработанной лабораторной методики, основанной на применении метода ПЦР–РВ [9], [120].

Диагностические характеристики метода ПЦР–РВ определяли с использованием формул:

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{\text{ИП} + \text{ЛО}} \quad (3)$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИО}}{\text{ИО} + \text{ЛП}}, \text{ где} \quad (4)$$

ИП — истинно положительные результаты (число положительных образцов, определенных и ПЦР–РВ, и секвенированием),

ЛО — ложноотрицательные результаты (число образцов, определенных как отрицательные в ПЦР–РВ, но положительные секвенированием),

ИО — истинно отрицательные результаты (число образцов, определенных как отрицательные и в ПЦР–РВ, и при секвенировании),

ЛП — ложноположительные результаты (число образцов, определенных как положительные в ПЦР–РВ, но отрицательные при секвенировании).

Метод ПЦР, являясь прямым методом диагностики, позволяет увеличивать количество копий необходимого фрагмента исходной матрицы. ПЦР применяется для решения различных задач, в том числе при диагностике инфекционных болезней, за счет обнаружения специфичных для возбудителя инфекции участки генома. К достоинствам метода можно отнести высокую аналитическую чувствительность и специфичность при простоте проведения исследования [90].

Цикличность ПЦР достигается путем многократного (от 40 до 45 раз) последовательного повторения шагов инкубации реакционной смеси при температурах: 90–95°C (денатурация ДНК/кДНК), 50–65°C (отжиг праймеров) и 60–72°C (элонгация цепи ДНК).

Исследование образцов биологического материала с использованием разработанных методик состоит из следующих этапов:

- экстракция нуклеиновых кислот из образцов биологического материала (включая автоматизированные способы);

– получение кДНК в реакции ОТ (проводится отдельным этапом в методике дифференцирования вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2. Важно отметить, что кДНК при этом может храниться без замораживания при температуре от 2°C до 8°C в течение недели и продолжительнее при температуре от -24°C до -16°C в течение 6 месяцев или при температуре не выше -68°C в течение года. Также, допускается однократное повторное замораживание кДНК. В методике дифференцирования сублиний Omicron SARS-CoV-2 реакция ОТ совмещена с мультиплексным анализом и не требует отдельного проведения;

– амплификация кДНК при помощи специфичных к выбранным мишеням праймеров в присутствии флуоресцентно меченных зондов на приборах роторного или планшетного типа в режиме реального времени;

– анализ и интерпретация результатов [121].

Для получения более точных результатов, помимо положительных контролей, использовали образцы, с подтвержденным методом секвенирования (как фрагментов генов, так и полногеномным) наличием или отсутствием соответствующих мутаций и отрицательный (TE-буфер) контроль.

В качестве положительных контрольных образцов использовали клонированные в плазмидный вектор pGEM-T ампликоны (выполнено Научной группой генной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Порядок работы и правила интерпретации результатов для образцов, исследованных с января по июнь 2022 года представлены в разработанных и утвержденных Методических рекомендациях МР 3.1.0302-22 «Методика определения геновариантов «Омикрон» и «Дельта» SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени» от 10 октября 2022 года.

Интерпретация результатов для образцов, исследованных с июня по декабрь 2022 года, полученных при использовании оптимизированной методики для идентификации сублиний Omicron SARS-CoV-2 представлена в статье автора и др. [120].

Статистические методы

Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Office Excel и библиотеки Python (Pandas [122], Numpy [123]). Доверительный интервал (95% ДИ) рассчитывался с использованием точного метода Клоппера-Пирсона (онлайн калькулятор EPITOOLS [124]).

Визуализация представленных данных проводилась с использованием Matplotlib [125], Plotly [126] и при помощи программы Microsoft Office Excel.

ГЛАВА 3. ДИНАМИКА УРОВНЯ И СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID–19 В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ И Г. МОСКВЕ В 2020–2022 ГГ.

В контексте проведенного исследования осуществлен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) на территории Российской Федерации, включая Московскую область и г. Москва, в интервале времени с 2020 по 2022 год. В течение этого периода зарегистрировано 21 600 553 случая заболевания COVID–19.

С учетом того, что новая коронавирусная инфекция (COVID–19) появилась в марте 2020 года, на момент написания диссертационной работы не предоставляется возможным корректно оценить цикличность и сезонность данного заболевания. Однако, есть предположения, что новая коронавирусная инфекция (COVID–19) в будущем может охарактеризоваться сезонностью [74], [103], [127].

На **рисунке 9** понедельно представлены показатели заболеваемости в Российской Федерации в 2020–2022 гг. по данным отчетной формы №1035 «Мониторинг о количестве заболевших коронавирусной инфекцией, в том числе внебольничными пневмониями, и летальных исходов».

Анализ данных официальных статистических отчетных форм за период с 2020 года по 2022 год выявил наличие шести эпидемических подъемов заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19). При агрегации данных заболеваемости населения новой коронавирусной инфекцией по неделям, определены следующие эпидемические периоды (6 восходящих и 6 нисходящих компонент): **первый** зарегистрирован с 9 марта по 24 августа 2020 года, **второй** — с 31 августа 2020 года до 3 мая 2021 года, **третий** — с 10 мая по 6 сентября 2021 года, **четвертый** — с 13 сентября 2021 по 3 января 2022 года, **пятый** — с 10 января по 20 июня 2022 года, **шестой** — с 27 июня по 7 ноября 2022 года.

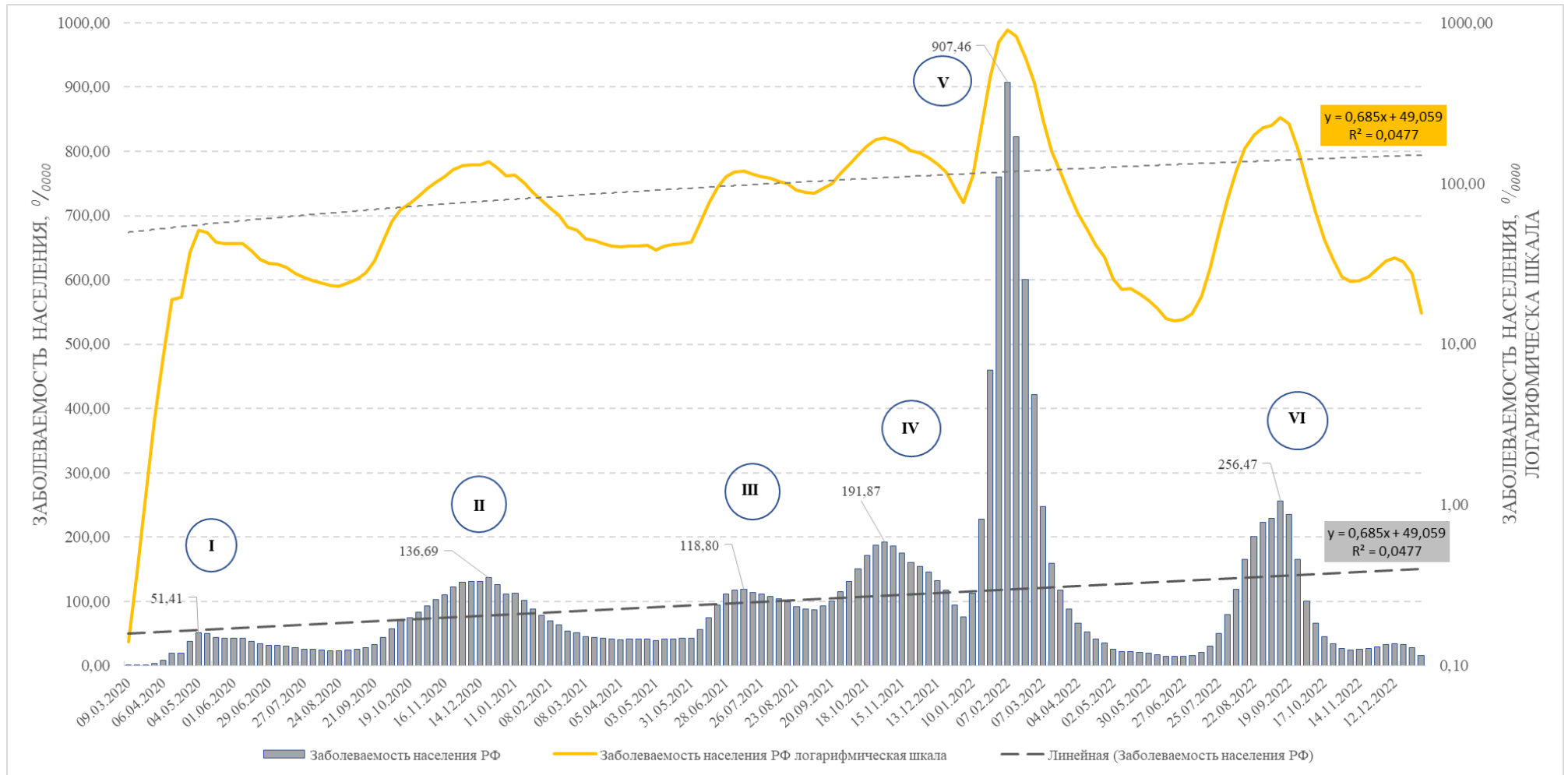


Рисунок 9 — Динамика заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) по неделям в Российской Федерации в 2020–2022 гг. ($^{\circ}/_{0000}$)

30 января 2020 года закрыто сообщение на границе Российской Федерации на Дальнем Востоке из-за информации о вспышке заболевания новой коронавирусной инфекцией в Китае.

В Российской Федерации первые два случая новой коронавирусной инфекции зарегистрированы 31 января 2020 года (граждане КНР) [1]. С 3 февраля было приостановлено пассажирское сообщение с Китаем, к 20 февраля для граждан Китая введено временное ограничение на въезд на территорию Российской Федерации. К концу февраля введено ограничение на авиасообщение и въезд из Ирана, а с 1 марта — из Южной Кореи, где также были зафиксированы случаи заболевания новой коронавирусной инфекцией.

Первый случай заболевания, зарегистрированный в г. Москве 2 марта 2020 года являлся завозным из Италии. В начальный период пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID–19), значительная часть случаев заболевания была сосредоточена в трех ключевых регионах России: Московской области, г. Москве и г. Санкт-Петербурге. Именно эти территории оказали наибольшее влияние на статистику заболеваемости, поскольку на их долю приходилось 84% (95% ДИ 83,08–85,20) [74].

С 9 марта по 24 августа 2020 года зафиксирован I эпидемический период заболеваемости (продолжительностью 25 недель). Устойчивый рост заболеваемости начался с 30 марта 2020 года, продолжился до 11 мая 2020 года, темп прироста новых случаев заболеваемости варьировал от 4,07% до 66,5% в начале периода. Темп снижения заболеваемости варьировал от 0,18% до 14%.

Всего за данный период зарегистрировано 990 326 случаев заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID–19). Уровень заболеваемости в этот период составил 673,9 ‰, среднее значение уровня заболеваемости — 26,9 ‰, максимальный уровень 59,4 ‰ зарегистрирован 6 апреля 2020 года.

II эпидемический период заболеваемости выделен с 31 августа 2020 года по 3 мая 2021 года (36 календарных недель). Динамика прироста числа новых случаев менялась от 24,7% в конце сентября 2020 года до 0,6% к декабрю

того же года. Скорость снижения числа случаев колебалась от 17,4% в феврале 2021 года до 0,01% в апреле 2021 года.

За этот период было зафиксировано 3 889 936 случаев заболевания. Общий уровень заболеваемости достиг 2623,8 ‰, со средним показателем в 73,9 ‰. Пиковый уровень заболеваемости, равный 136,7 ‰, был зафиксирован 21 декабря 2020 года. Наименьший уровень заболеваемости, равный 24,0 ‰, наблюдался в начале упомянутого периода.

III эпидемический период наблюдался с **10 мая по 6 сентября 2021 года** (18 календарных недель). Динамика прироста числа новых случаев менялась от 24,5% в июне 2021 года до 0,7% в июле 2021 года, перед началом снижения темпа. Скорость снижения числа случаев колебалась от 8,7% в августе 2021 года до 1,1% в конце эпидемического периода.

Всего за этот период на территории Российской Федерации зарегистрировано 2 259 808 случаев заболевания новой коронавирусной инфекцией. Уровень заболеваемости населения в этот период составил 1541,3 ‰. Среднее значение уровня заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) в Российской Федерации составило 85,6 ‰, с максимальным уровнем 118,8 ‰, наблюдавшимся 12 июня 2021 года. Минимальный уровень заболеваемости зарегистрирован в самом начале эпидемического периода и составил 40,9 ‰.

IV эпидемический период заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) на территории Российской Федерации продолжался с **13 сентября 2021 года по 03 января 2022 года** (17 календарных недель). Темп прироста новых случаев заболевания варьировал от 13,5% в октябре 2021 года до 2,6% при достижении максимума эпидемического подъема. Темп снижения случаев варьировал от 3,4% в начала спада заболеваемости до 24,7% в конце эпидемического периода.

Всего в данный эпидемический период зарегистрировано 3 510 779 случаев заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) на территории Российской Федерации. Уровень заболеваемости при этом

составил 2380,7 ‰. Среднее значение уровня заболеваемости при этом составило 140,0 ‰, с максимумом 191,9 ‰, отмечавшимся 1 ноября 2021 года. Минимальный уровень заболеваемости регистрировался в конце периода, 3 января 2022 года и составил 75,9 ‰.

С 10 января по 20 июня 2022 года зарегистрирован V эпидемический период (24 календарные недели). Характеризовался стремительным темпом прироста новых случаев заболевания до 50,7% 17-24 января 2022 года, темп снижения случаев заболеваемости также был резким и варьировал от 69,9% в марте 2022 года до 3,3% перед началом следующего эпидемического периода.

За рассматриваемый эпидемический период зарегистрировано 7 747 411 случаев заражения COVID–19. Общий уровень заболеваемости достиг 5270,3 ‰. В среднем, показатель заболеваемости новой коронавирусной инфекцией в Российской Федерации за этот временной отрезок составил 147,6 ‰, с пиковым значением 907,5 ‰ зафиксированным 7 февраля 2022 года. Самый низкий уровень заболеваемости был отмечен в конце упомянутого периода, 20 июня 2022 года, и составил 14,0 ‰.

VI эпидемический период выделен с 27 июня по 7 ноября 2022 года (20 календарных недель). Динамика прироста числа новых случаев менялась от 2,2% в начале периода до 39,9% в июле 2022 года, с постепенным снижением нарастания до 10,5% в конце периода. Темп снижения случаев заболеваемости варьировал от 64,4% в начале спада до 7,1% в конце изучаемого периода.

Всего в данный эпидемический период зарегистрировано 3 037 673 случая заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) на территории Российской Федерации. Уровень заболеваемости в этот период составил 2099,9 ‰, со средним значением 105,0 ‰ и максимальным уровнем заболеваемости населения 256,5 ‰, зарегистрированным 12 сентября 2022 года. Минимальный уровень заболеваемости населения отмечен в начале периода, 27 июня 2022 года и составил 14,3 ‰.

Сравнение показателей заболеваемости населения COVID-19 в Российской Федерации, Московской области и г. Москве

Поскольку Московская область и г. Москва представляют собой крупные географические единицы, в исследовании проведено сравнение данных о заболеваемости населения в Российской Федерации с показателями среди жителей Московской области и г. Москвы, получены следующие результаты:

На **рисунке 10** понедельно представлены показатели заболеваемости населения в 2020–2022 гг. по данным отчетной формы №1035 «Мониторинг о количестве заболевших коронавирусной инфекцией, в том числе внебольничными пневмониями, и летальных исходов». Данные представлены с накоплением в полулогарифмическом формате.

По результатам исследования можно заметить, что население г. Москвы активнее вовлекалось в эпидемический процесс. Наибольшая заболеваемость отмечена в период смены варианта Delta на вариант Omicron SARS-CoV-2 (905,4 ‰) в период с января 2021 года по февраль 2022 года.

При общем совпадении подъемов эпидемической заболеваемости наблюдается смещение по временной шкале вовлеченности в эпидемический процесс населения Московской области и Российской Федерации в целом относительно заболеваемости населения в г. Москве.

При оценке распределения недельных показателей заметна выраженная асимметрия в значениях заболеваемости как в Московской области, так и в г. Москве, а также в целом по Российской Федерации. Это связано с пиковыми значениями заболеваемости, вызванными появлением варианта Omicron SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации.

При сравнении статистических характеристик временных рядов заболеваемости населения (разбитых по неделям) по Российской Федерации, Московской области и г. Москве выявлено следующее: выборочное среднее значение заболеваемости по Российской Федерации составило 100,1 ‰, по Московской области 98,6 ‰, по г. Москве — 175,7 ‰. При медиане

57,2 ‰, 60,9 ‰ и 118,5 ‰; соответственно (данные представлены в таблице 4).

Таблица 4 — Описание меры центральной тенденции недельных интенсивных показателей по Российской Федерации, Московской области и г. Москве в 2020–2022 гг. (‰)

Показатель	Российская Федерация	Московская область	г. Москва
Выборочное среднее	100,1	98,6	175,7
Стандартное отклонение	134,5	133,4	189,4
Минимум	0,1	0,1	0,3
Q1 (25% процентиль)	31,9	20,4	49,4
Q2 mediana (50% процентиль)	57,2	60,9	118,5
Q3 (75% процентиль)	117,5	126,1	257,0
Максимум	907,5	986,1	1290,4

Наблюдается асимметрия показателей за счет пиковых значений заболеваемости при смене варианта Delta на вариант Omicron SARS-CoV-2 (с максимумом показателя заболеваемости населения по Российской Федерации до 907,5 ‰, по Московской области до 986,1 ‰, в г. Москве до 1290,4 ‰).

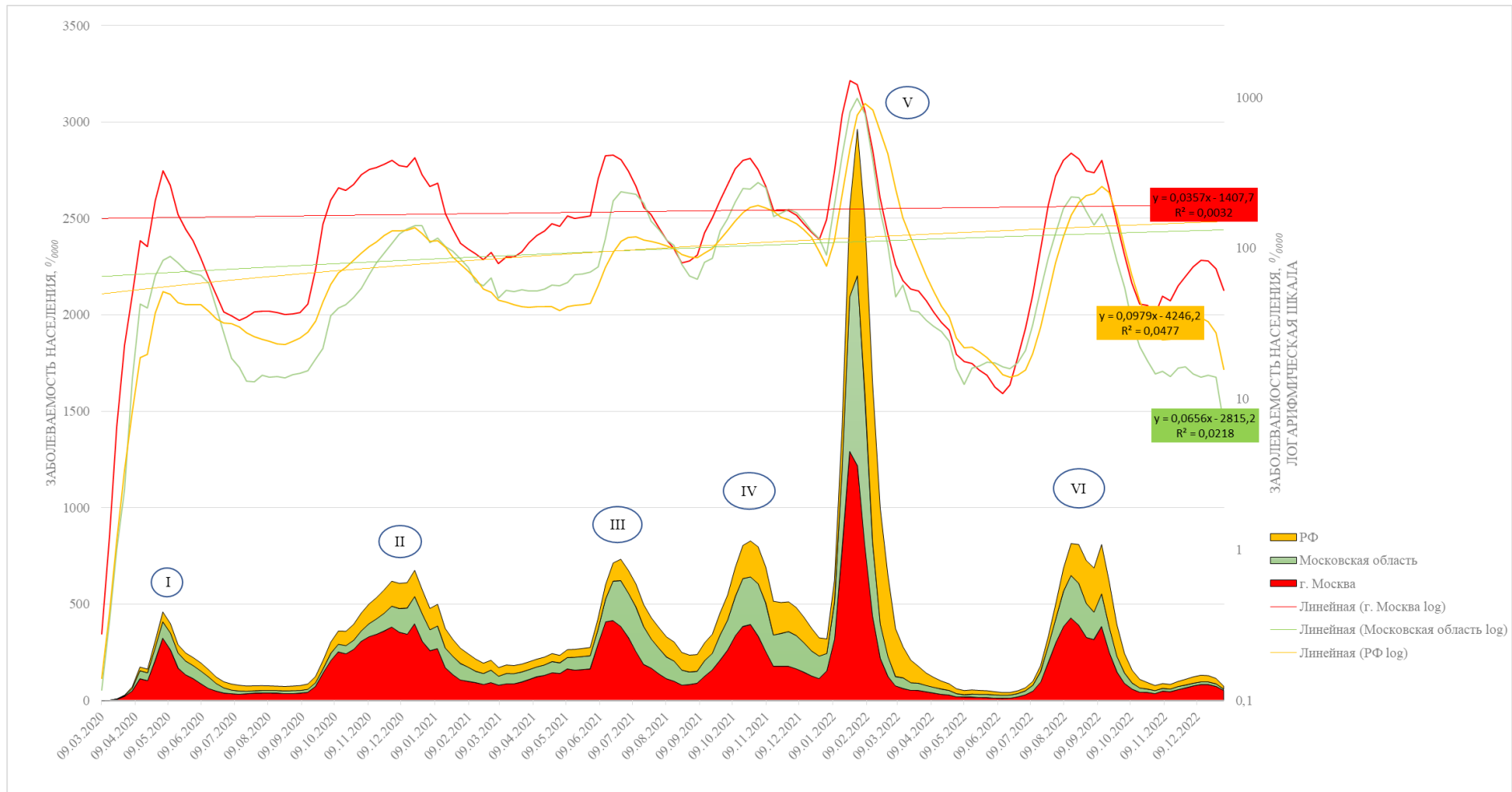


Рисунок 10 – Сравнение недельной динамики заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) населения Российской Федерации, Московской области и г. Москвы (‰/0000)

На основании анализа корреляции динамики временных рядов заболеваемости (сравнение коэффициентов корреляции Пирсона) среди возрастных групп населения Московской области и г. Москвы, а также совокупного населения Российской Федерации (таблица 5) показана очередность вовлечения в эпидемический процесс (рисунок 11).

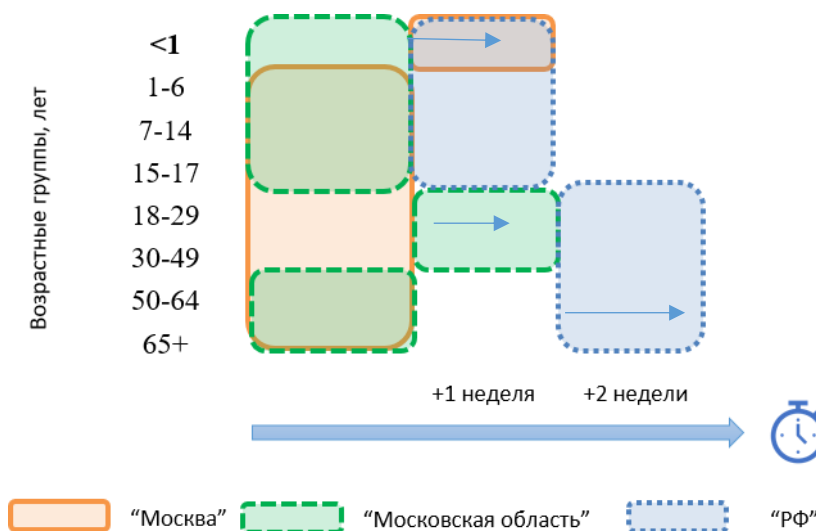


Рисунок 11 – Очередность вовлечения возрастных групп в эпидемический процесс при рассмотрении заболеваемости населения Российской Федерации, Московской области и г. Москвы в 2020–2022 гг.

Население г. Москвы вовлекалось в эпидемический процесс практически одновременно, за исключением возрастной группы младше 1 года, для которой показан сдвиг на одну неделю позже. Хотелось бы отметить, что в показатели данной группы входят, как действительно младенческий возраст, так и возможные ошибки при заполнении регистрационных форм.

Одновременно с населением г. Москвы происходит вовлечение в эпидемический процесс населения Московской области, за исключением возрастных групп 18–29 лет и 30–49 лет, для которых показан сдвиг на одну неделю позже.

Таблица 5 – Коэффициенты корреляции Пирсона и временные ряды со сдвигами на 1 неделю, 2 недели, 3 недели и 4 недели

	г. Москва	Московская область	Российская Федерация	г. Москва+1 неделя	Московская область +1 неделя	Российская Федерация +1	г. Москва +2 недели	Московская область +2 недели	Российская Федерация +2	г. Москва +3 недели	Московская область +3 недели	Российская Федерация +3	г. Москва +4 недели	Московская область +4 недели	Российская Федерация +4 недели
г. Москва	1,00	0,91	0,69	0,89	0,72	0,46	0,65	0,47	0,24	0,40	0,25	0,07	0,20	0,09	-0,02
Московская область	0,91	1,00	0,82	0,90	0,89	0,60	0,72	0,65	0,36	0,47	0,40	0,18	0,26	0,22	0,07
Российская Федерация	0,69	0,82	1,00	0,86	0,94	0,94	0,89	0,91	0,77	0,79	0,76	0,56	0,61	0,57	0,37
г. Москва+1	0,89	0,90	0,86	1,00	0,91	0,69	0,89	0,73	0,46	0,65	0,47	0,24	0,40	0,25	0,08
Московская область+1	0,72	0,89	0,94	0,91	1,00	0,82	0,90	0,89	0,60	0,72	0,65	0,36	0,47	0,40	0,18
Российская Федерация +1	0,46	0,60	0,94	0,69	0,82	1,00	0,86	0,94	0,94	0,89	0,91	0,77	0,79	0,76	0,56
г. Москва+2	0,65	0,72	0,89	0,89	0,90	0,86	1,00	0,91	0,70	0,89	0,73	0,46	0,65	0,47	0,24
Московская область+2	0,47	0,65	0,91	0,73	0,89	0,94	0,91	1,00	0,82	0,90	0,89	0,60	0,72	0,65	0,36
Российская Федерация +2	0,24	0,36	0,77	0,46	0,60	0,94	0,70	0,82	1,00	0,86	0,94	0,94	0,90	0,91	0,77
г. Москва+3	0,40	0,47	0,79	0,65	0,72	0,89	0,89	0,90	0,86	1,00	0,91	0,70	0,89	0,73	0,46
Московская область+3	0,25	0,40	0,76	0,47	0,65	0,91	0,73	0,89	0,94	0,91	1,00	0,82	0,90	0,89	0,60
Российская Федерация +3	0,07	0,18	0,56	0,24	0,36	0,77	0,46	0,60	0,94	0,70	0,82	1,00	0,86	0,94	0,94
г. Москва+4	0,20	0,26	0,61	0,40	0,47	0,79	0,65	0,72	0,90	0,89	0,90	0,86	1,00	0,91	0,70
Московская область+4	0,09	0,22	0,57	0,25	0,40	0,76	0,47	0,65	0,91	0,73	0,89	0,94	0,91	1,00	0,82
Российская Федерация +4	-0,02	0,07	0,37	0,08	0,18	0,56	0,24	0,36	0,77	0,46	0,60	0,94	0,70	0,82	1,00

**Гендерно-возрастная структура заболеваемости населения
Российской Федерации, Московской области и г. Москвы**

На **рисунке 12** показана возрастная структура населения Московской области и г. Москвы в сравнении с аналогичной структурой населения Российской Федерации. Для построения диаграммы из долей возрастных групп населения Московской области и г. Москвы произведено вычитание аналогичных показателей населения Российской Федерации (данные взяты из отчетов по демографии населения Федеральной службы государственной статистики [128]).

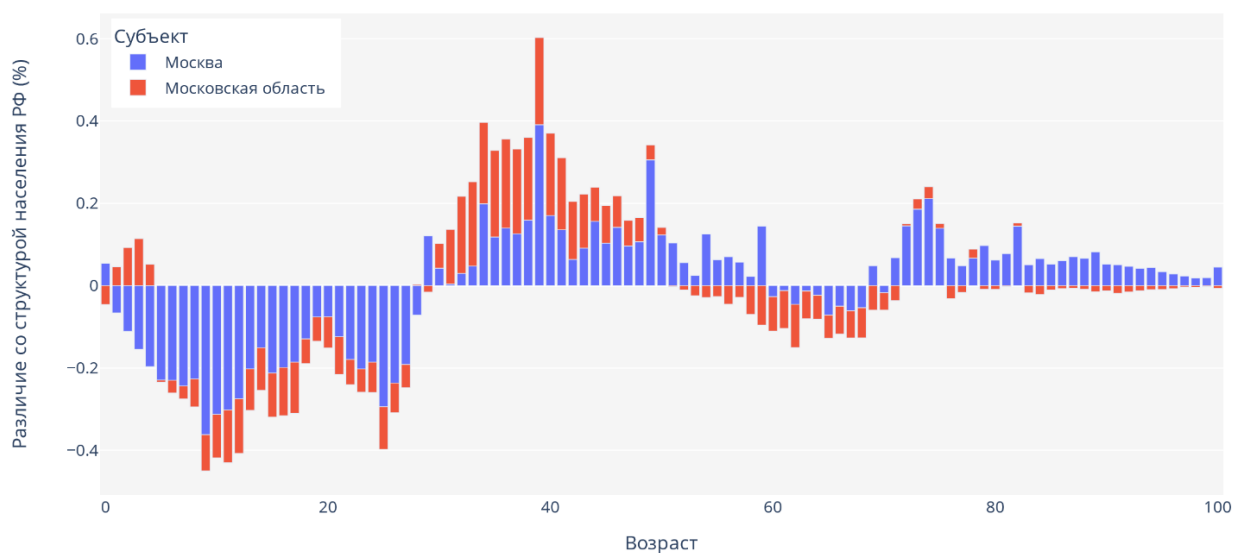


Рисунок 12 – Возрастная структура населения Московской области и г. Москвы в сравнении с совокупным населением Российской Федерации в 2020–2022 гг.

