

ЕСЬМАН АННА СЕРГЕЕВНА

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

3.2.2. Эпидемиология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель

Акимкин Василий Геннадьевич — академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Асланов Батырбек Исмелович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фельдблюм Ирина Викторовна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой эпидемиологии и гигиены Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «_____» _____ 2024 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 64.1.010.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и на сайте института www.crie.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Николаева Светлана Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. *CO*rona*V*irus*D*isease 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 противозидемических 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) [Logunov D.Y., 2020; Jones I., 2021; Акимкин В.Г., 2022].

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 [Esmann 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 объема 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 вариабельность 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 помесечного 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–PB, на территории Российской Федерации.

Личное участие автора в получении результатов

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–PB. Разработка методики осуществлена в Лаборатории молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов и Научной группе геномной 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.

Внедрения результатов исследования

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).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 172 страницах. 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 диссертационной работе использованы эпидемиологический, молекулярно-биологические и статистические методы, представленные сведения об использованных материалах обобщены в **таблице 1**.

Эпидемиологический метод

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).

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.

Таблица 1 — Материалы исследования

Направление исследования	Материалы исследования	Кол-во
Оценка уровня и структуры заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) на территории Российской Федерации, Молекулярно-генетический мониторинг распространения изолятов SARS–COV–2	Случаи заболевания населения	21 600 553
	Отчет Роспотребнадзора №970 «Информация о случаях инфекционных заболеваний у лиц с подозрением на новую коронавирусную инфекцию»	764
	Отчет о результатах молекулярно-генетического мониторинга изолятов SARS–CoV–2 на территории Российской Федерации	379
	Отчётная форма 1248 «Результаты молекулярно-генетического мониторинга изолятов SARS–CoV–2»	361
	Аналитические материалы о результатах молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции, циркулирующих в Российской Федерации	67
	Эпидемиологический анализ заболеваемости COVID–19 и структуры циркулирующих геновариантов SARS–CoV–2 на территории Российской Федерации	64
	Эпидемиологический анализ заболеваемости COVID–19 и структуры циркулирующих геновариантов SARS–CoV–2 на территории Центрального федерального округа	35
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	> 200 экспериментов
	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 исследований

Описательно-аналитические методы

В исследовании учтены такие параметры как: уровни заболеваемости, распределение показателей по неделям, характеристика групп по возрастам, распределение заболевших по полу и тяжести заболеваемости.

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 гибридационно-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).

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

Определение первичной нуклеотидной последовательности методами секвенирования

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. Для указанных исследований использованы набор для подготовки библиотеки РНК ATOPlex от MGI и набор Midnight от ONT (Oxford Nanopore Technologies, Оксфорд, Великобритания).

Секвенирование фрагментов генов проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе 3500× Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, США) с использованием реагентов, рекомендованных производителем. 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. Анализ полученных последовательностей проводился с использованием программного обеспечения GEM: CoV-2 и с применением инструментов платформы VGARus.

Пиросеквенирование для валидации разработанных методик проведено на приборе PyroMark Q24 (QIAGEN, Hilden, Germany) с использованием реагентов, рекомендованных производителем.

Метод ПЦР-РВ

Генотипирование вариантов SARS-CoV-2 Delta и субвариантов Omicron проводили при помощи разработанных лабораторных методик, основанных на применении метода ПЦР-РВ. В качестве положительных контрольных образцов использовали клонированные в плазмидный вектор pGEM-T ампликоны.

Статистические методы

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика уровня и структуры заболеваемости COVID–19 в Российской Федерации, Московской области и г. Москве в 2020–2022 гг.

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.

На **рисунке 1** 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. 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.

