

ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии
Роспотребнадзора

На правах рукописи

Киреев Дмитрий Евгеньевич

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ИНФЕКЦИЕЙ, ВЫЗЫВАЕМОЙ
ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА 1 ТИПА, С ПРИМЕНЕНИЕМ
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

3.2.2. Эпидемиология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
академик РАН, д.м.н., профессор
Покровский Вадим Валентинович

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	22
1.1. Развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в мире и в Российской Федерации	22
1.2. Генетическая изменчивость и лекарственная устойчивость ВИЧ-1	28
1.3. Лабораторные подходы и методики секвенирования ВИЧ-1	36
1.4. Биоинформатические методы в системе эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией	39
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
2.1. Материалы исследования.....	57
2.2. Методы исследования	58
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	71
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИЧ-1.....	84
4.1 Разработка набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq»	84
4.2 Разработка набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS»	90
ГЛАВА 5. СОЗДАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ БАЗ ДАННЫХ ДЛЯ СБОРА, ХРАНЕНИЯ И АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИЧ-1 И ИНФОРМАЦИИ О ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТАХ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ.....	101
ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ХОДЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РАССЛЕДОВАНИЙ СЛУЧАЕВ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИЧ-1, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ.....	117
ГЛАВА 7. ВЫЯВЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНЫХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1 И ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	136
7.1 Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, к препаратам классов ингибиторы протеазы и обратной транскриптазы среди пациентов без опыта терапии.....	136

7.2 Резистентность ВИЧ-1 к препаратам классов ингибиторы протеазы и обратной транскриптазы среди пациентов без опыта терапии	144
7.3 Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 к препаратам класса ингибиторы интегразы	146
ГЛАВА 8. АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ.....	150
ГЛАВА 9. ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЦЕНТРАЛЬНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ С ПОМОЩЬЮ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИЧ-1 И СОПУТСТВУЮЩЕЙ ИНФОРМАЦИИ О ПАЦИЕНТАХ.....	165
9.1 Применение биоинформатических методов при изучении особенностей распространения эпидемии ВИЧ-инфекции	165
9.2 Применение кластерного анализа нуклеотидных последовательностей в ходе ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа	180
ГЛАВА 10. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ.....	197
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	207
ВЫВОДЫ.....	226
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	229
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	230
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	231
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	235
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	236
ПРИЛОЖЕНИЯ	263

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

В Российской Федерации (РФ) болезнь, вызываемая вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), наносит значительный экономический ущерб, негативно влияя на демографию и социально-экономическое развитие страны. Социальная значимость болезни определяется ростом смертности среди трудоспособного населения и снижением продолжительности жизни. Согласно данным Государственного доклада в 2022-м году прямые медицинские затраты по противодействию распространению ВИЧ-инфекции, включающие обследование населения, профилактические, противоэпидемические мероприятия и медицинскую помощь, достигли 76,8 млрд. руб. [32]. А косвенные экономические затраты от преждевременной смертности и инвалидизации населения в связи с ВИЧ-инфекцией составили 172,7 млрд. руб. Таким образом, ВИЧ-инфекция по суммарному экономическому ущербу в РФ в 2022-м году среди инфекционных заболеваний находилась на втором месте, уступая только новой коронавирусной инфекции.

Несмотря на определенные достигнутые успехи и снижение заболеваемости, пораженность населения ВИЧ-инфекцией продолжает расти и на 31 декабря 2022 г. составила 794,7 на 100 тысяч человек [32]. При этом все большее количество лиц среди вновь выявленных заражается посредством полового пути передачи при гетеросексуальных контактах, что указывает на активное распространение ВИЧ-инфекции в общих группах населения [52].

Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией в РФ регламентируется Санитарными правилами и нормами 3.3686-21 [55], Федеральным законом №38-ФЗ [61] и Федеральным законом №52-ФЗ [62]. Приказами Министерства Здравоохранения в стране создана и функционирует сеть государственных учреждений (центров по профилактике и борьбе со СПИДом), занимающихся профилактикой и диагностикой ВИЧ-инфекции, а также оказанием медицинской

помощи ВИЧ-инфицированным лицам [41-43]. По каждому выявленному случаю ВИЧ-инфекции специалистами центра СПИД проводится эпидемиологическое расследование, по результатам которого дается заключение о причинах и источниках заболевания, путях и факторах передачи. Разрабатывается и осуществляется комплекс противоэпидемических мероприятий [28]. Каждый случай заболевания ВИЧ-инфекцией подлежит регистрации и учету в медицинских организациях и территориальных органах Роспотребнадзора. Сведения в рамках эпидемиологического надзора собираются согласно формам №4, №61, №1 и №2, утвержденным Федеральной службой государственной статистики. Указанные формы позволяют оперативно получать информацию о структуре и уровне заболеваемости по каждому субъекту РФ.

Применение биоинформатических методов, под которыми подразумевается компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 совместно с клинико-эпидемиологическими данными ВИЧ-инфицированных пациентов, практически не описано в отечественных нормативных документах. Только в методических рекомендациях «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» [24] указывается на возможность проведения генотипирования при проведении расследования случаев передачи ВИЧ, что, однако, является малоэффективным методом. В настоящее время возможности применения биоинформатических методов в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией значительно шире.

ВИЧ-инфекция является пожизненным заболеванием с высоким уровнем стигматизации [57]. По этой причине в ходе проведения эпидемиологического расследования пациент склонен скрывать истинный путь передачи ВИЧ и не указывать контактных лиц [13, 187]. А вследствие неспецифических клинических признаков острой стадии болезни, выявление ВИЧ-инфекции происходит иногда много позже заражения человека. Все эти факторы осложняют оценку истинной динамики и структуры заболеваемости. Однако за последние несколько десятилетий значительно улучшилось понимание вирусной эволюции. Было показано, что ВИЧ-инфицированные люди, эпидемиологически связанные между

собой, имеют генетически схожие варианты вируса [217]. При этом чем короче эпидемиологическая цепочка, тем выше генетическое сходство геномов ВИЧ этих пациентов [111]. Поскольку нуклеотидная последовательность вируса является объективной характеристикой ВИЧ-инфицированного пациента, сравнение геномов вируса позволяет уточнить характеристики, невыясненные при эпидемиологическом расследовании [86].

Совершенствование лабораторной базы для секвенирования позволило в развитых странах определять нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 для каждого пациента уже в момент постановки диагноза [109]. А значительное развитие биоинформатических методов и рост компьютерных мощностей позволили проводить анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 совместно с эпидемиологической информацией, собранной о пациентах. На первых этапах данный подход использовали только для научных исследований, однако по мере накопления эпидемиологических и геномных данных, а также развития способов анализа, расширились области его прикладного применения [135]. В настоящее время этот подход используется при изучении развития эпидемий в пространстве и времени (филогеография [104, 214] и филодинамика [118, 143]); оценке таких параметров, как заболеваемость и пораженность [73, 114]; определении динамики основных характеристик эпидемического процесса [185], оценке качества выявления новых случаев инфекции [129] и эффективности профилактических мероприятий [134]. Анализ геномных вирусных данных, выполняемый в «реальном времени», позволяет проводить оперативный мониторинг распространенности вариантов вируса [75]. Своевременно проводимые противоэпидемические мероприятия, реализуемые с учетом молекулярных данных, позволяют определять границы очага и эффективно предотвращать появление новых случаев инфекции [172].

В результате прогресса, достигнутого в области вирусологии, биоинформатики и лабораторной диагностики, в развитых странах биоинформатические методы в эпидемиологическом надзоре эффективно используются не только для определения лекарственной устойчивости ВИЧ и

расследования случаев инфицирования при оказании медицинской помощи. Однако в РФ они до настоящего времени не имеют широкого применения. В связи с этим разработка и внедрение молекулярно-генетических и биоинформатических методов в систему эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией представляется актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования.

Первые случаи заражения ВИЧ-1 произошли в Советском Союзе в конце 80-х годов. Почти сразу после этого в стране была создана система учреждений, занимающихся профилактикой, диагностикой, а чуть позже и лечением ВИЧ-инфекции. За прошедшие с тех пор 30 лет были разработаны и утверждены нормативные документы разного уровня, определяющие в том числе порядок санитарно-эпидемиологического надзора за болезнью.

В то же время в рамках эпидемиологического надзора биоинформатические методы представлены слабо. На момент начала настоящего исследования только в методических рекомендациях № 6963-РХ «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» [24] указывалось, что возможно проведение генотипирования ВИЧ в ходе осуществления эпидемиологического расследования, а также в методических рекомендациях № 5958-РХ «О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам» [23] описывалась возможность проведения когортных исследований с целью мониторинга лекарственной устойчивости вируса.

С участием автора настоящего исследования применение молекулярно-биологических методов было внедрено в надзор за распространением вариантов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам, а также разработаны методические рекомендации МР 3.1.5.0075/1-13, утвержденные 20 августа 2013 г. [26].

Также с участием автора проводилась валидация применения филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей в ходе расследования случаев передачи ВИЧ при оказании медицинской помощи [21, 48, 63]. В результате проведенных исследований данный биоинформатический метод был успешно внедрен в эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации, а его применение регламентировано разработанными методическими указаниями 3.1.3342-16 «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией», утвержденными 26 февраля 2016 г. [28], а впоследствии также СанПиН 3.3686-21 [55].

Прогресс, достигнутый в области молекулярно-генетических и биоинформатических методов, позволяет использовать биоинформатические методы шире и эффективнее, чем это описано в настоящее время в документах, регламентирующих эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией в стране.

В связи с этим настоящее исследование посвящено разработке инструментов, основанных на использовании молекулярно-генетических технологий и биоинформатического анализа, и их последующему внедрению в систему эпидемиологического надзора.

Цель работы:

Совершенствование системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией путем использования методов биоинформатического анализа.

Задачи:

1. Провести анализ существующей системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации, обосновать целесообразность внесения в нее биоинформатических методов анализа.
2. Разработать диагностические наборы реагентов для получения нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, которые могут быть использованы для определения лекарственной устойчивости вируса и расследования случаев инфицирования, потенциально связанных с оказанием медицинской помощи.

3. Разработать электронные базы данных для сбора и анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных пациентах на территории Российской Федерации и стран Восточной Европы и Центральной Азии.
4. Повысить достоверность результатов и эффективность применения биоинформатических методов, используемых в ходе эпидемиологического расследования случаев инфицирования ВИЧ-1, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи.
5. Выявить резистентные варианты ВИЧ-1 на территории Российской Федерации и оценить динамику лекарственной устойчивости вируса к антиретровирусным препаратам.
6. Изучить разнообразие генетических вариантов вируса в Российской Федерации и проанализировать особенности их распространения.
7. Оценить возможности анализа молекулярных кластеров при изучении эпидемического процесса ВИЧ-инфекции на примере Центрального федерального округа Российской Федерации.
8. Разработать подходы к использованию биоинформатических методов анализа с целью совершенствования эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

Научная новизна.

Выявлено несовершенство нормативно-методической документации, определяющей эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации, и определена целесообразность внесения в нее биоинформатических методов анализа.

Впервые получена информация о 7164 уникальных нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1 и сопутствующие эпидемиологические данные о пациентах, на основании чего определены особенности циркуляции вариантов ВИЧ-1 за весь период эпидемии ВИЧ-инфекции в Российской Федерации.

Получены новые данные о распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на территории Российской Федерации. Доказано, что частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, к препаратам классов нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, ингибиторов протеазы у пациентов без опыта антиретровирусной терапии на территории Российской Федерации в период с 2005 по 2019 гг. находилась в диапазоне 1,79-6,60%. Показано, что с 2020 по 2022 гг. зарегистрирован достоверный рост до 9,38% ($p < 0,05$). В условиях достоверного роста лекарственная устойчивость ВИЧ-1 наиболее часто выявлялась к препаратам класса ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы невирапину и эфавирензу (10,40%). При этом уровень распространенности резистентности вируса к препаратам класса ингибиторов интегразы оставался низким в течение всего изучаемого периода и составил 0,28% (95%-й ДИ 0,05%-0,84%).

Впервые определены количественные критерии генетического сходства вариантов ВИЧ-1, которые позволяют провести оценку наличия эпидемиологической связи между пациентами с ВИЧ-инфекцией. Рассчитана скорость роста генетической дистанции между вирусами от эпидемиологически связанных ВИЧ-инфицированных лиц, которая составила 0,41% в год для консервативной области генома ВИЧ-1 с 2096-го по 3364-й нуклеотид (гены протеазы и обратной транскриптазы) и 1,99% в год – для вариабельной области генома с 6976-го по 7352-й нуклеотид (V3 петля гена белка gp120).

Получены новые данные, свидетельствующие о том, что распространенность различных генетических вариантов ВИЧ-1 зависит от региона проживания пациента и путей передачи вируса. Показано, что доля ВИЧ-1 суб-субтипа А6 снизилась с 91,2% до 78,4% среди новых случаев инфекции с одновременным ростом генетического разнообразия. Определено, что наиболее часто занос редких для Российской Федерации генетических вариантов вируса происходил из стран Западной Европы, США, Таиланда и Кубы.

Впервые с помощью анализа молекулярных кластеров показано, что распространение вируса посредством полового пути передачи при гомосексуальных контактах в Российской Федерации происходит чаще, чем официально регистрируется.

Теоретическая и практическая значимость работы.

- Сформулированы подходы по применению молекулярно-генетических и биоинформатических методов анализа с целью более глубокого изучения эпидемического процесса ВИЧ-инфекции.
- Впервые стандартизированный филогенетический анализ применен для расследования случаев инфицирования ВИЧ-1, потенциально связанных с оказанием медицинской помощи.
- Использованные биоинформатические методы анализа геномных и эпидемиологических данных позволили уточнить структуру путей передачи возбудителя, дать краткосрочный прогноз развития эпидемии и усовершенствовать эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией.
- Определены уровень распространенности и структура лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди пациентов без опыта приема антиретровирусных препаратов, что позволит повысить эффективность антиретровирусной терапии и оптимизировать расходы на лечение ВИЧ-инфицированных лиц.
- Разработаны и зарегистрированы в качестве медицинских изделий наборы реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» и «АмплиСенс HIV-Resist-NGS», обеспечивающие возможность секвенирования как фрагментов (pro, rev, int, env), так и всей кодирующей области генома ВИЧ-1, определения уровня распространенности лекарственной устойчивости вируса и осуществления биоинформатического анализа генетических данных.
- Разработано программное обеспечение «АмплиСенс Resist», позволяющее осуществлять редактирование нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1,

обнаружение мутаций лекарственной устойчивости, оценку качества исследования и формирование отчета для врачей-инфекционистов.

- Электронные базы данных RuHIV и EESAHIV, предназначенные для оценки лекарственной устойчивости, адаптированы для применения биоинформатических методов анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и клинико-эпидемиологической информации о пациентах.

Методология и методы исследования.

Методология выполненного исследования построена в соответствии с целью и задачами с учетом анализа отечественной и зарубежной литературы и результатов исследований в области эпидемиологии, вирусологии, молекулярной диагностики и биоинформатики. В работе были использованы общенаучные подходы и набор методов, включающих эпидемиологические (описательно-оценочный и аналитические), молекулярно-биологические, биоинформатические и статистические методы исследования.

Все работы с использованием молекулярно-биологических методов исследования проводились в лаборатории диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Для проведения части работ с использованием биоинформатических методов анализа привлекались сотрудники других лабораторий ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, а также сотрудники института проблем передачи информации имени А. А. Харкевича РАН.

Полученные результаты систематизированы и изложены в основных главах собственных исследований. Сформулированы выводы, даны практические рекомендации и указаны перспективы дальнейшей разработки темы.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Существующая система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией не включает все возможности биоинформатических методов анализа и не позволяет осуществлять эффективный мониторинг ЛУ ВИЧ-1, а также использовать биоинформатический анализ геномных вирусных данных для анализа передачи вируса, выявления завозных случаев инфекции, определения границ очагов, уточнения структуры путей передачи возбудителя и формирования противоэпидемических мероприятий.
2. Разработанные наборы реагентов и базы данных устойчивости вируса к АРВ препаратам позволяют получать, собирать и анализировать нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 и сопутствующую информацию о ВИЧ-инфицированных пациентах с помощью биоинформатических методов.
3. Оценка генетического сходства нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от пациентов, вовлеченных в эпидемические очаги, позволяет определить приблизительный период инфицирования и повышает достоверность результатов филогенетического анализа.
4. Анализ информации, загруженной в национальную базу данных резистентности ВИЧ к АРВ препаратам, позволяет эффективно проводить мониторинг ЛУ ВИЧ-1 среди пациентов без опыта АРВ-терапии, осуществлять генетическую характеристику циркулирующих вариантов ВИЧ-1 и выявлять завозные случаи инфекции.
5. Анализ молекулярных кластеров нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 позволяет определять особенности развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции, в том числе уточнять пути передачи и выявлять групповые очаги заболевания.
6. Совершенствование системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ с помощью биоинформатического анализа геномных данных ВИЧ-1 позволит повысить качество эпидемиологической диагностики этой инфекции, своевременность и эффективность противоэпидемических мероприятий в очагах ВИЧ-инфекции.

Личный вклад автора.

Автором лично разработан план и дизайн исследования, проведен анализ публикаций и нормативных документов по теме, сформулированы цель и задачи работы. Автором разработаны и валидированы наборы реагентов для определения нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, подготовлена техническая документация. Автор непосредственно участвовал в разработке концепции и структуры электронных баз данных, а также их валидации; проводил секвенирование фрагментов генома ВИЧ-1 в части клинических образцов. Автором организован сбор клинического материала и клинико-эпидемиологической информации о пациентах, лично применены и сравнены между собой биоинформатические программы, проведен анализ результатов исследования и их статистическая обработка. Автором сформулированы выводы и разработаны рекомендации, подготовлены публикации результатов исследований.

Внедрения в практику.