Как видно из приведенного **рисунка 13**, для населения анализируемых субъектов характерна более низкая доля для групп лиц в возрасте с 5 до 27 лет и более высокая доля лиц в возрасте от 30 до 51 лет.

Высокая доля заболевших среди лиц от 30 до 51 года является одной из причин более ранних эпидемических подъёмов заболеваемости по сравнению со средним показателем по Российской Федерации. Эта возрастная группа наиболее социально активна и часто вовлечена в трудовую миграцию и активный туризм, в том числе с поездками в зарубежные страны.

Для Московской области при рассмотрении возрастной структуры населения характерна большая доля лиц в возрасте 1–4 года относительно аналогичных показателей по Российской Федерации.

По г. Москве отмечается большая доля лиц в возрасте от 51 до 59 лет. Доля лиц в возрасте от 83 лет и старше в г. Москве превосходит аналогичные показатели населения в Московской области и Российской Федерации.

Сравнительная характеристика уровня и динамики заболеваемости мужчин и женщин Московской области и г. Москвы

Сравнительный анализ уровня и динамики заболеваемости среди мужчин и женщин, проживающих в Московской области и г. Москве, не позволил выявить существенных различий между группами распределения населения по полу. Данные представлены в **таблице 6**.

Таблица 6 — Показатели заболеваемости среди групп населения г. Москвы распределенных по полу в период с 2020 по 2022 гг. (‰₀₀₀₀)

Показатель	Мужчины	Женщины
Выборочное среднее	150,60	178,47
Стандартное отклонение	165,05	196,86
Минимум	6,65	8,17
Q1 (25% процентиль)	42,11	55,13
Q2 mediana (50% процентиль)	100,48	116,25
Q3 (75% процентиль)	212,20	255,81
Максимум	1128,29	1429,73

Несмотря на это, максимальные значения показателей заболеваемости среди женщин превышают аналогичные показатели среди мужчин, показатели дисперсии и средние значения отличаются не существенно. Данные по

заболеваемости среди групп населения Московской области, распределенных по полу, представлены в **таблице 7**.

Таблица 7 — Показатели заболеваемости среди групп населения Московской области, распределенных по полу в период с 2020 по 2022 гг. (‰/0000)

Показатель	Мужчины	Женщины
Выборочное среднее	91,3	114,8
Стандартное отклонение	117,7	150,9
Минимум	9,2	12,8
Q1 (25% процентиль)	26,1	29,5
Q2 mediana (50% процентиль)	59,2	71,5
Q3 (75% процентиль)	111,7	145,4
Максимум	863,0	1092,3

Характеристика заболеваемости отдельных возрастных групп населения Московской области и г. Москвы

В результате анализа уровня и динамики заболеваемости различных возрастных групп в г. Москве (**рисунок 13**) установлено, что в наиболее высокие показатели заболеваемости регистрировались в возрастной группе 18–29 лет до середины июля 2022 года.

После этого периода произошло смещение регистрируемых показателей в группу младше 1 года.

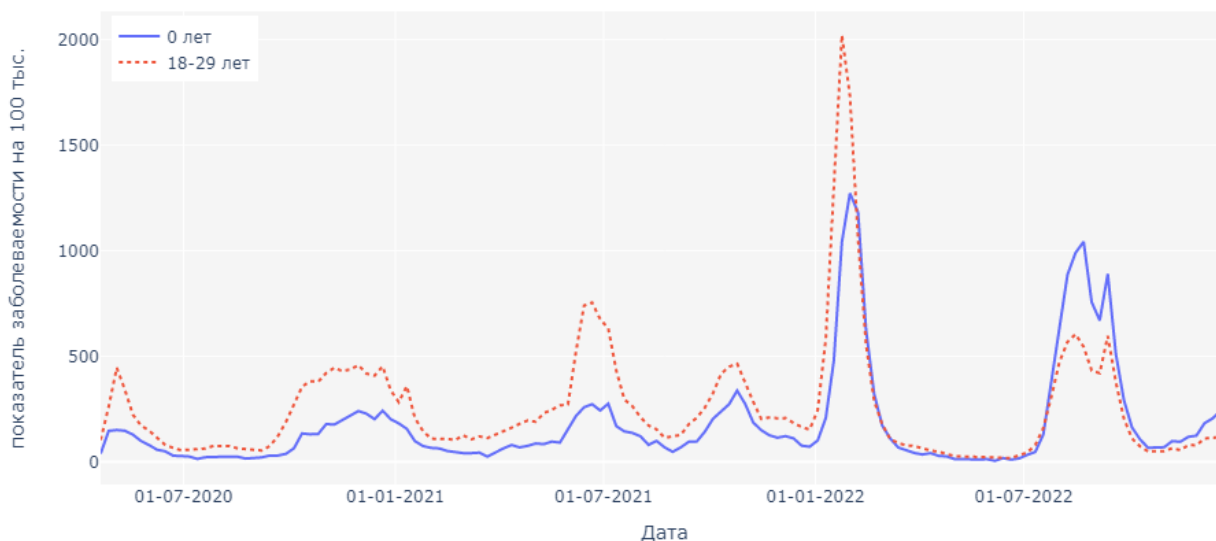


Рисунок 13 — Уровень и динамика заболеваемости различных возрастных групп в г. Москве в период с 2020 по 2022 гг. (‰/0000)

В **таблице 8** представлены характеристики заболеваемости групп населения по возрастам в г. Москве с 2020 по 2022 гг.

Таблица 8 — Характеристика заболеваемости различных возрастных групп населения г. Москвы с 2020 по 2022 гг. (‰/0000)

Показатели	< 1 года	1-6 лет	7-14 лет	15-17 лет	18-29 лет	30-49 лет	50-64 лет	65+
Заболеваемость	178,2	100,2	121,1	154,2	256,6	191,4	185,5	182,9
Стандартное отклонение	239,6	109,3	151,7	180,7	284,5	221,8	190,4	159,3
Минимум	4,8	4,0	1,2	1,9	16,7	9,5	10,3	17,2

Показатели	< 1 года	1-6 лет	7-14 лет	15-17 лет	18-29 лет	30-49 лет	50-64 лет	65+
Q1 (25% процентиль)	45,1	27,7	27,4	36,1	78,5	46,3	57,6	77,7
Q2 mediana (50% процентиль)	99,0	60,1	69,8	111,0	172,3	129,1	133,3	142,3
Q3 (75% процентиль)	202,0	133,8	155,6	199,8	358,7	275,9	272,6	260,8
Максимум	1271,4	597,3	1022,5	1232,3	2020,2	1602,4	1260,3	1023,2

Среди населения Московской области в различные периоды пандемии (**рисунок 14**) наиболее высокие показатели заболеваемости регистрировались в возрастной группе:

- младше 1 года — с начала июня 2022 года;
- 15-17 лет — в январе 2022 года;
- 50-64 лет — с мая 2020 по июнь 2020 года, с декабря 2020 по январь 2021 года и в июне – июле 2021 года;
- 65 лет и старше с января по май 2021 года и с сентября 2021 по январь 2022 года.

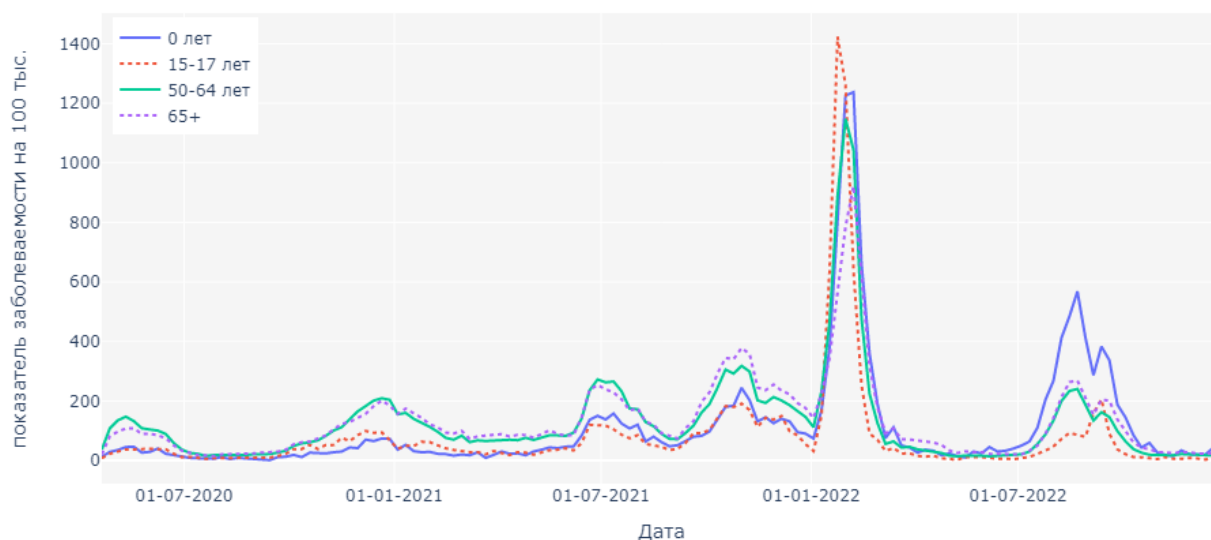


Рисунок 14 — Уровень и динамика заболеваемости различных возрастных групп в Московской области в период с 2020 по 2022 гг. (‰/0000)

В **таблице 9** представлены характеристики заболеваемости групп населения по возрастам в Московской области с 2020 по 2022 гг.

Таблица 9 — Характеристика заболеваемости различных возрастных групп населения Московской области с 2020 по 2022 гг. (‰/0000)

Показатели	< 1 года	1–6 лет	7–14 лет	15–17 лет	18–29 лет	30–49 лет	50–64 лет	65+
Заболеваемость	107,3	52,4	53,1	77,6	100,1	104,9	126,3	131,2
Стандартное отклонение	185,9	83,7	117,6	174,5	133,6	142,3	161,0	134,8
Минимум	1,3	4,0	0,4	2,4	9,2	10,6	14,0	14,8
Q1 (25% процентиль)	22,5	11,6	10,1	11,9	25,9	22,4	29,7	37,6
Q2 mediana (50% процентиль)	43,8	25,3	22,6	37,0	57,3	66,2	84,3	90,1
Q3 (75% процентиль)	111,4	59,4	52,3	84,5	124,7	130,4	162,1	176,2
Максимум	1237,5	620,5	958,2	1424,2	972,4	1086,7	1148,0	922,0

Распределение форм тяжести клинических проявлений в периоды доминирования различных вариантов SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации в 2020–2022 гг.

В результате проведенного анализа, в структуре распределения заболевших по степени тяжести по Российской Федерации выделено шесть периодов (рисунок 15).

Период с апреля по май 2020 года характеризовался доминированием случаев с бессимптомной формой заболевания, доля которой составляла от 42,1% (95% ДИ: 41,9–42,3) в мае до 43,8% (95% ДИ: 43,4–44,1) в апреле, на втором месте — с заболеванием средней степени тяжести 36,2% (95% ДИ: 35,9–36,5) в апреле, 29,5% (95% ДИ: 29,4–29,7) в мае, на долю заболеваний в легкой форме приходилось 15,3% (95% ДИ: 15,0–15,5) в апреле, 24,8% (95% ДИ: 24,6–25,0) в мае, а на долю тяжелой формы — 4,8% (95% ДИ: 4,6–4,9) в апреле, 3,6% (95% ДИ: 3,5–3,6) в мае.

Этот период времени характеризовался активным внедрением ранней диагностики инфекции и обследованием контактных в очагах, что вероятно нашло отражение в структуре распределения заболевших по степени тяжести.

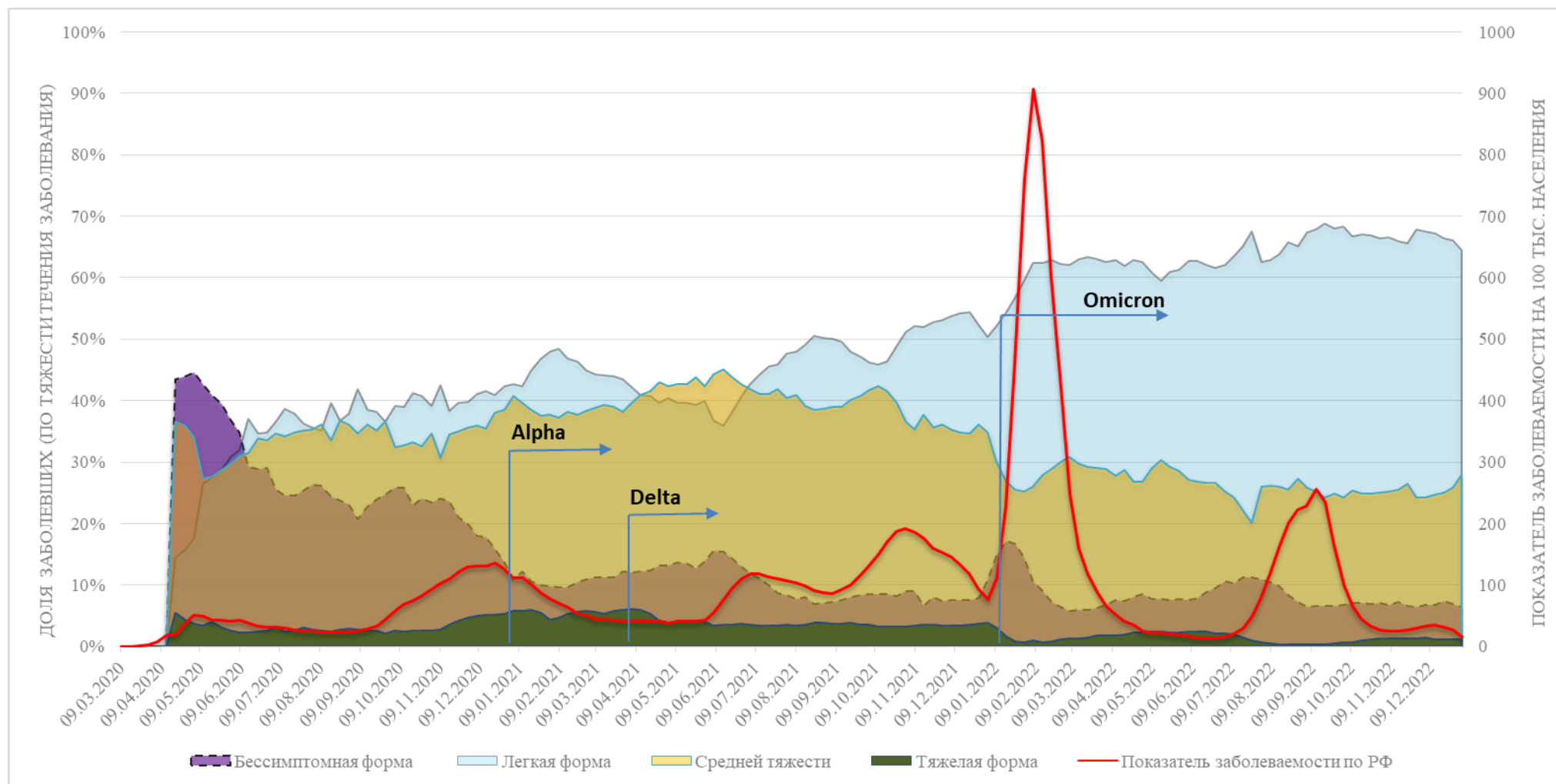


Рисунок 15 — Динамика распределения заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) по степени тяжести на территории Российской Федерации с апреля 2020 года по декабрь 2022 года

В период с июня по ноябрь 2020 года включительно наблюдалось постепенное снижение доли бессимптомных случаев с 32,1% (95% ДИ: 31,9–32,3) в июне до 22,3% (95% ДИ: 22,2–22,4) в ноябре и повышение доли легких форм с 33,7% (95% ДИ: 33,6–33,9) в июне до 40,0% (95% ДИ: 39,9–40,1) в ноябре. Доля среднетяжелых форм варьировала в пределах 31,7% (95% ДИ: 31,6–31,9)–35,5% (95% ДИ: 35,3–35,7), доля тяжелых форм — в пределах 2,4% (95% ДИ: 2,4–2,5)–3,6% (95% ДИ: 3,6–3,7).

Период с декабря 2020 года по апрель 2021 года включительно характеризовался доминированием в структуре легких форм заболевания (41,5% (95% ДИ: 41,3–41,6) в декабре и 40,8% (95% ДИ: 40,6–41,0) в апреле), а также наиболее высокими долями за все время наблюдения тяжелых форм на уровне 5,1% (95% ДИ: 5,1–5,2)–5,8% (95% ДИ: 5,7–5,8).

Доля бессимптомных форм варьировала от 16,4% (95% ДИ: 16,3–16,5) в декабре до 9,9% (95% ДИ: 9,8–10,0) в феврале. Доля среднетяжелых форм изменялась от 37,0% (95% ДИ: 36,9–37,1) в декабре до 41,3% (95% ДИ: 41,1–41,5) в апреле 2021 года. В этот период на территории Российской Федерации наблюдалась циркуляция варианта Alpha SARS-CoV-2.

В мае — июне 2021 года в структуре доминировали формы средней тяжести 42,8% (95% ДИ: 42,6–42,9)–43,8% (95% ДИ: 43,7–43,9), на долю бессимптомных форм приходилось 13,4% (95% ДИ: 13,3–13,5)–14,4% (95% ДИ: 14,3–14,5), на долю легких форм — 38,2% (95% ДИ: 38,1–38,4)–39,8% (95% ДИ: 39,6–40,0) случаев, случаи заболевания тяжелой формой составляли 3,6% (95% ДИ: 3,5–3,7)–4,0% (95% ДИ: 4,0–4,1). В этот период времени в Российской Федерации происходило активное распространение варианта Delta SARS-CoV-2.

В период с июля по декабрь 2021 года доля бессимптомных форм заболевания изменялась от 7,6% (95% ДИ: 7,5–7,7) до 10,5% (95% ДИ: 10,4–10,6), в структуре доминировали легкие формы (от 44,6% (95% ДИ: 44,5–44,7) в июле до 53,7% (95% ДИ: 53,6–53,8) в декабре, доля среднетяжелых форм изменялась от 41,5% (95% ДИ: 41,3–41,6) в июле до 35,2% (95% ДИ: 35,1–35,3)

в декабре 2021 года, доля тяжелых форм сохранялась на уровне 3,5% (95% ДИ: 3,4–3,5). В этот период времени в популяции возбудителя доминировал вариант Delta SARS-CoV-2.

В период с января по декабрь 2022 года в структуре распределения населения по форме заболевания доминировала легкая форма, ее доля изменялась от 57,1% (95% ДИ: 57,1–57,2) в январе до 67,4% (95% ДИ: 67,2–67,5) в октябре 2022 года, доля бессимптомных форм составляла от 15,4% (95% ДИ: 15,3–15,4) в январе до 7,0% (95% ДИ: 6,9–7,1) в декабре 2022 года.

Следует отметить, что по сравнению с декабрем 2021 года в январе 2022 года произошел двукратный рост доли бессимптомных случаев, что вероятно может быть связано с повышением диагностической активности на фоне смены доминирующего варианта возбудителя Delta на вариант Omicron SARS-CoV-2.

Доля среднетяжелых форм изменялась от 29,9% (95% ДИ: 29,8–30,0) в марте до 25,0% (95% ДИ: 24,8–25,1) в декабре 2022 года, доля тяжелых форм изменялась от 2,4% (95% ДИ: 2,3–2,5) в марте до 1,2% (95% ДИ: 1,2–1,3) в декабре 2022 года. Этот период характеризовался доминированием варианта Omicron SARS-CoV-2.

Период с июля 2021 года по декабрь 2022 года характеризовался наличием в популяции возбудителя доминирующих вариантов, а по структуре тяжести клинических проявлений возможно отметить следующие закономерности:

- доля бессимптомных форм заболевания изменялась на уровне 6,0% (95% ДИ: 5,9–6,0)–15,4% (95% ДИ: 15,3–15,4), при этом двукратный рост доли показан в период максимальной диагностической активности в январе 2022 года, во время смены доминирующего варианта;
- доля легких форм заболевания имела тенденцию к росту и повысилась с 44,6% (95% ДИ: 44,5–44,7) в июле 2021 года до 67,4% (95% ДИ: 67,2–67,5) в октябре 2022 года;

- доля среднетяжелых форм заболевания имела тенденцию к снижению с 41,5% (95% ДИ: 41,3–41,6) с июля 2021 до 25,0% (95% ДИ: 24,8–25,1) в декабре 2022 года;
- доля тяжелых форм имела тенденцию к снижению с 3,7% (95% ДИ: 3,6–3,7) в августе 2021 года до 0,4% (95% ДИ: 0,4–0,4) в сентябре 2022 года (95%).

На рисунке 16 представлено распределение заболевших по степени тяжести для периодов, характеризующихся доминированием разных вариантов.

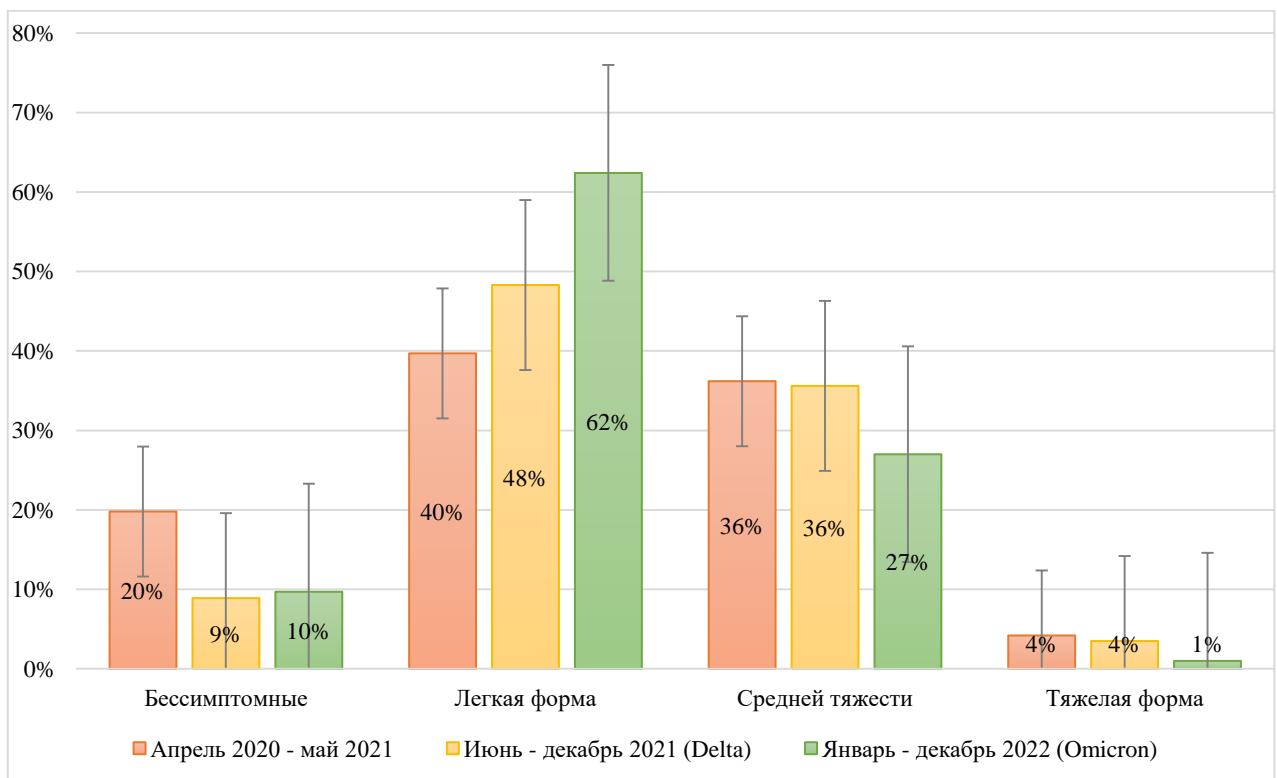


Рисунок 16 — Распределение заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) по степени тяжести для периодов: апрель 2020–май 2021 гг., июнь–декабрь 2021 год, январь–декабрь 2022 год, характеризующихся доминированием разных вариантов SARS–CoV–2 на территории Российской Федерации

Учитывая значительный объем наблюдений для всех описываемых периодов и степеней тяжести заболевания, получены статистически значимые различия.

Распределение форм тяжести клинических проявлений по Московской области в 2021–2022 гг.

В структуре распределения заболевших в Московской области по степени тяжести можно условно выделить четыре периода, каждый из которых характеризуется определенным соотношением групп по степени тяжести (рисунок 17).

В период с апреля по август 2020 года наибольшую долю в структуре составляли бессимптомные формы, их доля менялась от 37,0% (95% ДИ: 35,7–38,3) в августе до 48,0% (95% ДИ: 47,3–48,7) в июне 2020 года.

Доля легких форм изменялась от 17,2% (95% ДИ: 16,7–17,6) до 27,3% (95% ДИ: 26,1–28,5), доля среднетяжелых форм — от 25,9% (95% ДИ: 24,7–27,2) до 36,8% (95% ДИ: 36,2–37,4), а доля тяжелых форм — от 0,9% (95% ДИ: 0,6–1,2) до 2,4% (95% ДИ: 2,0–2,8).

Период характеризовался доминированием в структуре среднетяжелых форм, их доля составляла 38,2% (95% ДИ: 37,5–38,9), доля бессимптомных форм колебалась от 20,7% (95% ДИ: 20,0–21,4) в октябре до 30,4% (95% ДИ: 29,2–31,7) в сентябре, доля легких форм — от 27,6% (95% ДИ: 26,4–28,8) в сентябре до 38,9% (95% ДИ: 38,1–39,8) в октябре. Доля тяжелых форм была наибольшей за весь период наблюдения и составляла 2,6% (95% ДИ: 2,4–2,9).

Период с ноября 2020 года по май 2022 года характеризовался доминированием в структуре заболеваний легкой степени, доля которой варьировала от 50,6% (95% ДИ: 50,1–51,2) в ноябре 2020 года до 80,9% (95% ДИ: 79,8–81,8) в мае 2022 года.

Доля бессимптомных форм в этот период изменялась от 10,1% (95% ДИ: 9,7–10,5) % в мае 2021 года до 30,3% (95% ДИ: 30,0–30,6) в феврале 2022 года.

Доля среднетяжелых форм менялась от 25,8% (95% ДИ: 25,3–26,3) в ноябре 2020 года до 2,7% (95% ДИ: 2,6–2,8) % в феврале 2022 года.

Доля тяжелых форм — от 1,7% (95% ДИ: 1,6–1,9) в ноябре 2020 года до 0,2% (95% ДИ: 0,2–0,2) в январе 2022 года.

В период с июня 2022 года по декабрь 2022 года доля легких форм заболевания изменялась от 89% (95% ДИ: 86,9–90,5) в июне до 95,3% (95% ДИ: 95,2–95,5) в июле и августе 2022 года.