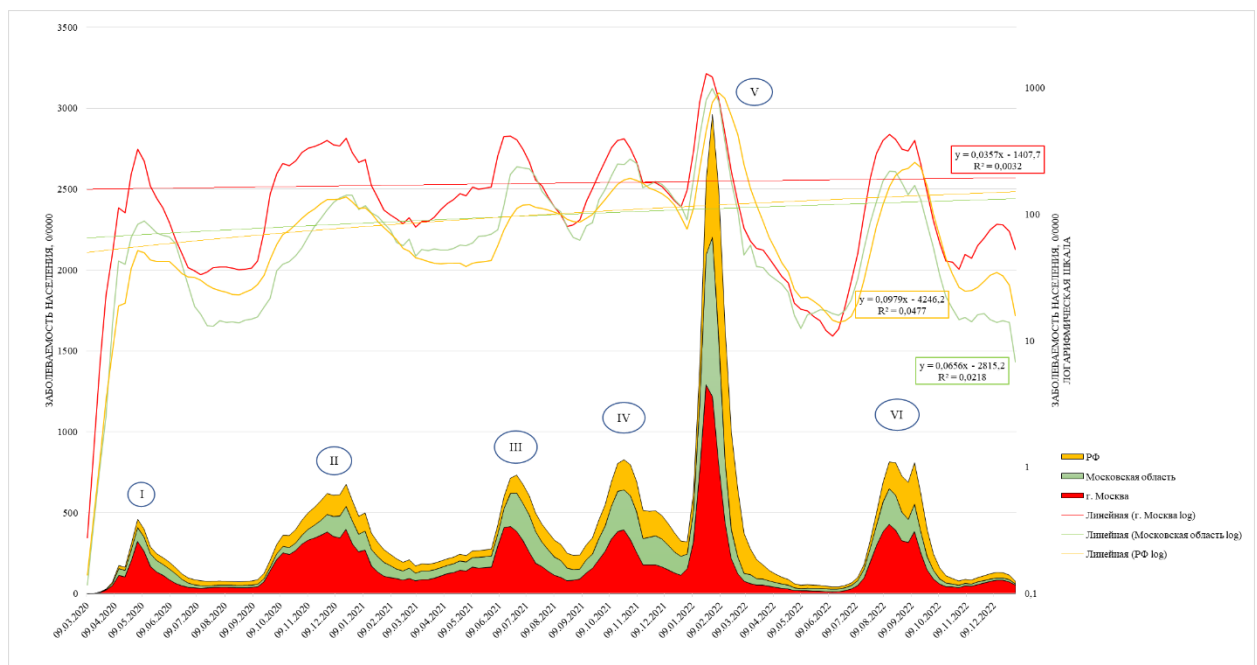


Рисунок 1– Сравнение понедельной динамики заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID–19) населения Российской Федерации, Московской области и г. Москвы (°/0000)

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 (**рисунком 2**).

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.



Рисунок 2 – Возрастная структура населения Московской области и г. Москвы в сравнении с совокупным населением Российской Федерации в 2020–2022 гг.

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 (**рисунок 3**).

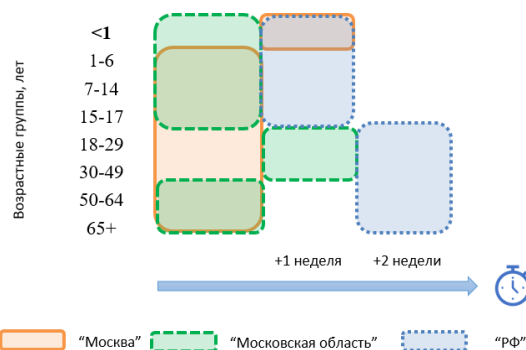


Рисунок 3 – Очередность вовлечения возрастных групп в эпидемический процесс при рассмотрении заболеваемости населения Российской Федерации, Московской области и г. Москвы в 2020–2022 гг.

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 (**рисунок 4**):

- 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.