В результате исследований были разработаны и зарегистрированы медицинские изделия, программы для ЭВМ и электронные базы данных, разработаны МР и МУ, внесены дополнения в СанПиН. Также материалы исследований внедрены в работу референс-центра по мониторингу за ВИЧ и ВИЧ-ассоциированными инфекциями и включены в циклы повышения квалификации лабораторных специалистов:

- Разработаны:
 - МР 3.1.5.0075/1-13. 3.1.5. «Эпидемиология. Профилактика инфекционных болезней. ВИЧ-инфекции. Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам. Методические рекомендации» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 20.08.2013),

- МУ 3.1.3342-16 «3.1. Эпидемиология. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией. Методические указания» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 26.02.2016),
- МР 3.1.0366-25 «Использование генотипирования и филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции и гепатита С» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 19 февраля 2025 г.),
- Добавлены разделы о необходимости сбора генетических данных (пункт 668) и применении филогенетического анализа (пункт 615) в СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 года N 4),
- Разработаны проекты:
 - МР «Мониторинг за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам, и лабораторные методы выявления маркеров генетической устойчивости к вирусу иммунодефицита человека» (2025 г.),
 - МР «Применение молекулярно-биологических и биоинформатических методов в рамках эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией» (2026 г.),
- Разработаны и зарегистрированы в качестве медицинских изделий:
 - набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (РУ № ФСР 2008/02414 от 11 апреля 2012 года) для выявления мутаций ЛУ ВИЧ-1 в генах протеазы, обратной транскриптазы, интегразы, а также определения тропизма ВИЧ-1 методом классического секвенирования,
 - набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS» (РУ № РЗН 2018/6940 от 16 марта 2018 года) для выявления мутаций ЛУ ВИЧ-1 в генах протеазы, обратной транскриптазы, интегразы, определения тропизма

ВИЧ-1, а также определения всей кодирующей области генома вируса методом массового параллельного секвенирования,

- Разработаны:
 - программа для ЭВМ «АмплиСенс Resist» (свидетельство о государственной регистрации № 2020610175 от 10 января 2020 г.),
 - программа для ЭВМ «Российская система агрегирования информации об устойчивости ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам «RuHIV» (свидетельство о государственной регистрации № 2024617383 от 01 апреля 2024 г.),
 - программа для ЭВМ «Система агрегирования информации об устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам «ЕЕСАНIV» (свидетельство о государственной регистрации № 2023615805 от 20 марта 2023 г.),
- Получены свидетельства о государственной регистрации:
 - базы данных № 2020620803 «База данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам» от 19 мая 2020 г.,
 - базы данных № 2023620937 «База данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам в странах Восточной Европы и Центральной Азии» от 21 марта 2023 г.
- Результаты исследования внедрены в работу референс-центра по мониторингу за ВИЧ и ВИЧ-ассоциированными инфекциями ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
- Материалы диссертации включены в сертификационные циклы тематического усовершенствования специалистов «ПЦР-диагностика инфекционных заболеваний» и «Методы лабораторной диагностики лекарственной устойчивости ВИЧ и определению тропизма ВИЧ на основе метода секвенирования», проводимых на базе учебного центра ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов исследования подтверждается большим объемом выборки, использованием современных методов исследования, статистической обработкой полученных данных, соблюдением принципов доказательной медицины.

Материалы исследования представлены на региональных, всероссийских и международных совещаниях, конференциях и конгрессах:

- VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика - 2010», Москва, 2010 г.,
- научно-практическая конференция «25 лет борьбы с ВИЧ/СПИД в России», Суздаль, 2010 г.,
- совещание «Совершенствование надзора за эффективностью противоэпидемических мероприятий, осуществляемых в рамках противодействия распространению ВИЧ-инфекции», Суздаль, 2011 г.,
- конференция «Основные проблемы организации и проведения эффективных противоэпидемических мероприятий в группах высокого риска заражения ВИЧ-инфекцией», Суздаль, 2012 г.,
- совещание «Эпидемиологический мониторинг, итоги реализации мероприятий, направленных на профилактику, выявление и лечение ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С в рамках приоритетного национального проекта», Суздаль, 2013 г.,
- совещание «Предупреждение распространения ВИЧ в ЦФО», Суздаль, 2013 г.,
- научно-практическая конференция с международным участием «Байкальская неделя противодействия ВИЧ-инфекции 2013: взгляд в будущее», Иркутск, 2013 г.,
- совещание «Выявление источников ВИЧ-инфекции и организация противоэпидемических мероприятий», Суздаль, 2013 г.,

- VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2014», Москва, 2014 г.,
- Четвертая Конференция по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии, Москва, 2014 г.,
- совещание «Эпидемиологический надзор за распространением ВИЧ и разработка комплексных подходов к противоэпидемическим мероприятиям, 25 лет системы противодействия ВИЧ/СПИД в России», Суздаль, 2014 г.,
- XX Всероссийская юбилейная научно-практическая конференция «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России», Москва, 2015 г.,
- VIII ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 2016 г.,
- совещание «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией. Профилактика ВИЧ-инфекции», Суздаль, 2017 г.,
- IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017», Москва, 2017 г.,
- III Межведомственная научно-практическая конференция «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика», Москва, 2017 г.,
- III Российский конгресс лабораторной медицины, Москва, 2017 г.,
- Ежегодный конгресс с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2017)», Москва, 2017 г.,
- XI съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение

эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», Москва, 2017 г.,

- VI Международная конференция по ВИЧ/СПИДу в Восточной Европе и Центральной Азии, Москва, 2018 г.,
- Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018», Минск, Республика Беларусь, 2018 г.,
- III Санкт-Петербургский форум по ВИЧ-инфекции с международным участием, Санкт-Петербург, 2018 г.,
- Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики», Екатеринбург, 2018 г.,
- совещание «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией и профилактика ВИЧ В Российской Федерации», Суздаль, 2018 г.,
- IV Санкт-Петербургский форум по ВИЧ-инфекции с международным участием, Санкт-Петербург, 2019 г.,
- Международная конференция «Эпидемиологическое благополучие», Москва, 2021 г.,
- Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2022», 2022 г.,
- XII съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов и XIII съезд гигиенистов, токсикологов и санитарных врачей, Москва, 2022 г.,
- Международная научно-практическая конференция «Современные подходы к вопросам эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями в группе природно-очаговых и особо опасных заболеваний», Барнаул, 2023 г.,
- Юбилейная конференция «Эпидемиология и инфекционные болезни: связь времен и поколений», Москва, 2023 г.,

- Научно-практическая конференция «Эпидемиологическое благополучие и предупреждение распространения ВИЧ и сопутствующих инфекций», Суздаль, 2023 г.
- Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Проблемы эпидемиологии, терапии и лабораторной диагностики инфекционных заболеваний – 2024», Москва, 2024 г.

В окончательном виде диссертационная работа была представлена и рекомендована к защите на заседании апробационного совета ФБУН «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора от 25 февраля 2025 года, протокол № 95.

Соответствие паспорту специальности.

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.2.2. Эпидемиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, а именно пунктам 2, 4 и 5 паспорта специальности эпидемиология.

Публикации.

Результаты по теме диссертационной работы опубликованы в 36 печатных работах, в том числе 18 в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для публикации основных научных результатов диссертации по специальности «Эпидемиология».

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 277 страницах машинописного текста, состоит из введения, 10 глав (обзора литературы; главы, описывающей материалы и методы исследования; 8 глав собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка

сокращений, терминов и определений, списка литературы и 8 приложений. Список литературы включает 250 источников, в том числе 65 отечественных и 185 зарубежных. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 28 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в мире и в Российской Федерации

Первый случай инфицирования человека вирусом иммунодефицита 1 типа (ВИЧ-1) в мире был зарегистрирован центром по контролю и профилактике заболеваний в Соединенных Штатах Америки в 1981-м году [87]. В течение этого и следующих нескольких лет случаи заболевания начали регистрироваться в других странах, в частности, в 1981-м году – в Великобритании [199], в 1982-м – в Италии [206], Великобритании [122], Бразилии, Канаде, Австралии [194], в 1983-м – в Португалии, в 1985-м – в Китае. В СССР вирус был занесен позже, первый случай заболевания был обнаружен в 1985-м году у Африканского гражданина [36]. На протяжении нескольких лет в нашей стране случаи ВИЧ-инфекции регистрировались исключительно среди иностранцев, и только в 1987-м году диагноз был впервые поставлен гражданину СССР [36, 37].

Сам вирус иммунодефицита человека впервые был выделен в 1983-м году Робертом Галло [120] и Люком Монтанье [170], однако рядом исследований было показано, что вирус присутствовал в Америке уже в 1970-х годах [240]. А самые ранние прямые доказательства присутствия ВИЧ-1 у людей были обнаружены ретроспективно в образцах сыворотки и образце биопсии лимфатического узла, собранных в 1959-м и 1960-м годах, соответственно, в Киншасе (Демократическая Республика Конго) [74, 105].

Уже к 1990-му году в большинстве стран мира регистрировались случаи заражения ВИЧ-1, а общее количество инфицированных лиц превысило 8 миллионов человек [237]. Количество новых случаев инфекции росло до середины 90-х годов прошлого века, однако благодаря развитию эпидемиологического надзора, внедрению профилактических и противоэпидемических мероприятий, в частности широкомасштабному применению АРВ-терапии, в течение последующих 30 лет глобально

регистрируется снижение заболеваемости. В то же время эпидемический процесс ВИЧ-инфекции развивается неравномерно в различных регионах и группах, вследствие особенностей передачи вируса, а также клинических проявлений болезни.

В СССР и затем в Российской Федерации развитие эпидемии ВИЧ-инфекции началось позже по сравнению с другими развитыми странами, и до середины 90-х годов было значительно ограничено. К концу 1995 г. общее количество выявленных ВИЧ-инфицированных в стране было менее 1500 человек [38]. Однако затем ситуация начала резко меняться, вследствие попадания ВИЧ-1 в группу лиц, парентерально употребляющих наркотики. На рисунке 1 представлен анализ динамики и структуры заболеваемости ВИЧ-инфекцией в РФ с 1997 по 2022 гг. на основе данных, представленных в информационных бюллетенях «ВИЧ-инфекция», публикуемых СНИОП СПИД ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (<http://www.hivrussia.info/elektronnye-versii-informatsionnyh-byulletenij/>).

Как видно, за указанный период эпидемия ВИЧ-инфекции характеризуется двумя подъемами заболеваемости. Первый, зарегистрированный в 2000-2002 гг., был обусловлен резким увеличением количества новых случаев инфекции среди лиц, парентерально употребляющих психоактивные вещества [39]. Наиболее пораженными федеральными округами (ФО) в тот период времени являлись Уральский, Северо-Западный и Приволжский. Результаты различных исследований показывали, что именно по территориям этих округов пролегал трафик наркотических средств, и регистрировалось наибольшее потребление наркотиков населением [5, 16].

Второй подъем заболеваемости ВИЧ-инфекции в РФ был менее выраженным, однако более продолжительным по времени, и регистрировался в период с 2011 по 2017 гг. Он был характерен только для ряда ФО и наиболее сильно проявился в Уральском и Сибирском ФО. Начиная с 2017 года, а в некоторых ФО с 2015-го, регистрируется снижение уровня заболеваемости практически во всех регионах.

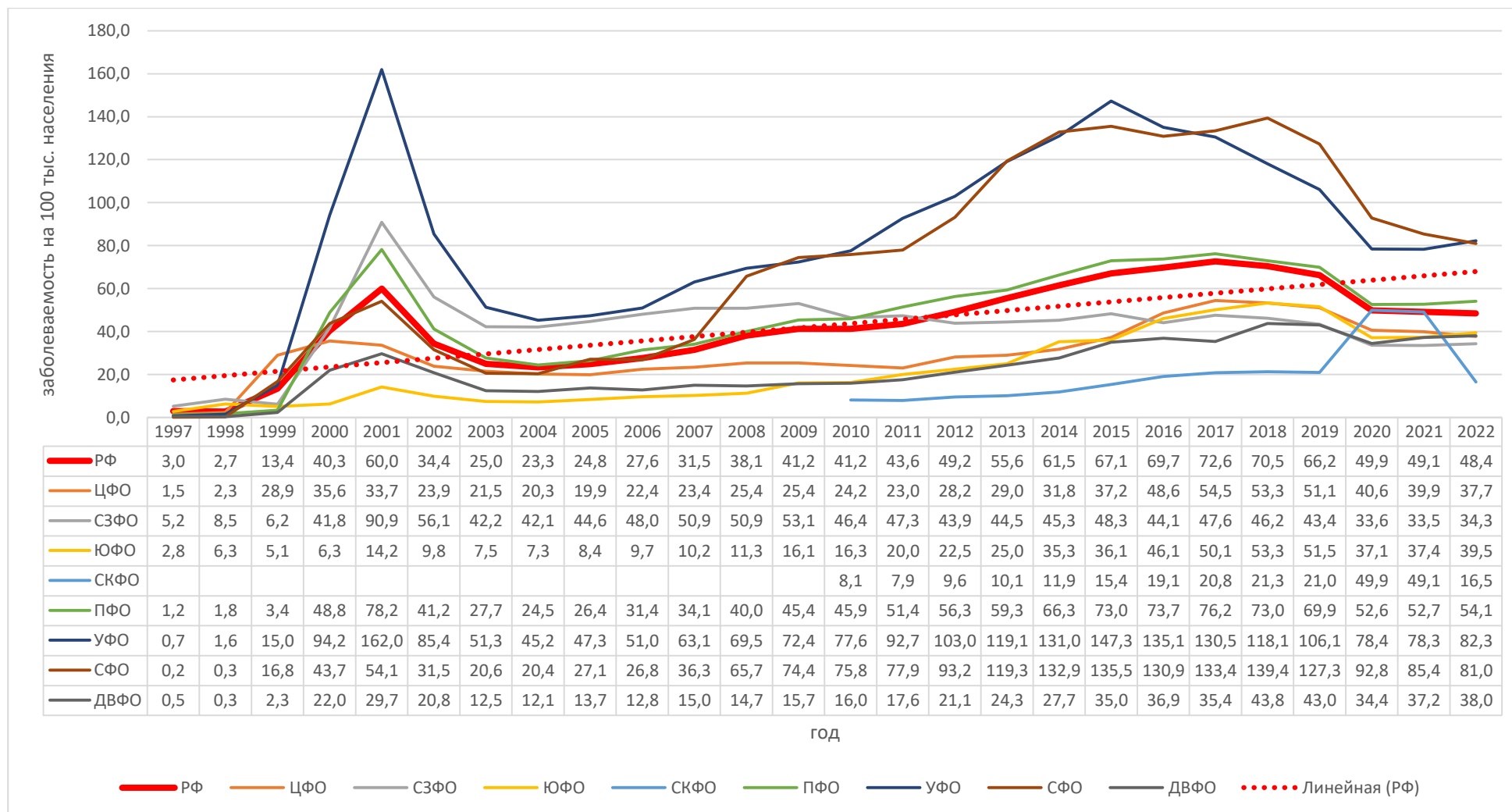


Рисунок 1 – Динамика заболеваемости ВИЧ-инфекцией на территории Российской Федерации с 1997 по 2022 гг.

Пунктирной линией обозначена линия тренда, рассчитанная для общероссийской заболеваемости

В настоящее время Уральский и Сибирский ФО являются наиболее пораженными регионами с заболеваемостью, почти двукратно (82,3 и 81,0 против 48,4 случаев на 100 тысяч населения соответственно) превышающей общероссийский показатель. В остальных шести ФО заболеваемость находится на уровне или ниже общероссийского показателя. Отдельно необходимо отметить Северо-Западный ФО, в котором второй подъем заболеваемости, характерный для других регионов, отсутствовал, а с 2009-го года непрерывно регистрировалась тенденция к снижению. В 2022-м году в СЗФО была зарегистрирована заболеваемость на уровне 34,3 случаев на 100 тысяч населения, что почти в 1,5 раза ниже общероссийского.

Одной из особенностей ВИЧ-инфекции является ее распространение преимущественно среди определенных (уязвимых) групп населения. В связи с этим общая заболеваемость значительно отличается от заболеваемости среди этих групп, к которым относятся лица, употребляющие психоактивные вещества; мужчины, имеющие секс с мужчинами; лица с подозрением или подтвержденным диагнозом инфекций, передаваемых половым путем (ИППП); лица, находящиеся в местах лишения свободы и коммерческие секс-работники. По этой причине в рамках осуществления эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией пристальное внимание уделяется регистрации такого показателя, как выявляемость, который рассчитывается, как отношение числа лиц из групп населения, у которых впервые была выявлена ВИЧ-инфекция, к численности протестированных на антитела к ВИЧ в данной группе населения в это же время на 100 тысяч [27].

Анализ данных о выявляемости ВИЧ-инфекции с 1997 по 2022 гг., представленных в информационных бюллетенях «ВИЧ-инфекция» (<http://www.hivrussia.info/elektronnye-versii-informatsionnyh-byulletenij/>), показал, что контингентами, в которых ВИЧ-инфекция выявлялась значимо чаще чем в среднем у граждан РФ на протяжении всего исследуемого периода, являлись лица, употребляющие психоактивные вещества, лица, находящиеся в местах лишения свободы, и обследованные при проведении эпидемиологического

расследования. А группой с наиболее настораживающей динамикой выявляемости ВИЧ-инфекции является уязвимая группа мужчин, имеющих секс с мужчинами (рисунок 2).



Рисунок 2 – Выявляемость ВИЧ-инфекции в РФ в наиболее уязвимых контингентах с 1997 по 2022 гг.