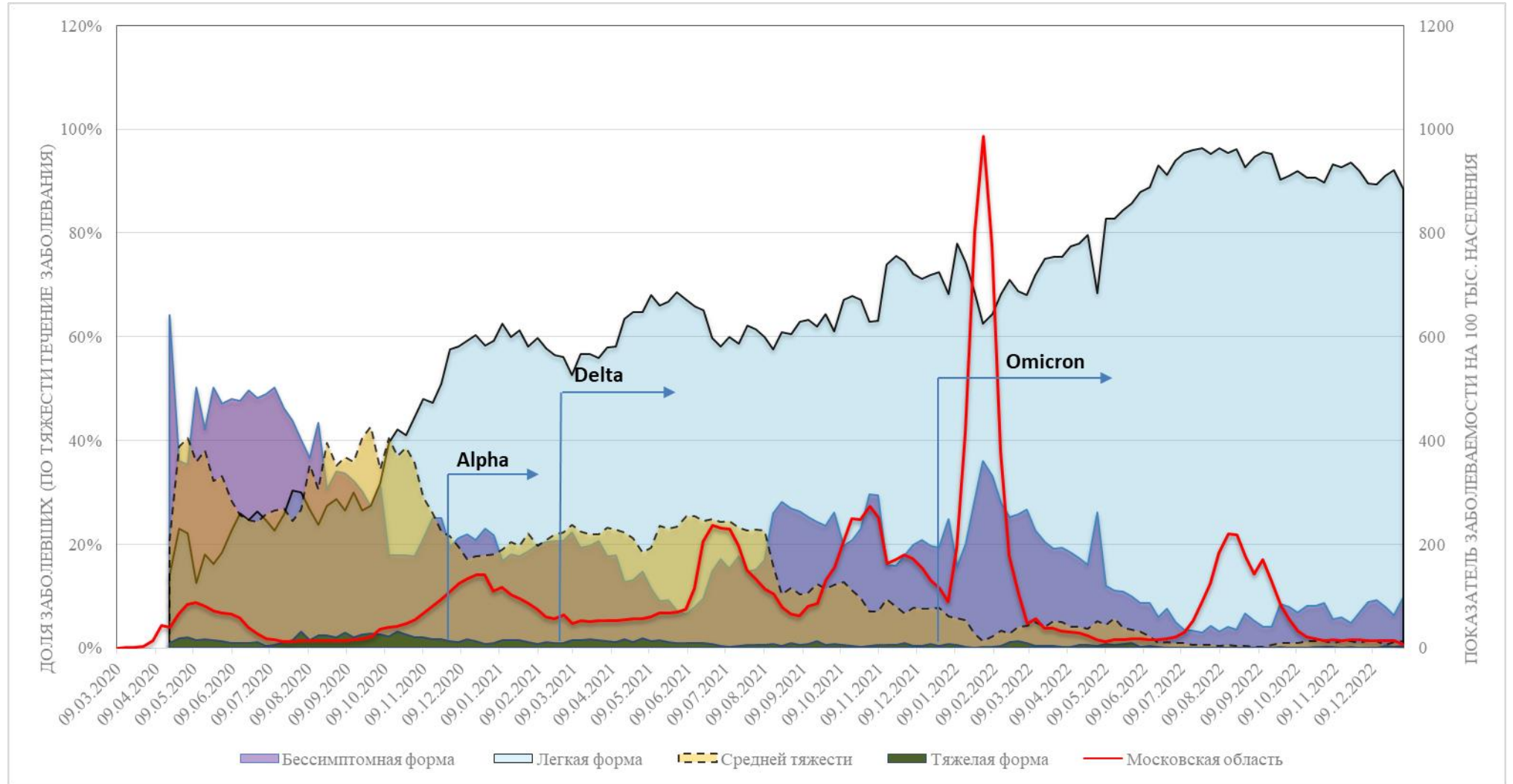


Рисунок 17 — Динамика распределения заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) по степени тяжести в Московской области с апреля 2020 года по декабрь 2022 года

Доля бессимптомных форм — от 4,1% (95% ДИ: 4,0–4,3) в июле и августе до 7,8% (95% ДИ: 7,3–8,4) в октябре 2022 года. Доля среднетяжелых форм — от 1,9% (95% ДИ: 1,5–2,3) в июне до 0,6% (95% ДИ: 0,5–0,6) в августе и сентябре 2022 года. Доля тяжелых форм составляла менее 1%.

На **рисунке 18** представлено распределение заболевших в Московской области по степени тяжести для периодов, характеризующихся доминированием разных вариантов SARS-CoV-2.

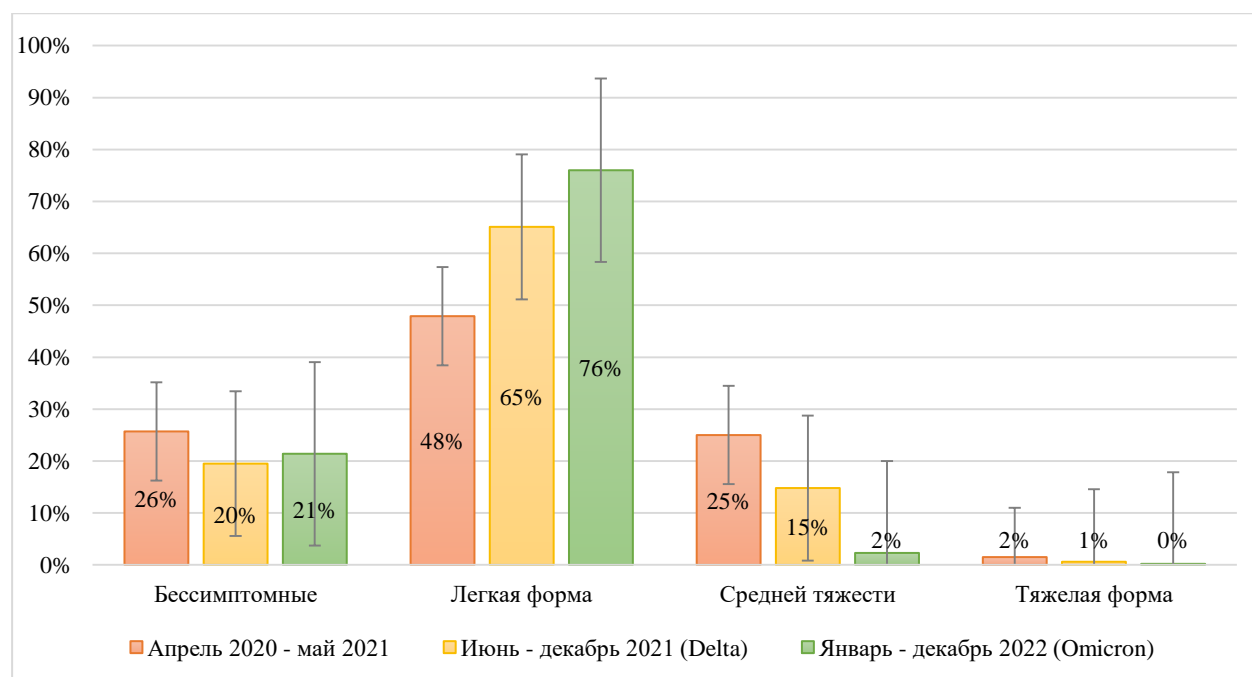


Рисунок 18 — Распределение заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в Московской области по степени тяжести для периодов: апрель 2020–май 2021 гг, июнь–декабрь 2021 год, январь–декабрь 2022 год, характеризующихся доминированием разных вариантов SARS-CoV-2

Учитывая значительный объем наблюдений для всех описываемых периодов и степеней тяжести заболевания, получены статистически значимые различия.

Распределение форм тяжести клинических проявлений по г. Москве в 2021–2022 гг.

В структуре распределения заболевших в г. Москве по степени тяжести можно условно выделить четыре периода, каждый из которых характеризуется

определенным соотношением групп по степени тяжести заболевания (рисунок 19).

В апреле 2020 года в структуре доминировали среднетяжелые формы 48,6% (95% ДИ: 48,1–49,1), тяжелые формы имели наибольшую долю за весь период наблюдения — 7,0% (95% ДИ: 6,7–7,2). На долю бессимптомных форм приходилось 38,9% (95% ДИ: 38,4–39,4), а на долю легких форм — 5,5% (95% ДИ: 5,3–5,8).

Период с мая по ноябрь 2020 года характеризовался доминированием бессимптомных форм заболевания, их доля варьировала от 43,1% (95% ДИ: 42,9–43,4) в мае до 57,4% (95% ДИ: 56,7–58,0) в августе 2020 года.

Доля легких форм изменялась от 28,5% (95% ДИ: 28,1–28,9) в июне до 20,0% (95% ДИ: 19,4–20,6) в июле, августе и ноябре 2020 года.

Доля среднетяжелых форм составляла от 21,5% (95% ДИ: 21,0–22,0) в августе до 34,2% (95% ДИ: 34,0–34,4) в ноябре. Тяжелые формы варьировали от 4,3% (95% ДИ: 4,2–4,4) в мае до 1,4% (95% ДИ: 1,4–1,5) в июле, августе, сентябре и октябре 2020 года.

Период с декабря 2020 года по октябрь 2021 года характеризовался доминированием в структуре среднетяжелых форм, доля которых варьировалась от 43,6% (95% ДИ: 43,3–43,8) в декабре до 55,2% (95% ДИ: 54,9–55,4) в октябре 2021 года.

Доля бессимптомных форм изменялась от 34,5% (95% ДИ: 34,3–34,7) в декабре 2020 года до 22,5% (95% ДИ: 22,3–22,7) в октябре 2021 года.

Доля легких форм на протяжении всего периода составляла 20,0% (95% ДИ: 19,8–20,2), а доля тяжелых форм — 1,5% (95% ДИ: 1,5–1,5).

Период с ноября 2021 года по декабрь 2022 года характеризовался доминированием в структуре легких форм, их доля в этот период менялась от 50,2% (95% ДИ: 49,0–51,4) в июне 2022 года до 71,5% (95% ДИ: 71,1–72,0) в декабре 2022 года.

Доля бессимптомных форм в этот период составила от 38,9% (95% ДИ: 38,8–39,1) январе 2022 года до 9,1% (95% ДИ: 8,8–9,4) в декабре 2022 года.

Доля тяжелых форм изменялась от 2,5% (95% ДИ: 2,5–2,6) в ноябре 2021 года до 0,4% (95% ДИ: 0,4–0,5) в сентябре 2022 года.

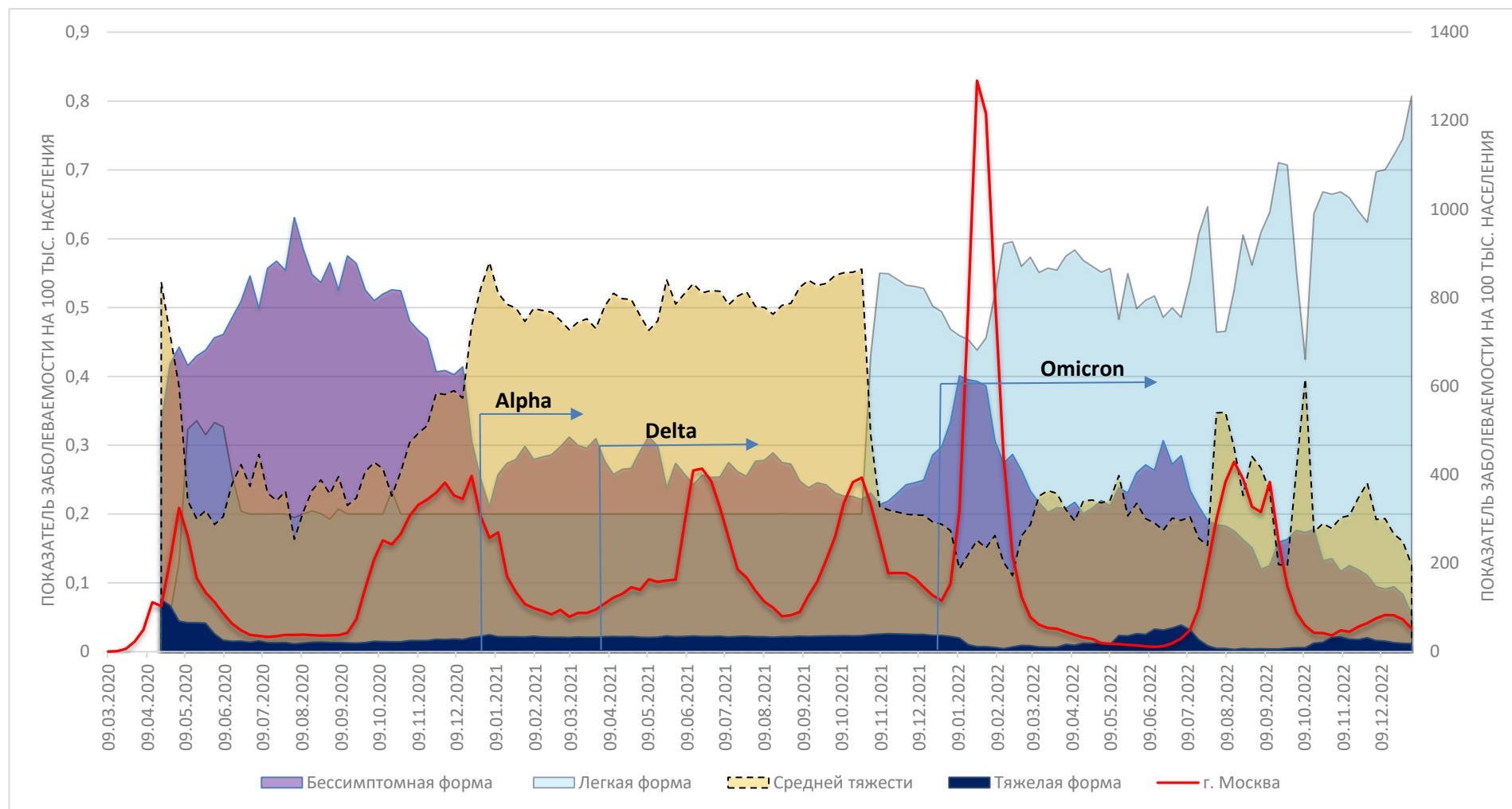


Рисунок 19 — Динамика распределения заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) по степени тяжести в г. Москве с апреля 2020 года по декабрь 2022 год

На рисунке 20 представлено распределение заболевших в г. Москве по степени тяжести для периодов, характеризующихся доминированием разных вариантов SARS-CoV-2.

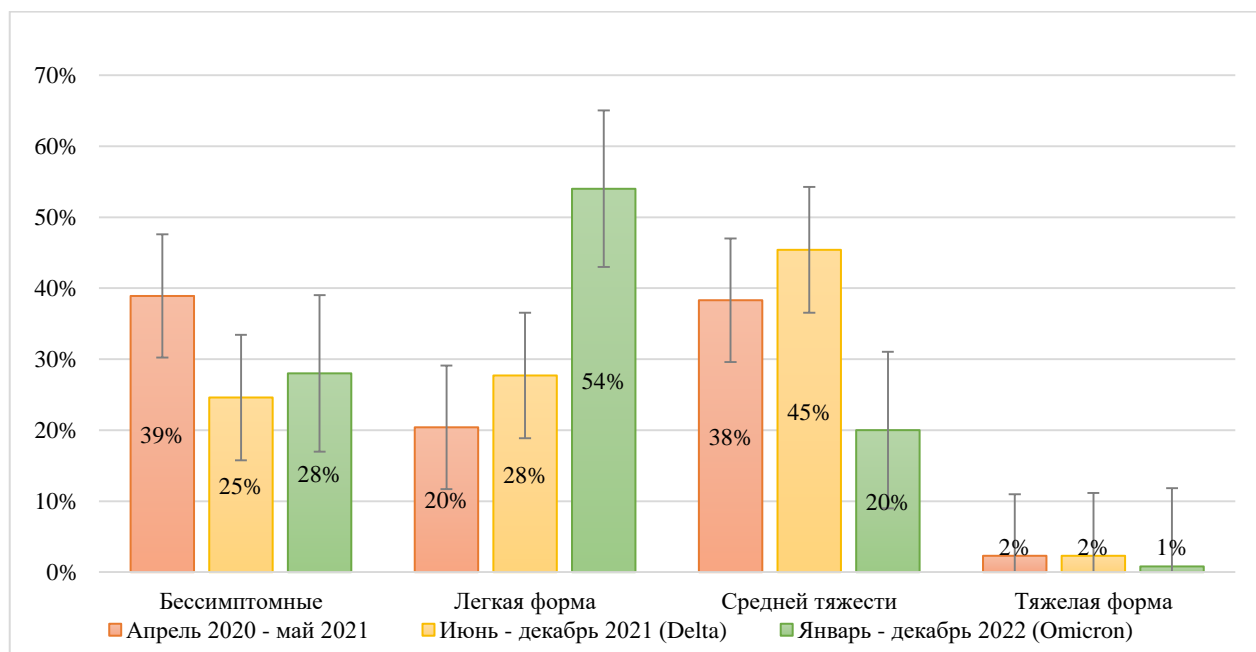


Рисунок 20 — Распределение заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в г. Москве по степени тяжести для периодов: апрель 2020–май 2021 гг., июнь–декабрь 2021 год, январь–декабрь 2022 год, характеризующихся доминированием разных вариантов SARS-CoV-2

Учитывая значительный объем наблюдений для всех описываемых периодов и степеней тяжести заболевания, получены статистически значимые различия.

Таким образом, анализ данных официальной статистики за период с 2020 года по 2022 год позволил выявить **шесть эпидемических подъемов** заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID-19): **первый** зарегистрирован с 9 марта по 24 августа 2020 года, **второй** — с 31 августа до 3 мая 2021 года, **третий** — с 10 мая по 6 сентября 2021 года, **четвертый** — с 13 сентября 2021 по 3 января 2022 года, **пятый** — с 10 января по 20 июня 2022 года, **шестой** — с 27 июня по 7 ноября 2022 года.

При общем совпадении подъемов заболеваемости наблюдается запаздывание развития эпидемического процесса среди населения

Московской области и Российской Федерации в целом относительно заболеваемости населения в г. Москве.

Население Московской области и г. Москвы характеризуется меньшей долей лиц в возрасте 5–27 лет и большей в возрасте 30–51 лет, чем совокупное население Российской Федерации. Большая доля лиц от 30 до 51 лет, может быть, одним из факторов, влияющих на более раннее начало эпидемий, поскольку эта группа наиболее социально активна и вовлечена в трудовую миграцию и активный туризм, в том числе с поездками за границу. Заболеваемость в группах распределения по полу населения Московской области и г. Москвы существенных различий не имеет. В периоды эпидемических подъемов по сравнению с населением мужского пола отмечены более высокие показатели заболеваемости среди женщин.

Среди возрастных групп населения г. Москвы наиболее высокие показатели заболеваемости до июля 2022 года регистрировались в возрастной группе 18–29 лет. После июля 2022 года — в возрастной группе младше 1 года.

Среди групп распределения населения Московской области по возрасту до января 2022 года наиболее высокие показатели заболеваемости регистрировались среди лиц старше 50 лет, а с июня 2022 года — в группе младше 1 года.

Различия в динамике заболеваемости различных групп распределения населения по возрасту между населением Московской области и г. Москвы значительны и должны учитываться при разработке профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Население Московской области и г. Москвы вовлекалось в активный эпидемический процесс практически одновременно, исключение составляла возрастная группа младше 1 года в г. Москве и 18–29 лет и 30–49 лет в Московской области, для которой характерен сдвиг динамики заболеваемости на одну неделю позже.

Проведенный анализ по распределению заболевших в Российской Федерации по степени тяжести клинических проявлений показал, что ряд

изменений в структуре совпал по времени со сменой циркулирующих и доминирующих вариантов:

- в период с декабря 2020 года по апрель 2021 года зарегистрированы наибольшие доли случаев тяжелых форм заболевания за весь период мониторинга до 6,1% (95% ДИ: 5,9–6,3). Этот временной промежуток частично пересекается с временем доминирования варианта Alpha SARS-CoV-2;
- период с июля по декабрь 2021 года по сравнению с предыдущим периодом характеризовался доминированием в структуре легких форм до 54,3% (95% ДИ: 54,1–54,6) за счет уменьшения доли тяжелых и среднетяжелых форм. Этот период совпал с периодом циркуляции варианта Delta SARS-CoV-2;
- период с января по декабрь 2022 года, характеризующийся наиболее низкими долями тяжелых и среднетяжелых форм (менее 1,0%), совпал по времени с доминированием варианта Omicron SARS-CoV-2.

Среди наиболее значимых изменений в структуре тяжести среди заболевших в Московской области в течение всего периода наблюдения (с 2020 года по 2022 год) можно определить:

- увеличение доли легких форм с 12,5% (95% ДИ: 11,7–13,3) до 96,4% (95% ДИ: 96,1–96,7),
- снижение доли среднетяжелых и тяжелых форм заболевания с 45,5% (95% ДИ: 43,1–47,9) до 0,3% (95% ДИ: 0,2–0,4).

Среди наиболее значимых изменений в структуре тяжести среди заболевших в г. Москве можно определить:

- значительное увеличение доли легких форм в течение всего периода наблюдения с 2020 года по 2022 год с 5,5% (95% ДИ: 5,2–5,8) до 74,5% (95% ДИ: 73,6–75,3),

- снижение доли среднетяжелых и тяжелых форм в два раза в период циркуляции варианта Omicron SARS-CoV-2 с 2022 года до 30,0% (95% ДИ: 29,6–30,4).

Изменение распределения заболевших в Российской Федерации в целом по степени тяжести клинических проявлений совпадает по времени со сменой циркулирующих и доминирующих вариантов SARS-CoV-2, что не наблюдается в показателях для населения Московской области и г. Москвы.

Для распределений заболевших по степени тяжести клинических проявлений для периодов, характеризующихся доминированием разных вариантов SARS-CoV-2 получены достоверные различия как в целом для Российской Федерации, так и для населения Московской области и г. Москвы.

С июля 2021 года среди населения Российской Федерации в целом наметилась тенденция к уменьшению доли тяжелых и среднетяжелых форм. Подобная тенденция наблюдается и для населения Московской области и г. Москвы.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ СКРИНИНГОВОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВАРИАНТОВ DELTA И OMICRON SARS–COV–2

При появлении информации о возникновении на территории других стран нового варианта SARS–CoV–2, резко отличающегося от циркулирующих ранее, и стремительном росте заболеваемости, для снижения нагрузки с центров секвенирования и получения дополнительной эпидемиологической информации принято решение о разработке и последующем масштабировании по территории 85 субъектов Российской Федерации методики для дифференцирования ранее циркулирующего варианта Delta SARS–CoV–2 и нового варианта Omicron SARS–CoV–2.

Рекомендации Технической консультативной группы ВОЗ по эволюции вирусов [129] и использование биоинформатических методов при анализе геномов изолятов SARS–CoV–2 позволили определить мишени для точной дифференциации вариантов Delta и Omicron SARS–CoV–2. Что позволило создать и внедрить в практику Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека скрининговые методы типирования вируса, основанные на ПЦР–РВ.

Методика явилась актуальной в период с января по июль 2022 года, при стремительном распространении варианта Omicron SARS–CoV–2 на территории Российской Федерации.

Выбор мишеней для методики

Список мутаций, характерных для различных вариантов SARS–CoV–2 представлен на сайте ВОЗ и обновляется Технической консультативной группой по эволюции SARS–CoV–2 [129].

При разработке праймеров и зондов для ПЦР–РВ выравнивание нуклеотидной последовательности для выбора позиций олигонуклеотидов проводили с помощью программы BioEdit [130].

Данные о последовательности полного генома варианта Omicron SARS-CoV-2 получены из базы данных GISAID [59], [131]. Также использованы геномные отчеты Outbreak.info [132] для сравнения линий и оценки распространенности мутаций между линиями. Работа по выбору мишеней для разработки методик осуществлена совместно с руководителем Научной группы генной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

На рисунке 21 представлены различные ключевые мутации S-гена в разных вариантах SARS-CoV-2, позволяющие дифференцировать варианты друг от друга.

Alpha	Beta	Gamma	Kappa	Delta		AT.1			Lambda	Mu	Eta	Iota		Theta	Omicron
B.1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.617.1	B.1.617.2	B.1.617.3	B.1.1.370.1	B. 1.1.523	B.1.1.317	C.37	B.1.621	B.1.525	B.1.526	C.1.2		B.1.1.529
	L18F	L18F		T19R	T19R	P9L			G75V	Q52R	L5F				A67V G446S T547K
		T20N	T95I			D215G			T76I	T95I	A67V	T95I	del_Y144		del_HV 69-70 S477N H655Y
del_HV 69-70	D80A	P265		P156G		del_136-144				Y144S(T)	del_HV 69-70		R190S		T95I T478K N679K
del_Y144	D215G	D138Y		FR157-158del		H245P	del-156-158	D138Y	del247-253	Y145N			D215G		G142D P681H
	Del_LLA 241-243	R190S	G142D	G142D					D253N	R346K		D253G	Del_LA 242-243		del 143-145 N764K
	K417N	K417T	L452R	L452R	L452R	mut_306-312	F306L	S477N	L452Q						del1211 D796Y
	E484K	E484K	E484Q			E484Q	E484K	E484K		E484K	E484K	E484K	E484K	E484K	L212I E484A
							S494P		F490S						ins214 EPE Q493K N856K
				T478K											G339D G496S Q954H
N501Y	N501Y	N501Y								N501Y			N501Y	N501Y	S371L N501Y N969K
A570D						N679K	E780A	A522S			677H		H655Y		S373P Y505H L981F
P681H	A701V	H655Y	P681R	P681R	P681R	ins_679_GL AL		Q675R	T859N	P681H		A701V		P681H	S375F
T716I						E780K		A845S			F888L		T859N		K417N
S982A		T1027I	Q1071H					T1027I						E1092K	N440K
D1118H		V1176F												H1101Y	
														V1176F	

Рисунок 21 — Мутации S-гена SARS-CoV-2 в различных вариантах

При появлении варианта Alpha SARS-CoV-2, достаточным для скрининга образцов являлось выявление мутаций delHIV69–70, N501Y и delY144 для его дифференцирования от дикого типа.

В дальнейшем, при появлении следующих вариантов, к разработке скрининговых методик добавлены новые мишени в соответствии с рекомендациями ВОЗ: A570D, D80A, E484K, D138Y, T95I, P681R, L452R, del143–145, Ins214EPE, E484A и другие, что позволило оперативно реагировать на изменение картины циркуляции вариантов вируса на территории Российской Федерации.

Учитывалась информация о важных ключевых мутациях, таких как **N501Y**, **E484A** и **L452R**, которые расположены в домене RBD S-белка и классифицируются ВОЗ как мутации VOC [133].

Считается, что мутации, происходящие в позициях 452 (L452R/M/Q) и 484 (E484K/A), дают возможность вирусу обходить иммунный ответ организма и оставаться неуязвимым для действия моноклональных антител [134].

Мутация E484K впервые описана для варианта Beta и встречалась в различных вариантах: Gamma, Yota, Mu и т. д. В случае варианта Omicron SARS-CoV-2 в позиции 484 представлена другая мутация — E484A, которая встречается во всех субвариантах (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5).

Мутация L452R также присутствовала в вариантах Delta, Kappa и Epsilon (и L452Q в Lambda). Мутации в этом положении (L452R/M/Q) также произошли независимо в нескольких сублиниях BA.2. Мутация L452R присутствует в линиях BA.4/BA.5. С лета 2022 года вариант Omicron SARS-CoV-2 с мутацией в положении 452 остается доминирующим не только в Российской Федерации, но и в других странах [135–138].

Мутация **P681R** выбрана в качестве маркера варианта Delta SARS-CoV-2. Мутация P681H в этой позиции характерна для варианта Omicron SARS-CoV-2. Предположительно, мутации в этом положении повышают трансмиссивность вируса [79], [139].

Делеция **delHV69–70** характерна для варианта Omicron SARS-CoV-2 и других VOC вариантов (Alpha, Eta), расположена в N-концевом домене S-белка, также повышает устойчивость к нейтрализующим антителам и связана с уклонением от иммунитета [140–142].

Следует также отметить, что любые инсерции и делеции являются удобной мишенью для разработки системы праймеров и зондов для детекции методом ОТ–ПЦР–РВ. Такие значительные различия в нуклеотидных последовательностях упрощают задачу.

Так, инсерция **Ins214EPE** явилась удобной мишенью для обнаружения методом ПЦР–РВ. На момент разработки методики, Ins214EPE не обнаружена в

других вариантах SARS-CoV-2 до появления варианта Omicron SARS-CoV-2. Данная мутация представлена только в линии BA.1 SARS-CoV-2. Предполагается, что мутация может влиять на T-клеточный ответ [143].

Выбор олигонуклеотидов

Для работы по генотипированию вируса выбран S-ген SARS-CoV-2. Разработка методик осуществлена непосредственно автором в Лаборатории молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. В **таблице 10** перечислены мутации, выбранные в работу для определения вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2. Цветовым выделением обозначены соответствующие каналы для флуорофоров (желтым — R6G, зеленым — FAM).