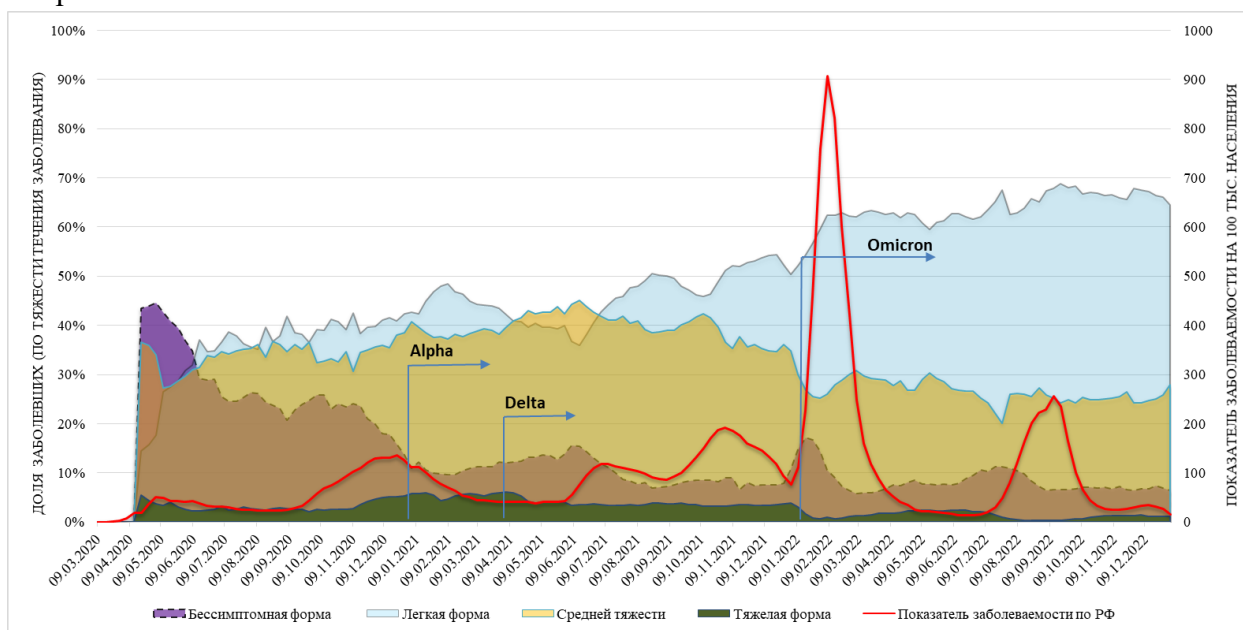


Рисунок 4 — Динамика распределения заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) по степени тяжести на территории Российской Федерации с апреля 2020 года по декабрь 2022 года

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 (**рисунок 5**): 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).