Среди лиц, употребляющих психоактивные вещества, а также с подозрением или подтвержденным диагнозом ИППП выявляемость коррелировала с динамикой общероссийской заболеваемости. Однако для лиц, находящихся в местах лишения свободы, и обследованных при проведении эпидемиологического расследования, корреляция была гораздо более слабой. Наиболее значительно от других групп отличался контингент мужчин, имеющих секс с мужчинами. В период с 1997 по 2015 гг. выявляемость в этой группе непрерывно росла значительными темпами (с 22,4 до 15847,7 серопозитивных

случаев на 100 тысяч протестированных образцов). И только с 2015 по 2022 гг. начала регистрироваться некоторая стабилизация. В настоящее время этот контингент является наиболее пораженным, где выявляется от 15 до 20 ВИЧ-инфицированных человек на каждые 100 протестированных.

При этом за последние 20 лет происходило снижение доли уязвимых контингентов среди всех лиц, подвергающихся тестированию (рисунок 3).

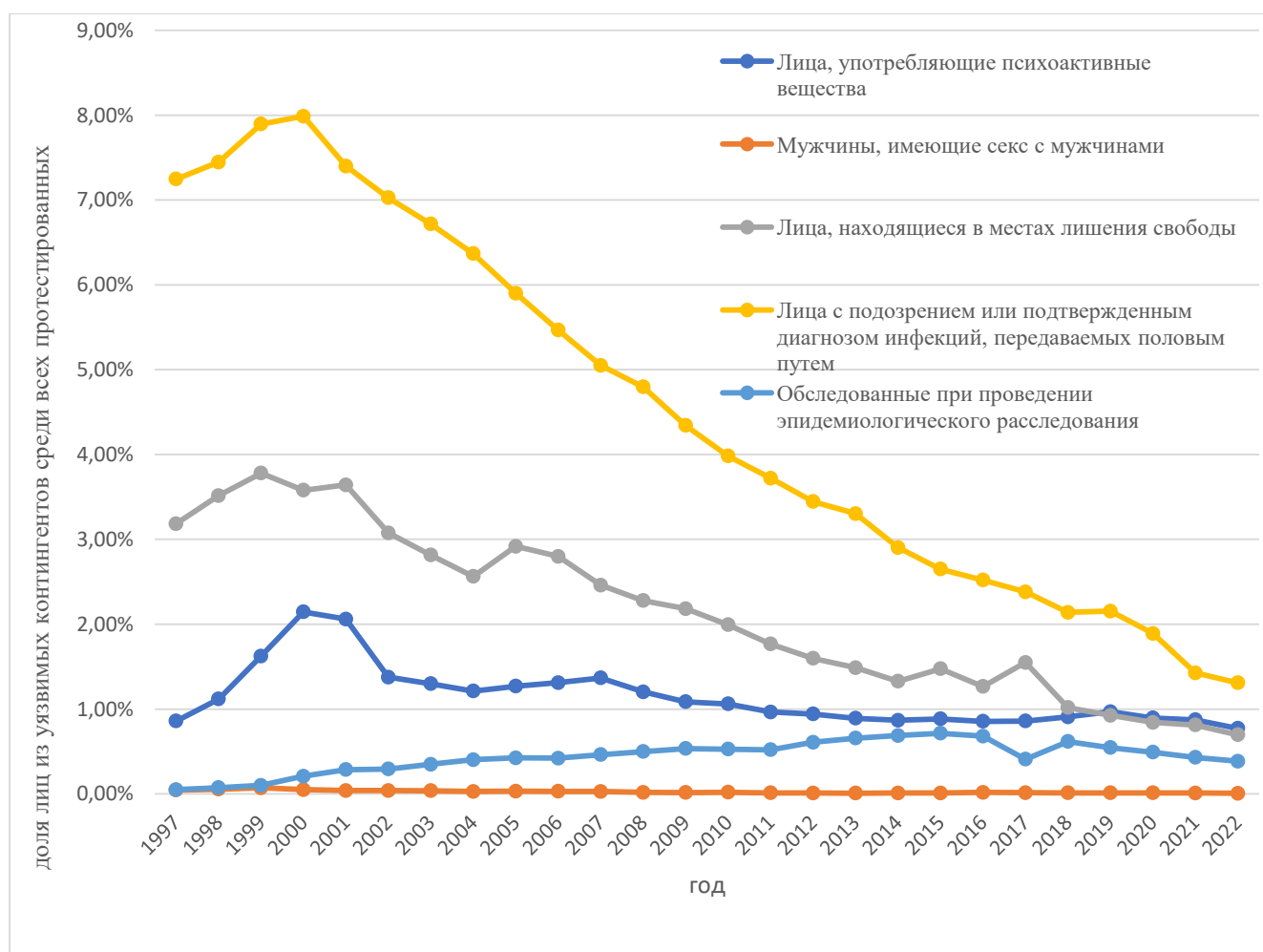


Рисунок 3 – Доля уязвимых контингентов среди всех протестированных лиц в период с 1997 по 2022 гг.

Наиболее значительно это снижение было выражено для мужчин, имеющих секс с мужчинами (в 9,9 раза с 0,072% в 1999 г. до 0,007% в 2022 г.), лиц с подозрением или подтвержденным диагнозом ИППП (в 6,1 раза с 7,99% в 2000 г. до 1,31% в 2022 г.), а также для лиц, находящихся в местах лишения свободы (в

5,4 раза с 3,78% в 1999 г. до 0,7% в 2022 г.). В несколько меньшей степени снижение было выражено для лиц, употребляющих психоактивные вещества (в 2,8 раза с 2,14% в 2000 г. до 0,77% в 2022 г.). Только для контингента обследованных при проведении эпидемиологического расследования за исследуемый период доля оставалась стабильной без выраженной динамики. В течение всего исследуемого периода наиболее многочисленными группами тестируемых (суммарно от 51,7% в 1997 г. до 68,6% в 2022 г.) являлись контингенты «прочие» и «обследованные по клиническим показаниям».

Необходимо отметить, что для всех уязвимых групп, кроме лиц, употребляющих психоактивные вещества, снижение происходило не только в виде уменьшения доли среди всех обследованных, но и в абсолютных числах. Так, в 1999-м году было протестировано 15895 мужчин, имеющих секс с мужчинами, а в 2022-м – 3292. Лиц с подозрением или подтвержденным диагнозом ИППП в 2000-м году было протестировано 1953106, а в 2022-м – 589869 человек. Лица, находящиеся в местах лишения свободы, в 1999-м году были протестированы в количестве 833071, а в 2022-м – 313355 человек [11, 12, 14].

1.2. Генетическая изменчивость и лекарственная устойчивость ВИЧ-1

Генетическая изменчивость вируса иммунодефицита чрезвычайно высока, является его важнейшей характеристикой и обусловлена рядом причин. Первой причиной является то, что геном ВИЧ-1 представлен рибонуклеиновой кислотой (РНК). В процессе вирусной репликации происходит синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) на матрице РНК, который осуществляется ферментом РНК-зависимая-ДНК-полимераза (обратная транскриптаза, ревертаза). Данный фермент не имеет функции 3'-5'-экзонуклеазной активности, в связи с чем во время синтеза цепи в ДНК копию (кДНК) периодически (приблизительно 3 на 100 тысяч присоединенных нуклеотидов) вставляются ошибочные нуклеотиды [160, 224]. Дополнительно

увеличивает вариабельность работа факторов клеток человека АРОВЕС3G [56], выполняющих противовирусную роль в организме. Поскольку размер генома ВИЧ-1 составляет чуть менее 10 000 нуклеотидов, каждая появляющаяся вирусная частица генетически отличается от предыдущей, что влечет за собой изменения в работе ее белков [94].

Второй причиной является высокая репликативная активность ВИЧ-1, в результате которой в организме больного при отсутствии лечения в течение одного дня может появляться до 10^{10} новых вирусных частиц [136]. В среднем за сутки в макроорганизме образуется и разрушается до 1 миллиарда вирусных частиц, обеспечивая таким образом быструю сменяемость поколений вируса.

Наконец, третьей важнейшей причиной разнообразия ВИЧ-1 является хроническое течение болезни. В отличие от других высоковариабельных РНК-содержащих вирусов, таких, как, например, вирус гриппа, вирус иммунодефицита после установления системной инфекции присутствует в организме человека всю его оставшуюся жизнь. В связи с этим продолжительность его вирусной эволюции в отличие от острых вирусных инфекций протекает гораздо более значительна. Показано, что у ВИЧ-инфицированного человека разнообразие генетических вариантов сравнимо с глобальным разнообразием вируса гриппа за целый год его распространения [117]. Было подсчитано, что в среднем скорость изменения генома в области генов протеазы/ревертазы ВИЧ-1 у пациента в случае, если тот не принимает АРВ препараты, составляет 0,1% генома в год [86].

Генетическая вариабельность (генетическое разнообразие) в настоящее время хорошо отражена в современной систематике вируса иммунодефицита. ВИЧ классифицируется на два типа (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), в свою очередь значительно более широко распространенный ВИЧ 1-го типа состоит из четырех групп: М (main), N (non-M, non-O), О (outlier) и Р (putative) [68, 224]. Только группа М распространена повсеместно. Вирусы этой группы вызывают подавляющее большинство новых случаев инфекции в мире [132]. В настоящее время она включает в себя 9 субтипов, обозначаемых буквами латинского алфавита А, В, С, D, F, G, H, J, K [130] и более 130 циркулирующих

рекомбинантных форм (circulating recombinant form, CRF). Наиболее обширные и гетерогенные субтипы в свою очередь подразделяются на суб-субтипы, например, субтип А включает в себя шесть суб-субтипов: А1-А6 [179]. В настоящее время наиболее широко распространенным субтипом ВИЧ-1 в мире является субтип С (приблизительно 47% всех случаев инфекции), за которым следуют субтипы В ($\approx 12\%$ случаев) и А ($\approx 10\%$ случаев). Доминирование субтипа С ВИЧ-1 обусловлено прежде всего его распространенностью в странах Южной Африки, где пораженность чрезвычайно велика. В то же время субтип В превалирует в странах Западной Европы и Северной Америки [139] с высоким уровнем дохода, а субтип А в странах бывшего СССР, в том числе в Российской Федерации [29].

Высокая генетическая изменчивость вируса оказывает значительное негативное влияние на борьбу человечества с эпидемией ВИЧ-инфекции. Несмотря на многочисленные усилия до настоящего времени не разработано эффективных вакцин [97, 173], существующие АРВ препараты не позволяют добиться полного уничтожения вируса в организме инфицированного [151], а наборы для диагностики *in vitro* периодически показывают сниженную чувствительность в отношении выявления вируса [83, 212, 216].

Еще одним важнейшим следствием изменчивости ВИЧ-1 является его возможность быстро приобретать лекарственную устойчивость. Под устойчивостью вируса подразумевается его способность продолжать реплицироваться в организме, несмотря на присутствие в крови стандартных концентраций АРВ препаратов. Впервые резистентность ВИЧ-1 была обнаружена вскоре после коммерциализации первого АРВ препарата [157].

Подавляющее большинство препаратов, предназначенных для лечения ВИЧ-инфекции, останавливают размножение вируса в клетке путем блокирования работы трех его основных ферментов: обратной транскриптазы, протеазы и интегразы. Значительно реже применяются препараты, блокирующие проникновение вируса в клетку, такие как CCR5-антагонисты и ингибиторы фузии [130]. На сегодняшний день для лечения ВИЧ-инфекции разработано и зарегистрировано более 30 различных препаратов, относящихся к этим 5 классам,

которые обычно применяются в различных комбинациях [215]. Часто еще до этапа регистрации нового лекарственного средства становится известно о механизмах, посредством которых вирусу удастся становиться к нему лекарственно-устойчивым. После начала широкомасштабного применения эти данные обычно дополняются.

Вирус приобретает устойчивость к тому или иному препарату в результате изменений нуклеотидной последовательности своего генома, которые в свою очередь влекут за собой изменения в аминокислотной последовательности, таким образом изменяя структуру и свойства вирусного белка. Для появления ЛУ к некоторым АРВ препаратам с низким генетическим барьером достаточно изменения в единственном нуклеотиде генома вируса. К препаратам с высоким генетическим барьером, вирус должен приобрести целый ряд изменений [156]. Однако важно отметить, что резистентность ВИЧ-1 может развиваться ко всем известным на сегодняшний день АРВ препаратам.

ВИЧ-инфицированных с резистентными вариантами вируса можно разделить на две категории:

- пациенты, у которых вирус приобрел лекарственную устойчивость во время приема ими АРВ препаратов,
- люди, заразившиеся резистентным вариантом ВИЧ-1.

У первой категории лекарственная устойчивость развивается в результате неполного подавления вирусной репликации в организме [160]. Неполное подавление репликации может быть следствием ряда совершенно различных факторов. ВОЗ определяет 4 категории причин, вызывающих развитие резистентности вируса: (1) зависящие от свойств и особенностей приема АРВ препаратов, (2) зависящие от биологии вируса, (3) зависящие от поведения ВИЧ-инфицированного лица и (4) зависящие от организации лечения. Во всех таких случаях ЛУ называют приобретенной, поскольку она появляется в процессе применения АРВ-терапии [31, 233].

В случае возникновения ЛУ вирус, несмотря на продолжающийся прием АРВ препаратов пациентом, эффективно размножается в организме, вирусная нагрузка у больного возрастает, и повышается вероятность дальнейшей передачи возбудителя. В этом случае инфицирование может произойти лекарственно-устойчивым вариантом вируса. Данный тип резистентности называется первичной (передаваемой) ЛУ ВИЧ-1 [6].

Негативное влияние лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на развитие эпидемии велико и возрастает пропорционально увеличению количества ВИЧ-инфицированных, находящихся на терапии. Согласно целям, заявленным ЮНЕЙДС в декабре 2020-го года (стратегия «95-95-95»), для подавления развития эпидемии необходимо достичь 95%-го охвата пациентов АРВ-терапией, причем 95%, среди получающих лечение, должны достигнуть недетектируемого уровня вирусной нагрузки [69]. Необходимо учитывать, что согласно всем существующим стандартам лечения, АРВ-терапия является пожизненной.

Увеличение количества людей, принимающих АРВ-препараты, является предпосылкой к непрерывному появлению лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ и увеличению распространенности лекарственной устойчивости в целом. Первоначальная тенденция роста ЛУ регистрировалась в 1990-х и начале 2000-х годов в тех регионах, где терапия стала широко доступна. Дополнительные причины этого подъема были связаны с тем, что сейчас формулируется как неоптимальная терапия — ограниченное количество доступных классов препаратов, большое количество ежедневно принимаемых таблеток, токсические эффекты, позднее начало терапии [230]. С тех пор количество и безопасность препаратов значительно выросли, появилась индивидуальная терапия, в том числе с применением тестов на резистентность, и упрощенные режимы. Эти изменения привели в некоторых странах к снижению ЛУ [110], либо к ее стабилизации [236]. Однако в то же время, наблюдается рост доли новых случаев инфекции, вызванных ЛУ вариантами ВИЧ-1, в развивающихся странах, где бремя инфекции наиболее высоко, а ресурсы ограничены [127, 148].

Повышение уровня распространенности ЛУ ВИЧ-1 негативно влияет на различные аспекты борьбы с ВИЧ-инфекцией. С клинической точки зрения присутствие или появление у ВИЧ-инфицированного пациента ЛУ варианта вируса снижает эффективность АРВ-терапии, ухудшает состояние и укорачивает время жизни больного. С эпидемиологической точки зрения повышение вирусной нагрузки у пациента, столкнувшегося с вирусологическим неуспехом вследствие ЛУ, увеличивает количество новых случаев инфекции. С точки зрения организации здравоохранения лекарственная устойчивость ВИЧ-1 требует увеличения финансирования с целью закупок диагностических тестов и более дорогих АРВ-препаратов. В целом, рост резистентности препятствует достижению поставленной ВОЗ цели по искоренению СПИДа к 2030-му году [245].

В связи с этим ВОЗ разрабатывает и регулярно обновляет руководства по надзору за резистентностью ВИЧ-1 у различных категорий ВИЧ-инфицированных пациентов [248], публикует отчеты о проведенных исследованиях по данной теме [247], создала и курирует руководящую группу по изучению резистентности [249], а также способствует развитию сети аккредитованных лабораторий, занимающихся мониторингом ЛУ ВИЧ-1 [250]. В Российской Федерации также существуют нормативно-методические документы (МР и МУ), упомянутые ранее, которые посвящены мониторингу ЛУ, и описывающие основные принципы надзора за распространением резистентных вариантов вируса в стране [26, 28].

В России, несмотря на значительное число ВИЧ-инфицированных людей, количество исследований ЛУ ВИЧ-1 сильно уступает таковому, выполняющимся в развитых странах. Причем в подавляющем большинстве случаев они выполняются с клиническими целями по назначению врача в случае возникновения неэффективности проводимой АРВ-терапии. Эпидемиологические исследования и работы по изучению генетического разнообразия ВИЧ-1, связанные с определением нуклеотидных последовательностей вируса, практически не проводятся. Согласно аналитическому обзору, в котором были проанализированы работы по теме ЛУ ВИЧ-1, опубликованные в мире в период с

01.01.2010 по 31.12.2019, среди 934 исследований, всего 19 (2,0%) из них относились к региону бывшего СССР [201].

Можно выделить две группы коллективов, осуществляющих секвенирование ВИЧ-1. Первая, более многочисленная группа, включает центры по профилактике и борьбе со СПИДом, обязанности которых лежат в области эпидемиологии, диагностики и лечения ВИЧ-инфицированных. Ко второй малочисленной группе относятся коллективы лабораторий научных институтов, занимающихся изучением ВИЧ-1 в области вирусологии, эпидемиологии и молекулярной биологии. Несмотря на то, что самые ранние исследования, связанные с секвенированием ВИЧ-1 в России [165], появились уже в первой половине 90-х годов XX века, только через 10 лет стали появляться работы, посвященные анализу ЛУ ВИЧ-1 в стране [58]. И только еще спустя пять лет такие работы стали публиковаться более или менее регулярно.