Таблица 10 — Мутации-мишени для идентификации вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2

Вариант SARS-CoV-2	Мутация					
	L452R	P681R	del69-70	N501Y	del143-145	Ins214EPE
Delta	Обнаружена	Обнаружена	Не обнаружена	Не обнаружена	Не обнаружена	Не обнаружена
Omicron	Не обнаружена	Не обнаружена	Обнаружена	Обнаружена	Обнаружена	Обнаружена

Для разработки методики для идентификации варианта Delta и Omicron SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ в работу выбраны две мутации S-гена линии Delta SARS-CoV-2: L452R и P681R и четыре мутации S-гена линии B.1.1.529 (Omicron SARS-CoV-2): del HV69-70, N501Y, del VYY143-145, Ins 214EPE [77].

Выбор олигонуклеотидов проводился на основе комбинации прямого и обратного праймеров (один из которых с модификацией 5'-biotin в зависимости от направления прочтения) и флуоресцентного зонда для проведения ПЦР-РВ с возможностью проверки специфичности данной системы при помощи метода пиросеквенирования.

Дополнительно в систему для проведения реакции пиросеквенирования выбран праймер для секвенирования. Итого в системе подобного типа: 1 прямой

праймер, 1 обратный праймер, 1 секвенирующий и флуоресцентный зонд. Схема системы представлена на рисунке 22.

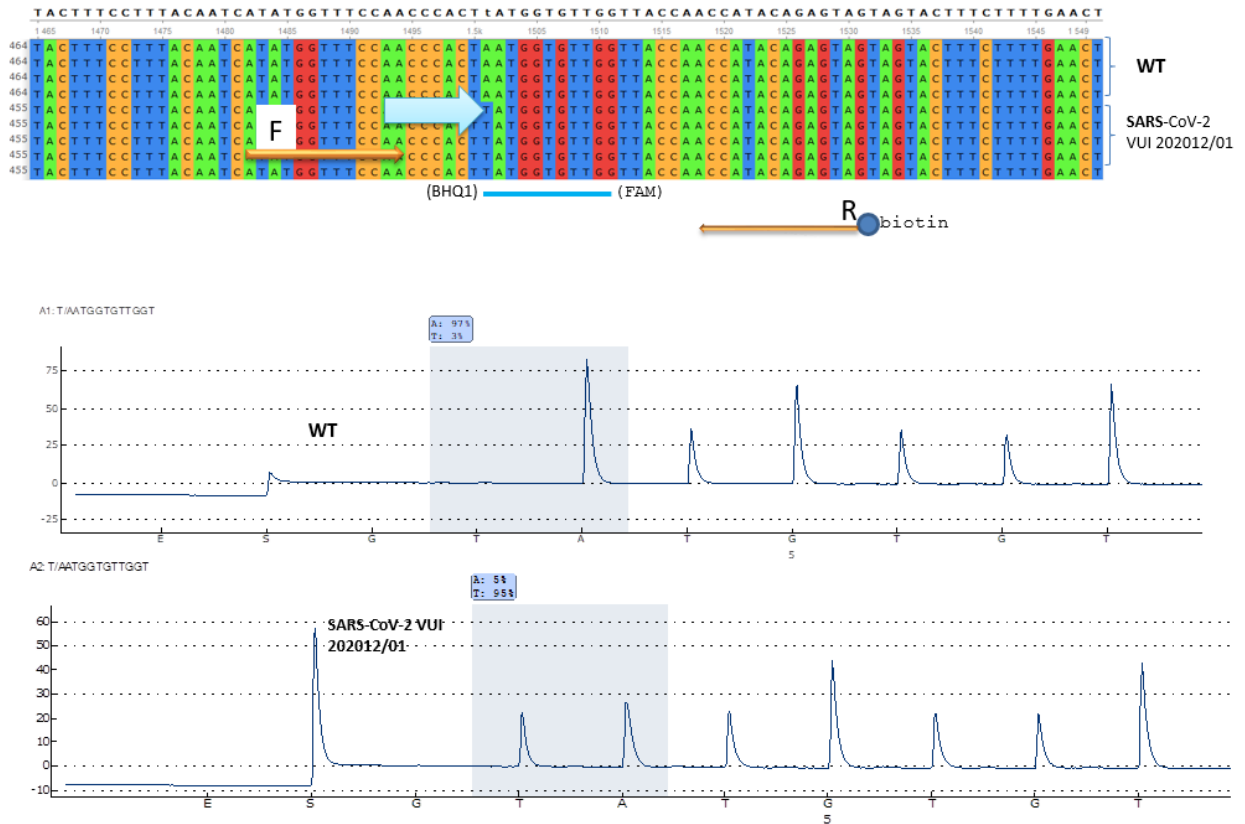


Рисунок 22 — Схема расположения олигонуклеотидов относительно детектируемой области, используемая для дизайна систем на этапе разработки и пирограммы дикого типа (WT) и Alpha варианта SARS-CoV-2. **Голубой стрелкой** обозначена мишень (в данной случае замена A>T), **Оранжевым цветом** — прямой и обратный праймеры, **синим** — сайт посадки флуоресцентного зонда. На пирограммах **голубым цветом** обозначена полиморфная область.

В начале разработки методики для выявления мутации N501Y в качестве контрольных образцов использовали $1 \cdot 10^8$ ГЭ/мл «PHK SARS-CoV2 VOC-2020 12/01» (вариант Alpha SARS-CoV-2) и $1 \cdot 10^8$ ГЭ/мл «PHK SARS-CoV-2 (дикий тип, номер GenBank Wuhan MN908947, RefSeq NC_045512)» (изоляты получены от руководителя Научной группы разработки новых молекулярно-биологических технологий ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Для этого проводили серию десятикратных разведений (**рисунк 23**). Для

дальнейших постановок в качестве контрольных образцов без количественного определения концентраций выбраны разведения «2», «6», «4», «8».

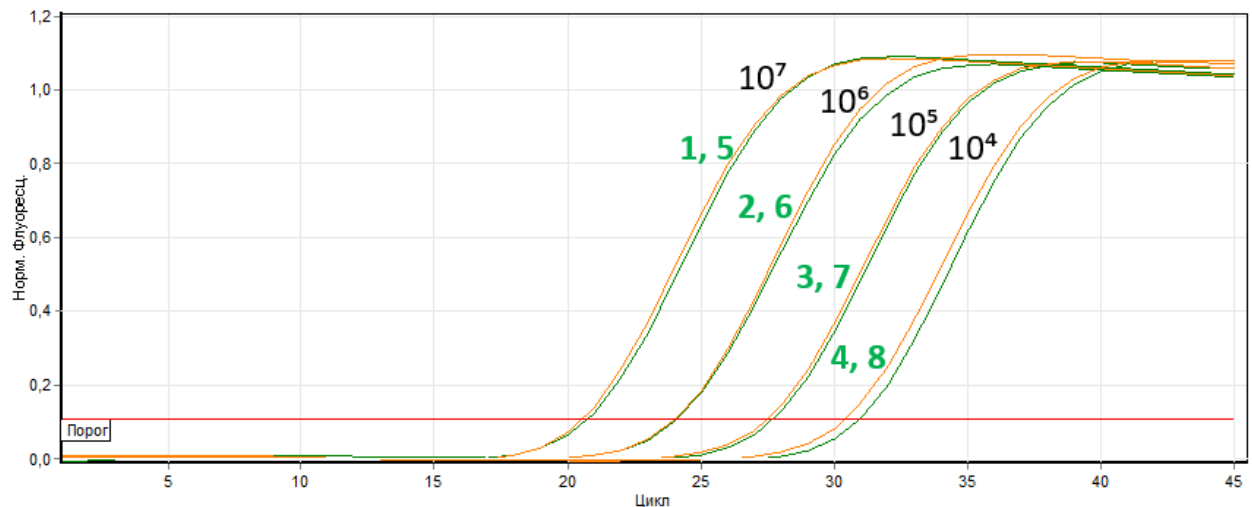


Рисунок 23 — Результат постановки методики на приборе роторного типа (Rotor GeneQ, QIAGEN, Hilden, Germany) в формате ПЦР–РВ

Цифровые обозначения:

1-4 — «дикий тип» Wuhan MN908947 SARS–CoV–2 (WT),

5-8 — вариант Alpha SARS–CoV–2

В дальнейшем получены положительные контроли путем клонирования специфических ампликонов с целевыми мутациями в вектор pGEM–T (Promega, Madison, WI, USA) в соответствии с протоколами производителя. Правильность клонированных последовательностей подтверждена секвенированием по методу Сэнгера.

Условия постановки реакции ПЦР–РВ

Лабораторная методика для идентификации вариантов Delta и Omicron SARS–CoV–2 реализована в моноплексном формате с предварительным этапом проведения реакции ОТ. Данный формат не так удобен в работе, как мультиплексный, однако позволяет в короткие сроки изменять количество детектируемых мутаций в зависимости от задач. В дальнейшем, с учетом ограниченности во времени для разработки методики, этот подход на практике оказался успешным.

Для методики отбирались только образцы с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2.

ПЦР-РВ проводили с использованием амплификаторов роторного (Rotor Gene Q, QIAGEN, Hilden, Germany) и планшетного типа (ДТпрайм, ДНК-технология, Россия и CFX96 Bio-Rad, Hercules, California, USA) с возможностью детекции флуоресцентного сигнала как минимум по двум каналам.

Условия проведения моноплексной ПЦР: реакционная смесь для каждой мишени состояла из 10 мкл ПЦР-микс-1 (содержит dNTP, праймеры и зонды, концентрация праймеров и зондов экспериментально подобрана от 0,5 до 0,7 мкМ и от 0,2 до 0,3 мкМ соответственно), 5 мкл ПЦР-микс-2 (содержит Трис-буфер и MgCl₂) и 0,5 мкл полимеразы TaqF. В подготовленные пробирки добавляли 10 мкл образца кДНК или образца положительного контроля, состоящего из плазмидной ДНК.

Для учета результатов одновременно для всех мишеней использована универсальная программа. При оптимизации условий ПЦР-РВ приоритетными считались условия, сокращающие время амплификации (1 цикл при 95°C в течение 15 минут, затем 45 циклов при 95°C в течение 10 с/60°C в течение 20 с. Детекцию результатов проводили на стадии 60 °C по каналам FAM и R6G).

Подтверждение результатов и валидация методик на этапе разработки проведены с использованием референсных методов определения принадлежности образца к вариантам SARS-CoV-2 методами секвенирования по методу Сэнгера и пиросеквенированием [77].

Для разработки методик использована информация о GC-составе гена S-белка, после чего для разработки выбрана модификация олигонуклеотидов закрытой нуклеиновой кислотой (LNA) при дизайне зондов.

На наборы олигонуклеотидов (праймеры и зонды) для методик определения мутаций, использованные в данном исследовании получены патенты на изобретения, охраняемые патентным правом на территории

Российской Федерации (перечислены в разделе «Внедрение в практику» данного диссертационного исследования).

Интерпретация результатов и подробные условия применения методики представлены в утвержденных Методических рекомендациях МР 3.1.0302-22 «Методика определения геновариантов Омикрон и Дельта SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени» [121].

На этапе разработки было проанализировано 436 образцов методом ПЦР-РВ на наличие или отсутствие мутаций: L452R, P681R, del69-70, N501Y, del143-145 и Ins214EPE с подтверждением результатов при помощи секвенирования. Результаты представлены в **таблице 11**.

Таким образом, выбраны мутации-мишени, при детекции которых возможно дифференцировать варианты SARS-CoV-2 друг от друга. В случае с вариантами Delta и Omicron SARS-CoV-2 выбраны шесть мутаций в гене S-белка: L452R, P681R, del69-70, N501Y, del143-145 и Ins214EPE. Для предположительного ответа о принадлежности изолята к варианту Delta SARS-CoV-2 в 2022 году с декабря до июля достаточным было обнаружение двух мутаций — S:L452R и S:P681R. При одновременном обнаружении мутаций S:del69-70, S:N501Y, S:del143-145 и S:Ins214EPE выдавался результат о предположительной принадлежности к варианту Omicron SARS-CoV-2.

Таблица 11 — Результаты применения методики на этапе разработке на образцах биологического материала с подтвержденным наличием SARS-CoV-2

Результаты/мишени	L452R	P681R	del69–70	N501Y	del143–145	Ins214EPE
NGS/Sanger отрицательные	28	19	10	26	69	49
Истинно отрицательные	28	19	10	26	69	47
Ложноположительные	0	0	0	0	0	2
Специфичность (ДИ)	100,0% (87,9-100,0%)	100,0% (83,0-100,0%)	100,0% (72,0-100,0%)	100,0% (87,0-100,0%)	100,0% (95,0-100,0%)	95,9% (86,0-99,0%)
NGS/Sanger положительные	117	67	241	190	124	169
Истинно положительные	117	67	239	190	123	169
Ложноотрицательные	0	0	2	0	1	0
Чувствительность (ДИ)	100,0% (96,9-100,0%)	100,0% (94,6-100,0%)*	100,0% (97,0-99,9%)	100,0% (98,0-100,0%)	100,0% (95,6-99,9%)	98,8% (97,8-100,0%)
Всего	145	86	251	216	193	218
Точность (ДИ)	100% (97,0-100%)	100% (95,7-100%)	99% (98,5-100%)	100% (82,9-92,0%)	99% (98,1-100%)	99% (96,7-99,0%)

* С использованием критерия Вильсона для малых групп [124],

ДИ — доверительный интервал (рассчитан с использованием точного критерия Клоппера–Пирсона [144],

Специфичность — истинно отрицательные / (истинно отрицательные + ложноположительные),

Чувствительность — истинно положительные / (истинно положительные + ложноположительные),

Точность — (истинно положительные + истинно отрицательные) / общее количество,

Всего — истинно отрицательные + ложноположительные + истинно положительные + ложноотрицательные.

При получении нетипичных результатов требовалась перестановка ПЦР–РВ, если же результат повторялся, такой образец рекомендовалось отдать на исследование методами секвенирования, предполагая ошибку постановки или появление новой линии вируса. Специфичность и чувствительность разработанных методик приближена к 100%. Что позволило использовать ее наравне с методами секвенирования (полногеномным и секвенированием фрагментов генов по методу Сэнгера).

Данная методика реализована в моноплексном формате, что, несомненно, не так удобно для пользователя, но позволило сократить время на разработку методики и отправить в кратчайшие сроки для использования специалистами в региональных вирусологических лабораториях. В дальнейшем при эволюции SARS–CoV–2 моноплексный формат позволил быстро оптимизировать методику, добавив дополнительные мишени-мутации.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ СУБЛИНИЙ ВАРИАНТА OMICRON SARS-COV-2

Оптимизация методики и выбор мишеней

При дальнейшей эволюции вируса необходим постоянный мониторинг за ситуацией и оптимизация скрининговых методов, применяемых для типирования SARS-CoV-2. Нами осуществлена также разработка мультиплексной ПЦР-РВ, совмещенной с этапом обратной транскрипции для скринингового типирования субвариантов Omicron SARS-CoV-2, которая проходила в несколько этапов.

Выбор мишеней (мутаций SARS-CoV-2) для выявления основан на анализе распространенности мутаций в различных подлиниях варианта Omicron SARS-CoV-2. При выборе мишеней учитывалась значимость мутаций с учетом эволюции вируса, а также сложность реализации разработки.

В качестве маркера линий BA.2 и BA.4/BA.5 выбрана делеция кодонов, кодирующих аминокислоты в положениях 24–26 S-белка SARS-CoV-2. Делеция **delLPP24-26** расположена в стратегическом антигенном сайте и предположительно позволяет вирусу избегать действия моноклональных антител или иммунного ответа [145].

Мутация T95I добавлена в ПЦР-анализ в качестве маркера линий BA.1 и BA.3. Она была обнаружена в сублиниях Delta SARS-CoV-2 (10–40%), а также в вариантах Mu и Eta. Влияние этой мутации на тяжесть заболевания или свойства вируса в момент написания исследования неизвестно [146].

В **таблице 12** представлен метод интерпретации результатов ОТ-ПЦР-РВ. Некоторые мутации имеют разную частоту встречаемости в сублиниях варианта Omicron SARS-CoV-2, и это следует учитывать при применении метода. При анализе данных о частоте мутаций использовались данные с сайта outbreak.info [132].

Таблица 12 — Мутации, выбранные для разработки мультиплексной ПЦР–РВ и интерпретация полученных результатов

Мутация/сублиния	BA.1	BA.2	BA.3	BA.4/BA.5	Вариант Delta
L452R	–	–	–	+	+
P681R	–	–	–	–	+
N501Y	+	+	+	+	–
delHV69–70	+	–	+	+	–
Ins214EPE	+	–	–	–	–
E484A	+	+	+	+	–
delLPP24-26	–	+	–	+	–
T95I	+	–	+	–	–

**Данная мутация обнаружена в части геномов Delta-варианта SARS–CoV–2*

Подобный выбор значимых мутаций позволяет не только дифференцировать сублинии Omicron SARS–CoV–2 — BA.1, BA.2, BA.3, BA.4/BA.5, но и выявить новые/атипичные комбинации значимых мутаций VOC-вариантов. Любая нетипичная комбинация мутаций является рекомендацией для проведения секвенирования образца.

На **рисунке 24** представлен дизайн расположения мутаций-мишеней в мультиплексных смесях для проведения ПЦР–РВ с цветовым обозначением соответствующего спектра.

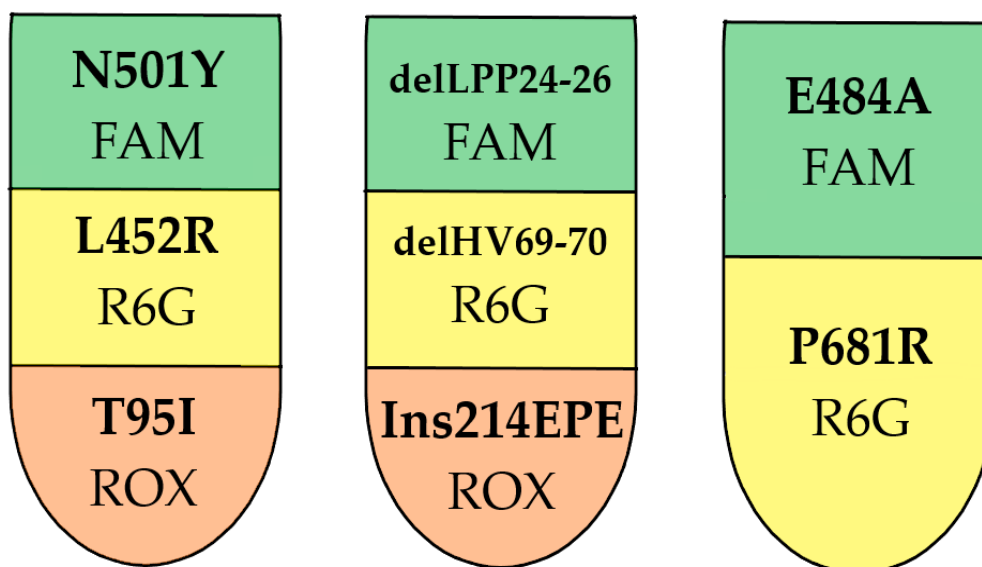


Рисунок 24 — Дизайн мультиплекса ОТ–ПЦР–РВ (представлены мишени и соответствующие флуорофоры)

Для одностадийной мультиплексной ПЦР–РВ использовали ревертазу (MMIV), RT–G–mix–2, Taq–F полимеразу и ПЦР– смесь–2 FEP/FRT (все реагенты производства Amplisens, ЦНИИЭ, г. Москва, Россия). Методами сравнения для разработанной методики выбраны секвенирование по методу Сэнгера и полногеномное секвенирование.

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей при дизайне положений праймеров и зондов использовали BioEdit [130], [147].

Данные о полногеномных последовательностях линий Omicron SARS–CoV–2 получены из базы данных GISAID [133]. Для оценки распространенности мутаций использованы геномные отчеты Outbreak.info [132].

В реакции использованы два праймера и LNA-модифицированный флуоресцентный зонд для каждой амплифицируемой кДНК-мишени (РНК в случае мультиплексного анализа).

Для моноплексного формата использовали следующий протокол: 1 цикл при 95°C в течение 15 мин, затем 45 циклов при 95°C в течение 10 с/60°C в течение 20 с. Детекцию флуоресценции проводили на стадии 60 °C по каналам FAM, R6G и ROX [77].

Условия проведения моноплексной ПЦР–РВ: реакционная смесь для каждой мишени состояла из 10 мкл ПЦР–микс–1 (содержит dNTP, праймеры и зонды, концентрация праймеров и зондов экспериментально подобрана от 0,5 до 0,7 мкМ и от 0,2 до 0,3 мкМ соответственно), 5 мкл ПЦР–микс–2 (содержит Трис-буфер и MgCl₂) и 0,5 мкл полимеразы TaqF. В подготовленные пробирки добавляли 10 мкл образца кДНК или образца положительного контроля, состоящего из плазмидной ДНК.

Для одноэтапных мультиплексных анализов использовали следующий протокол: 1 цикл 50°C в течение 20 мин, 1 цикл 95°C в течение 15 мин, затем 45 циклов 95°C в течение 10 с/60°C в течение 20 с. Детекцию флуоресценции проводили на стадии 60 °C по каналам FAM, R6G и ROX.

Протокол детекции для одноэтапных мультиплексных анализов реализовывался следующим образом: реакционная смесь состояла из 10 мкл ПЦР-микс-1 (содержит dNTP, праймеры и зонды; концентрация праймеров и зондов определялась экспериментально от 0,5 до 0,7 мкМ и от 0,2 до 0,3 мкМ соответственно), 5 мкл ПЦР–микс–2 (содержит Трис-буфер и MgCl₂), 0,5 мкл полимеразы TaqF, 0,25 мкл Ревертазы-MMLV и 0,25 мкл RT-G-Mix-2 (содержит 1–тиоглицерин). В подготовленные пробирки добавляли 10 мкл образца РНК или образца положительного контроля, состоящего из плазмидной ДНК.

Положительные контроли, как и при первом варианте разработки получены путем клонирования специфических ампликонов с целевыми мутациями в вектор pGEM–T (Promega, Madison, WI, USA) в соответствии с протоколами производителя. Правильность клонированных последовательностей подтверждена секвенированием по методу Сэнгера.

Каждый фрагмент фланкировался праймерами и содержал мишень-мутацию. Для создания мультиплексного контроля ПЦР анализа контрольные

образцы смешивали в эквимольных количествах, для получения единой смеси всех контрольных образцов, используемых в протоколе.

Концентрацию положительного контроля измеряли спектрофотометрически с использованием Nanodrop 2000. Далее контрольные образцы с концентрацией 20 нг/мкл смешивали в равных пропорциях для получения смеси контролей.

Для конечной смеси приготовлена серия разведений и проанализирована с помощью ОТ–ПЦР–РВ со всеми ПЦР-смесями, использованными в моноплексном формате. По результатам экспериментов выбрано разведение со значением C_t в диапазоне 20–25. В дальнейшем все эксперименты проводились с этим разведением.

Проведена проверка мишеней и сайтов олигонуклеотидов на наличие полиморфизмов (учитывая относительно быструю эволюцию вируса). Окончательный вариант мультиплекса представлен выше на **рисунке 24**.

Для данного исследования специально отобраны образцы с подтвержденным наличием или отсутствием выбранных мишеней после секвенирования (NGS и секвенирование по методу Сэнгера).

Мультиплексные системы протестированы после получения надежных моноплексных методик. Разработка одностадийной ПЦР–РВ в сочетании с реакцией обратной транскрипции осуществлена после оптимизации условий исследования.

В **таблице 13** показаны прямые и обратные праймеры и зонды, используемые для детекции выбранных мутаций-мишеней.

Таблица 13 — Мишени-мутации S-гена SARS-CoV-2 и олигонуклеотиды для их детекции (для применения в мультиплексном формате ОТ-ПЦР-РВ)

Мутации S-гена SARS-CoV-2	5'-последовательность-3'
L452R	(F) GGC TGC GTT ATA GCT TGG AAT TCT
	(R) CCG GCC TGA TAG ATT TCA GTT GAA
	(P) [*] (R6G)AAT TAC CGG TAT AGA T (BHQ1)
N501Y	(F) CTG AAA TCT ATC AGG CCG GTA
	(R) GCT GGT GCA TGT AGA AGT TCA AAA G
	(P) [*] (FAM)CCC ACT TAT GGT G (BHQ1)
T95I	(F) GGT TTG ATA ACC CTG TCC TAC CA
	(R) GGG ACT GGG TCT TCG AAT CTA A
	(P) [*] (ROX)GCT TCC ATT GAG AA (BHQ-2)
delHV69-70	(F) GGA CTT GTT CTT ACC TTT CTT TTC CAA TG
	(R) TGG AAG CAA AAT AAA CAC CAT CAT TAA AT
	(P) [*] (R6G)TCC ATG CTA TCT CTG GGA C (BHQ1)
delLPP24-26	(F) CAC TAG TCT CTA GTC AGT GTG T
	(R) TGT CAG GGT AAT AAA CAC CAC G
	(P) [*] (FAM)GAA CTC AAT CAT ACA CT (BHQ-1)
Ins214EPE	(F) GGA CCT TGA AGG AAA ACA GGG TAA
	(R) CCA ATG GTT CTA AAG CCG AAA AAC C
	(P) [*] (ROX)TAG TGC GTG AGC CAG AA (BHQ2)
P681R	(F) GTA GGC AAT GAT GGA TTG ACT AGC TAC
	(R) TGC AGG TAT ATG CGC TAG TTA TCA GA
	(P) [*] (R6G)GCC GAC GAG AA (BHQ1)
E484A	(F) TTC AAC TGA AAT CTA TCA GGC CG
	(R) AGT TGC TGG TGC ATG TAG AAG TTC A
	(P) [*] (FAM)GTG TTG CAG GTG (BHQ-1)

* Зонд включает от 4 до 7 LNA.

Температура плавления (T_m) зондов находилась в пределах от 65°C до 70°C. Для оценки термодинамических характеристик и вторичных структур использован калькулятор IDT OligoAnalyzer™ Tool [148].

Мультиплексная ОТ–ПЦР–РВ адаптирована под приборы Rotor Gene Q (QIAGEN, Hilden, Германия), DT–prime (ДНК-технология, Протвино, Россия) и CFX96 Bio-Rad (Hercules, Калифорния, США).

Результаты исследования образцов с использованием разработанной мультиплексной ОТ–ПЦР–РВ представлены в **таблице 14**. Всего данной методикой исследовано 622 образца с различными сочетаниями мутаций. Наличие и отсутствие мутаций подтверждено методом секвенирования.

В **таблице 14** представлены данные для всех форматов (как моноплексного, мультиплексного, так и ОТ–мультиплексного анализа), то есть расчет проводился именно для разработанных комбинаций праймеры–зонд для каждой из выбранной мишени. Результаты, не подтвержденные секвенированием по методу Сэнгера или NGS, были исключены из расчетов.

Таблица 14 — Результаты применения разработанной методики на архивных образцах и образцах с июля по декабрь 2022 года.

Результаты/мишени	N501Y	L452R	T95I	Del LPP24-26	Del 69-70	Ins 214EPF	E484A	P681R
NGS/Sanger отрицательные	10	26	245	22	71	120	16	110
Истинно отрицательные	8	26	241	20	63	120	14	110
Ложноположительные	2	0	4	2	8	0	2	0
Специфичность (ДИ)	80,0% (49,0–94,4%)*	100% (87,1–100%)*	98,4% (95,9–99,6%)	90,9% (72,2–97,5%)*	88,7% (79,0–95,0%)	100% (97,0–100%)	87,5% (64,0–96,5%)*	100% (97,4–100%)
NGS/Sanger положительные	213	192	46	235	276	3	255	0**
Истинно положительные	206	183	43	235	270	3	251	-
Ложноотрицательные	7	9	3	0	6	0	4	-
Чувствительность (ДИ)	96,7% (93,4–98,7%)	95,3% (91,3–97,8%)	93,5% (82,1–98,6%)	100% (98,4–100%)	97,8% (95,3–99,2%)	100% (43,9–100%)*	98,4% (96,0–99,6%)	-
Всего	223	218	291	257	347	123	271	110
Точность (ДИ)	96,0% (92,5–98,1%)	95,9% (92,3–98,1%)	97,6% (95,16–99,06%)	99,26% (97,26–99,96%)	96% (93,36–97,8%)	100% (97,1–100%)	97,8% (95,2–99,2%)	100% (96,7–100%)

* С использованием критерия Вильсона для малых групп [124],

*** Для P681R мутации, чувствительность и специфичность подтверждена на больших выборках в предыдущей разработке (во время активного циркулирования на территории Российской Федерации варианта Delta SARS-CoV-2 [9]).*

***ДИ** — доверительный интервал (рассчитан с использованием точного критерия Клоппера-Пирсона [144],*

***Специфичность** — истинно отрицательные/ (истинно отрицательные + ложно положительные),*

***Чувствительность** — истинно положительные/ (истинно положительные + ложноположительные),*

***Точность** — (истинно положительные + истинно отрицательные) / общее количество,*

***Всего** — истинно отрицательные + ложноположительные + истинно положительные + ложноотрицательные.*

Для **Mix N501Y + T95I + L452R** диагностическая специфичность анализа составила 80,0–100,0%, диагностическая чувствительность — 93,5–96,3%.