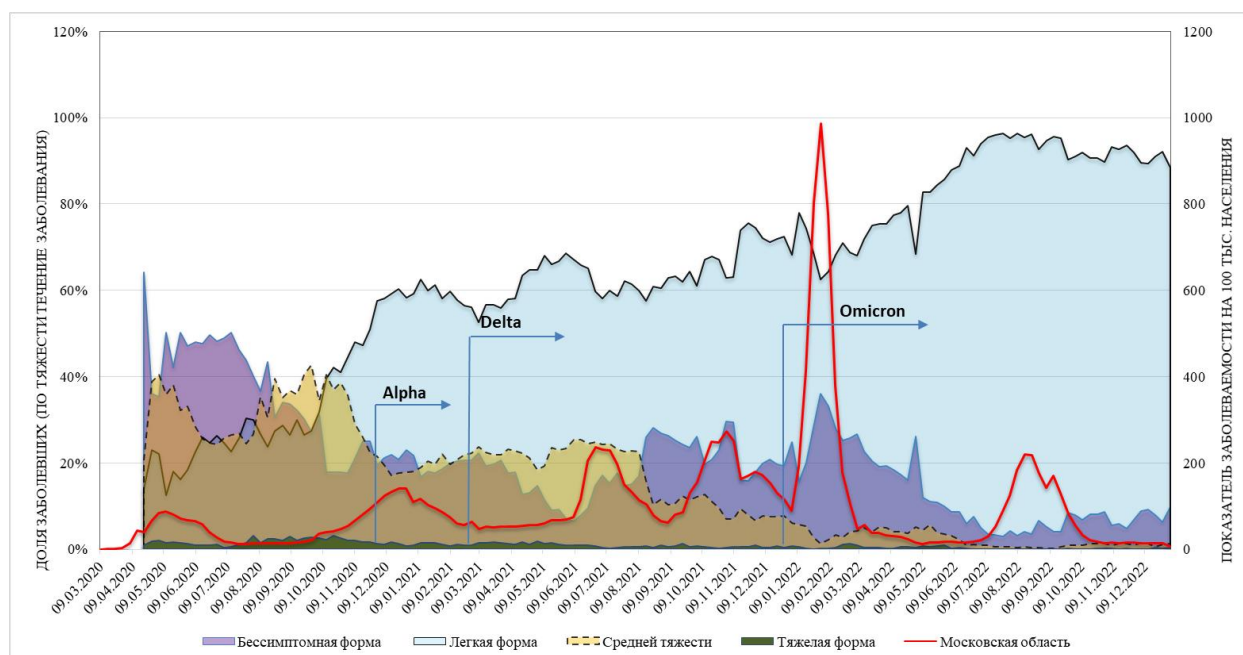


Рисунок 5 — Динамика распределения заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) по степени тяжести в Московской области с апреля 2020 года по декабрь 2022 года

Среди наиболее значимых изменений в структуре тяжести среди заболевших в г. Москве можно определить (рисунок 6): 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).