Среди наиболее репрезентативных исследований, проведенных среди пациентов без опыта приема АРВ препаратов, можно отметить следующие работы. Носик М.Н. с коллегами [3] провела анализ 527 образцов, собранных в Москве и Московской области в 2008-2017 годах, и получила распространенность ЛУ ВИЧ-1 к препаратам классов НИОТ/ННИОТ/ИП в 2,0%.

Кириченко А.А. с коллегами в рамках общероссийских исследований получила распространенность в 5,3% к препаратам классов НИОТ/ННИОТ/ИП (размер выборки 1560 образцов, период забора крови 1998-2017 годы) [60] и 2,7% к препаратам класса ИИ (размер выборки 408 образцов, период забора крови 2007-2019 годы) [123].

Антонова А.А. в ходе анализа образцов, собранных в 2014-2019 годах от 323 наивных пациентов, проживающих на юге России, оценила распространенность в 4,6% [10].

Нужно отметить, что исследования ЛУ ВИЧ-1 среди пациентов без опыта приема АРВ препаратов проводились в разные периоды времени, на разных территориях, а при анализе распространенности авторы использовали различные подходы. В ряде работ изучалась распространенность ЛУ ВИЧ-1 путем выявления

мутаций из списка «надзорных» (surveillance drug resistance mutations), рекомендуемых ВОЗ. В других исследованиях авторы выявляли мутации, которые вызывают ЛУ ВИЧ-1 к различным АРВ препаратам. В некоторых работах авторы дополнительно учитывали мутации полиморфизма, например, мутацию A62V в гене обратной транскриптазы. К сожалению, эти различия в оценке распространенности резистентности ВИЧ-1 значительно осложняют объединение данных и сопоставление результатов исследований.

В связи с тем, что в большинстве случаев в России секвенирование ВИЧ-1 проводится с клинической целью, большинство публикаций посвящено оценке ЛУ вируса среди пациентов с неэффективной АРТ [22, 30, 67, 102]. Такого рода работы имеют больше клиническое, чем научное значение, поскольку обычно не раскрывают информацию о нуклеотидных последовательностях вируса и поэтому их результаты не могут быть впоследствии использованы в других исследованиях.

Суммируя результаты опубликованных исследований, можно сделать вывод, что к 2021-му году в большинстве федеральных округов Российской Федерации распространенность ЛУ ВИЧ-1 варьировала от 5% до 10%. Такой уровень считается ВОЗ умеренным [246] и не требующим каких-либо изменений в рекомендациях по назначению АРВ препаратов для лечения ВИЧ-инфекции. Тем не менее в последние 10 лет применения АРВ регистрируется достоверный рост ЛУ ВИЧ-1 ко всем основным классам препаратов на всех территориях страны. А с учетом непрерывного увеличения в последние годы количества пациентов, принимающих АРВ-терапию [4], существуют предпосылки к дальнейшей распространенности ЛУ.

Прогнозирование дальнейшего распространения лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ-1 является непростой задачей. Общая численность пациентов с ЛУ складывается как из лиц с вирусологическим неуспехом, так и лиц, инфицирующихся резистентными вариантами. Очевидно, что при моделировании будущего распространения ЛУ должна учитываться динамика эпидемии, то есть количество пациентов, получающих лечение, и количество новых случаев инфекции. Например, существует большая разница между уровнем

распространенности передаваемой ЛУ в 15% с заболеваемостью в 2%, и уровнем распространенности передаваемой ЛУ в 5% и заболеваемостью в 6%. Примером этого является работа по моделированию, выполненная Камбиано [193], в которой рассматривается вероятное влияние широко распространенной стратегии «тестируй и лечи» на примере Южной Африки. Основываясь на распространенности передаваемой ЛУ ВИЧ-1 менее 10% в 2012 году, их модель определила, что за 20-летний период стратегии «тестируй и лечи» общая заболеваемость снизится на 50%. Однако, к тому времени до 30% новых случаев инфекции будут вызваны лекарственно-устойчивыми вариантами вируса. По этой причине программы надзора за распространенностью ЛУ ВИЧ-1 должны учитывать клинико-эпидемиологический контекст эпидемии изучаемого региона.

Подводя итог, можно утверждать, что изучение генетического разнообразия, структуры и уровня распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1 необходимо проводить на постоянной основе. Работы по секвенированию вируса должны осуществляться:

- с клиническими целями в случае возникновения вирусологического неуспеха у пациента, принимающего АРВ-терапию,
- с эпидемиологическими целями для надзора за распространением ЛУ ВИЧ-1 в стране,
- с научными целями, в рамках которых выявляются и охарактеризовываются новые генетические варианты ВИЧ-1.

Дополнительной причиной регулярного секвенирования вируса ВИЧ-1, которая будет подробно описана ниже, является применение биоинформатического анализа геномных данных вируса в качестве дополнительного инструмента эпидемиологического надзора.

1.3. Лабораторные подходы и методики секвенирования ВИЧ-1

Секвенирование, то есть определение нуклеотидной последовательности ДНК, произвело революцию в целом ряде областей науки. Прежде всего

значительно развитие получили вирусология, микробиология, генетика, молекулярная биология. Однако косвенно технология секвенирования стала оказывать влияние на многие другие научные направления. В настоящее время определение нуклеотидных последовательностей генов осуществляется повсеместно в тысячах лабораторий с самыми разными целями.

Фредерик Сенгер своим открытием в 1977-м году, за которое уже в 1980-м году он получил Нобелевскую премию, положил начало широкому распространению метода секвенирования [211]. Его метод определения последовательности расположения нуклеотидов в цепи ДНК с использованием дидезоксинуклеотидтрифосфатов позволил относительно просто и быстро секвенировать фрагменты протяженностью до 1000 пар нуклеотидов. Вскоре были разработаны приборы – секвенаторы, позволяющие осуществлять процесс в автоматическом режиме. На протяжении трех десятков лет этот метод являлся основным в мире. До сих пор в литературе его часто называют «классическим» и «традиционным» секвенированием. Однако в конце XX века начали быстро появляться методы определения нуклеотидных последовательностей, принцип которых был основан на более современных технологиях и приборной базе. Развитие микрофлюидики, биоинформатики и электроники позволило создать приборы, осуществляющие секвенирование в масштабах, на порядки превосходящих возможности классического секвенирования. Это является первой основной чертой, отличающей их от секвенирования по принципу Сенгера. Для сравнения, с помощью секвенатора, работающего на технологии «Сенгеровского» секвенирования за один запуск можно получить информацию максимально о 100 тысячах нуклеотидов. В то же время современные секвенаторы следующего поколения за один запуск секвенируют от 1 до 800 миллиардов нуклеотидов [128], таким образом являясь в миллион раз более производительными.

Другим важным отличием является формат секвенирования. Как уже было описано ранее, ВИЧ-1 является настолько переменчивым, что практически каждая вирусная частица в организме имеет уникальный геном. Это разнообразие влияет на клиническое течение болезни, эффективность АРВ-терапии и важно для

эпидемиологического надзора. При использовании классического метода секвенирования исследователи получают одну нуклеотидную последовательность, которая является суммарным отражением представителей вирусной популяции, присутствующих в организме пациента в доле, превышающей 20% [93]. Современные методы секвенирования за счет значительного большей производительности позволяют секвенировать множество геномов различных вирусных частиц в отдельности. Благодаря этому с их помощью появилась возможность выявлять отдельных представителей вирусной популяции (квазивида) с чувствительностью вплоть до 1% [70], причем осуществлять это в полуколичественном формате [78], что значительно повышает информативность анализа ЛУ ВИЧ-1. Другим важным следствием возможности получения с помощью современных методов секвенирования множества нуклеотидных последовательностей вируса является возможность определения направления передачи возбудителя [209]. Достижения в области биоинформатики позволили разработать программное обеспечение, которое, используя только генетические данные, определяет в эпидемиологической цепи потенциального источника инфекции и реципиента [192].

Новые подходы стали называть «секвенированием следующего поколения» (next generation sequencing, NGS) или «массовым параллельным секвенированием». В настоящее время приборы NGS имеют огромную популярность и большую часть генетических данных получают именно с их помощью. Классическое секвенирование все еще широко используется, но только в небольших лабораториях с ограниченными потребностями.

Первые работы, посвященные изучению генома ВИЧ-1, были опубликованы в 1984 году [126, 174, 221]. В 1985-м несколькими коллективами геном вируса был отсеквенирован полностью [94, 175, 176]. А к 2000-му году публикаций по этой теме было уже больше 3000. К началу 2023-го года в базе данных лаборатории Лос-Аламоса (<http://www.hiv.lanl.gov/>), содержащей самую большую открытую коллекцию геномных данных этого возбудителя, в открытом доступе находилось более 1.000.000 нуклеотидных последовательностей, а количество

публикаций, связанных с получением или анализом генетических данных вируса, превысило 16 тысяч.

Значимость информации о нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1 сложно переоценить. Она используется в большинстве направлений науки, клинических исследованиях, при разработке диагностических тестов, вакцин и лекарственных препаратов. Только благодаря наличию информации о последовательности нуклеотидов в геноме вируса появилась возможность разработки диагностических наборов, базирующихся на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Такие наборы в настоящее время широко используются при выявлении лиц, инфицированных ВИЧ-1, и незаменимы при оказании медицинской помощи ВИЧ-инфицированным пациентам. Направление разработки вакцин против ВИЧ-инфекции также зачастую используют информацию о последовательностях вируса. Разработка антиретровирусных препаратов может осуществляться без генетических данных, однако современные исследования показывают, что препараты имеют могут иметь неодинаковую эффективность в отношении подавления репликации различных генетических вариантов ВИЧ-1 [123].

1.4. Биоинформатические методы в системе эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией

Биоинформатикой называют междисциплинарную область, которая объединяет между собой биологию, генетику, химию, компьютерные науки, математику и статистику. Часто под биоинформатическими методами подразумевают использование компьютерных методов для анализа, хранения и визуализации биологических данных, например, нуклеотидных последовательностей. Биоинформатика появилась относительно недавно, однако значительный прогресс, произошедший в вышеуказанных науках, сделал к настоящему времени ее важной составляющей многочисленных исследований.

Появление резистентности вируса в ответ на прием АРВ препаратов, высокая вирусная изменчивость, пожизненное течение болезни, отсутствие эффективных вакцин, непрерывный рост количества инфицированных, все эти факторы определили востребованность биоинформатических методов в области изучения ВИЧ. С развитием эпидемии ВИЧ-инфекции увеличивалось количество известных нуклеотидных последовательностей вируса, параллельно росли и возможности биоинформатических методов.

В настоящее время можно выделить следующие наиболее актуальные направления, в которых применяются молекулярно-генетические методы и биоинформатический анализ:

- Оценка лекарственной устойчивости ВИЧ-1,
- Расследование очагов инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи,
- Реконструкция истории распространения вируса на изучаемых территориях (филогеография),
- Определение скорости передачи вируса (филодинамика),
- Оценка эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий,
- Предотвращение новых случаев инфекции путем выявления и анализа молекулярных кластеров в реальном времени.

Для решения перечисленных задач биоинформатический анализ может быть применен к любому фрагменту генома ВИЧ-1. Однако наиболее часто в исследованиях используются нуклеотидные последовательности региона *pol* ВИЧ-1 [135], поскольку именно эта область генома вируса наиболее часто подвергается секвенированию с клиническими целями. Следует отметить, что существует целый ряд математических методов анализа, начиная от расчета генетической дистанции [141, 163] и заканчивая построением филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия [186] или с применением байесовских подходов [207]. Разнообразие биоинформатических методов обусловлено различиями в целях работ, размерах анализируемой выборки

(количеством нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1) и сопутствующей клинико-эпидемиологической информацией о пациентах, доступной исследователям.

Лекарственная устойчивость ВИЧ-1.

Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ-1 был первым направлением, где в области ВИЧ-инфекции были применены молекулярные и биоинформатические методы. Уже в конце 80-х годов прошлого века начали появляться работы, описывающие снижение чувствительности препарата ретровир (зидовудин), который стал широко применяться для лечения в 1987-м году [155, 157, 158].

К каждому АРВ препарату, используемому в настоящее время в лечении ВИЧ-инфекции, возможно возникновение мутаций лекарственной устойчивости, причем к большинству таких мутаций существует несколько. Вместе с увеличением количества одобренных для применения АРВ препаратов росла и сложность анализа нуклеотидной последовательности ВИЧ-1. Поэтому уже в 1999-м году была создана международная база данных, разработанная в университете Стэнфорда. Она позволила с помощью биоинформатических методов в автоматическом режиме осуществлять поиск мутаций резистентности, их анализ и расчет степени устойчивости вируса ко всему спектру существующих препаратов [213]. До настоящего времени Стэнфордская база данных является наиболее широко используемым ресурсом для анализа ЛУ ВИЧ-1 с клиническими, эпидемиологическими и научными целями. Кроме нее есть и другие открытые базы данных ЛУ ВИЧ-1. Однако также необходимо отметить появление и рост количества национальных и региональных закрытых баз данных, в которых собираются, хранятся и анализируются нуклеотидные последовательности вируса и сопутствующая информация о пациентах. Например, в национальной базе данных Бразилии (Brazilian Genotyping Network (RENAGENO) database), созданной в 2006-м году [99], содержится информация о более чем 50 тысячах граждан [139], что составляет приблизительно 5% от всех людей, живущих с ВИЧ-1, в стране [237]. Такие базы данных существуют в

большом количестве стран [107] и в настоящее время активно используются не только для мониторинга ЛУ ВИЧ-1 на страновом уровне, но и для эпидемиологического надзора [79, 91, 103]. Среди опубликованных работ, посвященных анализу информации, содержащейся в национальных базах данных, наиболее полной является швейцарская. В ней содержится информация о более чем 95% пациентов в стране, которым был поставлен диагноз ВИЧ-инфекция [91]. Заметно, что чем более развита страна, тем для большей доли ВИЧ-инфицированных проведен анализ ЛУ ВИЧ-1 и информация об этом присутствует в национальной базе данных. В зарубежной литературе доля ВИЧ-инфицированных, для которых известна нуклеотидная последовательность, определена термином «плотность выборки» или «глубина сэмплирования» (sampling density). Этот параметр является крайне важным, поскольку достоверность исследований, в рамках которых осуществляется анализ геномных данных возбудителя совместно с эпидемиологическими характеристиками пациентов, тем выше, чем выше плотность выборки.

В Российской Федерации также существует национальная база данных ЛУ ВИЧ (<https://hivresist.ru/>). Она была создана в 2009-м году в рамках деятельности «Референс-центра по мониторингу и профилактике ВИЧ и ВИЧ-ассоциированных инфекций» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, и ее основной задачей является сбор информации о результатах секвенирования ВИЧ-1 и сопутствующей деперсонифицированной информации о пациентах с целью проведения эпидемиологического надзора за резистентностью ВИЧ-1 на территории РФ. К концу 2022-го года в базе данных присутствовала информация о 10626 пациентах с ВИЧ-инфекцией [53, 138], что составляло приблизительно 1% от лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), проживающих в стране.

На основании анализа содержащейся в базе данных информации о распространенности отдельных мутаций ЛУ и резистентности в целом возможны оптимизация закупок АРВ препаратов, внесение изменений в клинические рекомендации по лечению ВИЧ-инфекции, определение трендов увеличения/снижения резистентности ВИЧ-1 в различных регионах и уязвимых

группах. Регулярный анализ информации о распространенности ЛУ ВИЧ-1 помогает снизить расход средств, которые государство выделяет на борьбу с болезнью, повысить эффективность АРВ-терапии на страновом уровне, а также уменьшить количество новых случаев инфекции.

В случае секвенирования значительной доли ВИЧ-инфицированных пациентов появляется возможность проводить мониторинг лекарственной устойчивостью ВИЧ-1 более детально. Например, надзор может осуществляться в отношении определенных групп. В своем исследовании Сабин Йерли и коллеги [227] осуществили анализ когорты ВИЧ-инфицированных с недавней инфекцией, которые были выявлены в Женеве с 2000-го по 2008-й года. Недавняя инфекция определялась на основании результатов негативного результата серологического теста, выполненного менее года назад. Результаты исследования показали, что мутации, связанные с устойчивостью по крайней мере к одному классу АРВ препаратов, были обнаружены у 8,5%, и устойчивость к ННИОТ увеличивалась с течением времени. Филогенетический анализ показал, что в кластеры группировались 34,9% лиц с диагностированным заболеванием и 52,7% лиц с недавним инфицированием. При этом лица с резистентными вариантами ВИЧ-1 чаще оказывались внутри кластеров (59,3% против 32,6%, $p < 0,0001$). Более того, 84% пациентов с ЛУ вариантами ВИЧ-1 являлись частью кластеров, включающих только пациентов с недавно диагностированным заболеванием.

Таким образом, включение филогенетического анализа в эпидемиологический надзор за ЛУ ВИЧ-1 способствует лучшему пониманию движущих сил распространения резистентности, определению источника мутаций ЛУ и изменению факторов, влияющих на ее распространенность.

Расследование очагов инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи.

ВИЧ-1 имеет чрезвычайно высокую скорость генетической изменчивости. В различных работах она была оценена приблизительно в 0,1-0,4% генома в год [86, 95]. Это означает, что уже через год после инфицирования нуклеотидная

последовательность генома ВИЧ-1 реципиента может отличаться на 0,2-0,8% от нуклеотидной последовательности ВИЧ-1 источника инфекции. В то же время вирусы эпидемиологически связанных пациентов на протяжении длительного времени продолжают быть генетически более схожими друг с другом нежели с вирусами пациентов, которые не являются частью данной эпидемиологической цепи. В работе Жоэль Вертхейм [217] было показано, что ЛЖВ, имеющие вирусы генетически схожие более чем на 98%, достоверно чаще относились к одной эпидемиологической сети (кластеру передачи) по сравнению с ЛЖВ, чьи вирусы различались более чем на 2%.