Для **Mix delHV69–70 + Ins214EPE + delLPP24-26** диагностическая специфичность анализа составила 88,7–100,0%, диагностическая чувствительность — 97,8–100,0%.

Для **Mix E484A+P681R** диагностическая специфичность теста составила 93,8–100%, диагностическая чувствительность — 97,7–100,0% (специфичность методики для P681R подтверждена экспериментально в предыдущей разработке). Интерпретацию результатов проводили с помощью **таблицы 12**.

Практическое применение разработанных методик

Лабораторная методика для дифференцирования вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2 масштабирована и внедрена на производство на основании Распоряжения Правительства Российской Федерации от 10 февраля 2022 года № 213-р. Масштабирование и внедрение на производство осуществлено совместно с главным технологом ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и руководителем центра разработки, развития продукции и инноваций ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Данная методика в

виде расфасованных реагентов отправлена для применения в лабораторном звене Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по 85 субъектам Российской Федерации.

Результаты, полученные при рутинной практике Научной группы геномной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при проведении исследований по молекулярно-генетическому мониторингу за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) с июня по декабрь 2022 года, представлены в публикациях [3] и [9].

Методика апробирована на больших выборках образцов в практике Научной группы геномной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. В общей сложности с 2021 по 2022 гг. протипировано 1072 образцов. Из них к варианту Delta SARS-CoV-2 отнесено 149 образцов, Omicron SARS-CoV-2 — 881, сомнительный результат получен для 42 образцов.

Результаты, полученные при использовании реагентов специалистами региональных Центров гигиены и эпидемиологии загружены в базу данных VGArus (Платформа агрегирования результатов расшифровок генома возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний) на основании Постановления Правительства Российской Федерации от 23 марта 2021 года № 448 и рассмотренные в следующих главах исследования вместе с результатами, полученными в результате исследования полногеномным секвенированием и секвенированием фрагментов генов по методу Сэнгера.

Методика для дифференцирования субвариантов Omicron SARS-CoV-2 использована в рутинной практике Научной группы геномной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при проведении исследований по молекулярно-генетическому мониторингу за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) с июня по декабрь 2022 года [120].

В **таблице 15** представлены результаты, полученные с июля по декабрь 2022 года с использованием ОТ-мультиплексного ПЦР-РВ анализа.

Таблица 15 — Результаты, полученные с июля по декабрь 2022 года с использованием метода мультиплексной ОТ–ПЦР–РВ для скрининга субвариантов Omicron SARS–CoV–2

	BA.1	BA.2	BA.3	BA.4/5	Delta	Не определено	Всего	Доверительный интервал/ Коэффициент погрешности *
Июль	2 (4,3%)	17 (37,0%)	0 (0,0%)	27 (58,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	46 (100,0%)	90%/10%
Август	0 (0,0%)	2 (3,8%)	0 (0,0%)	51 (96,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	53 (100,0%)	90%/10%
Сентябрь	0 (0,0%)	2 (1,4%)	0 (0,0%)	139 (98,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	141 (100,0%)	95%/2%
Октябрь	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	181 (95,3%)	2 (1,1%)	7 (3,7%)	190 (100,0%)	99%/1%
Ноябрь	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	52 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	52 (100,0%)	90%/10%
Декабрь	0 (0,0%)	3 (6,0%)	0 (0,0%)	47 (94,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	50 (100,0%)	90%/10%

* Количественная репрезентативность выборки

Всего с июля по декабрь 2022 года при помощи разработанной методики проанализировано 532 пробы. Определена доминирующая роль субвариантов BA.4/5, доля которых в исследованных выборках была значительно выше долей других субвариантов. Полученные результаты позволили использовать разработанный метод в качестве инструмента скрининга для генотипирования сублиний Omicron SARS–CoV–2.

Таким образом, учитывая эволюцию SARS-CoV-2, нами проведена оптимизация лабораторной методики, представленной в Главе 4. Методика для дифференцирования субвариантов Omicron SARS-CoV-2 реализована в одноэтапном, совмещенном с обратной транскрипцией, мультиплексном формате. Позволяет дифференцировать субварианты Omicron SARS-CoV-2 — BA.1, BA.2, BA.3, BA.4/5 и вариант Delta SARS-CoV-2 друг от друга. В качестве мишеней для детекции в ПЦР-ПВ выбраны мутации S: N501Y, S: L452R, S: T95I, S: DelLPP24-26, S: Del69-70, S: Ins214EPE, S: E484A и S: P681R.

Разработка реализована в несколько этапов: пересмотр и проверка мест посадки праймеров и зондов на наличие полиморфизмов и замен для исключения ложноотрицательных результатов, тестирование моноплексных смесей, подбор оптимальных условий постановки ПЦР-ПВ, формирование мультиплексных смесей и их тестирование. Одновременно с этим нами подготовлен мультиплексный контроль для постановок.

На практике использование лабораторных методов для дифференцирования вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2, а также субвариантов Omicron SARS-CoV-2, показало, что можно исследовать большое количество образцов биологического материала с подтверждённым наличием РНК SARS-CoV-2 с чувствительностью и специфичностью, практически равными тем, которые достигаются при использовании методов секвенирования. Данные методики на момент реализации проекта по применению скрининга образцов в молекулярно-генетическом мониторинге за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) оказались экономичнее в 1,4–2,7 раз метода секвенирования фрагментов генов по методу Сэнгера и в 4,8–6,8 раз метода NGS (расчет проведен ориентировочно с учетом стоимости реактивов, рабочего времени, затраченного на исследование и обслуживание приборов).

При резко увеличившейся нагрузке на вирусологические лаборатории во время смены варианта Delta на Omicron SARS-CoV-2 применение скрининговых методик позволило быстрее и эффективнее проводить работу по исследованию

генетической принадлежности образцов биологического материала, что значительно снизило в последствии нагрузку на центры секвенирования.

ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ДИНАМИКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВАРИАНТОВ SARS–COV–2 НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ И Г. МОСКВЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДИК ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ ВАРИАНТОВ И СУБЛИНИЙ SARS–COV–2 В 2021–2022 ГГ.

Распространенность циркулирующих вариантов на территории Российской Федерации в 2021–2022 гг.

С января 2021 года на территории Российской Федерации внедрена система молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19). Ключевая роль в этой системе отведена Российской базе данных VGARus.

В период с января 2021 года по октябрь 2022 года определены следующие периоды с доминированием разных вариантов SARS–CoV–2 (рисунок 25).

До июня 2021 года на территории Российской Федерации отсутствовал вариант SARS–CoV–2, который можно было бы назвать доминирующим. Вызывающий повышенную озабоченность в связи с началом интенсивного распространения вариант Alpha SARS–CoV–2 достиг максимума в общей структуре — 18% в апреле 2021 года и уже в этом же месяце доля идущего ему на смену варианта Delta SARS–CoV–2 достигла 4%. В мае 2021 года доля варианта Alpha SARS–CoV–2 снизилась до 14%, а доля Delta SARS–CoV–2 повысилась до 35%. Период с июня 2021 года по декабрь 2021 года характеризуется доминированием варианта Delta SARS–CoV–2.

В январе 2022 года наибольшую долю в структуре стал занимать вариант Omicron SARS–CoV–2. На момент написания диссертационной работы вариант Omicron SARS–CoV–2 занимает доминирующую позицию.

Среди образцов биологического материала полученных от пациентов из разных субъектов Российской Федерации в 2022 году методом полногеномного

секвенирования выделено более 250 сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2. Среди общего количества этих образцов более 44% отнесены к сублинии BA.5.2, более 20% — к BA.1.1 и 12% к BA.2.

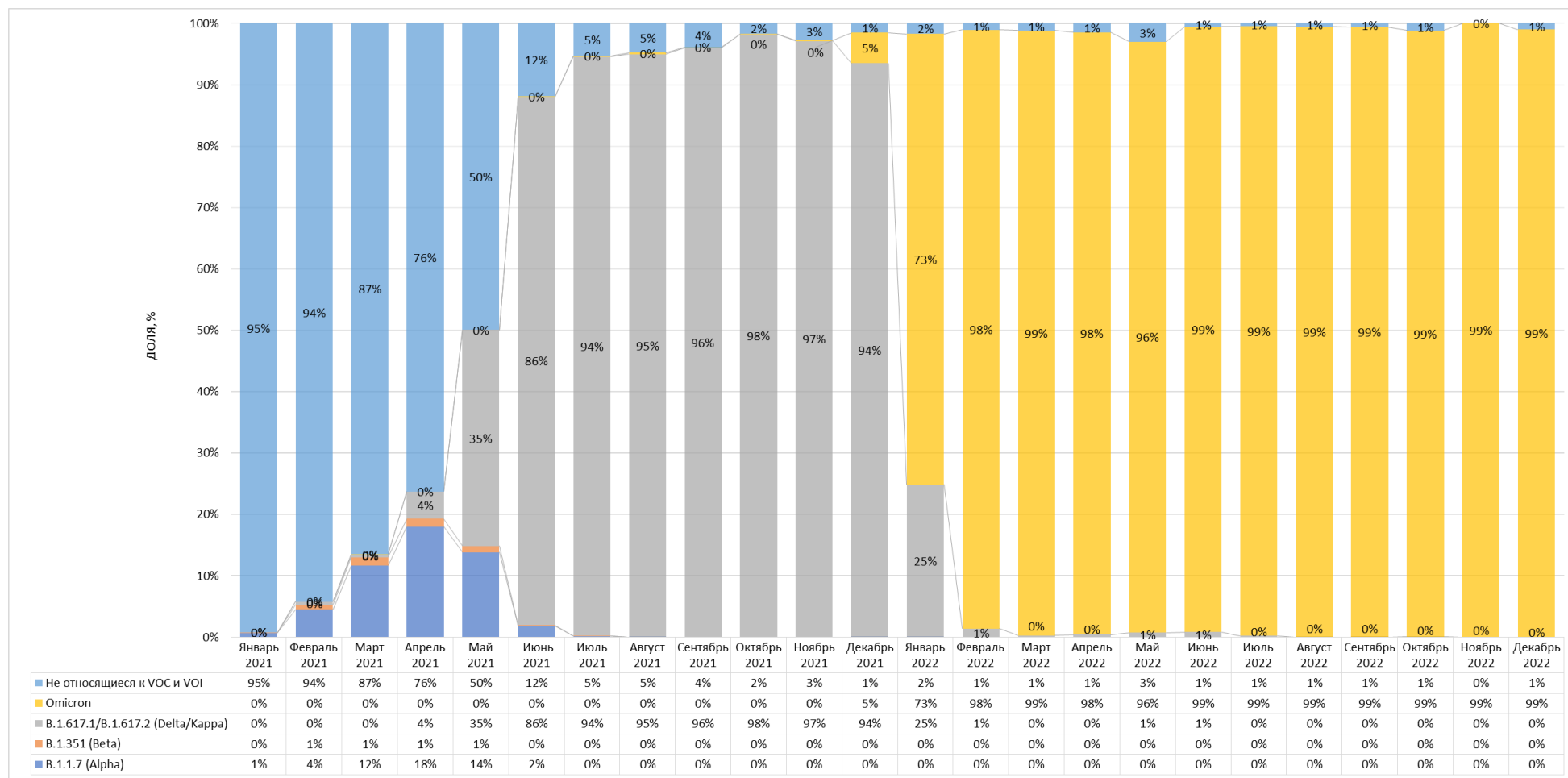


Рисунок 25 — Динамика вариантов SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации с января 2021 года по декабрь 2022 года

В январе 2022 года, среди образцов биологического материала, доминировала сублиния ВА.1.1 Omicron, составив 62% от общего числа исследований. Однако к февралю 2022 года ее доля уменьшилась до 58%, тогда как присутствие сублинии ВА.2 возросло до 18,5%.

В период с марта по июнь 2022 года, субвариант ВА.2 стал преобладающим в структуре варианта Omicron SARS-CoV-2, его доля увеличилась с 53% в марте до 74% к июню.

В июле 2022 года произошла смена доминирующей сублинии на ВА.5.2, ее доля составила 63%, второе место в структуре заняла сублиния ВА.5.1 — 10%.

В период с **августа по октябрь 2022 года** пропорции долей сублиний оставались стабильными. Сублиния ВА.5.2 показывала небольшие колебания, составляя 78% в октябре и достигая 81% в сентябре, в то время как доля сублинии ВА.5.1 варьировалась от 6% в сентябре до 7% в августе (**рисунок 26**).

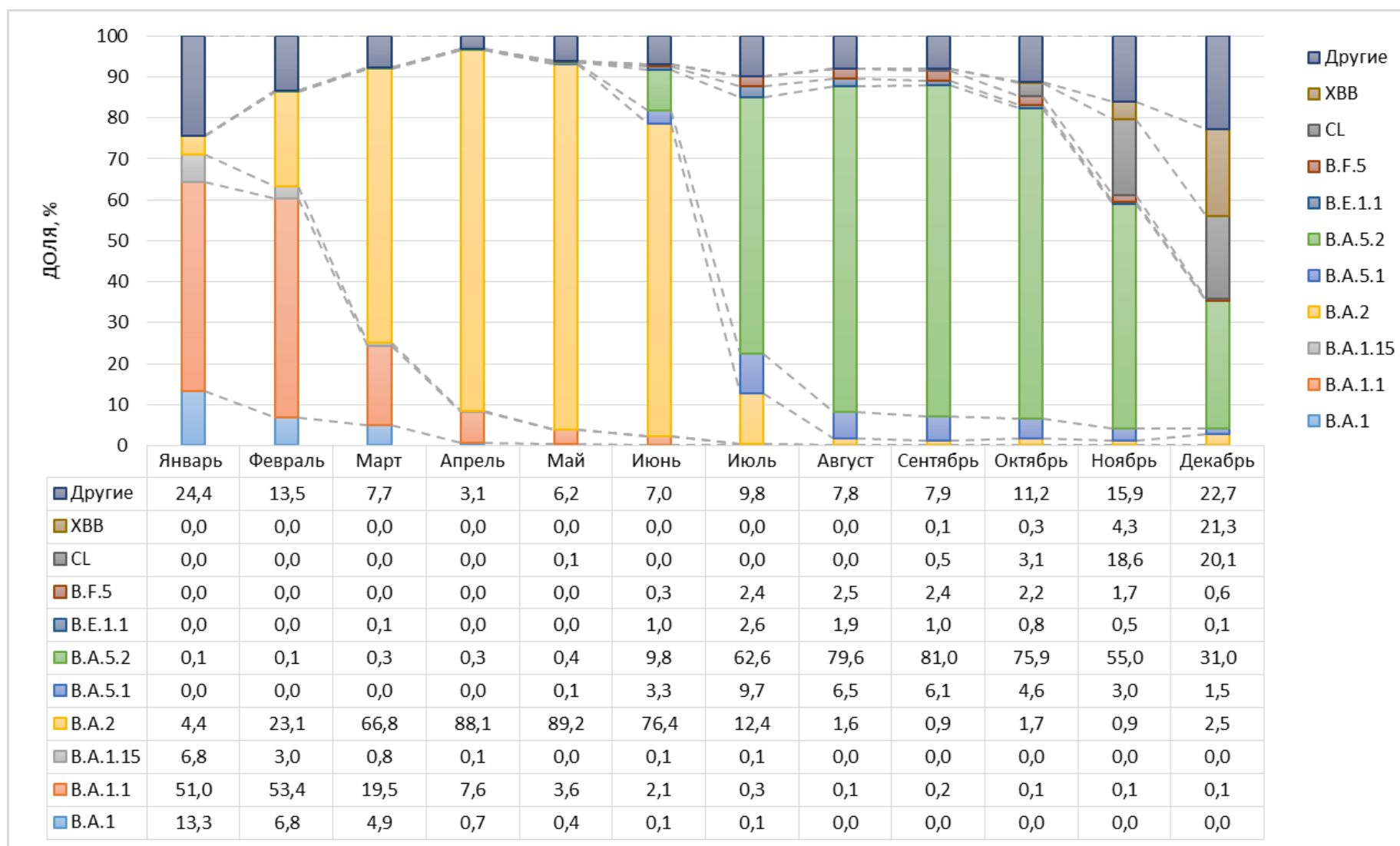


Рисунок 26 — Структура сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 в Российской Федерации с января по декабрь 2022 года

Распространенность циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 на территории Московской области в 2021–2022 гг.

В период с января 2021 года по октябрь 2022 года в Московской области можно выделить несколько периодов, характеризующихся доминирующими вариантами возбудителя (рисунок 27).

До июня 2021 года на территории Московской области отсутствовал вариант SARS-CoV-2, который можно было бы назвать доминирующим. Доля варианта Alpha SARS-CoV-2 достигла максимума в общей структуре среди образцов от пациентов Московской области — 30% в апреле 2021 года.

В мае 2021 года доля варианта Alpha SARS-CoV-2 снизилась до 7%, а доля идущего ему на смену варианта Delta SARS-CoV-2 составила 47%.

С июня по декабрь 2021 года в Московской области преобладал вариант Delta SARS-CoV-2. Его присутствие варьировалось, достигая 87% в декабре и увеличиваясь до полного доминирования — 100%, в октябре того же года.

В январе 2022 года наибольшую долю в структуре стал занимать вариант Omicron SARS-CoV-2, на момент написания диссертационной работы занимающий доминирующую позицию.

Среди образцов биологического материала полученных от пациентов из Московской области в 2022 году, методом полногеномного секвенирования определено более 110 сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2. Среди общего количества этих образцов 53% отнесены к сублинии BA.5.2, 11% — к BA.1.1, 10% — к BA.2, 6% — к BA.5.1

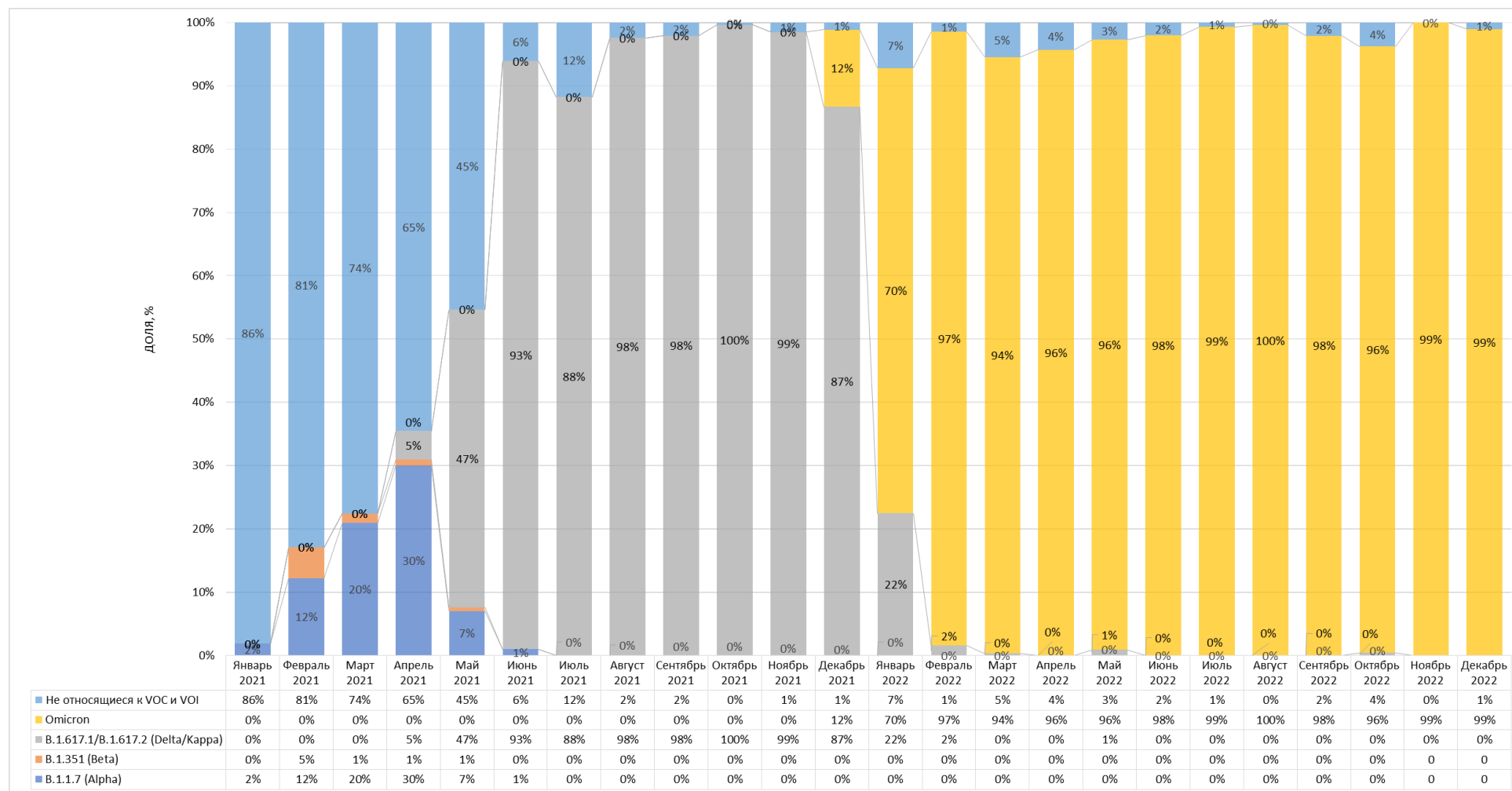


Рисунок 27 — Динамика вариантов SARS-CoV-2 на территории Московской области с января 2021 года по октябрь 2022 года

Среди образцов от пациентов, проживающих в Московской области, в январе 2022 года наибольшую долю (49%) составили пробы, отнесенные к сублинии ВА.1.1. Однако уже в марте 2022 года доля сублинии ВА.1.1 снизилась до 21%, а доля сублинии ВА.2 достигла 61%.

В период с **марта по июнь 2022 года** сублиния ВА.2 варианта Omicron SARS-CoV-2 занимала ведущее положение, причем ее доля увеличивалась с 61% в марте до 77% в апреле того же года. В июле 2022 года произошла смена доминирующей сублинии на ВА.5.2, ее доля составила 72%, второе место в структуре заняла сублиния ВА.5.1 — 10%.

В **августе–октябре 2022 года** распределение долей сублиний оставались относительно стабильными, с колебаниями доли сублинии ВА.5.2 в пределах 66% в октябре и до 78% в августе, тогда как доля сублинии ВА.5.1 колебалась между 7% в сентябре и октябре и 8% в августе (**рисунок 28**).

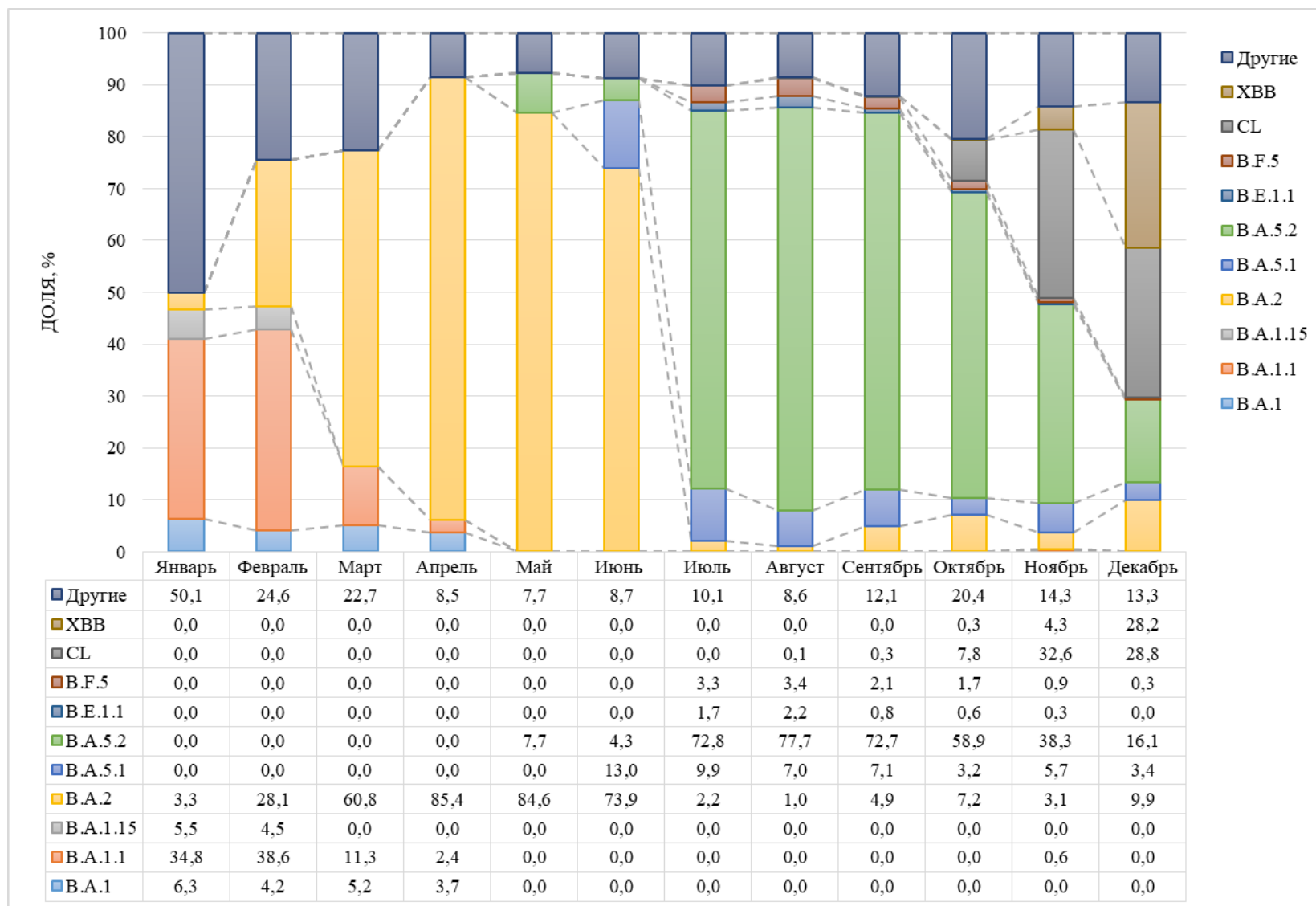


Рисунок 28 — Динамика вариантов SARS-CoV-2 на территории Московской области с января 2022 по декабрь 2022 год

Распространенность циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 на территории г. Москвы в 2021–2022 гг.

В период с **января 2021** года по **октябрь 2022** года можно выделить несколько периодов, характеризующихся доминирующими вариантами возбудителя (рисунок 29).

До **июня 2021** года на территории г. Москвы отсутствовал вариант SARS-CoV-2, который можно было бы назвать доминирующим. В **марте 2021** года доля варианта Alpha SARS-CoV-2 достигла пика, составив 20% от общего числа случаев.

К **апрелю** этого же года ее уровень опустился до 18%, в то время как доля нового варианта Delta SARS-CoV-2 увеличилась до 3%. К **маю** доля варианта Delta в структуре возросла до 42%.

Период с **июня 2021** года по **декабрь 2021** года в г. Москве характеризовался доминированием варианта Delta SARS-CoV-2.

В **январе 2022** года наибольшую долю в структуре стал занимать вариант Omicron SARS-CoV-2, на момент написания диссертационной работы занимающий доминирующую позицию.

Среди образцов биологического материала полученных от пациентов из г. Москвы в 2022 году методом полногеномного секвенирования выделено более 160 сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2. Среди общего количества этих образцов 52% отнесены к сублинии BA.5.2, 19% — к BA.1.1, 6% — к BA.5.1, 5% — к BA.2.

Среди образцов с датой отбора от пациентов, проживающих в г. Москве в **январе 2022** года наибольшую долю (63%) составляли пробы, отнесенные к сублинии BA.1.1. Однако уже в **марте 2022** года доля сублинии BA.1.1 снизилась до 19%, а доля сублинии BA.2 достигла 45%.

С **марта по июнь 2022** года сублиния BA.2 варианта Omicron SARS-CoV-2 занимала доминирующее положение, причём её доля колебалась от 45% в **марте** до 80% в **мае** того же года.