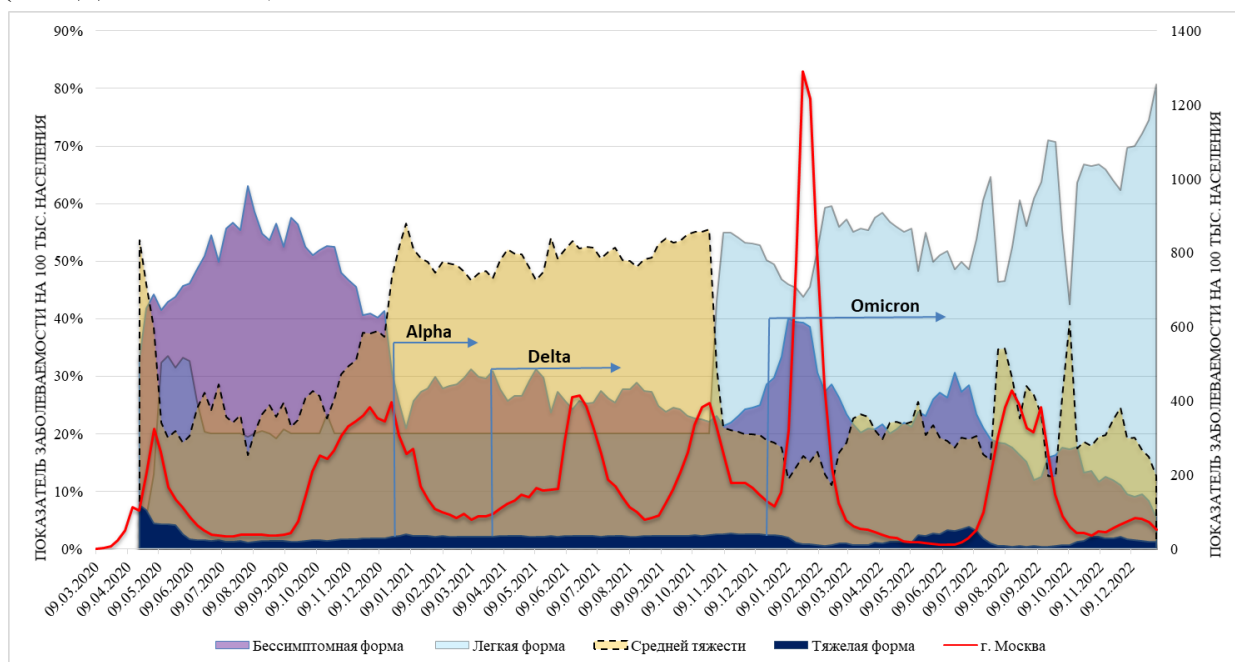


Рисунок 6 — Динамика распределения заболевших новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) по степени тяжести в г. Москве с апреля 2020 года по декабрь 2022 год

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.

Разработка лабораторной методики для скринингового генотипирования вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2

Рекомендации Технической консультативной группы ВОЗ по эволюции вирусов и использование биоинформатических методов при анализе геномов изолятов SARS-CoV-2 позволили определить мишени для точной дифференциации вариантов Delta и Omicron SARS-CoV-2.

При разработке праймеров и зондов для ПЦР-РВ выравнивание нуклеотидной последовательности для выбора позиций олигонуклеотидов проводили с помощью программы BioEdit. Данные о последовательности полного генома варианта Omicron SARS-CoV-2 получены из базы данных GISAID. Также использованы геномные отчеты Outbreak.info для сравнения линий и оценки распространенности мутаций между линиями.

Для работы по генотипированию вируса выбран S-ген SARS-CoV-2. В **таблице 2** 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 2 — 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.

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. 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 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.

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. Диагностическая специфичность и чувствительность разработанных методик: для **L452R** — 100,0% (95% ДИ: 87,9–100,0) и 100,0% (95% ДИ: 96,9–100,0), **P681R** — 100,0% (95% ДИ: 83,0–100,0) и 100,0% (95% ДИ: 94,6–100,0), **del69–70** — 100,0% (95% ДИ: 72,0–100,0) и 100,0% (95% ДИ: 97,0–99,9), **N501Y** — 100,0% (95% ДИ: 87,0–100,0) и 100,0% (95% ДИ: 98,0–100,0), **del143–145** — 100,0% (95% ДИ: 95,0–100,0) и 100,0% (95% ДИ: 95,6–99,9), **Ins214EPE** — 95,9% (95% ДИ: 86,0–99,0) и 98,8% (95% ДИ: 97,8–100,0) соответственно. Что позволило использовать ее наравне с методами секвенирования (полногеномным и секвенированием фрагментов генов по методу Сэнгера).

Разработка лабораторной методики для дифференцирования сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2

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 **таблице 4** представлен метод интерпретации результатов ОТ–ПЦР–РВ.

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.

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

Таблица 4 — Мутации, выбранные для разработки мультиплексной ПЦР–РВ и интерпретация полученных результатов

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

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

На **рисунке 7** представлен дизайн расположения мутаций–мишеней в мультиплексных смесях для проведения ПЦР–РВ с цветовым обозначением соответствующего спектра.

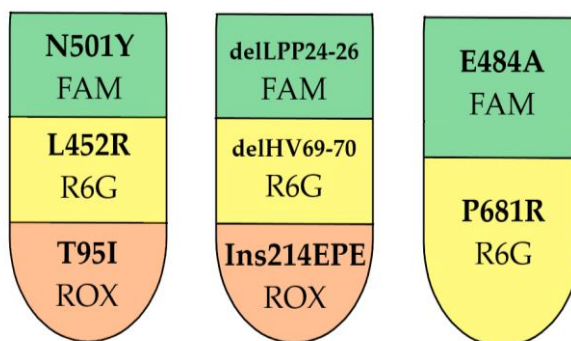


Рисунок 7 — Дизайн мультиплекса ОТ–ПЦР–РВ (представлены мишени и соответствующие флуорофоры)

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).

Всего данной методикой исследовано 622 образца с различными сочетаниями мутаций. Наличие и отсутствие мутаций подтверждено методом секвенирования.