Эти особенности могут применяться в ходе расследований очагов ВИЧ-инфекции. В частности, максимально эффективно это может использоваться при расследованиях очагов, потенциально связанных с оказанием медицинской помощи, поскольку некоторые пути передачи в таких очагах могут быть исключены, а кроме того, эпидемиологам доступны записи медицинских вмешательств, которые в некоторых случаях указывают на возможную связанность пациентов.

Одной из первых работ, где был осуществлен анализ нуклеотидных последовательностей для оценки генетической схожести, была работа по анализу очага ВИЧ-инфекции из общего источника среди больных гемофилией, которым переливали зараженную партию фактора свертывания крови [95]. Шесть из восьми больных гемофилией, подвергшихся воздействию этого источника, образовали молекулярный кластер близкородственных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 с малыми генетическими расстояниями.

Другим известным примером использования биоинформатических методов в ходе расследования нозокомиального очага является, так называемое «дело дантиста», опубликованное в 1992-м году [164]. Исследователи секвенировали геномы вирусов врача-дантиста, находящегося в стадии СПИДа, семерых его пациентов, а также 35 ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в том же регионе. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что последовательности ВИЧ-1 дантиста и пятерых

пациентов имеют высокую генетическую схожесть. Эти результаты в сочетании с данными эпидемиологического расследования послужили достаточными доказательствами, чтобы сделать вывод о заражении от врача пятерых пациентов в ходе получения ими стоматологической помощи.

С тех пор было опубликовано большое количество работ, где биоинформатические методы использовались для анализа эпидемиологической связи между ВИЧ-инфицированными лицами. Данный подход зарекомендовал себя как надежный, но в то же время имеющий ряд ограничений. В связи с этим в 2008-м году была опубликована работа, описывающая использование филогенетического анализа в качестве доказательства в уголовном расследовании передачи ВИЧ-1 [133]. В этой аналитической обзорной статье было суммированы возможности и ограничения, которыми обладает филогенетический анализ:

- Филогенетический анализ позволяет определить только степень генетического родства двух образцов ВИЧ-1. Он не может дать окончательный ответ о наличии или отсутствии эпидемиологической связи. Это определяется тем, что ВИЧ-1, в отличие от образцов ДНК или отпечатков пальцев человека, не является уникальным для человека.
- Результаты филогенетического анализа сами по себе не могут являться доказательством того, что передача вируса произошла от одного человека другому непосредственно. Даже если у этих людей варианты ВИЧ-1, имеющие крайне высокую генетическую схожесть, это не обязательно будет означать прямую передачу вируса.
- Филогенетический анализ сам по себе не дает никакой информации о направлении передачи вируса.
- Для филогенетического анализа жизненно важно включать правильные образцы для сравнения, потому что неподходящие образцы могут преувеличить родство между двумя вирусами (потенциального источника и реципиента инфекции). Эта группа образцов сравнения в идеале должна быть взята из того же географического региона, социальной группы и

потенциальной сети передачи и должна быть собрана примерно в период предполагаемого инфицирования реципиента.

С 2008-го года в Российской Федерации филогенетический анализ также начал использоваться как вспомогательный инструмент в ходе исследований внутрибольничных очагов ВИЧ-инфекции, а несколько позднее и гепатитов В и С [63, 64]. В 2010-м году необходимость его применения в рамках эпидемиологических исследований была определена в Санитарных Правилах и Нормах СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» [54], а в 2016-м году были утверждены методические указания, детально описывающие порядок этого применения [28]. К концу 2022-го года сотрудниками института эпидемиологии Роспотребнадзора биоинформатические методы были использованы в ходе исследований более чем 70 внутрибольничных очагов ВИЧ-инфекции.

Филогеография ВИЧ-1.

ВИЧ-инфекция – одно из небольшого количества социально-значимых заболеваний, которое начало распространяться среди людей сравнительно недавно. При этом вследствие особенностей патогенеза вируса, хронического течения и неспецифических клинических проявлений заболевания, диагностика и анализ развития эпидемии затруднительны. По этим причинам изучение попадания вируса в человеческую популяцию и дальнейшего его распространения на планете является целью многих исследовательских групп.

В ходе изучения поверхностных антигенов ВИЧ-1, антител к ним, а позже и генетических исследований генома было обнаружено, что родственные вирусы широко распространены среди различных видов обезьян, лемуров, семейства кошачьих и ряда других млекопитающих [214].

А с появлением более обширных генетических данных о вирусе и эпидемиологической информации о пациентах стало возможным провести биоинформатические исследования с целью исторической реконструкции развития эпидемии.

Наиболее известные работы в этой области появились в начале XXI века. Первой была работа Корбера и коллег, выполненная путем сравнительного анализа геномов современных генетических вариантов вируса и наиболее ранних выявленных [234]. Корбер оценил дату появления последнего общего предка основной группы ВИЧ-1 как 1931-й год (1915-1941, 95%-ный интервал). Через 8 лет после этого Михаил Воробей с коллегами [105], используя более сложные биоинформатические методы анализа, оценил время существования последнего общего предка ВИЧ-1 группы М в 1908-м году (1884-1924, 95%-ный интервал). Он также предположил, что эпицентром развития пандемии могла стать Демократическая Республика Конго, расположенная в регионе Западной Африки.

Другие значимые работы по теме филогеографии ВИЧ-1 посвящены изучению появления и распространения вируса в отдельных регионах и странах. В работе Михаила Воробья и коллег, опубликованной в 2016-м году [66], описано развитие эпидемии в Северной Америке. В рамках исследования они провели серологический скрининг более 2 тысяч образцов сыворотки, затем отобрали положительные и амплифицировали из них вирусный геном. Они успешно секвенировали полные геномы ВИЧ-1 в 8 образцах, собранных в период 1978-1979 годов. Последующий биоинформатический анализ этих образцов в сочетании с образцами из других географических регионов показал, что эпидемия ВИЧ-1 в США в этот период уже активно развивалась, а также то, что ее возникновение было обусловлено, начавшейся ранее эпидемией в странах Карибского бассейна. Байесовский филогенетический анализ с высокой достоверностью показал, что развитие эпидемии в США началось в Нью-Йорке приблизительно в 1970-м году (1969-1974) с последующим распространением в штатах Джорджия и Калифорния.

Мишель Томпсон и коллеги подробно изучили появление и дальнейшее распространение вируса на территории стран бывшего СССР [104]. Их работа заключалась в биоинформатическом анализе приблизительно 6 тысяч фрагментов геномов ВИЧ-1 с происхождением из Африки и стран бывшего СССР. На основании полученных результатов авторы предположили, что вариант вируса

субтипа А, который позже будет назван, как A_{FSU} (в настоящее время суб-субтип А6), попал из Африки в Восточную Европу приблизительно в 70-х годах. А эпицентром впоследствии развившейся эпидемии стал город Одесса, где, как было рассчитано, появился наиболее близкий предок ВИЧ-1 субтипа A_{FSU} . По их оценкам, приблизительно через 10 лет, в 1993-м году также в Одессе этот генетический вариант получил широкое распространение в результате вспышки среди лиц, употребляющих инъекционные наркотики (ЛУИН). В этой же работе с помощью байесовского филогеографического анализа авторами было определено, что статистически достоверными регионами последующими распространения вируса стали другие города Украины, России, Казахстана, Узбекистана и Беларуси.

Поскольку ежегодно появляется все больше информации о нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1, в том числе путем секвенирования архивных клинических образцов, исследования по теме филогеографии вируса продолжаются и результаты предыдущих лет уточняются [225]. Такие исследования полезны не только с точки зрения восстановления картины исторического распространения вируса, но также и анализа особенностей распространения определенных генетических вариантов в различных уязвимых группах [137, 190, 191, 208].

Филодинамика ВИЧ-1.

Биоинформатические подходы также можно использовать для изучения развития эпидемического процесса заболевания. Впервые термин «филодинамика» в начале XXI-го века сформулировал Гренфелл с соавторами [238], которые постулировали, что филогенетика вирусов «... определяется комбинацией иммунного отбора, изменений в размере вирусной популяции и пространственной динамики». Филодинамические модели могут дать представление об эпидемиологических параметрах, которые трудно оценить с помощью традиционных средств эпидемиологического надзора [243]. Например, оценка показателя R_0 (базовое репродуктивное число) по данным

эпидемиологического надзора требует тщательного контроля за изменением регистрируемых случаев инфекции и качеством их выявления. В то же время анализ демографической истории вирусной популяции на основании генетических данных может предложить другой способ расчета R_0 . Такие подходы использовались, в частности, для оценки R_0 ВИЧ-1 [185]. За прошедшие с тех пор 20 лет появилось значительное количество исследований, в которых анализ роста молекулярных кластеров применялся для количественной оценки соответствующих кластеров передачи. Например, Деннис и коллеги [143] выявили увеличение кластеров передачи в Северной Каролине путем анализа генетических данных вируса с высокой плотностью выборки и охарактеризовали активные кластеры передачи с помощью филодинамического анализа. Они использовали эффективное репродуктивное число (Re) для наблюдения за активными кластерами, которые продемонстрировали склонность к устойчивому росту. В другом исследовании, выполненном в Сербии, где авторы использовали филодинамический анализ [118], было показано, что Re оставалось выше единицы в течение всего периода исследования, то есть каждый ВИЧ-инфицированный являлся источником инфекции более чем для одного человека. Было рассчитано, что уязвимая группа мужчин, имеющих секс с мужчинами (МСМ), инфицированная ВИЧ-1 субтипа В, имеет крутую кривую роста до 2030-го года, тогда как гетеросексуальные группы, имеющие ВИЧ-1, как В, так и С субтипа, демонстрируют незначительный рост и последующую стагнацию.

Филодинамические исследования могут быть эффективно применены для оценки скорости и особенностей распространения возбудителя в отдельных популяциях ВИЧ-инфицированных. Лейт Браун с коллегами [235] провели анализ 14560 нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, полученных от уязвимой группы МСМ Великобритании, что составляло на момент исследования 60% всех ВИЧ-инфицированных этой группы в стране, получающих медицинскую помощь. На основании результатов своего исследования они предположили, что более высокая контагиозность, связанная с острой инфекцией, играет основную роль в ускоренной передаче вируса в этой уязвимой группе. В связи с этим они сделали

вывод о том, что для эффективного противодействия эпидемии противоэпидемические мероприятия должны быть организованы в отношении определенных уязвимых групп. Схожие результаты были получены исследователями, изучившими группу ВИЧ-инфицированных МСМ в штате Мичиган, США в период с 2004-го по 2012-й годы [140]. Получив 664 нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 и сравнив их с более чем 30 тысячами других в этом штате, они пришли к выводу, что почти половина случаев заражения (44,7%, ДИ 42,2%-46,4%) произошла от лиц с длительностью инфекции менее одного года.

Работы, оценивающие филодинамику, позволяют также оценить эпидемиологические характеристики, определяющие повышенный риск инфицирования ВИЧ-1. В своей работе Джозель Вертхейм и коллеги [147] в результате анализа 19511 нуклеотидных последовательностей, взятых из системы национального мониторинга ВИЧ-1 США с 2010-го по 2017-й годы, определили значимость вклада в число новых случаев инфекции недиагностированных ВИЧ-инфицированных людей по сравнению с ВИЧ-инфицированными, получающими АРВ-терапию, но не достигшими вирусологического успеха.

В настоящее время исследования по филодинамике ВИЧ-1 наиболее часто посвящены таким направлениям, как оценка скорости передачи вируса среди различных уязвимых групп [113, 169, 188, 200], время заноса вируса на территорию [219] и его последующее распространение [225, 231], выявление связей между региональными эпидемиями [90, 106, 108] и оценка параметров роста эпидемии [115, 159, 183], в том числе для планирования и оценки противоэпидемических мероприятий [144, 167, 223].

Оценка эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий.

Также как биоинформатические методы применяются для изучения географического распространения и скорости передачи ВИЧ-1, они могут быть использованы для оценки эффективности проводимых на территории противоэпидемических мероприятий. В работе Филипа Петерса и коллег [134],

опубликованной в 2016-м году, описывается применение молекулярно-биологических методов в рамках изучения вспышки ВИЧ-1, связанной с парентеральным употреблением оксиморфона в штате Индиана (США) в 2014-2015-м годах. В связи с выявлением к январю 2015-го года 11 новых случаев ВИЧ-1 в небольшом сообществе Индианы, были проведены эпидемиологическое расследование и филогенетический анализ, которые указали на наличие очага инфекции, связанного с немедицинским использованием наркотических средств путем парентеральных инъекций общими шприцами. В рамках продолжения расследования к ноябрю 2015-го года суммарно был выявлен 181 случай инфицирования, 157 пациентов имели ВИЧ-1, нуклеотидные последовательности которых имели высокое генетическое сходство. В качестве противоэпидемических мероприятий в конце марта 2015-го года были утверждены мероприятия по быстрому расширению тестирования (25-кратное увеличение охвата тестированием), создание местных служб по оказанию медицинской помощи и другие программы. В период с апреля по октябрь в рамках экстренной программы по обмену шприцев было распространено и обменено более 97000 штук. Филогенетический анализ, проводившийся непрерывно в течение 2015-го года для каждого нового случая инфицирования, показал, что пик регистрации новых случаев в очаге инфекции регистрировался в марте-апреле, а затем начал снижаться. Начиная с июня 2015-го года эпидемиологически связанные с источником вспышки случаи практически перестали регистрироваться.

Схожим образом в последующие годы были выполнены еще несколько работ, где биоинформатические методы были использованы для оценки эффективности проведенных противоэпидемических мероприятий. Во всех исследованиях описывались вмешательства, предпринятые в контексте групповых эпидемических очагов ВИЧ-инфекции, и связанные с ними расследования, которые проводились среди людей, употребляющих инъекционные наркотики [119, 177, 181, 205]. Среди оцениваемых вмешательств в этих исследованиях можно выделить следующие 4 категории: (1) расширение оказываемых

населению услуг (увеличение числа врачей и полевых эпидемиологов), (2) обучение поставщиков услуг, пациентов или членов сообщества (расширенное последующее наблюдение с упором на начало антиретровирусной терапии, уведомление партнеров и тестирование на ВИЧ), (3) расширение вспомогательных услуг (образовательные инициативы, ориентированные на пациентов, членов сообщества, поставщиков медицинских услуг или поставщиков вспомогательных услуг) и (4) расширение охвата тестирования на ВИЧ и лечения ВИЧ-инфекции (увеличение количества услуг по шприцам, расширение тестирования на ВИЧ в отделениях неотложной помощи и больницах, приютах для бездомных, тюрьмах и других местах, улучшение предоставления и доступа к антиретровирусной терапии и расширенная связь со вспомогательными службами).

Выявление и анализ молекулярных кластеров в реальном времени.

В связи с недавними достижениями в области технологий секвенирования ВИЧ-1 и биоинформатических методов в развитых странах, представители органов здравоохранения проявили интерес к использованию кластерного анализа в дополнение к классическим методам эпидемиологического надзора за ВИЧ-1 [124, 228, 241]. В ходе кластерного анализа генетические последовательности вируса образуют группы (молекулярные кластеры), которые определяют эпидемиологические сети (кластеры передачи). А затем клинико-эпидемиологические характеристики пациентов, попавших внутри кластеров передачи, анализируются с целью определения факторов риска передачи, мониторинга растущих кластеров, выявления лиц с риском заражения ВИЧ-1 [188, 218, 232] и снижения последующей передачи [222, 239]. Кластерный анализ особенно привлекателен, потому что в сочетании с традиционными подходами эпидемиологического надзора он потенциально может выявить пробелы в существующих программах тестирования и лечения ВИЧ-1, направить дополнительные ресурсы в «горячие точки» передачи [76, 188], или, наоборот, определить, когда такие дополнительные ресурсы не требуются.

За последние пять лет происходило накопление результатов исследований, в которых описан опыт внедрения биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и сопутствующей информации о пациентах. Текущие результаты пока не предлагают единственного стандартизированного подхода, однако достоверно указывают, что выявление молекулярных кластеров ВИЧ-1 в режиме реального времени может и должно инициировать меры общественного здравоохранения, направленные на прекращение передачи ВИЧ-1 и сокращение темпов развития эпидемии [135].

Идея о внедрении подхода по выявлению молекулярных кластеров в режиме реального времени была впервые предложена канадскими учеными в 2015-м году [226]. Хотя биоинформатический анализ геномных данных ВИЧ-1 с целью выявления кластеров стал к тому времени уже достаточно распространенным инструментом, ранее он, как правило, проводился ретроспективно. Описанные же в предыдущим разделе расследования очагов заболевания обеспечили понимание, каким образом биоинформатические подходы могут быть использованы в эпидемиологическом надзоре [180]. Например, после выявления крупного кластера передачи и определения группы риска, противоэпидемические мероприятия могут представлять собой: (1) старт лечения для подавления вирусной нагрузки среди ВИЧ-инфицированных в сети передачи с целью снижения заболеваемости, смертности и риска передачи ВИЧ-1 контактными лицам; (2) увеличение масштабов тестирования для выявления невыявленных случаев; и (3) проведение доконтактной профилактики и других профилактических мероприятий для лиц с отрицательным результатом теста, но имеющим повышенный риск заражения ВИЧ-1.

Одной из первых работ, где описывается применение таких подходов в системе эпидемиологического мониторинга в режиме реального времени, была работа по расследованию группового очага заболевания, вызванного лекарственно-устойчивым вариантом ВИЧ-1, в Ванкувере [172]. В том случае кластер из 25 человек, состоящий преимущественно из мужчин, имеющих половые контакты с мужчинами, увеличился на 11 новых случаев за три месяца.

Восемь пациентов из 11 были инфицированы вирусом с одной и той же мутацией, придающей устойчивость к ННИОТ первого поколения. Предварительный отчет был направлен территориальному органу здравоохранения, что привело к официальному расследованию очага и последующему усиленному медико-санитарному наблюдению за пациентами из кластера передачи в течение следующих двух месяцев. В течение года кластер продолжал увеличиваться, однако частота передаваемой ЛУ ВИЧ-1 значительно снизилась вследствие проведенных противоэпидемических мероприятий.