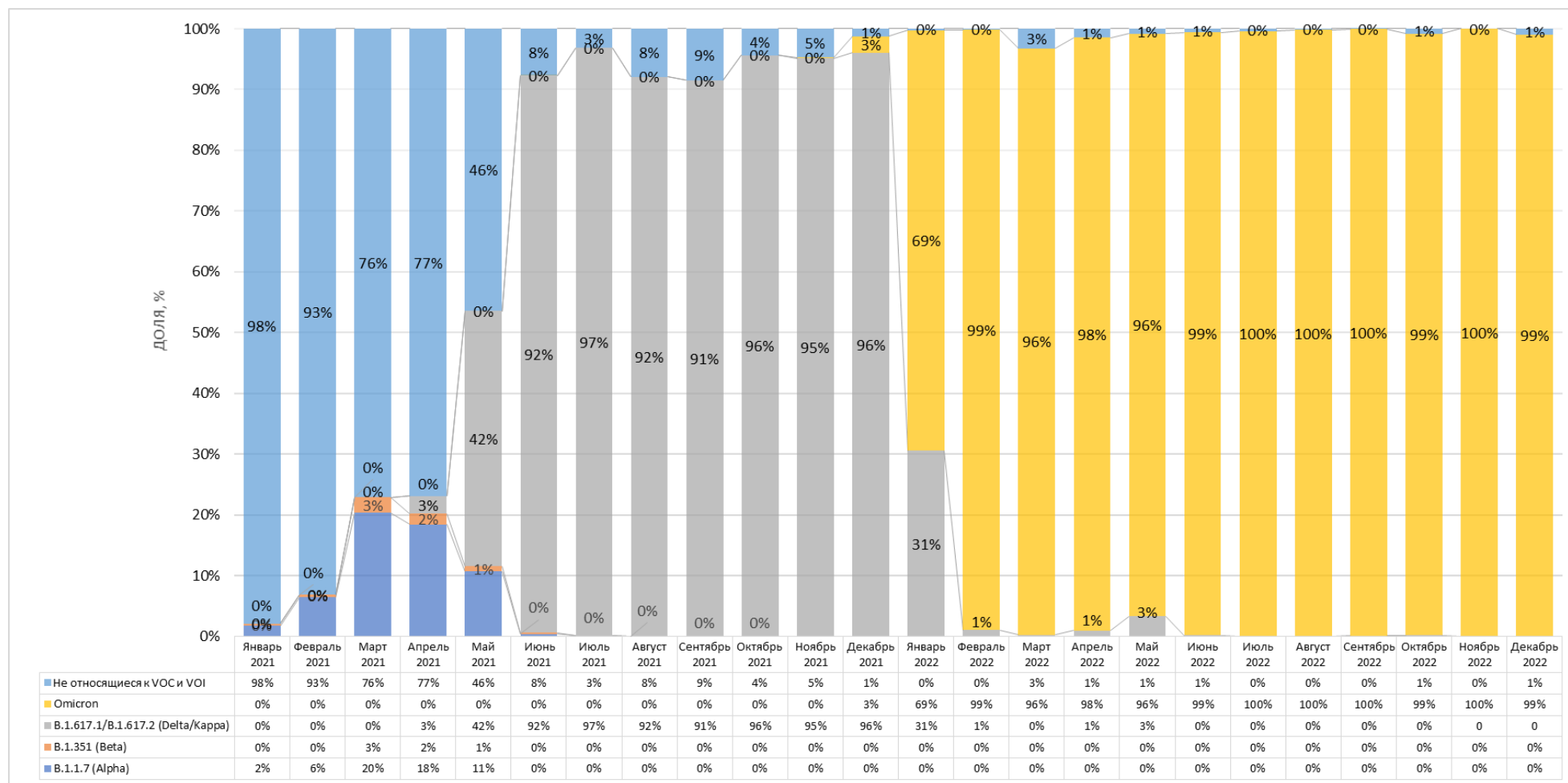


Рисунок 29 — Динамика вариантов SARS-CoV-2 на территории г. Москвы с января 2021 года по октябрь 2022 года

В июле 2022 года произошла смена доминирующей сублинии на ВА.5.2, ее доля составила 69%, второе место в структуре заняла сублиния ВА.5.1 — 11%.

В период с августа по октябрь 2022 года пропорции долей субвариантов оставались стабильными, при этом доля субварианта ВА.5.2 колебалась между 65% в октябре и 82% в августе и сентябре. В то же время, доля субварианта ВА.5.1 менялась от 7% в августе до 18% в октябре (**рисунок 30**).

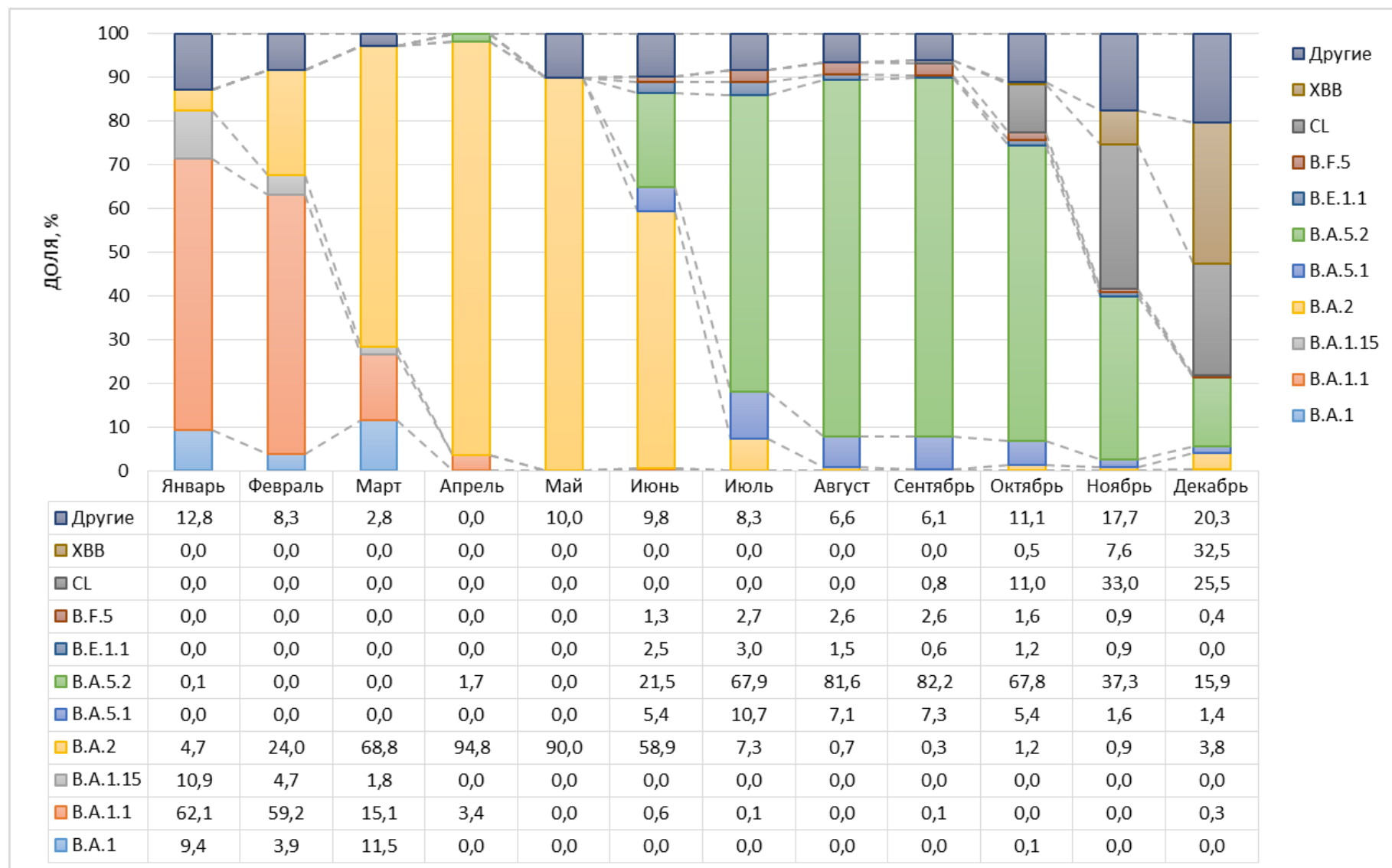


Рисунок 30 — Динамика сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 в г. Москве с января по декабрь 2022 год

Таким образом, периоды доминирования отдельных сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 на территории Московской области и г. Москвы, а также Российской Федерации в целом идентичны.

При сравнении помесечного распределения долей сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 на территории Московской области и г. Москвы установлено, что среди сублиний, имевших наибольшие доли в структуре варианта Omicron SARS-CoV-2 (топ-10), восемь имели приоритетное распространение в обоих субъектах, это: BA.5.2, BA.1.1, BA.2, BA.5.1, BF.5, BA.1, BA.1.15, BE.1.1.

Для помесечных динамик этих вариантов рассчитаны коэффициенты корреляции, которые показали наличие прямой линейной зависимости между циркуляцией пяти сублиний (BA.5.2, BA.1.1, BA.2, BF.5, BA.1.15) на территории Московской области и г. Москвы. Общая доля образцов, отнесенных к этим линиям, составляет 84%.

С начала проведения молекулярно-генетического мониторинга (январь 2021 года) до настоящего времени как в Российской Федерации в целом, так и Московской области и г. Москве можно выделить **три периода** по доминирующему варианту SARS-CoV-2.

Первый с января по май 2021 года, **второй** с июня по декабрь 2021 года характеризовался доминированием варианта Delta SARS-CoV-2. **Третий** с января 2022 года по настоящее время (до декабря 2022 года) характеризуется доминированием варианта Omicron SARS-CoV-2.

Вариант Omicron SARS-CoV-2 в **период с января до октября 2022 года** представлен более чем 250 сублиниями в Российской Федерации, в Московской области — более чем 110 сублиниями, а в г. Москве — более чем 160 сублиниями.

Сроки и помесечная динамика смены доминирующих вариантов и сублиний как в Российской Федерации в целом, так и в Московской области и г. Москве не отличаются.

ГЛАВА 7. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID–19) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДИК В 2021–2022 ГГ.

В Российской Федерации действует государственная система эпидемиологического надзора, осуществляющая контроль за инфекционными заболеваниями и включающая информационную, диагностическую и управленческую подсистемы, которые тесно связаны между собой.

Информационная подсистема, отвечающая за сбор и регистрацию данных о динамике эпидемического процесса и факторах, влияющих на его развитие в конкретном регионе, является фундаментом эпидемиологического контроля. Сведения о характеристиках инфекционных заболеваний, теоретических знаниях и практических навыках способствуют осуществлению эпидемиологического и социально-экологического мониторинга.

Диагностическая подсистема включает в себя предэпидемическую диагностику, которая позволяет прогнозировать эпидемиологическую обстановку, а также дальнейшее развитие ситуации на основе анализа всей доступной информации.

Управленческая подсистема направлена на использование в эпидемиологическом надзоре информационных, диагностических и аналитических данных с учётом последних научных достижений и практического опыта. Управленческие решения предполагают разработку тематических и целевых программ, контроль за их выполнением и корректировку стратегии действий с учётом меняющихся факторов риска.

Пандемия, вызванная распространением нового типа коронавируса SARS–CoV–2, привела к созданию инновационных инструментов и технологий в разных областях и ускорила внедрение геномных исследований в систему общественного здравоохранения. Возникла необходимость в разработке новых подходов к эпидемиологическому анализу и молекулярно-генетическому

мониторингу за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19).

Молекулярно-генетический мониторинг за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19) опирается на Методические рекомендации МР 3.1.0272–22 «Профилактика инфекционных болезней. Молекулярно-генетический мониторинг штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции. Методические рекомендации» и осуществляется при помощи полногеномного секвенирования, регламентируется Положением об эпидемиологическом мониторинге за инфекционными и паразитарными заболеваниями от 28 ноября 2023 года. Документ определяет цели и задачи мониторинга, участников взаимодействия и включает анализ эпидемиологической ситуации (оперативный и ретроспективный), а также сроки и порядок предоставления информации.

Определение антигенных характеристик возбудителя помогает разрабатывать меры общественного здравоохранения для предотвращения вспышек заболевания и реагирования на них, а также позволяет исследовать эффективность вакцин. Молекулярно-генетический мониторинг является составной частью системы эпидемиологического надзора. **Рисунок 31** иллюстрирует систематический подход к организации этого процесса через ряд последовательных шагов. В контексте эпидемиологического надзора осуществляется сбор, архивирование и передача информации, её начальная обработка и анализ, а также выполнение эпидемиологической диагностики и разработка эпидемиологических прогнозов.

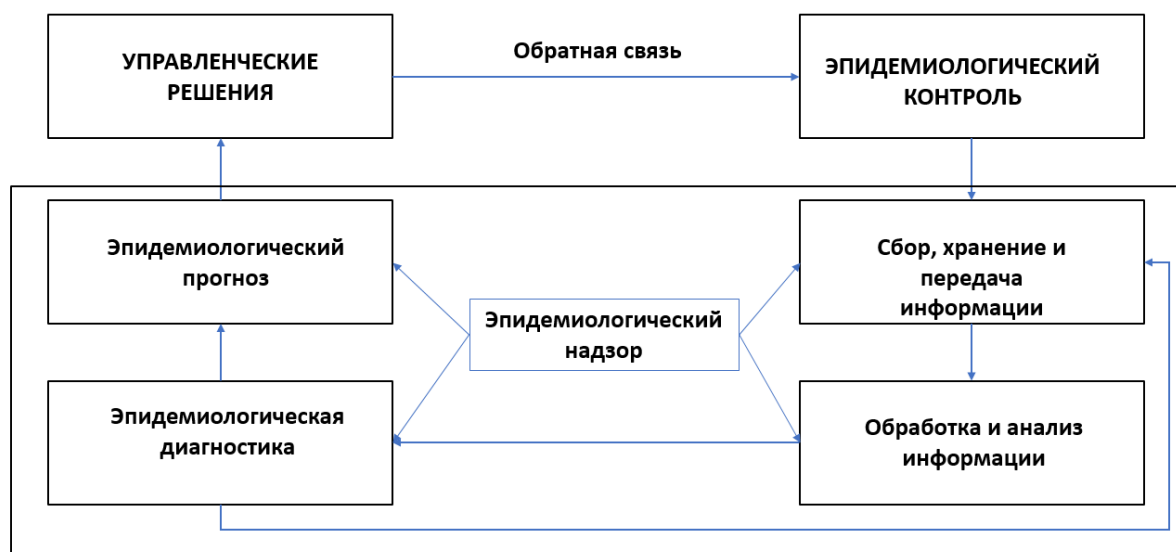


Рисунок 31 — Схематическое изображение системного подхода к организации эпидемиологического надзора [21]

В соответствии с перечисленными выше документами задачами, решаемыми в рамках молекулярно-генетического мониторинга, являются:

- быстрое выявление и мониторинг вариантов SARS-CoV-2 на ранних этапах их локального распространения необходимы для оценки их особенностей и разработки рекомендаций по возможным ответным мерам,
- обнаружение вспышек заболеваний, вызванных новыми вариантами SARS-CoV-2, и принятие соответствующих мер, а также отслеживание тенденций развития уже существующих вариантов,
- осуществление мониторинга локально циркулирующих вариантов/субвариантов вирусов и их связи с глобальными и региональными тенденциями распространения,
- предоставление данных о вирусах, рассматриваемых в качестве кандидатов для создания вакцин, а также для оценки рисков и мероприятий по разработке и производству вакцин,
- описание генетических и антигенных особенностей циркулирующих вирусов,

– проведение контроля чувствительности вирусов к противовирусным препаратам.

Для осуществления молекулярно-генетического мониторинга за вариантами новой коронавирусной инфекции (COVID–19) создана российская платформа агрегирования результатов расшифровок генома возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний (VGARus) [4], [116].

База данных VGARus представляет собой программно-аппаратный комплекс, содержащий информацию о генетических последовательностях SARS–CoV–2, перечне обнаруженных мутаций, а также метаданные, необходимые для проведения эпидемиологического анализа. Кроме того, накопленные сведения могут быть использованы для разработки эффективных диагностических систем для выявления циркулирующих генетических линий возбудителя [149].

Подавляющее количество геномных данных получено в 2021 году и особенно в 2022 году, при широком распространении варианта Omicron SARS–CoV–2. Важно, что объем информации в базе данных VGARus значительно превышает количество геномных последовательностей вирусов из России в базе данных GISAID [59]. В базу данных VGARus в декабре 2022 года загружено более 125 тысяч целых геномных последовательностей, в GISAID — около 60 тысяч. На момент написания диссертационной работы, в отличие от GISAID, база данных VGARus доступна только для специалистов ведомственных научно-исследовательских организаций.

Данный информационный ресурс создан как один из системообразующих элементов эпидемиологического надзора за новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) в Российской Федерации. Помимо хранения данных генетических последовательностей, VGARus является платформой для взаимодействия территориальных органов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) и научно-исследовательских институтов различных министерств, позволяя отслеживать

образцы для секвенирования с момента их сбора до интерпретации результатов молекулярно-генетических исследований.

Внедренный проект по применению скринингового метода типирования SARS-CoV-2 в деятельность специалистов ПЦР-лабораторий позволил усовершенствовать молекулярно-генетический мониторинг за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в 2022 году при смене варианта Delta SARS-CoV-2 на вариант Omicron SARS-CoV-2.

Поскольку оборудование для ПЦР-РВ, в отличие от дорогостоящего оборудования для полногеномного секвенирования, имеется в большинстве научных и диагностических учреждений Российской Федерации, становится возможным проводить работу по определению вариантов возбудителя на базе большего количества учреждений, что повышает информативность такой работы и ценность для принятия управленческих решений.

Таким образом, научное обоснование, создание научных методик и практическая реализация молекулярно-генетического мониторинга свидетельствует о важности проведения данного научного исследования.

Большой объём собранных данных о заболеваемости с момента начала пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19) позволил лучше понять механизмы развития эпидемического процесса среди разных групп населения и разработать наиболее эффективный алгоритм противоэпидемических мер, учитывая специфику распространения возбудителя в разных регионах.

Анализ данных лежит в основе разработки противоэпидемических мероприятий, налаживания взаимодействия между специалистами из разных областей и внедрения методов молекулярной диагностики в рутинную практику эпидемиологов.

Использование современных геномных и информационных технологий в процессе эпидемиологического наблюдения за возбудителями инфекционных заболеваний даёт возможность применять разработанные методы молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) для наблюдения за другими инфекционными агентами.

Безусловно, секвенирование полных геномов является наиболее информативным и предпочтительным методом эпидемиологического надзора за возбудителями, такие подходы описаны и реализованы [117]. Однако, использование менее сложных (например, секвенирование по методу Сэнгера) и наиболее экономически выгодных методов (основанных на ПЦР) в эпидемиологическом надзоре за вариантами SARS-CoV-2 также успешно.

На фоне роста заболеваемости, большого количества образцов биологического материала или ограниченных ресурсов (различные условия оснащения региональных лабораторий), секвенирование по методу Сэнгера и скрининговые методы типирования патогенов могут стать надежным инструментом для быстрой оценки эпидемиологической ситуации.

Низкая стоимость и скорость анализа, наряду с гибкостью таких методов и способностью адаптироваться к эволюции вируса, являются их преимуществами. Рациональное использование комбинации всех описанных методов позволяет получить полную картину развития эпидемической ситуации на большой территории.

В Российской Федерации для оперативного и действенного проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий создана система эпидемиологического контроля за новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), позволяющая отслеживать ситуацию с заболеваемостью практически в реальном времени.

По состоянию на 26 января 2023 года имеется утвержденное Руководителем Роспотребнадзора А.Ю. Поповой Положение об эпидемиологическом мониторинге за инфекционными и паразитарными заболеваниями (02/20475–2023027 от 29 ноября 2023 года), которое определяет цели и задачи мониторинга, состав участников осуществления мониторинга и порядок взаимодействия между участниками мониторинга.

Разработанные в ходе настоящего диссертационного исследования скрининговые методики предполагаются для применения на этапе

«Определение геноварианта возбудителя», после чего идет этап корректировки противоэпидемических мероприятий при необходимости.

На **рисунке 32** представлена схема интеграции VGARus в систему эпидемиологического надзора за новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) в Российской Федерации.

Особенностью VGARus является акцент на эпидемиологические данные: нуклеотидные последовательности сопровождаются неперсонифицированной информацией, включая сведения о дате и месте сбора биологического материала, поле и возрасте и вакцинации от новой коронавирусной инфекции (COVID-19). На федеральном уровне VGARus позволяет контролировать полноту охвата исследованием населения каждого субъекта и оптимизировать планы обследования на основе информации о затратах времени на каждом этапе работы [121].

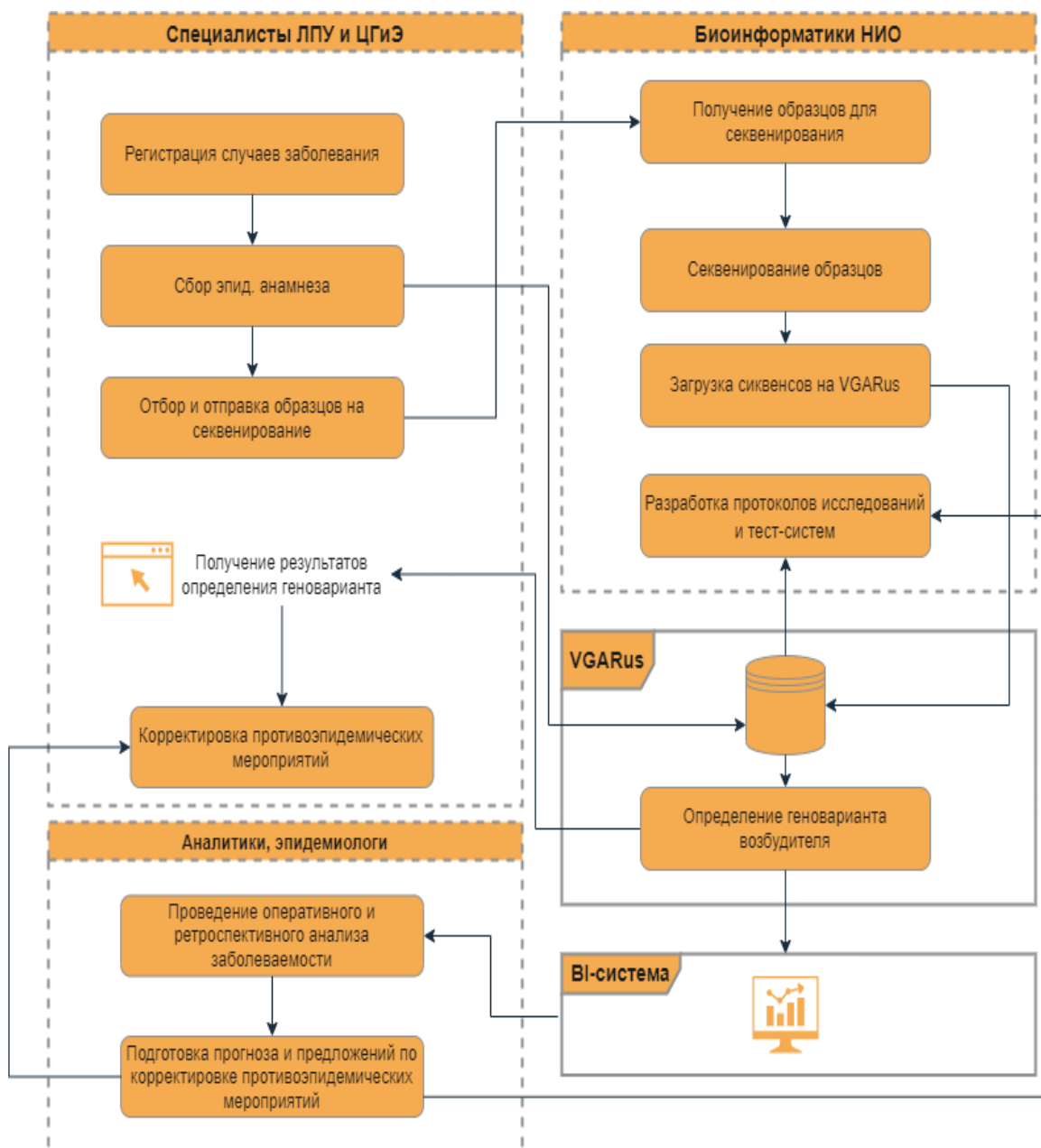


Рисунок 32 — Общая схема интеграции VGARus в систему эпидемиологического надзора за COVID–19 в Российской Федерации

ЛПУ — лечебно-профилактические учреждения

ЦГиЭ — Центры Гигиены и Эпидемиологии

НИО — научно-исследовательские организации

BI-система (с англ. *Business Intelligence* — бизнес-аналитика) — программные решения для сбора, систематизации и наглядного отображения данных из различных источников.

На этапе «определение геноварианта возбудителя» применяются методы секвенирования, полногеномное и фрагментов генов. Настоящее

диссертационное исследование направлено на внедрение скрининговых методов генотипирования SARS-CoV-2, основанных на методах амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) в данную систему.

В качестве скрининговых методов могут использоваться технологии LAMP (*англ. Loop-mediated isothermal amplification, петлевая изотермическая амплификация*), например, подобные методики использовались для выявления мутации S:N501Y [150] при идентификации варианта Alpha SARS-CoV-2. Применение МАНК позволило значительно снизить количество образцов, отправляемых на полногеномное секвенирование для обнаружения и отслеживания вариантов с мутацией в гене S-белка N501Y, при обнаружении которой было возможно дифференцировать Wuhan MN908947 и вариант Alpha SARS-CoV-2 [151]. Однако, при эволюции патогена и появлении вариантов с новыми мутациями в спайковом белке, обнаружилось, что геномные замены в сайтах отжига праймеров LAMP снижают эффективность данного метода [152], что делает невозможным дальнейшее применение методик на основе LAMP при интенсивной эволюции возбудителя.

В данном исследовании представлены методики, основанные на ПЦР-РВ, имеющие высокую чувствительность и специфичность [91], что позволяет использовать их в качестве скрининговых методов при типировании SARS-CoV-2.

Применение скрининговых методик было актуальным и научно-обоснованным в период с января до июля 2022 года для дифференцирования вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2 и с июля по декабрь 2022 года для дифференцирования субвариантов Omicron SARS-CoV-2. Применять в дальнейшем метод ПЦР-РВ для дифференцирования вариантов стало нецелесообразно из-за повсеместного преобладания варианта Omicron SARS-CoV-2 по всему миру, а дифференцировать сублинии варианта Omicron SARS-CoV-2 стало невозможно из-за минимальных отличий между сублиниями. В данном случае рациональным стало применение только полногеномного секвенирования.

Применение оперативно разработанных в рамках данной диссертационной работы скрининговых методов типирования SARS-CoV-2, основанных на ПЦР-РВ в рутинной практике специалистов лабораторного звена Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при проведении молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19), позволяет снизить трудозатраты и финансовые расходы и значительно сокращает время анализа. Также методики позволяют типировать варианты, имеющие значимые стабильные отличия в профиле мутаций и предполагать появление или завоз новых вариантов при получении нетипичных результатов в методике.

Таким образом, проведение молекулярно-генетического мониторинга даёт возможность детально изучить генетические характеристики возбудителей, что позволяет прогнозировать изменения их фенотипических свойств, влияющих на проявления эпидемического процесса и социально-экономические последствия этих изменений. Необходимо подчеркнуть, что в конце 2023 года произошло снижение объёма геномного секвенирования в мире. Из-за этого новые варианты могут оставаться необнаруженными в течение продолжительного периода времени. Тем не менее, собрано большое количество данных об эволюции генома SARS-CoV-2 и его новых свойствах, важных для эпидемиологии. Исходя из этого, для системы эпидемиологического надзора важны всеобъемлющий мониторинг, в том числе с использованием скрининговых методов типирования, и геномное секвенирование вируса, позволяющие выявлять новые варианты возбудителя и разрабатывать стратегии профилактики инфекционных болезней для общественного здравоохранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно официальной статистике на 31 октября 2022 г., в Российской Федерации зарегистрировано 21 429 506 случаев заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID–19), общая заболеваемость при этом составила — 14 589 ‰ [153]. Появление на территории новых вариантов SARS–CoV–2 совпало с ростом заболеваемости населения.

Наибольшая заболеваемость на территории Российской Федерации отмечена в период распространения варианта Omicron SARS–CoV–2, уровень заболеваемости при этом фиксировался в несколько раз выше, чем в предыдущие периоды [8], [32].

По состоянию на декабрь 2022 года среди образцов биологического материала, полученных от пациентов из разных регионов РФ в 2022 года, методом полногеномного секвенирования выявлено более 250 вариантов сублинии Omicron SARS–CoV–2.