Диагностическая специфичность и чувствительность разработанных методик: **N501Y** — 80,0% (95% ДИ 49,0–94,4) и 96,7% (95% ДИ 93,4–98,7), **L452R** — 100% (95% ДИ 87,1–100) и 95,3% (95% ДИ 91,3–97,8), **T95I** — 98,4% (95% ДИ 95,9–99,6) и 93,5% (95% ДИ 82,1–98,6), **delLPP24–26** — 90,9% (95% ДИ 72,2–97,5) и 100% (95% ДИ 98,4–100), **delHV69–70** — 88,7% (95% ДИ 79,0–95,0) и 97,8% (95% ДИ 95,3–99,2), **Ins214EPE** — 100% (95% ДИ 97,0–100) и 100% (95% ДИ 43,9–100), **E484A** — 87,5% (95% ДИ 64,0–96,5) и 98,4% (95% ДИ 96,0–99,6) соответственно. Диагностическая специфичность и чувствительность анализа составили: для **Mix N501Y + T95I + L452R** — 80,0–100,0%, и 93,5–96,3%. Для **Mix delHV69–70 + Ins214EPE + delLPP24–26** — 88,7–100,0%, и 97,8–100,0%. Для **Mix E484A+P681R** — 93,8–100% и 97,7–100,0% соответственно. Интерпретацию результатов проводили с помощью **таблицы 4**.

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. 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.

Методика апробирована на больших выборках образцов в рутинной 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 (отправлены на секвенирование).

Результаты, полученные при использовании реагентов специалистами региональных Центров гигиены и эпидемиологии загружены в базу данных VGenus на основании Постановления Правительства Российской Федерации от 23 марта 2021 года № 448 (150 000 исследований).

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.

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.

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 подтвержденным 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.

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.

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 месячного 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 месячных 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.

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.

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.

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 при применении в диагностической подсистеме эпидемиологического надзора.

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.

Безусловно, секвенирование полных геномов является наиболее информативным и предпочтительным методом эпидемиологического надзора за возбудителями. 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.

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.

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 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. 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.

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, del169–70, N501Y, del143–145 и Ins214EPE. 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 публикаций по теме диссертации

1. 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, No. 6. — P. 1218. — DOI 10.3390/genes14061218.

2. **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. *

3. **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. *

4. **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. *

5. 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.

6. **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. *

7. Патент № 2791958 С1 Российская Федерация, МПК С12N 15/00, С12Q 1/68. Олигонуклеотиды для определения мутации S:N501Y SARS-CoV-2: № 2022126136: заявл. 06.10.2022: опубл. 14.03.2023 / **А.С. Есьман**, К.О. Миронов, 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.

8. Патент № 2795014 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 15/86. Олигонуклеотиды для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2: № 2022126124: заявл. 06.10.2022: опубл. 27.04.2023 / **А.С. Есьман**, К.О. Миронов, 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.

9. Патент № 2795016 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 7/00. Олигонуклеотиды для определения мутации S:delVYY143–145 SARS–CoV–2: № 2022126130: заявл. 06.10.2022: опубл. 27.04.2023 / **А.С. Есьман**, К.О. Миронов, 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.

10. Патент № 2795017 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 7/00. Олигонуклеотиды для определения мутации S:Ins214EPE SARS–CoV–2: № 2022126133: заявл. 06.10.2022: опубл. 27.04.2023 / **А.С. Есьман**, К.О. Миронов, 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.

11. Патент № 2795018 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 15/86. Олигонуклеотиды для определения мутации S:L452R SARS–CoV–2: № 2022126134: заявл. 06.10.2022: опубл. 27.04.2023 / **А.С. Есьман**, К.О. Миронов, 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.

12. Патент № 2795019 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 15/00. Олигонуклеотиды для определения мутации S:P681R SARS–CoV–2: № 2022126137: заявл. 06.10.2022: опубл. 27.04.2023 / **А.С. Есьман**, К.О. Миронов, 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.