В 2019-м году центр по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) опубликовал 2-ю «черновую» версию руководства для департаментов здравоохранения по выявлению кластеров передачи ВИЧ-1 и соответствующему реагированию на них [86]. Это руководство является частью анонсированного в том же году президентом США стратегического плана по прекращению эпидемии ВИЧ-инфекции в стране в течение 10 лет. План включает в себя 4 принципа: (1) выявление людей с ВИЧ максимально быстро после их инфицирования, (2) раннее начало терапии и эффективное подавление вирусной нагрузки, (3) предотвращение заражения ВИЧ людей из групп риска, в том числе с помощью доконтактной профилактики (ДКП), и (4) быстрое выявление возникающих кластеров и реагирование для сокращения в них новых случаев инфекции [112]. Практическое руководство CDC посвящено четвертому принципу. В нем последовательно описывается, (1) что является кластером передачи, (2) каким образом с ним соотносится молекулярный кластер, (3) как выявление кластеров передачи может помочь сконцентрировать профилактические меры, (4) как осуществляется расстановка приоритетов и реагирование на кластеры. Указывается, что использование данных эпидемиологического надзора для обнаружения кластеров передачи посредством выявления как кластеров ВИЧ, сгруппированных во времени и пространстве (т. е. пространственно-временных кластеров), так и кластеров близкородственных вариантов вируса (т. е. молекулярных кластеров), позволяет выявлять очаги заболевания, которые в противном случае остались бы незамеченными, а затем

сосредотачивать на них проверенные средства профилактики заражения ВИЧ-1. Молекулярные и биоинформатические методы позволяют выявлять кластеры передачи, которые не всегда обнаруживаются с помощью традиционных эпидемиологических подходов [144]. Поэтому внедрение их в эпидемиологический надзор позволит повысить вероятность и скорость выявления очагов заболевания [92, 150, 152]. Первые примеры таких работ, выполненных в США согласно вышеупомянутому руководству, уже опубликованы.

Марк Ховисон с коллегами [75] разработали комплекс инструментов для интеграции данных, анализа и последующей отчетности, применяющийся в режиме реального времени, что позволило значительно снизить задержку реагирования общественного здравоохранения. Работа программ была применена к 18-ти ежемесячным наборам данных, созданным в период с января 2020-го года по июнь 2022-го года в штате Род-Айленд (США). Результаты кластерного анализа и отчетность в режиме, близком к реальному времени, стали основой для действий общественного здравоохранения в 37 филогенетически сгруппированных случаях заражения из 57 новых диагнозов ВИЧ-инфекции. В будущем авторами планируется использовать данный подход для проспективного рутинного анализа молекулярных данных о ВИЧ-1 в масштабе штата с целью оптимизации действий общественного здравоохранения, направленных на прерывание передачи вируса.

Таким образом, эпидемия ВИЧ-инфекции в Российской Федерации продолжает развиваться, а число ЛЖВ в стране растет в связи с тем, что количество новых случаев болезни превышает количество смертей ВИЧ-инфицированных лиц. Несмотря на то, что на ранних этапах ее развития число новых случаев было невелико, попадание вируса в уязвимую группу лиц, парентерально употребляющих наркотические средства, значительно ухудшило ситуацию. В результате до настоящего времени заболеваемость и пораженность ВИЧ-инфекцией в нашей стране выше не только по сравнению с развитыми, но и многими развивающимися странами. Широкое распространение болезни сильно

осложняет борьбу с ней, так как требует привлечения значительных ресурсов, причем основное бремя заключается в расходах на закупку АРВ препаратов. В связи с отсутствием эффективных вакцин, необходимостью в пожизненной терапии и повышении охвата ВИЧ-инфицированных лиц лечением можно предположить, что ущерб, причиняемый болезнью, будет увеличиваться.

В настоящее время в стране организована и функционирует сеть медицинских учреждений, основными функциями которых является профилактика, диагностика и лечение ВИЧ-инфекции. Центры СПИДа на основании нормативных документов осуществляют сбор эпидемиологической информации, профилактические и противоэпидемические мероприятия, выявляют ВИЧ-инфицированных лиц и оказывают им медицинскую помощь.

В XXI веке в мире значительное развитие получили методы секвенирования нуклеиновых кислот и биоинформатический анализ. Если 20 лет назад они использовались исключительно в науке, то в настоящее время их начали использовать в эпидемиологическом надзоре. В развитых странах они уже становятся рутинными инструментами организаций общественного здравоохранения в борьбе с эпидемией ВИЧ-инфекции. Однако в нашей стране подобные исследования и разработки немногочисленны, а нормативные документы практически не содержат описаний применения молекулярно-биологических методов и биоинформатического анализа в рамках эпидемиологического надзора. В связи с этим разработка стандартизированных методик и наборов реагентов для секвенирования ВИЧ-1, инструментов для сбора и анализа генетических данных, программного обеспечения для применения биоинформатического анализа в эпидемиологическом надзоре и разработка нормативно-методических документов, описывающих их применение, представляется значимым и необходимым направлением работ.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Исследование выполнялось с 2009 по 2022 годы на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. В исследование были включены 4812 пациентов с диагнозом «ВИЧ-инфекция», поставленные на диспансерный учет в центрах по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями РФ. Образцы от пациентов были собраны в ходе выполнения государственного задания (НИОКТР АААА-А21-121011990056-9), осуществления эпидемиологических расследований случаев заражения ВИЧ-1, проведения анализа ЛУ ВИЧ-1 по клиническим показаниям, либо в рамках следующих НИР:

- Кросс-секционное эпидемиологическое исследование тропизма с использованием генотипической методики вариантов ВИЧ субтипа А, распространенных на территории РФ, среди пациентов, не получавших АРТ и имеющих опыт применения АРТ (исследование одобрено ЛЭК ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, протокол №29 от 14 декабря 2011 года);
- Международное, многоцентровое, рандомизированное, частично слепое клиническое исследование эффективности, безопасности и подбора оптимальной дозировки препарата VM-1500 в сравнении с препаратом Эфавиренз на фоне стандартной базисной антиретровирусной терапии, состоящей из двух нуклеозидных/нуклеотидных ингибиторов обратной транскриптазы, у ВИЧ-1-инфицированных пациентов, ранее не получавших лечения;
- Международное исследование «РЕЗЕДА – Предотвращение распространения штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусной терапии в странах-реципиентах помощи», выполненное в рамках распоряжения Правительства № 2314-р от 14 ноября 2015 г.;

- Анализ первичной лекарственной резистентности ВИЧ-1 в трех административных регионах Российской Федерации: многоцентровое поперечное эпидемиологическое исследование;
- Международное исследование «Предотвращение распространения штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусной терапии в странах-реципиентах помощи», выполненное в рамках распоряжения Правительства № 2656-р от 1 декабря 2018 г. (исследование одобрено ЛЭК ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, протокол №92 от 21 мая 2019 года);
- Оценка развития эпидемии ВИЧ-инфекции путем секвенирования ВИЧ-1 и биоинформатического анализа молекулярных и эпидемиологических данных в отдельно взятом регионе Российской Федерации (исследование одобрено ЛЭК ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, протокол №93 от 18 июня 2019 года ЛЭК).

В ходе исследования для решения поставленных задач были также использованы материалы, включающие:

- Нормативно-методические документы Минздрава, Роспотребнадзора, Росстата РФ (Законы, СанПиНы, приказы, распоряжения, постановления, МУ, МР) – 27 документов с 1985 по 2022 гг.,
- информационные бюллетени «ВИЧ-инфекция» СНИОП СПИД – 47 бюллетеней с 1994 по 2024 гг.

2.2. Методы исследования

В исследовании были использованы эпидемиологические, молекулярно-биологические, биоинформатические и статистические методы, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Материалы и методы исследования

Направление исследования	Материалы исследования	Количество	Типы и методы исследования
Разработка диагностических наборов реагентов для секвенирования ВИЧ-1 и определения ЛУ	Стандартные образцы предприятия, Международные стандарты ВИЧ, Биологический материал – цельная кровь от ВИЧ-инфицированных граждан, включенных в исследование; цельная кровь от ВИЧ-негативных людей	СОП № 11 «ДНК ВИЧ-1» СОП № 50 «РНК ВИЧ-1» Стандарт рNL4-3, Стандарт рLAI.2, 311 образцов цельной крови от ВИЧ-инфицированных, 90 образцов цельной крови от ВИЧ-негативных людей	Молекулярно-биологические (экстракция НК, ОТ, ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, массовое параллельное секвенирование) Биоинформатические (редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей в BioEdit 7.2.0, а также с использованием инструмента быстрого выравнивания (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK_ALIGNv2/QuickAlign.html), анализ олигонуклеотидов OligoAnalyzer Tool (https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer), контроль качества нуклеотидных последовательностей (https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc) и (https://hivdb.stanford.edu/cpr/), определение субтипа вируса, выявление мутаций ЛУ ВИЧ-1 (https://hivdb.stanford.edu/), определение тропизма вируса (https://coreceptor.gen02pheno.org/)
Разработка электронных баз данных и сбор информации	Медицинские карты амбулаторного больного, Нуклеотидные последовательности	4812 ВИЧ-инфицированных, 7164 нуклеотидные последовательности	Эпидемиологический (описательный) методический прием) Биоинформатические (редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей в BioEdit 7.2.0, а также с использованием инструмента с использованием инструмента HIValign базы данных Лос-Аламоса

Направление исследования	Материалы исследования	Количество	Типы и методы исследования
	льности ВИЧ-1	льности ВИЧ-1	(https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VIRALIGN/viralign.html), контроль качества нуклеотидных последовательностей (https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc) и (https://hivdb.stanford.edu/cpr/), определение субтипа вируса, выявление мутаций ЛУ ВИЧ-1 https://hivdb.stanford.edu/ , определение тропизма вируса https://coreceptor.gen02pheno.org/ , анализ на контаминацию – модифицированная версия BLAST)
Анализ и оценка динамики лекарственной устойчивости ВИЧ-1	Записи в базе данных, содержащие эпидемиологические данные о ВИЧ-инфицированных пациентах, Нуклеотидные последовательности ВИЧ-1	4812 ВИЧ-инфицированных, 7164 нуклеотидные последовательности ВИЧ-1	Биоинформатические (редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей в BioEdit 7.2.0, а также с использованием инструмента с использованием инструмента HIValign базы данных Лос-Аламоса (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VIRALIGN/viralign.html), контроль качества нуклеотидных последовательностей (https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc) и (https://hivdb.stanford.edu/cpr/), определение субтипа вируса, выявление мутаций ЛУ ВИЧ-1 https://hivdb.stanford.edu/ , определение тропизма вируса https://coreceptor.gen02pheno.org/ , анализ на контаминацию – модифицированная версия BLAST) Статистические (IBM SPSS Statistics v. 21.0, Microsoft Excel)
Анализ нуклеотидных последовательностей	Медицинские карты амбулаторного больного,	1328 записей о пациентах с ВИЧ-инфекцией	Эпидемиологический (описательный методический прием) Молекулярно-биологические (секвенирование) Биоинформатические (редактирование и

Направление исследования	Материалы исследования	Количество	Типы и методы исследования
Возрастных групп ВИЧ-1 в ходе исследования эпидемиологических случаев инфицирования	Биологический материал – цельная кровь от ВИЧ-инфицированных граждан, включенных в исследование Записи в базе данных, содержащие эпидемиологические данные о ВИЧ-инфицированных пациентах Нуклеотидные последовательности ВИЧ-1	4255 нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1	выравнивание нуклеотидных последовательностей в BioEdit 7.2.0, а также с использованием инструмента с использованием инструмента HIValign базы данных Лос-Аламоса (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VIRALIGN/viralalign.html), контроль качества нуклеотидных последовательностей (https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc) и (https://hivdb.stanford.edu/cpr/), определение субтипа вируса, выявление мутаций ЛУ ВИЧ-1 (https://hivdb.stanford.edu/), определение тропизма вируса (https://coreceptor.geno2pheno.org/), анализ на контаминацию – модифицированная версия BLAST, филогенетический анализ и расчет генетической дистанции в ПО MEGA 6.06) Статистические (IBM SPSS Statistics v. 21.0, Microsoft Excel)
Оценка генетического разнообразия	Записи в базе данных, содержащие эпидемиологические данные	4812 ВИЧ-инфицированных, 7164	Биоинформатические (редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей в BioEdit 7.2.0, а также с использованием инструмента с использованием

Направление исследования	Материалы исследования	Количество	Типы и методы исследования
ВИЧ-1 и анализ особенностей распространения вируса	ические данные о ВИЧ-инфицированных пациентах, Нуклеотидные последовательности ВИЧ-1	нуклеотидные последовательности ВИЧ-1	инструмента HIValign базы данных Лос-Аламоса (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VIRALIGN/viralalign.html), контроль качества нуклеотидных последовательностей (https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc) и (https://hivdb.stanford.edu/cpr/), определение субтипа вируса, выявление мутаций ЛУ ВИЧ-1 https://hivdb.stanford.edu/ , определение тропизма вируса https://coreceptor.gen02pheno.org/ , анализ на контаминацию – модифицированная версия BLAST, филогенетический анализ и расчет генетической дистанции в ПО MEGA 6.06) Статистические (IBM SPSS Statistics v. 21.0, Microsoft Excel)
Оценка развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в РФ путем анализа молекулярных кластеров	Форма № 4 "Сведения о результатах исследования крови на антитела к ВИЧ" Росстата РФ, Информационные бюллетени СНИОП СПИД Записи в базе данных, содержащие эпидемиолог	Форма №4 за период с 1997 по 2021 гг., Информационные бюллетени №№ 1-49 за период с 1994 по 2024 гг. 4812 ВИЧ-инфицированных, 7164 нуклеотидные	Эпидемиологический (ретроспективное описательное эпидемиологическое исследование), Биоинформатические (редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей в BioEdit 7.2.0, а также с использованием инструмента с использованием инструмента HIValign базы данных Лос-Аламоса (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VIRALIGN/viralalign.html), филогенетический анализ в ПО IQ-TREE, FastTree, RAxML, анализ молекулярных кластеров в ПО Cluster Picker и MicrobeTrace), Статистические (IBM SPSS Statistics v. 21.0, Microsoft Excel)

Направление исследования	Материалы исследования	Количество	Типы и методы исследования
	ические данные о ВИЧ- инфицирова нных пациентах, Нуклеотидн ые последовате льности ВИЧ-1	последовател ьности ВИЧ- 1	

Эпидемиологический метод.

Включение пациентов в настоящее исследование осуществлялся в период с 2009 по 2022 гг. Критериями включения пациентов являлись:

- Диагноз «ВИЧ-инфекция», поставленный согласно нормативным документам,
- Наличие обязательной сопутствующей информации о пациенте:
 - Пол,
 - Дата или год рождения,
 - Регион проживания (ФО),
 - Дата или год лабораторного подтверждения наличия ВИЧ-инфекции (наиболее часто – дата первого положительного иммунного блота),
 - Дата или год забора крови для проведения секвенирования ВИЧ,
 - Опыт приема АРВ препаратов на момент забора крови, включая до- и постконтактную профилактику.

Критериями невключения в исследование являлись:

- Отсутствие гражданства Российской Федерации,

- Отсутствие обязательной сопутствующей информации о пациенте.

Критерием исключения из исследования являлась:

- Невозможность получения специфического фрагмента ДНК ВИЧ-1 для секвенирования.

Соглашение о сотрудничестве (Приложение 1) было получено для той части пациентов, кто участвовал только в настоящем исследовании. После включения пациента в исследование, ему присваивался уникальный номер.

В случае включения пациента в исследование, осуществлялся сбор полной клинико-эпидемиологической информации о пациенте:

- Пол
- Дата рождения,
- Дата первого положительного иммунного блота,
- Код обследования,
- Код заражения,
- Дата инфицирования,
- Опыт приема АРВ препаратов,
- Опыт до- и постконтактной профилактики,
- Регион проживания (город, административный район, ФО),
- Регион инфицирования (город, административный район, ФО, страна),
- Стадия заболевания,
- Показания о вирусной нагрузке,
- Показания об уровне CD4⁺ Т-лимфоцитов,
- Информация о наличии аллели HLA B*5701,
- Информация о всех схемах АРВ-терапии, включая текущую,
- Дата забора крови.

Этика исследования. Настоящее исследование было проведено в соответствии с законами Российской Федерации. На исследование было получено одобрение локального этического комитета ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

Исследование было проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации, Федерального закона от 27 июля 2006 года № 152-ФЗ «О персональных данных», руководства по надлежащей эпидемиологической практике (GEP) и «Международного этического руководства по проведению эпидемиологических исследований» СММНО. На настоящее исследование не распространяются требования о соответствии правилам надлежащей клинической практики (GCP).

Молекулярно-биологические методы.

Забор крови и первичная обработка клинических образцов. Забор крови для проведения лабораторных исследований молекулярными методами осуществлялся в вакуумные пробирки, содержащие К2ЭДТА/К3ЭДТА, либо с активатором свертывания. После окончания забора крови содержимое пробирки перемешивалось путем аккуратного переворачивания. Хранение первичных пробирок с кровью осуществлялось в вертикальном положении в течение нескольких часов при комнатной (18-24 °C), либо в течение не более 48 часов при температуре 2-8 °C.

Для исследования РНК ВИЧ-1 использовалась плазма или сыворотка крови. Для этого первичные пробирки центрифугировались в течение 15-20 минут при 1500 g. В результате центрифугирования кровь разделялась на клеточную и бесклеточную фракции. Бесклеточная фракция крови (плазма или сыворотка) переносилась в пробирки типа эппендорф на 1,5 мл. Дальнейшее хранение клинических образцов осуществлялось при температуре не выше 18 °C в течение не более 3 месяцев, либо при температуре минус 70 °C в случае длительного хранения.