Внедрение скрининговых методов типирования патогенов в практику эпидемиологического надзора за инфекционными агентами является актуальной проблемой.

Учитывая актуальность проблемы, определены цель и задачи исследования, заключающиеся в совершенствовании молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19) путем внедрения в практику скринингового типирования, основанного на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР–РВ).

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

1. Проведен анализ динамики уровня и структуры заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) в Российской Федерации, Московской области и г. Москве в 2020–2022 гг.

2. Разработаны лабораторные методики для скринингового типирования вариантов SARS-CoV-2, основанные на обнаружении значимых мутаций в геноме.

3. Проведен молекулярно-генетический анализ циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 за период 2021–2022 гг. на территории Российской Федерации.

4. Разработан алгоритм молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) с использованием скрининговых лабораторных методик для определения вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2, а также сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2, основанных на ПЦР-РВ.

В теоретической части работы представлены общая характеристика SARS-CoV-2, молекулярная эпидемиология новой коронавирусной инфекции (COVID-19), методы лабораторной диагностики и определения вариантов новой коронавирусной инфекции (COVID-19), а также основные принципы молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) на территории Российской Федерации.

В третьей главе проанализирована динамика уровня и структуры заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в Российской Федерации, Московской области и г. Москве в 2020–2022 гг. Население Московской области и г. Москвы характеризуется меньшей долей лиц в возрасте 5–27 лет и большей в возрасте 30–51 лет, чем совокупное население Российской Федерации. Большая доля лиц от 30 до 51 лет может быть одним из факторов, влияющих на более раннее начало эпидемий, поскольку эта группа наиболее социально активна и вовлечена в трудовую миграцию и активный туризм, в том числе с поездками за границу.

Заболеваемость в группах распределения по полу населения Московской области и г. Москвы существенных различий не имеет, но отмечались более высокие показатели заболеваемости среди женщин в периоды эпидемических подъемов.

Среди возрастных групп населения г. Москвы наиболее высокие показатели заболеваемости до июля 2022 года регистрировались в возрастной группе 18–29 лет. После июля 2022 года — в возрастной группе младше 1 года.

Среди групп распределения населения Московской области по возрасту до января 2022 года наиболее высокие показатели заболеваемости регистрировались среди лиц старше 50 лет, а с июня 2022 года — в группе младше 1 года.

Различия в динамике заболеваемости различных групп распределения населения по возрасту между населением Московской области и г. Москвы значительны и должны учитываться при разработке профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Население Московской области и г. Москвы вовлекалось в активный эпидемический процесс практически одновременно, исключение составляла возрастная группа младше 1 года в г. Москве и 18–29 лет и 30–49 лет в Московской области, для которых характерен сдвиг динамики заболеваемости на одну неделю позже.

Проведенный анализ по распределению заболевших в Российской Федерации по степени тяжести клинических проявлений показал, что ряд изменений в структуре совпал по времени со сменой циркулирующих и доминирующих вариантов.

В период с декабря 2020 года по апрель 2021 года отмечены наиболее высокие за весь период наблюдения с 2020 года по 2022 год доли тяжелых форм. Данный период частично совпал с периодом циркуляции варианта Alpha SARS-CoV-2. **Период с июля по декабрь 2021 года** по сравнению с предыдущим периодом характеризовался доминированием в структуре легких форм за счет уменьшения доли тяжелых и среднетяжелых форм. Данный период совпал с циркуляцией варианта Delta SARS-CoV-2. **Период с января по декабрь 2022 года**, характеризующийся наиболее низкими долями тяжелых и среднетяжелых форм, совпал по времени с доминированием варианта Omicron SARS-CoV-2.

Среди наиболее значимых изменений в структуре тяжести среди заболевших в Московской области в течение всего периода наблюдения (с 2020 года по 2022 год) можно определить:

- увеличение доли легких форм,
- снижение доли среднетяжелых и тяжелых форм заболевания.

Среди наиболее значимых изменений в структуре тяжести среди заболевших в г. Москве можно определить:

- значительное увеличение доли легких форм в течение всего периода наблюдения с 2020 года по 2022 год,
- снижение доли тяжелых форм в два раза в период циркуляции варианта Omicron SARS-CoV-2 с 2022 года.

Изменение распределения заболевших в Российской Федерации в целом по степени тяжести клинических проявлений совпадает по времени со сменой циркулирующих и доминирующих вариантов SARS-CoV-2, в то время как в показателях для населения Московской области и г. Москвы наблюдается незначительная задержка во времени.

Для распределений заболевших по степени тяжести клинических проявлений для периодов, характеризующихся доминированием разных вариантов SARS-CoV-2, получены достоверные различия как в целом для Российской Федерации, так и для населения Московской области и г. Москвы.

С июля 2021 года среди населения Российской Федерации в целом наметилась тенденция к уменьшению доли тяжелых и среднетяжелых форм. Подобная тенденция наблюдается и для населения Московской области и г. Москвы.

Полученные данные согласуются с результатами исследований по изучению эпидемического процесса других авторов [154, 155], [127]. Т.А. Платоновой и соавторами [127] проведен анализ шести эпидемических подъемов заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), представлены данные по уровню заболеваемости, темпам прироста и снижения, совпадающими по времени с доминированием различных генетических

вариантов SARS-CoV-2. В работе также продемонстрировано, как менялась структура клинических форм заболеваний. Во время пятого и шестого эпидемических подъёмов чаще встречались клинические формы острых респираторных инфекций, а частота случаев пневмонии снизилась. Полученные данные согласуются с результатами, полученными в данном диссертационном исследовании, что позволяет сделать предположение о возможном формировании сезонности данного заболевания.

В исследовании, проведенном Г.А. Гасановым и соавторами [154], приводятся сведения об уровне заболеваемости жителей Московской области новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Уровень заболеваемости в каждый из рассматриваемых периодов был выше, чем в предыдущий, что согласуется с данными, представленными в диссертационном исследовании. Тяжесть заболевания населения новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) рассмотрена в работе Н.И. Брико и соавторов [155], показано, что доля тяжелых и крайне тяжелых форм заболеваемости оставалась стабильной в различные эпидемические подъемы заболеваемости. По представленным данным старший возраст и наличие сопутствующих заболеваний явились факторами риска более тяжелого течения заболевания.

В четвертой главе представлены этапы разработки лабораторной методики для скринингового типирования вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2 и результаты ее применения. Выбраны мутации, при детекции которых возможно дифференцировать варианты SARS-CoV-2 друг от друга. В случае с вариантами Delta и Omicron SARS-CoV-2 выбраны шесть мутаций в гене S-белка: L452R, P681R, del69-70, N501Y, del143-145 и Ins214EPE. Для предположительного ответа о принадлежности изолята к варианту Delta SARS-CoV-2 в 2022 году с декабря до июля достаточным было обнаружение двух мутаций: S:L452R и S:P681R. При одновременном обнаружении мутаций S:del69-70, S:N501Y, S:del143-145 и S:Ins214EPE предположительно выдавался результат о принадлежности к варианту Omicron SARS-CoV-2.

При получении нетипичных результатов требовалась перестановка ПЦР–РВ, если же результат повторялся, такой образец рекомендовалось отдать на исследование методами секвенирования, предполагая ошибку постановки или появление нового варианта вируса. Специфичность и чувствительность разработанных методик приближена к 100%. Это позволило использовать ее наравне с методами секвенирования (полногеномным и секвенированием фрагментов генов по методу Сэнгера).

Данная методика реализована в моноплексном формате, что, несомненно, не так удобно для пользователя, но позволило сократить время на разработку методики и отправить реагенты для ее применения в кратчайшие сроки для использования специалистами в региональных вирусологических лабораториях. В дальнейшем при эволюции SARS–CoV–2 моноплексный формат позволил быстро оптимизировать методику, добавив дополнительные мишени-мутации.

В пятой главе представлена оптимизация и разработка лабораторной методики для дифференцирования сублиний варианта Omicron SARS–CoV–2. Методика для дифференцирования сублиний Omicron SARS–CoV–2 реализована в одноэтапном, совмещенном с обратной транскрипцией, мультиплексном формате. Позволяет дифференцировать сублинии Omicron SARS–CoV–2 BA.1, BA.2, BA.3, BA.4/5 и вариант Delta SARS–CoV–2 друг от друга. В качестве мишеней для детекции в ПЦР–РВ выбраны мутации S:N501Y, S: L452R, S: T95I, S:DelLPP24-26, S:Del69–70, S:Ins214EPE, S:E484A и S:P681R.

Разработка реализована в несколько этапов: пересмотр и проверка мест посадки праймеров и зондов на наличие полиморфизмов и замен для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, тестирование моноплексных смесей, подбор оптимальных условий постановки ПЦР–РВ, формирование мультиплексных смесей и их тестирование. Одновременно с этим нами подготовлен мультиплексный контроль для постановок.

Использование на практике перечисленных лабораторных методик для дифференцирования вариантов Delta, Omicron SARS–CoV–2 и субвариантов Omicron SARS–CoV–2 позволило с практически равной чувствительностью и

специфичностью, что и при использовании методов секвенирования, исследовать большое количество образцов биологического материала с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2.

Данные методики при скрининге образцов в молекулярно-генетическом мониторинге за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) оказались экономичнее в 1,4–2,7 раз метода секвенирования фрагментов генов по методу Сэнгера и в 4,8–6,8 раз метода NGS (расчет проведен ориентировочно с учетом стоимости реактивов, рабочего времени, затраченного на исследование и обслуживание приборов).

При резко увеличившейся нагрузке на вирусологические лаборатории во время смены варианта Delta на Omicron SARS-CoV-2 применение скрининговых методик позволило быстрее и эффективнее проводить работу по исследованию генетической принадлежности образцов биологического материала, что значительно снизило в последствии нагрузку на центры секвенирования.

Нами проанализированы результаты работы в данном направлении, как отечественных авторов [100–102], [156] так и зарубежных [86], [87]. Все они опираются на принципы, предлагаемые ВОЗ по внедрению скрининговых методов типирования в молекулярно-генетическом мониторинге за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) по использованию детекции мутаций-мишеней для дифференцирования вариантов SARS-CoV-2. Однако, разработки, представленные в диссертационном исследовании, обладают определенным «запасом прочности» за счёт того, что включают в себя расширенное количество мишеней для детекции. Проанализированы литературные данные: в работах Г.А. Шипулина и соавторов [102], [156] представлены результаты разработки ПЦР-систем для дифференцирования вариантов SARS-CoV-2, таких как Alpha, Beta, Gamma, Delta и Omicron. Данные системы основаны на обнаружении значимых мутаций в гене S-белка SARS-CoV-2: N501Y, P681H, HV69–70del, E484K и L452R и P681H + N679K. Результаты работы тесно связаны с представленными в данном диссертационном исследовании, однако нет данных об их массовом применении в молекулярно-

генетическом мониторинге вариантов возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19).

В работе Н.Д. Елшина и соавторов [100], проведена разработка системы для детекции мутации Ins214EPE SARS–CoV–2. Однако, при дальнейшей эволюции вируса, определение только данной мишени для типирования вариантов SARS–CoV–2 оказалось недостаточным, что сделало данную разработку непригодной для массового применения. В работе Н.Д. Елшина и соавторов [101] представлена система, направленная для идентификации сублинии BA.1 варианта Omicron SARS–CoV–2, основанная на обнаружении варианта Omicron SARS–CoV–2 и идентификации сублинии BA.1 варианта Omicron SARS–CoV–2 за счет детектирования мутаций-мишеней ERS31del и Ins214EPE. Как и в предыдущей разработке, данных мишеней с развитием патогена оказалось недостаточно, и система перестала быть актуальной.

Диссертационная работа представляет результаты разработок, проведенных в направлении скринингового типирования и учета полученных результатов при применении молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID–19) на территории Российской Федерации.

В шестой главе нами проведен анализ динамики распространения вариантов SARS–CoV–2 на территории Российской Федерации, Московской области и г. Москвы. Обнаружено, что периоды доминирования отдельных сублиний варианта Omicron SARS–CoV–2 на территории Московской области и г. Москвы, а также Российской Федерации в целом полностью совпадают.

При сравнении помесечного распределения долей сублиний варианта Omicron SARS–CoV–2 на территории Московской области и г. Москвы установлено, что среди сублиний, имевших наибольшие доли в структуре варианта Omicron SARS–CoV–2 (топ–10), восемь имели приоритетное распространение в обоих субъектах, это: BA.5.2, BA.1.1, BA.2, BA.5.1, BF.5, BA.1, BA.1.15, BE.1.1.

Для помесечных динамик этих вариантов рассчитаны коэффициенты корреляции, которые показали наличие прямой линейной зависимости между циркуляцией пяти сублиний (BA.5.2, BA.1.1, BA.2, BF.5, BA.1.15) на территории Московской области и г. Москвы. Общая доля образцов, отнесенных к этим линиям, составляет 84%.

С начала проведения молекулярно-генетического мониторинга (январь 2021 года) до настоящего времени как в Российской Федерации в целом, так и Московской области и г. Москве можно выделить **три периода** по доминирующему варианту SARS-CoV-2.

Первый — с января по май 2021 года, **второй** — с июня по декабрь 2021 года характеризовался доминированием варианта Delta SARS-CoV-2. **Третий** — с января 2022 года по настоящее время (октябрь 2022 года) характеризуется доминированием варианта Omicron SARS-CoV-2.

Вариант Omicron SARS-CoV-2 в **период с января до октября 2022 года** представлен более чем 250 сублиниями в Российской Федерации, в Московской области — более чем 110 сублиниями, в г. Москве — более чем 160 сублиниями.

Сроки и помесечная динамика смены доминирующих вариантов и субвариантов как в Российской Федерации в целом, так и в Московской области, и в г. Москве не отличаются.

Методы скрининга, основанные на выявлении одиночных мутаций с использованием ПЦР-РВ, также потенциально могут быть использованы для скрининга других патогенов с целью генотипирования и выявления маркеров лекарственной устойчивости.

Методы скрининга на основе ПЦР-РВ, естественно, имеют свои ограничения. Возможно получение отрицательного результата при наличии полиморфизмов в сайтах отжига праймеров или зондов. Именно по этой причине в панель скрининга следует добавлять несколько локусов для выявления различных вариантов.

При высокой изменчивости возбудителя также необходим постоянный мониторинг актуальности и эффективности методики. В случае с повсеместно

доминирующим вариантом Omicron SARS-CoV-2 различия между его циркулирующими субвариантами в данный момент уже не ограничиваются S-геном, поэтому необходимо проводить полногеномный отбор мишеней для мутаций, что довольно ресурсоемко.

Также, при использовании метода ПЦР-РВ для типирования патогена исследователь получает информацию о наличии или отсутствии строго определенных мутаций. Это не позволяет отметить появление нового варианта, если новые мутации расположены в других областях генома. Также необходимо учитывать влияние различных факторов, таких как: наличие ингибиторов, фрагментация РНК, содержащейся в образце, и т. д. на эффективность работы системы праймеров и зондов.

Однако, следует отметить, что скрининговые методы типирования, основанные на ПЦР-РВ, могут быть весьма эффективны для исследования массового потока образцов биологического материала в условиях недоступности секвенирования, как это наблюдалось при увеличении заболеваемости на фоне распространения варианта Omicron SARS-CoV-2.

Низкая стоимость, гибкость и способность адаптироваться к новым условиям являются преимуществами таких методов. Рациональное использование комбинации всех описанных приемов дают полную картину развития эпидемиологической ситуации на всей территории Российской Федерации.

В данной работе научно обоснованы подходы по совершенствованию молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в системе эпидемиологического надзора. Полученные в данном исследовании результаты показывают, что для совершенствования системы эпидемиологического надзора за новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), необходимо эффективно широкое внедрение скринингового типирования, основанного на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) при наличии подходящих для применения условий.

ВЫВОДЫ

1. Анализ данных официальной статистики за период с 2020 по 2022 гг. позволил выявить шесть эпидемических подъемов заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) на территории Российской Федерации, Московской области и г. Москвы, характеризующихся волнообразностью: первый зарегистрирован с марта по август 2020 года, второй — с августа до мая 2021 года, третий — с мая по сентябрь 2021 года, четвертый — с сентября 2021 по январь 2022 года, пятый — с января по июнь 2022 года, шестой — с июня по ноябрь 2022 года. При общем совпадении подъемов заболеваемости наблюдается запаздывание развития эпидемического процесса среди населения Московской области и Российской Федерации в целом относительно заболеваемости населения в г. Москве.

Структура заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) среди населения Московской области и г. Москвы характеризуется меньшей долей лиц в возрасте 5–27 лет и большей в возрасте 30–51 лет, чем совокупное население Российской Федерации. С июля 2021 года среди населения Российской Федерации в целом наметилась тенденция к уменьшению доли тяжелых и среднетяжелых форм заболевания с 44,5% (95% ДИ: 44,3–44,8) до 38,2% (95% ДИ: 37,9–38,4). Подобная тенденция наблюдается и для населения Московской области и г. Москвы.

2. Разработана лабораторная методика для дифференцирования вариантов Delta и Omicron SARS–CoV–2, основанная на детекции мутаций методом ПЦР–РВ в гене S–белка: L452R, P681R, del69–70, N501Y, del143–145 и Ins214ERE. Специфичность и чувствительность разработанной методики приближена к 100%, что позволило использовать ее наравне с методами секвенирования (полногеномным и секвенированием фрагментов генов по методу Сэнгера).

Также, разработана лабораторная методика для дифференцирования сублиний Omicron SARS-CoV-2, реализованная в одноэтапном, совмещенном с обратной транскрипцией, мультиплексном формате. Данная методика позволяет дифференцировать сублинии Omicron SARS-CoV-2 — BA.1, BA.2, BA.3, BA.4/5 и вариант Delta SARS-CoV-2 друг от друга. В качестве мишеней для детекции в ПЦР-РВ выбраны мутации S: N501Y, S: L452R, S: T95I, S: DelLPP24-26, S: Del69–70, S: Ins214EPE, S: E484A и S: P681R.

Разработанные методики могут использоваться в дополнение к методам полногеномного секвенирования и секвенирования фрагментов генов по методу Сэнгера и не уступают им по специфичности и чувствительности ($\approx 100,0\%$).

3. С начала проведения молекулярно-генетического мониторинга (январь 2021 года) до настоящего времени как в Российской Федерации в целом, так и в Московской области и г. Москве можно выделить три периода по доминирующему варианту SARS-CoV-2. Первый: январь–май 2021 года (с преобладанием дикого типа вируса), второй: июнь–декабрь 2021 года характеризовался доминированием варианта Delta SARS-CoV-2. Третий — с января 2022 года по настоящее время, характеризуется доминированием варианта Omicron SARS-CoV-2, при этом отмечено, что сроки и помесечная динамика смены доминирующих вариантов и субвариантов как в Российской Федерации в целом, так и в Московской области, и в г. Москве не отличаются.

Периоды доминирования отдельных сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 на территории Российской Федерации, Московской области и г. Москвы полностью совпадают.

При сравнении помесечного распределения долей в структуре сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2 на территории Московской области и г. Москвы установлено, что среди сублиний, имевших наибольшие доли в структуре варианта Omicron SARS-CoV-2, восемь имели приоритетное распространение в обоих субъектах (BA.5.2, BA.1.1, BA.2, BA.5.1, BF.5, BA.1, BA.1.15, BE.1.1) — более 84%.

4. Разработан алгоритм молекулярно-генетического мониторинга за вариантами возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19), основанный на дополнении высокоинформативных методов характеристики патогенов (методы секвенирования) скрининговыми методами типирования (ПЦР-РВ). Показана его эффективность на примере дифференцирования вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2, а также сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2. Данные методики не уступали по чувствительности и специфичности методам секвенирования ($\approx 100,0\%$).

Результаты оперативного молекулярно-генетического мониторинга явились важнейшей компонентой диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), позволявшие своевременно осуществлять комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий на всей территории Российской Федерации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При возникновении ситуаций с увеличением потока исследуемых образцов от пациентов или невозможности использования дорогостоящих методов полногеномного секвенирования или секвенирования фрагментов генов, необходима разработка и внедрение в практику скрининговых методов типирования патогена, основанных на МАНК.

При разработке лабораторных методик, основанных на ПЦР–РВ в качестве мишеней целесообразно использовать как делеции в последовательности, так и точечные замены. Необходим постоянный мониторинг эволюции патогена для своевременной оптимизации и усовершенствования методик.

Предлагается использовать результаты, полученные при применении скрининговых методов типирования патогенов для дополнения существующих баз данных в рамках реализации молекулярно-генетического мониторинга, а также для актуализации данных о мутациях-мишенях, подходящих для оперативной разработки скрининговых методик.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. При получении повторяющихся нетипичных результатов при использовании методик, основанных на ПЦР возможно предположить появление нового варианта/сублинии;
2. При появлении новых вариантов/сублиний SARS-CoV-2 с «возвращающимися» мутациями, возможно совершенствовать методики с учетом текущей эпидемиологической обстановки, добавляя уже имеющиеся системы на мишени в работу или создавая новые;
3. Предложенная методика может быть доработана при появлении вариантов, имеющих существенные различия в наборе стабильных мутаций;
4. Возможно использовать данные подходы и методы для мониторинга и изучения других инфекционных агентов при подходящих условиях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
SARS-CoV-2	<i>англ.</i> Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2
COVID-19	<i>англ.</i> COronaVIrusDisease 2019
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
VGARus	Платформа агрегирования результатов расшифровок генома возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	ПЦР с детекцией в формате «реального времени»
МКБ-10	Международная классификация болезней десятого пересмотра
GISAID	<i>англ.</i> A global initiative on sharing avian flu data
МР	Методические рекомендации
СП	Санитарные правила
LAMP	<i>англ.</i> Loop-mediated isothermal amplification
NGS	<i>англ.</i> next generation sequencing

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. COVID–19: научно-практические аспекты борьбы с пандемией в Российской Федерации / под ред. д-ра мед. наук, проф. А.Ю. Поповой. — Саратов: Амирит, 2021. — 608 с.
2. Coronavirus Pandemic (COVID–19) / E. Mathieu, H. Ritchie, L. Rodés-Guirao [et al.] [Электронный ресурс]. — URL: <https://ourworldindata.org/coronavirus> (дата обращения: 24.06.2024).
3. Сравнительный анализ скрининговых методов детекции точечных мутаций на примере выявления мутации N501Y в коронавирусе SARS–CoV–2 / А. С. Черкашина, А. Г. Голубева, Е. Д. Соловьева [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2021. — Т. 11, № 4. — С. 31-37. — DOI 10.18565/epidem.2021.11.4.31-7.
4. Virus Genome Aggregator of Russia (VGARus) [Электронный ресурс]. — URL: <https://genome.crie.ru/> (дата обращения: 29.06.2023).
5. COVID–19: эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID–19 / В. Г. Акимкин, А. Ю. Попова, А. А. Плоскирева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — Т. 99, № 3. — С. 269-286. — DOI 10.36233/0372-9311-276.
6. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID–19 vaccine candidate appears safe and effective // The Lancet. — 2021. — Vol. 397, No. 10275. — P. 642-643. — DOI 10.1016/S0140-6736(21)00191-4.
7. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID–19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova [et al.] // The Lancet. — 2020. — Vol. 396. № 10255. — P. 887–897. — DOI 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
8. Классификация варианта «омикрон» (B.1.1.529) как варианта вируса SARS–CoV–2, вызывающего беспокойство [Электронный ресурс]. — URL:

[https://www.who.int/ru/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-SARS-CoV-2-variant-of-concern](https://www.who.int/ru/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-SARS-CoV-2-variant-of-concern) (дата обращения: 23.05.2024).

9. SARS-CoV-2 Variants Monitoring Using Real-Time PCR / A. Esman, A. Cherkashina, K. Mironov [et al.] // *Diagnostics*. — 2022. — Vol. 12, No. 10. — P. 2388. — DOI 10.3390/diagnostics12102388.

10. Совершенствование ответных мер в отношении варианта «омикрон» вируса SARS-CoV-2: техническая справка и приоритетная деятельность государств-членов. Всемирная организация здравоохранения: штаб-квартира, Женева, Швейцария Обновленное издание#6: 21 января 2022 г. (обновление предыдущей версии от 7 января 2022 г.) [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/2021-01-21-global-technical-brief-and-priority-action-on-omicron-SARS-CoV-2-variant-ru.pdf> (дата обращения: 24.06.2024).

11. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV [Электронный ресурс]. — URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 01.06.2023).

12. A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size / A. Saberi, P. A. Newmark, A. A. Gulyaeva [et al.] // *PLoS Pathogens*. — 2018. — Vol. 14, No. 11. — P. e1007314. — DOI 10.1371/journal.ppat.1007314.

13. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks / H. M. Ashour, W. F. Elkhatib, M. M. Rahman, H. A. Elshabrawy // *Pathogens*. — 2020. — Vol. 9, No. 3. — P. 186. — DOI 10.3390/pathogens9030186.

14. Saif, L.J. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome? / L.J. Saif // *Scientific & Technical Review*. — 2004. — Vol. 23, № 2. — P. 643–660. — DOI 10.20506/rst.23.2.1513.

15. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia / A.M. Zaki, S. van Boheemen, T.M. Bestebroer [et al.] // *N Engl J Med*. — 2012. — Vol. 367, № 19. — P. 1814–1820. — DOI 10.1056/NEJMoa1211721.

16. Graham, R.L. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses / R.L. Graham, E.F. Donaldson, R.S. Baric // *Nat Rev Microbiol.* — 2013. — Vol. 11, № 12. — P. 836–848. — DOI 10.1038/nrmicro3143.

17. Discovery of a Novel Coronavirus, China Rattus Coronavirus HKU24, from Norway Rats Supports the Murine Origin of Betacoronavirus 1 and Has Implications for the Ancestor of Betacoronavirus Lineage A / S.K. Lau, P.C. Woo, K.S. Li [et al.] // *J Virol* / ed. Sandri-Goldin R.M. — 2015. — Vol. 89, № 6. — P. 3076–3092. — DOI 10.1128/JVI.02420-14.

18. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes / D. Forni, R. Cagliani, M. Clerici, M. Sironi // *Trends in Microbiology.* — 2017. — Vol. 25, № 1. — P. 35–48. — DOI 10.1016/j.tim.2016.09.001.

19. Study of SARS–CoV–2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab / D. Paoli, F. Pallotti, S. Colangelo [et al.] // *J Endocrinol Invest.* — 2020. — Vol. 43, № 12. — P. 1819–1822. — DOI 10.1007/s40618-020-01261-1.

20. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome/ T.G. Ksiazek, D. Erdman, C.S. Goldsmith [et al.] // *N Engl J Med.* — 2003. — Vol. 348, № 20. — P. 1953–1966. — DOI 10.1056/NEJMoa030781.

21. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней [в 2 т.]. Т.1 / Н.И. Брико, Г.Г. Онищенко, В.И. Покровский.- Москва: ООО "Издательство “Медицинское информационное агентство”, 2019. — 880 с.- с. 465-468.

22. Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции / С. Б. Яцышина, М. Г. Творогова, Г. А. Шипулин, В. В. Малеев // *Лабораторная служба.* — 2017. — Т. 6, № 3. — С. 238-267. — DOI 10.17116/labs201763238-267.

23. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID–19 / J.M. Kim, Y.S. Chung, H.J. Jo Goldsmith [et al.] // *Osong Public Health Res Perspect.* — 2020. Vol. 11, № 1. — P. 3–7. — DOI 10.24171/j.phrp.2020.11.1.02.