13. 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 [и др.] // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. — 2022. — № 4(90). — С. 64–71.

14. Применение ПЦР в режиме реального времени в молекулярно-генетическом мониторинге геноварианта «омикрон» вируса SARS–CoV–2 / **А.С. Есьман**, А.С. Черкашина, А.С. Сперанская [и др.] // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XIV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Москва, 28–30 марта 2022 года. — М.: Медицинское маркетинговое агентство, 2022. — 204 с. — с.62.

15. ПЦР–методики в молекулярно-генетическом мониторинге геноварианта «Омикрон» вируса SARS–CoV–2 / **А.С. Есьман**, А.С. Черкашина, А.Г. Голубева [и др.] // Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 55–летию со дня основания НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, С.–Петербург, 15 апреля 2022 г. — СПб.: ПОЛИТЕХ–ПРЕСС, 2022. — 81 с. — с.31.

16. Разработка и применение основанных на ПЦР методик в молекулярно-генетическом мониторинге геноварианта Омикрон вируса SARS–CoV–2 / **А.С. Есьман**, А.С. Черкашина, А.Г. Голубева [и др.] // Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2022: Сборник материалов конгресса с международным участием, Москва, 27–28 апреля 2022 года. — Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. — С. 244–245.

17. Скрининговое генотипирование вариантов Дельта и Омикрон вируса SARS–CoV–2 / **А.С. Есьман**, А.С. Черкашина, А.Г. Голубева [и др.] // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Лужки, 22–24 июня 2022 года. — Москва: Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, 2022. — С. 111–113.

18. Разработка методик генотипирования вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ / А.С. Черкашина, А.Г. Голубева, С.А. Саламайкина [и др.] // Материалы научно-практических конференций в рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022): Сборник тезисов, Москва, 06–08 сентября 2022 года. — Москва: У Никитских ворот, 2022. — С. 30.

19. 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.

20. Опыт применения основанных на ПЦР методик в мониторинге вариантов SARS-CoV-2 / А.С. Есьман, К.О. Миронов, А.С. Черкашина [и др.] // Взаимодействие науки и практики. Опыт и перспективы: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня образования государственной санитарно-эпидемиологической службы России, Екатеринбург, 06–07 октября 2022 года. — Екатеринбург: Федеральное бюджетное учреждение науки "Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. — С. 166–167.

21. Перспективы использования платформы VGARus для молекулярно-генетического мониторинга и эпидемиологического надзора за возбудителями вирусных гепатитов / Д.В. Дубоделов, К.Ф. Хафизов, А.С. Есьман [и др.] // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: Сборник трудов XV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Москва, 27–29 марта 2023 года. — Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Медицинское Маркетинговое Агентство", 2023. — С. 74.

22. Разработка и применение скрининговых методов типирования в мониторинге вариантов SARS-CoV-2 / А.С. Есьман, А.Г. Голубева, А.С. Черкашина [и др.] // Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 13–14 апреля 2023 г. — СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2023. — 110 с. — С. 36–37.

23. Разработка скрининговых методик типирования сублиний Omicron SARS-CoV-2 на основе ПЦР в режиме реального времени и их применение в молекулярно-генетическом мониторинге / А.С. Есьман, А.Г. Голубева, А.С. Черкашина [и др.] // Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2023: сборник тезисов Конгресса с международным участием, Москва, 27–28 апреля 2023 года. — Москва: Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. — С. 73–74.

24. Есьман А.С., Черкашина А.С., Акимкин В.Г. Совершенствование скрининговых методов для типирования SARS-CoV-2 в рамках молекулярно-генетического мониторинга COVID-19 // Россия – Африка: опыт работы Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней / под ред. д-ра мед. наук, проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН, д-ра мед. наук, проф. В.В. Кутырева. — Элиста: ООО «Процвет», 2023. — 244 с. — С. 59–61.

* опубликованы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертации по специальности «Эпидемиология»