24. Comparing SARS–CoV–2 with SARS-CoV and influenza pandemics/ E. Petersen, M. Koopmans, U. Go [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. — 2020. — Vol. 20, № 9. — P. e238–e244. — DOI 10.1016/S1473-3099(20)30484-9.
25. Закономерности эпидемического распространения SARS–CoV–2 в условиях мегаполиса / В. Г. Акимкин, С. Н. Кузин, Т. А. Семененко [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2020. — Т. 65, № 4. — С. 203-211. — DOI 10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211.
26. Exploring the Natural Origins of SARS–CoV–2 in the Light of Recombination / S. Lytras, J. Hughes, D. Martin [et al.] // *Genome Biology and Evolution*. — 2022. — Vol. 14, № 2. — P. evac018. — DOI 10.1093/gbe/evac018.
27. Weiss, S.R. Forty years with coronaviruses / S.R. Weiss // *Journal of Experimental Medicine*. — 2020. — Vol. 217, № 5. — P. e20200537. — DOI 10.1084/jem.20200537.
28. Перевезенцев, О.А. Зарубежный опыт молекулярно-генетической и иммунологической диагностики SARS–CoV–2 (обзор) / О.А. Превезенцев, Т.О. Холодная, Д.В. Бурцев // *Лабораторная служба*. — 2021. - №10(4). — С. 47-54.
29. Zoonotic origins of human coronaviruses/ Z.-W. Ye, S. Yuan, K.S. Yuen [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* — 2020. — Vol. 16, № 10. — P. 1686–1697. — DOI 10.7150/ijbs.45472.
30. COVID–19 Map / Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Электронный ресурс]. — URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (дата обращения: 02.06.2023).
31. Анализ циркуляции коронавирусов человека / С. Б. Яцышина, М. В. Мамошина, О. Ю. Шипулина [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2020. — Т. 65, № 5. — С. 267-276. — DOI 10.36233/0507-4088-2020-65-5-3.
32. Бруякин, С. Д. Структурные белки коронавируса SARS–CoV–2: роль, иммуногенность, суперантигенные свойства и возможности использования для терапевтических целей / С. Д. Бруякин, Д. А. Макаревич // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. — 2021. — № 2(78). — С. 18-27. — DOI 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-18-27.

33. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex/ B.J. Bosch, R. van der Zee, C.A. de Haan, P.J. Rottier // *J Virol.* — 2003. — Vol. 77, № 16. — P. 8801–8811. — DOI 10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003.

34. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation/ D. Wrapp, N. Wang, K.S. Corbett [et al.] // *Science.* — 2020. — Vol. 367, № 6483. — P. 1260–1263. — DOI 10.1126/science.abb2507.

35. Ahmed, S.F. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID–19 Coronavirus (SARS–CoV–2) Based on SARS-CoV Immunological Studies / S.F. Ahmed, A.A. Quadeer, M.R. McKay // *Viruses.* — 2020. Vol. 12, № 3. — P. 254. — DOI 10.3390/v12030254.

36. Site-specific glycan analysis of the SARS–CoV–2 spike/ Y. Watanabe, J.D. Allen, D. Wrapp [et al.] // *Science.* — 2020. — Vol. 369, № 6501. — P. 330–333. — DOI 10.1126/science.abb9983.

37. Molecular Architecture of the SARS–CoV–2 Virus/ H. Yao, Y. Song, Y. Chen [et al.] // *Cell.* — 2020. Vol. 183, № 3. — P. 730-738.e13. — DOI 10.1016/j.cell.2020.09.018.

38. SARS–CoV–2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor/ M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [et al.] // *Cell.* — 2020. — Vol. 181, № 2. — P. 271-280.e8. — DOI 10.1016/j.cell.2020.02.052.

39. Insights into SARS–CoV–2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach / A. A. T. Naqvi, T. Mohammad, M. I. Hassan [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular Basis of Disease.* — 2020. — Vol. 1866, No. 10. — P. 165878. — DOI 10.1016/j.bbadis.2020.165878.

40. Coronavirus biology and replication: implications for SARS–CoV–2 / P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* — 2021. — Vol. 19, № 3. — P. 155–170. — DOI 10.1038/s41579-020-00468-6.

41. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV / Y. Chen, Y. Guo, Y. Pan, Z.J. Zhao // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2020. — Vol. 525, № 1. — P. 135–140. — DOI 10.1016/j.bbrc.2020.02.071.
42. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR / V.M. Corman, O. Landt, M. Kaiser [et al.] // *Eurosurveillance*. — 2020. Vol. 25, № 3. — DOI 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
43. Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests/ C. Xie, L. Jiang, G. Huang [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. — 2020. — Vol. 93. — P. 264–267. — DOI 10.1016/j.ijid.2020.02.050.
44. Постановление Правительства РФ от 31.01.2020 N 66 “О внесении изменения в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих” | ГАРАНТ [Электронный ресурс]. — URL: <https://base.garant.ru/73492109/> (дата обращения: 02.06.2023).
45. World Health Organization. Transmission of SARS–CoV–2: implications for infection prevention precautions: scientific brief, 09 July 2020: WHO/2019-nCoV/Sci_Brief/Transmission_modes/2020.3. World Health Organization, — 2020. — 10 p.
46. Klompas, M. Airborne Transmission of SARS–CoV–2: Theoretical Considerations and Available Evidence / M. Klompas, M.A. Baker, C. Rhee // *JAMA*. — 2020. — Vol. 324, № 5. — P. 441. — DOI 10.1001/jama.2020.12458.
47. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China / W. Guan, Z.Y. Ni, Y. Hu // *N Engl J Med*. — 2020. — Vol. 382, № 18. — P. 1708–1720. — DOI 10.1056/NEJMoa2002032.
48. COVID–19. Этиология, патогенез, диагностика и лечение / В. П. Баклаушев, С. В. Кулемзин, А. А. Горчаков [и др.] // *Клиническая практика*. — 2020. — Т. 11, № 1. — С. 7-20. — DOI 10.17816/clinpract26339.
49. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID–19): Временные методические рекомендации / С. Н. Авдеев,

Л. В. Адамян, Е. И. Алексеева [и др.]. — Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. — 249 с.

50. World Health Organization. COVID–19 clinical management: living guidance, 25 January 2021: WHO/2019-nCoV/clinical/2021.1. World Health Organization, 2021. 116 p.

51. The Incubation Period Distribution of Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis/ H. Xin, J.Y. Wong, C. Murphy [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. — 2021. — Vol. 73, № 12. — P. 2344–2352. — DOI 10.1093/cid/ciab501.

52. Epidemiological and Clinical Characteristics of COVID–19 in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis / B. Li, S. Zhang, R. Zhang [et al.] // *Front. Pediatr.* — 2020. — Vol. 8. — P. 591132. — DOI 10.3389/fped.2020.591132.

53. Transmission of COVID–19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study / M. Marks, P. Millat-Martinez, D. Ouchi [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. — 2021. — Vol. 21, № 5. — P. 629–636.

54. SARS–CoV–2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis / M. Cevik, M. Tate, O. Lloyd // *The Lancet Microbe*. — 2021. — Vol. 2, № 1. — P. e13–e22.

55. Shedding of Viable SARS–CoV–2 after Immunosuppressive Therapy for Cancer / T. Aydililo, A.S. Gonzalez-Reiche, S. Aslam [et al.] // *N Engl J Med*. — 2020. — Vol. 383, № 26. — P. 2586–2588.

56. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak / Y. Wang, H. Kang, X. Liu, Z. Tong // *J Med Virol*. — 2020. — Vol. 92, № 6. — P. 538–539.

57. Информация о новой коронавирусной инфекции для медицинских работников [Электронный ресурс]. — URL: https://minzdrav.gov.ru/ministry/med_covid19 (дата обращения: 02.06.2023).

58. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding/ R. Lu, X. Zhao, J. Li [et al.]. // *The*

Lancet. — 2020. — Vol. 395, № 10224. — P. 565–574. — DOI 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

59. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) [Электронный ресурс]. — URL: <https://Gisaid.Org/> (дата обращения: 24.06.2024).

60. GenBank / D.A. Benson, M. Cavanaugh, K. Clark [et al.] // Nucleic Acids Research. — 2012. — Vol. D1, № 41. — P. D36–D42. — DOI 10.1093/nar/gks1195.

61. Wise, J. COVID–19: New coronavirus variant is identified in UK / J. Wise // BMJ. — 2020. — Vol. 371. — P. m4857. — DOI 10.1136/bmj.m4857.

62. Guidance for surveillance of SARS–CoV–2 variants: Interim guidance / World Health Organization, 2021. 18 p. [Электронный ресурс]. — URL: https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO_2019-nCoV_surveillance_variants (дата обращения: 02.06.2023).

63. Hossain, M.K. The emergence of new strains of SARS–CoV–2. What does it mean for COVID–19 vaccines? / M.K. Hossain, M. Hassanzadeganroudsari, V. Apostolopoulos // Expert Review of Vaccines. — 2021. — Vol. 20, № 6. — P. 635–638. — DOI 10.1080/14760584.2021.1915140.

64. The Mutational Landscape of SARS–CoV–2 / B. Saldivar-Espinoza, P. Garcia-Segura, N. Novau-Ferré [et al.] // IJMS. — 2023. — Vol. 24, № 10. — P. 9072. — DOI 10.3390/ijms24109072.

65. Руководство по эпидемиологическому надзору за вариантами SARS–CoV–2: Временные рекомендации / Всемирная организация здравоохранения, 2021. - 23 с. [Электронный ресурс]. — URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/343775/WHO-2019-nCoV-surveillance-variants-2021.1-rus.pdf> (дата обращения: 26.06.2024).

66. Nextstrain [Электронный ресурс]. — URL: <https://nextstrain.org/> (дата обращения: 02.06.2023).

67. Cov-Lineages [Электронный ресурс]. — URL: <https://cov-lineages.org/resources/pangolin.html> (дата обращения: 02.06.2023).

68. The emergence and ongoing convergent evolution of the SARS-CoV-2 N501Y lineages/ D.P. Martin, S. Weaver, H. Tegally [et al.] // *Cell*. — 2021. — Vol. 184, № 20. — P. 5189-5200.e7. — DOI 10.1016/j.cell.2021.09.003.
69. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England: Technical briefing / Public Health England, 2021. — 77 p.
70. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia before April 2021/ G.V. Klink, K.R. Safina, S.K. Garushyants [et al.] // *PLoS ONE*. — 2022. — Vol. 17, № 7. — P. e0270717. — DOI 10.1371/journal.pone.0270717.
71. Determining the International Spread of B.1.1.523 SARS-CoV-2 Lineage with a Set of Mutations Highly Associated with Reduced Immune Neutralization / L. Zemaitis, G. Alzbutas, D. Gecys [et al.] // *Microorganisms*. — 2022. — Vol. 10, № 7. — P. 1356. — DOI 10.3390/microorganisms10071356.
72. Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Genetic Variant with Distinct Spike Protein Mutations / A. Gladkikh, A. Dolgova, V. Dedkov [et al.] // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 6. — P. 1029. — DOI 10.3390/v13061029.
73. The lineage of coronavirus SARS-CoV-2 of Russian origin: Genetic characteristics and correlations with clinical parameters and severity of coronavirus infection/ O.S. Glotov, A.N. Chernov, A.I. Korobeynikov [et al.] // *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. — 2022. — Vol. 36, № 4. — P. 132–143. — DOI 10.29001/2073-8552-2021-36-4-132-143.
74. COVID-19 в России: эволюция взглядов на пандемию (часть 1) / В. И. Стародубов, В. В. Береговых, В. Г. Акимкин [и др.] // *Вестник Российской академии медицинских наук*. — 2022. — Т. 77, № 3. — С. 199-207. — DOI 10.15690/vramn2118.
75. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions / M. Dhawan, A. Sharma, Priyanka [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. — 2022. — Vol. 18, № 5. — P. 2068883. — DOI 10.1080/21645515.2022.2068883.
76. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.who.int/news/item/26-11-2021->

classification-of-omicron-(b.1.1.529)-SARS-CoV-2-variant-of-concern (дата обращения 27.06.2024).

77. Молекулярно-генетический мониторинг SARS-CoV-2: определение вариантов омикрон и дельта методом ПЦР в режиме реального времени / А. С. Есьман, К. О. Миронов, А. С. Черкашина [и др.] // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков: Сборник тезисов, Новосибирск, 27–30 сентября 2022 года. – Новосибирск: Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 2022. — С. 415.

78. Continued Complexity of Mutations in Omicron Sublineages / A.N. Spratt, S.R. Kannan, K. Sharma [et al.] // *Biomedicines*. — 2022. — Vol. 10, № 10. — P. 2593.

79. Origin, virological features, immune evasion and intervention of SARS-CoV-2 Omicron sublineages / S. Xia, L. Wang, Y. Zhu [et al.] // *Sig Transduct Target Ther*. — 2022. — Vol. 7, № 1. — P. 241.

80. CoVariants [Электронный ресурс]. — URL: <https://covariants.org/> (дата обращения: 24.06.2024).

81. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa/ Tegally, H., Moir, M., Everatt, J. [et al.] // *Nat Med* 28, 1785–1790. — 2022. — DOI 10.1038/s41591-022-01911-2.

82. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission / L.B. Shrestha, C. Foster, W. Rawlinson [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. — 2022. — Vol. 32, № 5. — P.e2381.

83. European Centre for Disease Prevention and Control. Sequencing of SARS-CoV-2: first update. Sequencing of SARS-CoV-2- first update / ECDC: Stockholm; 2021. [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/sequencing-SARS-CoV-2> (дата обращения: 24.06.2024).

84. Current Trends in Diagnostics of Viral Infections of Unknown Etiology / D. Kiselev, A. Matsvay, I. Abramov [et al.] // *Viruses*. — 2020. — Vol. 12, № 2. — P. 211.
85. COVID–19 в России: эпидемиология и молекулярно-генетический мониторинг / В. Г. Акимкин, Т. А. Семенов, С. В. Углева [и др.] // *Вестник Российской академии медицинских наук*. — 2022. — Т. 77, № 4. — С. 254-260. — DOI 10.15690/vramn2121.
86. A Method for Variant Agnostic Detection of SARS–CoV–2, Rapid Monitoring of Circulating Variants, and Early Detection of Emergent Variants Such as Omicron / E. Lai, E.B. Kennedy, J. Lozach [et al.] // *J Clin Microbiol* / 2022. — Vol. 60, № 7. — P. e00342-22.
87. SARS–CoV–2 Variants Detection Using TaqMan SARS–CoV–2 Mutation Panel Molecular Genotyping Assays / P. Neopane, J. Nypaver, R. Shrestha, S.S. Beqaj // *IDR*. — 2021. — Vol. Volume 14. — P. 4471–4479.
88. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus 2: A Narrative Review / M.P. Cheng, J. Papenburg, M. Desjardins [et al.] // *Annals of Internal Medicine*. — 2020. — Vol. 172, № 11. — P. 726–734.
89. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus / M. Shen, Y. Zhou, J. Ye [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. — 2020. — Vol. 10, № 2. — P. 97–101.
90. Амвросьева, Т. SARS CoV 2: лабораторная диагностика / Т. Амвросьева, Н. Поклонская // *Наука и инновации*. — 2020. — № 7. — С. 22–27.
91. Стратегии проектирования РТ-ПЦР-систем и организации мониторинга SARS–CoV–2 / Н.А. Кузнецова, А. А. Почтовый, М. А. Никифорова, В. А. Гуцин // *Вестник РГМУ*. — 2020. [Электронный ресурс]. — № 2. — URL: [https://cyberleninka.ru/article/n/strategii-dizayna-rt-ptsr-sistem-i-organizatsiya-monitoringa-SARS–CoV–2](https://cyberleninka.ru/article/n/strategii-dizayna-rt-ptsr-sistem-i-organizatsiya-monitoringa-SARS-CoV-2) (дата обращения: 24.06.2024).
92. Методы специфического лабораторного тестирования новой коронавирусной инфекции / О. А. Перевезенцев, Т. О. Холодная, А. Е. Самсонов,

Д. В. Бурцев // Медицинский вестник Юга России. — 2020. — Т. 11, № 3. — С. 27-33. — DOI 10.21886/2219-8075-2020-11-3-27-33.

93. Перечень зарегистрированных тест-систем для выявления коронавирусной инфекции — Новости РСПП [Электронный ресурс] // РСПП. — 2020. — URL: <https://rspp.ru/events/news/perechen-test-sistem-dlya-vyyavleniya-koronavirusnoy-infektsii/> (дата обращения: 21.07.2023).

94. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: Interim guidance / World Health Organization, 2020. — 20 p.

95. Marty, F.M. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen / F.M. Marty, K. Chen, K.A. Verrill // N Engl J Med. — 2020. — Vol. 382, № 22. — P. e76.

96. Проблема ДНК(РНК)-контаминации в лаборатории при проведении диагностики COVID-19 методом ПЦР / А.С. Волынкина, А.Г. Рязанова, Д.В. Русанова, А.Н. Куличенко // Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО. — 2021. — № 7. — С. 76-81. — DOI 10.35627/2219-5238/2021-29-7-76-81.

97. Ошибки в лабораторной медицине: обзор литературы / Э. И. Ибрагимова, Г. Е. Аимбетова, В. Ю. Байсугурова, М. А. Рамазанова // Наука о жизни и здоровье. — 2020. — № 1. — С. 103-110. — DOI 10.24411/1995-5871-2020-10072.

98. Prolonged viral shedding of SARS-CoV-2 in an immunocompromised patient / Y. Nakajima, A. Ogai, K. Furukawa [et al.] // Journal of Infection and Chemotherapy. — 2021. — Vol. 27, № 2. — P. 387–389.

99. Kim, M.M. Post-COVID-19 multisystem inflammatory syndrome in children / M.M. Kim, S. Murthy, R.D. Goldman // Can Fam Physician. — 2021. — Vol. 67, № 8. — P. 594–596.

100. Патент № 2772362 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/6806. Тест-система для выявления SARS-CoV-2 линии Омикрон методом одношаговой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией: № 2021140147 : заявл. 31.12.2021: опубл. 19.05.2022 / Н. Д. Елшин, К. В. Варченко, К. С. Комиссарова [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное

учреждение "Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

101. Патент № 2779025 С1 Российская Федерация, МПК С12N 15/00, С12Q 1/68. Тест-система на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией для выявления SARS-CoV-2 линии Омикрон с определением субварианта ВА.1: № 2022113631 : заявл. 20.05.2022: опубл. 30.08.2022 / Н. Д. Елшин, К. В. Варченко, А. Б. Комиссаров [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

102. Разработка ПЦР-теста для выявления генетических вариантов альфа, бета, гамма, дельта вируса SARS-CoV-2 / Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, А. К. Шурыева [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. — 2022. — Т. 24, № 1. — С. 5-11. — DOI 10.47183/mes.2022.003.

103. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге / В. Г. Акимкин, С. Н. Кузин, Е. Н. Колосовская [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2021. — Т. 98, № 5. — С. 497-511. — DOI 10.36233/0372-9311-154.

104. WHO EMRO | Emerging diseases | Health topics // World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.emro.who.int/health-topics/emerging-diseases/index.html> (дата обращения 31.05.2024).

105. Громашевский, Л.В. Общая эпидемиология: руководство для врачей и студентов санитарно-гигиенических факультетов / Л. В. Громашевский. - 4-е изд. — Москва: Медицина, 1965. — 290 с.

106. Павловский, Е. Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов / Е. Н. Павловский. — Москва: Федеральное государственное унитарное предприятие "Академический научно-издательский, производственно-полиграфический и книгораспространительский центр "Наука", 1964. — 211 с.

107. Беляков, В. Д. Общие закономерности функционирования паразитарных систем (механизмы саморегуляции) / В. Д. Беляков // Журнал «Паразитология». — 1986. — № 4. — С. 249-255.

108. Черкасский Б. Л. Теоретическое обоснование структуры эпидемиологического надзора // Эпидемиологический надзор за инфекционными болезнями. Москва. — 1987.

109. Покровский, В. И. Пути оптимизации эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в стране / В.И. Покровский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1986. № 63(11). — С. 3-7.

110. Беляков, В. Д. Эпидемиологический надзор – основа современной организации противоэпидемической работы / В. Д. Беляков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1985. — № 5. — С. 53-58.

111. Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы / В. Г. Акимкин, Т. А. Семенов, К. Ф. Хафизов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2024. — Т. 101, № 2. — С. 163-172. — DOI 10.36233/0372-9311-507.

112. Глобальная стратегия геномного эпиднадзора за возбудителями болезней, обладающих пандемическим и эпидемическим потенциалом, 2022–2032 гг. [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.who.int/ru/publications/i/item/9789240046979> (дата обращения: 13.06.2024).

113. Черкасский, Б. Л. Руководство по общей эпидемиологии / Б. Л. Черкасский. — Москва, 2001. — 560 с.

114. Беляков, В.Д. Избранные лекции по общей эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний / В. Д. Беляков. — Москва: «Медицина», 1995. — 176 с.

115. Покровский, В. И. Описательное эпидемиологическое исследование: (ретроспективный эпидемиологический анализ) / В. И. Покровский, Н. Н. Филатов, И. П. Палтышев. — Москва: Санэпидмедиа, 2005. — 239 с.

116. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021621178 Российская Федерация. VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia). Сервис RuStrain: № 2021621059 : заявл. 27.05.2021: опубли. 02.06.2021 / В. Г. Акимкин, А. С. Сперанская, А. С. Черкашина [и др.]; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

117. Effective Approaches to Study the Genetic Variability of SARS–CoV–2 / I. Kotov, V. Saenko, N. Borisova [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 9. – P. 1855.

118. Cherkashina, A.S. SARS–CoV–2 S-Gene Sanger Sequencing. protocols.io [Электронный ресурс]. — URL: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.3by14jnwzlo5/v1> (дата обращения: 24.06.24).

119. A Dynamic Nomenclature Proposal for SARS–CoV–2 Lineages to Assist Genomic Epidemiology / A. Rambaut, E.C. Holmes, Á. O'Toole [et al.] // *Nature Microbiology*. — 2020. — № 5 (11). — P.1403–1407. — DOI 10.1038/s41564-020-0770-5.

120. Development and Application of Real-Time PCR-Based Screening for Identification of Omicron SARS–CoV–2 Variant Sublineages / A. Esman, D. Dubodelov, K. Khafizov [et al.] // *Genes*. — 2023. — Vol. 14, № 6. — P. 1218.

121. Методика определения геновариантов “Омикрон” и “Дельта” SARS–CoV–2 методом ПЦР в режиме реального времени: Методические рекомендации МР 3.1.0302-22 / А. С. Есьман, К. О. Миронов, А. С. Черкашина, В. Г. Акимкин // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. — 2022. — № 4(90). — С. 64-71.

122. Pandas - Python Data Analysis Library [Электронный ресурс]. — URL: <https://pandas.pydata.org/> (дата обращения: 25.09.2023).

123. NumPy [Электронный ресурс]. — URL: <https://numpy.org/> (дата обращения: 25.09.2023).

124. Epitools - Calculate Confidence Limits for a Sample Proportion [Электронный ресурс]. — URL: <https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion> (дата обращения: 24.06.2024).

125. Matplotlib — Visualization with Python [Электронный ресурс]. — URL: <https://matplotlib.org/> (дата обращения: 25.09.2023).

126. Plotly: Low-Code Data App Development [Электронный ресурс]. — URL: <https://plotly.com/> (дата обращения: 25.09.2023).

127. Эпидемический процесс COVID–19 в Российской Федерации: детерминанты и проявления / Т.А. Платонова, А.А. Голубкова, С.С. Смирнова [и др.] // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2023. — Т. 12, № 3(46). — С. 8-17. — DOI 10.33029/2305-3496-2023-12-3-8-17.

128. Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. — URL: <https://rosstat.gov.ru/folder/12781/>(дата обращения: 24.06.2024).

129. Technical Advisory Group on SARS–CoV–2 Virus Evolution [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.who.int/groups/technical-advisory-group-on-SARS–CoV–2-virus-evolution> (дата обращения: 21.07.2023).

130. Alzohairy, A. BioEdit: An important software for molecular biology / A. Alzohairy // GERF Bulletin of Biosciences. — 2011. — № 2(1). — P.60-61.

131. GISAID’s Role in Pandemic Response / S. Khare, C. Gurry, L. Freitas [et al.] // China CDC Weekly. — 2021. — Vol. 3, № 49. — P. 1049 –1051. — DOI:10.46234/ccdcw2021.255.

132. Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS–CoV–2 variants and mutations / K. Gangavarapu, A.A. Latif, J.L. Mullen [et al.]. // Nat Methods. — 2023. — № 20. — P.512–522. — DOI 10.1038/s41592-023-01769-3

133. Tracking SARS–CoV–2 Variants [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS–CoV–2-variants> (дата обращения: 20.03.2023).

134. Pondé, R.A.A. Physicochemical effect of the N501Y, E484K/Q, K417N/T, L452R and T478K mutations on the SARS–CoV–2 spike protein RBD and

its influence on agent fitness and on attributes developed by emerging variants of concern / R.A.A. Pondé // *Virology*. — 2022. — Vol. 572. — P. 44–54.

135. Expansion of L452R-Positive SARS–CoV–2 Omicron Variant, Northern Lombardy, Italy / F. Novazzi, A. Baj, A. Genoni [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2022. — Vol. 28, № 6. — P.1301-1302.

136. Auspice [Электронный ресурс]. — URL: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m> (дата обращения: 8.03.2023).

137. CovSPECTRUM [Электронный ресурс]. — URL: <https://cov-spectrum.org> (дата обращения: 8.03.2023).

138. Callaway, E. COVID ‘variant soup’ is making winter surges hard to predict / E. Callaway // *Nature*. — 2022. — Vol. 611, № 7935. — P. 213–214.

139. Delta spike P681R mutation enhances SARS–CoV–2 fitness over Alpha variant / Y. Liu, J. Liu, B.A. Johnson [et al.] // *Cell Reports*. — 2022. — Vol. 39, № 7. — P. 110829.

140. Mapping mutations to the SARS–CoV–2 RBD that escape binding by different classes of antibodies / A.J. Greaney, T.N. Starr, C.O. Barnes [et al.] // *Nat Commun*. — 2021. — Vol. 12, № 1. — P. 4196.

141. Comprehensive mapping of mutations in the SARS–CoV–2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies / A.J. Greaney, A.N. Loes, K.H.D. Crawford [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2021. — Vol. 29, № 3. — P. 463-476.e6.

142. Complete Mapping of Mutations to the SARS–CoV–2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition / A.J. Greaney, T.N. Starr, P. Gilchuk [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2021. — Vol. 29, № 1. — P. 44-57.e9.

143. On the Origins of Omicron’s Unique Spike Gene Insertion / A.J. Venkatakrisnan, P. Anand, P.J. Lenehan [et al.] // *Vaccines*. — 2022. — Vol. 10, № 9. — P. 1509.

144. Brown, L.D. Interval Estimation for a Binomial Proportion / L.D. Brown, T.T. Cai, A. Dasgupta // *Statistical Science*. — 2001. — №16 (2). — P.101–133. — DOI 10.1214/ss/1009213286.

145. Omicron BA.2 Lineage, the “Stealth” Variant: Is It Truly a Silent Epidemic? A Literature Review / G. Tiecco, S. Storti, S. Arsuffi [et al.] // *IJMS*. — 2022. — Vol. 23, № 13. — P. 7315.

146. Wang, L. Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa / L. Wang, G. Cheng // *Journal of Medical Virology*. — 2022. — Vol. 94, № 4. — P. 1728–1733.

147. Hall, T.A. A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // *Nucleic Acids Symposium Series*. — 1999. № 41. — P.95-98.

148. Integrated DNA Technologies. Integrated DNA Technologies | IDT [Электронный ресурс]. — URL: <https://eu.idtdna.com/pages> (дата обращения: 06.02.2023).

149. COVID–19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS–CoV–2 / В. Г. Акимкин, А. Ю. Попова, К. Ф. Хафизов [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2022. — Т. 99, № 4. — С. 381-396. — DOI 10.36233/0372-9311-295.

150. Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции / В. Г. Акимкин, В. В. Петров, К. В. Красовитов [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2021. — Т. 66, № 6. — С. 417-424. — DOI 10.36233/0507-4088-86.

151. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации / К. Ф. Хафизов, В. В. Петров, К. В. Красовитов [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2021. — Т. 66, № 1. — С. 17-28. — DOI 10.36233/0507-4088-42.

152. Мониторинг распространения вариантов SARS–CoV–2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования / Н. И. Борисова, И. А. Котов, А. А. Колесников [и др.] //

Вопросы вирусологии. — 2021. — Т. 66, № 4. — С. 269-278. — DOI 10.36233/0507-4088-72.

153. Официальный интернет-ресурс для информирования общественности о коронавирусе [Электронный ресурс]. — URL: <https://стопкоронавирус.рф/> (дата обращения: 08.03.2023).

154. Эпидемический процесс новой коронавирусной инфекции на территории Московской области / Г. А. Гасанов, С. В. Углева, Д. В. Дубоделов [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2022. — Т. 12, № 4. — С. 19-25. — DOI 10.18565/epidem.2022.12.4.19-25.

155. Клинико-эпидемиологические особенности пациентов, госпитализированных с COVID–19 в различные периоды пандемии в Москве / Н. И. Брико, В. А. Коршунов, С. В. Краснова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — Т. 99, № 3. — С. 287-299. — DOI 10.36233/0372-9311-272.

156. Development and application of an RT–PCR assay for the identification of the delta and omicron variants of SARS–COV–2 / G.A. Shipulin, Y. Savochkina, A.K. Shuryaeva [et al.] // Heliyon. — 2023. — Vol. 9, № 6. — P. e16917.