Для исследования ДНК ВИЧ-1 использовались лейкоциты крови. После центрифугирования в течение 15-20 минут при 1500 g в пробирки на 1,5 мл отбиралось лейкоцитарное кольцо в объеме 200 мкл. Затем в пробирки добавляли Гемолитик (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ) в количестве 500 мкл. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. За время инкубации несколько раз

производили перемешивание на вортексе. После окончания инкубации осуществляли центрифугирование пробирок в течение 2 минут при 8000 g. Надосадочную жидкость удаляли с помощью вакуумного отсасывателя. Отмывку с помощью Гемолитика повторяли второй раз. После окончания отмывки образцы лейкоцитов крови замораживались в условиях, аналогичных плазме/сыворотке крови.

Подбор олигонуклеотидов. Первичный подбор олигонуклеотидов для проведения обратной транскрипции (ОТ), амплификации, подготовки библиотек и реакции циклического секвенирования осуществляли с помощью программы BioEdit 7.2.0 [125], а также с использованием инструмента быстрого выравнивания

(https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK_ALIGNv2/QuickAlign.html).

После подбора избыточного количества кандидатов они оценивались с помощью инструмента OligoAnalyzer Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) на предмет температуры плавления, GC-состава, шпилькообразования, гомо- и гетеродимеризации. Для снижения вероятности низкоэффективной амплификации фрагментов генома ВИЧ-1 вследствие несовпадений последовательностей, выборочные позиции олигонуклеотидов делались вырожденными. Работа подобранных олигонуклеотидов была оптимизирована в сочетании с использованием реагентов АмплиСенс (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ) для экстракции нуклеиновых кислот, ОТ, полимеразной цепной реакции (ПЦР), электрофоретической детекции в агарозном геле, очистки фрагментов ДНК, а также реактивов компании Applied Biosystems (США) в случае классического секвенирования по Сэнгеру и компании Illumina (США) в случае массового параллельного секвенирования.

Амплификация специфических фрагментов генома ВИЧ-1. Амплификация специфических фрагментов генома состояла из двух этапов. На первом этапе проводили ОТ и 1-ю стадию ПЦР совместно. На втором – проводили 2-ю стадию ПЦР. Необходимость использования «гнездовой» ПЦР была обусловлена высокими требованиями к чувствительности анализа.

В случае амплификации генов протеазы, обратной транскриптазы, интегразы и V3 петли гена белка оболочки с целью последующего секвенирования по Сэнгеру для ОТ-ПЦР использовались реактивы АмплиСенс (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ). В случае амплификации всей кодирующей области генома для последующего массового параллельного секвенирования применялись реактивы компании Invitrogen (кат. № 12574-035, США).

Секвенирование ВИЧ-1. Определение нуклеотидной последовательности ВИЧ-1 осуществлялось с помощью классического метода секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (США) и с помощью массового параллельного секвенирования на приборе MiSeq Illumina (США).

В первом случае секвенированию подвергались следующие области генома: гены протеазы и обратной транскриптазы (позиции 2253-3368 относительно референсного штамма HXB2, GenBank #K03455), ген интегразы ВИЧ-1 (позиции 4230–5093), а также V3 петля гена белка оболочки (env) (позиции 6970-7349). Во втором случае секвенированию подвергалась вся кодирующая область генома вируса (позиции 626-9623) с общей протяженностью 8998 нуклеотидов.

Биоинформатические методы.

Анализ хроматограмм, полученных в результате классического секвенирования, и последующая оценка итоговой нуклеотидной последовательности осуществлялись с помощью программ Деона (РНБит, РФ), либо «АмплиСенс Resist» (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ). Контроль качества консенсусных нуклеотидных последовательностей проводился с помощью инструментов ВОЗ (https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc) и базы данных Стэнфордского университета (<https://hivdb.stanford.edu/cpr/>), либо с помощью разработанного в ходе выполнения исследования алгоритма.

Сборка чтений и формирование итоговой нуклеотидной последовательности после окончания массового параллельного секвенирования осуществлялись с помощью инструмента VIRgenA [242].

Определение субтипа ВИЧ-1 осуществлялось несколькими способами. Для предварительного определения субтипа использовались автоматические алгоритмы базы данных Стэнфордского университета, а также института REGA (<http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>). Для более точного определения субтипа применялся филогенетический анализ с использованием набора референсных нуклеотидных последовательностей субтипов и циркулирующих рекомбинантных форм из базы данных Лос-Аламоса (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html#ref>), а также инструмента BLAST. В случае получения дискордантных результатов между автоматическими алгоритмами и филогенетическим анализом итоговое решение о субтипе принималось в пользу последнего.

Редактирование нуклеотидных последовательностей осуществлялось с использованием программы BioEdit 7.2.0. Выравнивание последовательностей проводилось с использованием инструмента HValign базы данных Лос-Аламоса (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VIRALIGN/viralalign.html>) методом HMM-align.

Выявление мутаций ЛУ ВИЧ-1 и оценка резистентности вируса к АРВ препаратам осуществлялись с помощью инструментов базы данных Стэнфордского университета (<https://hivdb.stanford.edu/>). Использовался алгоритм CPR (<https://hivdb.stanford.edu/cpr/>) для выявления мутаций, свидетельствующих о наличии передаваемой лекарственной устойчивости ВИЧ-1. А также использовался инструмент для выявления мутаций, имеющих клиническое значение (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>). Определение тропизма вируса осуществлялось с помощью инструмента geno2pheno, разработанного и курируемого институтом информатики Макса-Планка (<https://coreceptor.geno2pheno.org/>).

Построение филогенетических деревьев и расчет генетической дистанции проводилось в следующих программах:

- MEGA 6.06 [162],

- IQ-TREE [154],
- FastTree [198],
- RAxML [220].

При построении деревьев использовались следующие параметры: метод максимального правдоподобия, бутстреп 100, модель GTR+G+I, частичное удаление пробелов с порогом 95%.

Выявление кластеров осуществлялось с помощью программ:

- Cluster Picker 1.2.3 [80] с бутстрепом 0.9 и порогами генетической дистанции в диапазоне 1%-4,5%,
- MicrobeTrace [163] (<https://microbetrace.cdc.gov/MicrobeTrace/>) с порогами генетической дистанции 1-4,5%.

Визуализация и аннотация деревьев были выполнены в iTOL (<https://itol.embl.de/>). Последующий анализ молекулярных кластеров и сопутствующих данных проводился с использованием пакета Microsoft Office.

Разработка электронной базы данных лекарственной устойчивости ВИЧ-1. Разработка внутренней части базы данных осуществлялась на языках PHP, JS, HTML, CSS. Внешняя часть приложения, доступная для любого пользователя сети Интернет, разрабатывалась на платформе Bitrix. Процесс получения данных для главной страницы был осуществлялся посредством API (Application Programming Interface — «программный интерфейс приложения») в формате json. Графики, представленные на главной странице сайта, были реализованы с помощью библиотеки ChartJS.

Статистические методы.

Статистический анализ осуществлялся с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics v. 21.0. Статистическая значимость различий между количественными показателями оценивалась с использованием двухстороннего точного теста Фишера. Достоверность различий частот для несвязанных групп

рассчитывалась с использованием критерия χ^2 Пирсона. Достоверными считались различия в случае $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Для оценки существующей системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ был проведен последовательный анализ всех нормативно-методических документов Министерства Здравоохранения и Роспотребнадзора по темам диагностики, профилактики, а также диспансерного наблюдения и лечения ВИЧ-инфекции.

Первым документом, сформировавшим основные направления борьбы с распространением ВИЧ-инфекции, являлся приказ министерства здравоохранения СССР «Об организации поиска больных СПИД и контроле доноров на наличие возбудителя СПИД», опубликованный в 1985 г. [44]. Он определял необходимость: (1) усиления медицинского досмотра за прибывающими в страну иностранными гражданами, (2) разработки поискового обследования донорских контингентов на наличие СПИД, (3) освоения методов культивирования вируса LAV/HTLV-III (официальное название ВИЧ-1 в тот период времени) и разработки методов его выявления и антител к нему, (4) разработки программы массового обследования донорских контингентов клиническими и иммунологическими методами на наличие СПИД.

В 1987-м году Приказом Министерства здравоохранения «О расширении мероприятий по борьбе со СПИД в РСФСР» [40] была определена необходимость организации лабораторий для выявления ВИЧ, осуществления учета и анализа заболеваемости СПИД и носительства ВИЧ среди населения, организации активного поиска и выявления в очагах СПИД лиц, находившихся в контакте с больным СПИД или носителем ВИЧ. Также указывалось о необходимости развертывания работы по профилактике СПИД с использованием всех средств массовой информации. Важно отметить, что тем же приказом были определены

группы лиц «повышенного риска», которые подвергались поголовному тестированию:

- Наркоманы, употребляющие наркотики путем инъекций,
- Лица, судимые за половые преступления, связанные с гомосексуализмом, а также занимающиеся мужеложством,
- Судимые за распространение венерических заболеваний и уклонение от лечения,
- Проститутки.

В том же году Указанием Минздрава СССР [59] была определена необходимость сбора основной медицинской документации и направления ее в вышестоящий орган здравоохранения в виде внеочередных донесений в случае выявления серопозитивного лица.

Важное значение на организацию эпидемиологического надзора и борьбу с распространением ВИЧ оказала внутрибольничная вспышка, произошедшая в 1988-1989 годах на Юге страны и затронувшая ряд таких крупных городов, как Элиста, Ростов-на-Дону, Волгоград, Шахты, Грозный и Астрахань [8]. В ходе расследования было выявлено приблизительно 260 пострадавших детей и их матерей [7]. Вскоре после окончания расследования в 1989-м году приказами министерства здравоохранения в стране была создана сеть учреждений, центров по предупреждению и борьбе со СПИД [41-43]. В задачи этих учреждений вошли организация сероэпидемиологического скрининга населения, клинико-иммунологическое обследование выявленных больных и инфицированных лиц, их диспансерное наблюдение и лечение.

С течением времени вышеописанная нормативная база дополнялась и совершенствовалась. Ниже представлены основные документы, которые определяют порядок лабораторной диагностики, эпидемиологического надзора, оказания медицинской помощи и организации работы здравоохранения по теме ВИЧ-инфекции в целом:

- Федеральный закон от 30.03.1995 № 38-ФЗ "О предупреждении распространения в Российской Федерации заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция)";
- Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;
- Приказ Минздрава России от 16 сентября 2003 г. № 442 «Об утверждении учетных форм для регистрации детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями»;
- Письмо Роспотребнадзора от 23.06.2006 № 0100/6905-06-32 «Об отчетной форме ежемесячного наблюдения по реализации приоритетного национального проекта»;
- МР №5958-РХ "О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам" (утв. Заместителем министра здравоохранения и социального развития РФ 6 августа 2007 года);
- МР № 6963-РХ «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» (утв. Заместителем министра здравоохранения и социального развития РФ 20 сентября 2007 года);
- СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции». Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача РФ 11 января 2011 г.;
- МР 3.1.5.0075/1-13. 3.1.5. "Эпидемиология. Профилактика инфекционных болезней. ВИЧ-инфекции. Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам. Методические рекомендации" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 20.08.2013);
- МР 3.1.0087-14. 3.1. "Профилактика инфекционных болезней. Профилактика заражения ВИЧ. Методические рекомендации" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 18.03.2014);

- МУ 3.1.3342-16 "3.1. Эпидемиология. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией. Методические указания" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 26.02.2016);
- Распоряжение Правительства РФ от 20 октября 2016 г. № 2203-р О Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в РФ на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу;
- Постановление Правительства РФ от 8 апреля 2017 г. № 426 «Об утверждении Правил ведения Федерального регистра лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, и Федерального регистра лиц, больных туберкулезом»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 5 апреля 2019 г. N 199 «Об утверждении ведомственной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми инфекционными заболеваниями»;
- Приказ Федеральной службы государственной статистики № 66 от 14 февраля 2020 г. «Об утверждении формы федерального статистического наблюдения с указаниями по ее заполнению для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за санитарно-эпидемиологической ситуацией по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации» – форма 4;
- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.10.2020 г. № 1129н «Об утверждении Правил проведения обязательного медицинского освидетельствования на выявление вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции)»;
- Распоряжение Правительства РФ от 21 декабря 2020 г. № 3468-р О Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в РФ на период до 2030 г.;
- Приказ Росстата от 30.12.2020 № 863 "Об утверждении форм федерального статистического наблюдения с указаниями по их заполнению для организации Министерством здравоохранения Российской Федерации федерального

статистического наблюдения в сфере охраны здоровья" (с изменениями на 20 декабря 2021 года) – форма 61;

- Приказ Федеральной службы государственной статистики от 30 декабря 2020 года N 867 «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения с указаниями по их заполнению для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за санитарным состоянием субъекта Российской Федерации» - формы 1 и 2;
- Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 года N 4 Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (с изменениями на 25 мая 2022 года);
- Распоряжение Правительства от 19 октября 2021 г. №2933-р об утверждении плана мероприятий по реализации Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в РФ на период до 2030 года.

Наиболее значимые дополнения в нормативной документации, посвященной эпидемиологическому надзору за ВИЧ-инфекцией, внесенные с 1995-го года описаны в хронологическом порядке ниже.

Федеральным законом от 30.03.1995 № 38-ФЗ «О предупреждении распространения в РФ заболевания, вызываемого ВИЧ» [61] было определено, что медицинское освидетельствование, включающее в себя в том числе лабораторное исследование, осуществляется бесплатно с предварительным и последующим консультированием по вопросам профилактики ВИЧ-инфекции. Освидетельствование проводится добровольно и по желанию освидетельствуемого лица может быть анонимным, за исключением ряда случаев. Обязательному освидетельствованию подлежат доноры крови, биологических жидкостей, органов и тканей. Также обязательному освидетельствованию подвергаются работники отдельных профессий, производств, предприятий, учреждений и организаций. Этим же законом определялось, что государственный надзор в области предупреждения распространения ВИЧ-инфекции

осуществляется уполномоченными федеральными органами исполнительной власти.

Важнейшим документом стали Санитарные Правила и Нормы СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» [54], утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача РФ 11 января 2011 года. Этим документом в том числе были определены и уточнены: современный алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции; порядок освидетельствования на ВИЧ-инфекцию; группы лиц, рекомендуемые для прохождения добровольного тестирования на ВИЧ; организация диспансерного наблюдения за больными ВИЧ-инфекцией; использование генотипирования и филогенетического анализа в качестве дополнительного инструмента при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи или других сложных случаев; формат эпидемиологического расследования в отношении партнеров ВИЧ-инфицированного; государственный санитарно-эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией; санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия при ВИЧ-инфекции и гигиеническое воспитание населения.

В методических рекомендациях МР №5958-РХ, утвержденных 6 августа 2007 года, а затем МР 3.1.0087-14 «Профилактика заражения ВИЧ», утвержденных 18 марта 2014 года [23, 25], подробно представлены комплексные подходы к проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий при ВИЧ-инфекции. В частности, описаны: (1) мероприятия, проводимые в отношении источников возбудителя; (2) мероприятия, направленные на пути и факторы передачи вируса; (3) мероприятия в отношении восприимчивого контингента в выявленном очаге инфекции; (4) профилактика заражения ВИЧ-1, в том числе, среди специализированных групп населения.

Методическими рекомендациями МР 3.1.1.0075/1-13 «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам», утвержденными 20 августа 2013 года [26], были определены основные принципы организации и порядок осуществления эпидемиологического

надзора за распространением штаммов ВИЧ-1, резистентных к АРВ препаратам. Целью предложенных подходов по мониторингу за циркулирующими генетическими вариантами ВИЧ-1 являлась минимизация возникновения и распространения резистентных форм вируса на территории страны.

Методическими указаниями «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией», утвержденными 26 февраля 2016 года [28], определены основные принципы организации и порядок осуществления эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией. В документе описаны: организация системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией, этапы проведения эпидемиологического расследования, профилактические и санитарно-противоэпидемические мероприятия, мониторинг и оценка эффективности мероприятий по противодействию эпидемии ВИЧ-инфекции, а также оценка и прогнозы развития эпидемии.

В Государственных стратегиях противодействия распространению ВИЧ-инфекции в РФ от 2016-го [50] и 2020-го года [51] в разделе, посвященном совершенствованию эпидемиологического контроля и надзора, указывается о необходимости проведения молекулярно-эпидемиологических исследований в целях максимально полного анализа особенностей штаммов ВИЧ-1, циркулирующих в Российской Федерации.

Приказом Росстата № 863 [46] от 30 декабря 2020 года утверждена годовая форма федерального статистического наблюдения №61 «Сведения о ВИЧ-инфекции». Данная форма содержит информацию о: числе пациентов с впервые в жизни установленным диагнозом «ВИЧ-инфекция», движении и обследовании пациентов с ВИЧ-инфекцией, результатах лабораторного обследования на антитела к ВИЧ, выявлении и лечении сопутствующих заболеваний у ВИЧ-инфицированных, диспансерном наблюдении за беременными с ВИЧ-инфекцией, а также результатах лечения у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Приказами Росстата № 66 [45] и № 867 [47] от 2020-го года утверждены месячные и годовые формы 1, 2 и 4, содержащие сведения о результатах

исследования крови на антитела к ВИЧ, а также регистрации случаев заболеваний и смерти.

Постановлением главного государственного санитарного врача РФ в 2021-м году введены в действие санитарные правила [55], в разделе VI которых (Профилактика ВИЧ-инфекции) обновлена информация касательно выявления, учета и регистрации ВИЧ-инфекции; организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, мероприятиям в эпидемическом очаге, профилактическим мероприятиям, гигиеническому воспитанию и обучению граждан. В разделе, посвященном обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия в целях предупреждения распространения ВИЧ-инфекции, в частности, определена необходимость анализа ЛУ ВИЧ-1 у пациентов, как у пациентов на старте АРВ-терапии, так и у пациентов, получающих АРТ. Также в документе уточнены контингенты, подлежащие обязательному медицинскому освидетельствованию и рекомендуемые для добровольного обследования на ВИЧ-инфекцию.

Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией – это система постоянного слежения за проявлением эпидемиологических процессов, в том числе за динамикой, структурой, территориальной распространенностью заболевания с учетом различных социально-демографических процессов и поведенческих тенденций, наблюдающихся в социуме [28]. Целью государственного санитарно-эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации является оценка эпидемиологической ситуации, тенденций развития эпидемического процесса; слежение за охватом населения профилактикой, диспансерным наблюдением, лечением и поддержкой при ВИЧ-инфекции, эффективностью проводимых мероприятий для принятия управленческих решений и разработкой адекватных санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией; предупреждение формирования групповых заболеваний ВИЧ-инфекцией, тяжелых форм и летальных исходов. Исходя из этого можно констатировать, что в настоящее время перечисленные выше нормативные

документы не позволяют в полной мере осуществлять эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией, так как они в основном описывают традиционные эпидемиологические подходы. В таблице 2 перечислены все утвержденные нормативно-методические документы, в которых присутствовало описание применения молекулярно-генетических и биоинформатических методов.

До проведения настоящего исследования только в двух документах были описаны возможности биоинформатических методов. В методических рекомендациях "О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам" [23] описывались подходы по проведению надзора за лекарственной устойчивостью вируса среди недавно инфицированных пациентов, а также пациентов, принимающих АРВ препараты. В методических рекомендациях «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» [24], утвержденных в 2007 г., указывалось о возможности проведения генотипирования ВИЧ, однако повсеместное распространение на территории страны ВИЧ-1 субтипа А, делало предлагаемый подход малоинформативным.

Таблица 2 – Перечень утвержденных нормативно-методических документов, регламентирующих применение молекулярно-генетических и биоинформатических методов

Нормативно-методический документ	Год утверждения	Регламентируемая область применения молекулярно-генетических и биоинформатических методов	Разделы документа	Примечание
МР 5958-РХ "О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам" (утв. Заместителем министра здравоохранения и социального развития РФ 6 августа 2007 года)	2007	Описание подходов к осуществлению эпидемиологического надзора за генетическими вариантами ВИЧ для минимизации распространения резистентности к АРВ препаратам	Весь документ	Документ был разработан до начала выполнения диссертационного исследования
МР 6963-РХ «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» (утв. Заместителем министра здравоохранения и социального развития РФ 20 сентября 2007 года)	2007	Определение эпидемиологической связи между предполагаемым источником инфекции и реципиентов путем генотипирования ВИЧ	Раздел «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции»	Документ был разработан до начала выполнения диссертационного исследования
СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 11 января 2011 г.)	2011	Проведение эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи или других сложных случаев, с применением генотипирования и филогенетического анализа	Раздел «Организация диспансерного наблюдения за больными ВИЧ-инфекцией»	Раздел был разработан с учетом результатов диссертационного исследования, описанных в главах 4, 5, 6
МР 3.1.5.0075/1-13. 3.1.5 "Эпидемиология. Профилактика инфекционных болезней. ВИЧ-инфекции. Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам. Методические рекомендации" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 20.08.2013)	2013	Описание принципов организации и порядка осуществления эпидемиологического надзора за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к АРВ препаратам	Весь документ	Раздел был разработан с учетом результатов диссертационного исследования, описанных в главах 4, 5, 7
МУ 3.1.3342-16 "3.1. Эпидемиология. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией. Методические указания" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ	2016	Описание целей проведения мониторинга ЛУ ВИЧ, а также применения генотипирования и филогенетического анализа в качестве дополнительного	Разделы «Мониторинг за резистентностью ВИЧ к АРВП и циркуляцией генетических вариантов ВИЧ» и «Использование	Разделы были разработаны на основании результатов диссертационного исследования, описанных в главах 4, 5, 6, 7

Нормативно-методический документ	Год утверждения	Регламентируемая область применения молекулярно-генетических и биоинформатических методов	Разделы документа	Примечание
26.02.2016)		инструмента при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции	генотипирования ВИЧ и филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции»	
СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ от 28 января 2021 г. (с изменениями на 25 мая 2022 года))	2022	Указание о необходимости применения молекулярно-генетических и биоинформатических методов при проведении эпидемиологических исследований случаев ВИЧ-инфекции и оценке ЛУ ВИЧ, а также сборе полученных геномных данных	Пункт 615 о генотипировании и филогенетическом анализе Пункты 667 и 668 о проведении анализа на резистентность ВИЧ к АРВ препаратам и предоставлении результатов исследования	Пункты были сформулированы на основании результатов диссертационного исследования, описанных в главах 4, 5, 6, 7
МР 3.1.0366-25. «Использование генотипирования и филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции и гепатита С» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 19 февраля 2025 г.)	2025	Описание применения методики генотипирования и филогенетического анализа в рамках проведения эпидемиологического расследования	Весь документ	Раздел был разработан на основании результатов диссертационного исследования, описанных в главах 4, 5, 6

Таким образом, анализ действующих и более ранних нормативно-методических документов, регламентирующих систему эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ на момент начала настоящего исследования в 2009-м году, показал ее следующие ограничения.

Во-первых, осуществление мониторинга ЛУ ВИЧ-1 только в формате когортных исследований, либо путем анализа клинических образцов после обследования на ВИЧ в рамках скрининговых исследований. Однако серьезные территориальные различия в распространенности резистентности ВИЧ-1 на территории страны, а также значительное количество ВИЧ-инфицированных лиц, делают проведение таких исследований чрезвычайно трудоемкими и дорогостоящими. Анализ литературы показал, что за все время существования указанных нормативно-методических документов в Российской Федерации не было проведено ни одного исследования, удовлетворяющего перечисленным в них критериям [71]. Вместе с тем в настоящее время все шире исследования ЛУ ВИЧ-1 проводятся с клиническими целями как для пациентов без опыта приема АРВ-терапии, так и для пациентов, столкнувшихся с вирусологической неудачей. Результаты таких исследований могут быть с успехом использованы для анализа распространенности резистентности вируса.

Во-вторых, отсутствие рекомендаций и порядка использования филогенетического анализа в ходе расследования случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи. Этот подход, высокая эффективность которого была показана в многочисленных публикациях и зарубежных руководствах, помогает не только определить границы выявленного очага заболевания, но и с высокой степенью достоверности подтвердить или опровергнуть наличие эпидемиологической связи между потенциальным источником и реципиентом инфекции.

В-третьих, наиболее важным с точки зрения эпидемиологического надзора ограничением является отсутствие документов по применению биоинформатических методов анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1

и сопутствующей информации о ВИЧ-инфицированных пациентах при проведении оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа.

Проведенные в литературном обзоре результаты анализа заболеваемости ВИЧ-инфекцией в РФ показывают, что она имеет неодинаковую, иногда разнонаправленную, динамику в разных контингентах и регионах. При этом причины, которые обуславливают эти особенности, зачастую остаются невыясненными. Анализ динамики заболеваемости может быть проведен путем изучения выявляемости ВИЧ-инфекции среди различных контингентов. Однако хотя показатель выявляемости и указывает на интенсивность эпидемического процесса, тем не менее он не позволяет определить источник инфекции, а также определить границы эпидемического очага.

Дополнительную сложность для надзора несет стигматизация заболевания. В результате снижается качество собираемой информации, а в некоторых случаях происходит искажение собираемых данных. В частности, согласно данным информационных бюллетеней «ВИЧ-инфекция», на протяжении длительного периода времени (с 1987 по 2020 гг.) для 43,3%-50,8% зарегистрированных ВИЧ-инфицированных лиц не был определен главный фактор заражения. А в 2021 и 2022 гг. доля таких невыясненных случаев выросла до 59,2% и 80,5% соответственно.

Таким образом, проведенный анализ показывает, что существующая в Российской Федерации система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией не всегда позволяет определить причины регистрируемых изменений в динамике и структуре заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Для более глубокого понимания причин изменений в эпидемическом процессе могут быть применены молекулярно-генетические и биоинформатические методы анализа данных. А дополнение ими отечественных нормативно-методических документов позволит более эффективно препятствовать развитию эпидемии в стране.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИЧ-1

На момент выполнения настоящего исследования в Российской Федерации единственным доступным набором реагентов являлся набор Viroseq производства компании Celera Diagnostics (США), позволяющий определять нуклеотидные последовательности генов протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1 с помощью секвенирования по Сэнгеру. Возможностей указанной тест-системы было недостаточно для определения ЛУ ВИЧ-1 к основным классам АРВ препаратов и применения в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией, поэтому были разработаны два набора реагентов, которые позволили секвенировать более обширные области генома ВИЧ-1 различными способами.

4.1 Разработка набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq»

Первым набором, который был разработан, являлся набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq», основанный на классическом методе секвенирования по Сэнгеру и позволяющий определять нуклеотидные последовательности генов протеазы (pro), обратной транскриптазы (rev), интегразы (int) и V3 петли гена белка оболочки gp120 (env). Разработка набора реагентов осуществлялась в период с 2008-го по 2011-й годы. В 2012-м году набор реагентов успешно прошел технические и клинические испытания и был зарегистрирован в качестве медицинского изделия для диагностики *in vitro*, о чем было получено регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02414 от 11 апреля 2012 года (Приложение 2).

В рамках настоящего исследования были проведены следующие работы:

- Подбор олигонуклеотидов для амплификации и секвенирования различных фрагментов генома ВИЧ-1,

- Подбор компонентов реакционной смеси для наиболее эффективного прохождения реакций ОТ и ПЦР, а также оптимизация программ амплификации,
- Разработка и валидация программного обеспечения для сборки, анализа качества и редактирования консенсусной последовательности ВИЧ-1 на основании нескольких хроматограмм,
- Проведение испытаний для определения и подтверждения аналитических и диагностических характеристик набора реагентов (чувствительность, специфичность).

Наиболее широко используемыми классами АРВ препаратов являются НИОТ, ННИОТ и ИП. Еще одним классом, появившимся позднее, но в последнее десятилетие становящимся все более популярным, является класс ИИ. Кроме того, существует класс препаратов CCR5-антагонистов, являющийся малораспространенным, однако для некоторых групп пациентов чрезвычайно востребованным. В связи с этим нами была разработана система амплификации и секвенирования всех генов ВИЧ-1, в которых возможно появление мутаций ЛУ в ответ на применение АРВ препаратов указанных классов. Подобранные олигонуклеотиды позволили осуществлять определение нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 следующих регионов генома (позиции указаны для референсного штамма ВИЧ-1 HXB2 (GenBank K03455)):

- с 2096-го по 3364-й нуклеотид, фрагмент ДНК, включающий весь ген протеазы и с первой по 265-ю аминокислоту ген обратной транскриптазы,
- с 4158-го по 5199-й нуклеотид, фрагмент ДНК, включающий весь ген интегразы,
- с 6976-го по 7352-й нуклеотид, фрагмент ДНК, включающий V3 петлю гена белка gp120.

В связи с необходимостью высокой чувствительности набора реагентов была разработана «гнездовая» система амплификации, в рамках которой на первом этапе происходит обратная транскрипция, совмещенная с полимеразной

цепной реакцией, а на втором этапе амплифицируется менее протяженный фрагмент ДНК с использованием «вложенных» олигонуклеотидов. Также для получения необходимой аналитической чувствительности набора реагентов все четыре фрагмента генома (pro, rev, int, env) амплифицируются отдельно. Вследствие высокой variability ВИЧ-1 для повышения надежности определения нуклеотидной последовательности каждый нуклеотид должен быть отсеквенирован дважды. В связи с этим олигонуклеотиды для проведения реакции циклического секвенирования были подобраны с учетом этого требования (рисунок 4).

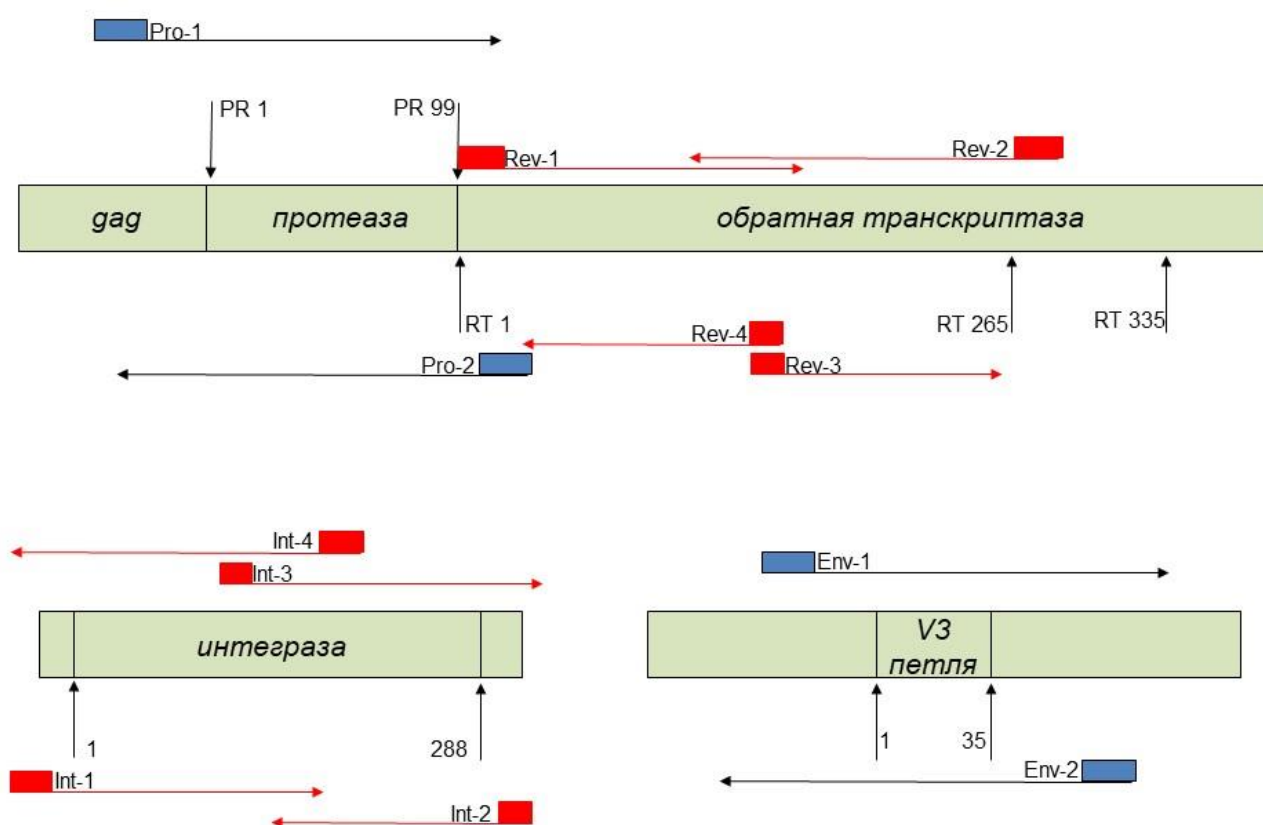


Рисунок 4 – Схема расположения секвенирующих олигонуклеотидов набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq». Внутри блоков зеленого цвета указаны названия генов ВИЧ-1, Горизонтальными стрелками и названиями (Pro, Rev, Int, Env) указано расположение олигонуклеотидов и направление, в котором

происходит секвенирование вируса. Вертикальными стрелками и цифрами указаны начало и конец генов или их фрагментов, подвергающихся секвенированию

Для осуществления анализа полученных в результате секвенирования хроматограмм, редактирования консенсусной последовательности вируса и поиска мутаций ЛУ ВИЧ-1 было разработано два вида программного обеспечения (ПО) для обработки результатов секвенирования нуклеотидных последовательностей: «ДЕОНА» и «АмплиСенс Resist» (Приложение 3), на каждое из которых были получены свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ. Указанные программы после загрузки в них набора хроматограмм фрагментов генома ВИЧ-1 осуществляют сборку консенсусной последовательности, а затем анализ ее качества. Далее пользователь может провести редактирование итоговой последовательности, либо отдельных хроматограмм. После завершения редактирования программа проводит поиск мутаций ЛУ к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП, ИИ с помощью алгоритма Стэнфордского университета, а также определяет тропизм вируса с помощью алгоритма института биоинформатики Макса Планка. После этого пользователь может заполнить основные демографические, клинические и эпидемиологические данные о пациенте и сформировать отчет о результатах ЛУ ВИЧ в формате *.pdf для лечащего врача. Программное обеспечение осуществляет также контроль качества проведенного исследования и сообщает пользователю, в каких случаях и по какой причине полученный результат является невалидным. Таким образом, разработанное ПО позволяет сотруднику лаборатории в полуавтоматическом режиме провести финальную часть исследования.

Подтверждение аналитических и диагностических характеристик «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» осуществлялось в рамках регистрации набора реагентов в качестве медицинского изделия. В ходе экспериментов использовались стандартные образцы предприятия, содержащие РНК и ДНК ВИЧ-1 в известной концентрации, цельная кровь, плазма крови и лейкоциты

крови от ВИЧ-негативных доноров, а также 57 образцов плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусной нагрузкой в диапазоне от $3,20E+02$ до $5,87E+06$ копий РНК ВИЧ/мл. В качестве набора сравнения (референсный набор) была использована тест-система для выявления мутаций лекарственной устойчивости в генах обратной транскриптазы и протеазы ViroSeq HIV-1 Genotyping (Celera Diagnostics, США).

В результате испытаний было показано, что максимальная аналитическая чувствительность при анализе 1 мл плазмы крови составляет 100 копий РНК ВИЧ-1/мл. Подробные характеристики аналитической чувствительности представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq»

Вид клинического материала	Объем экстракции, мкл	Комплект для выделения РНК/ДНК	Мишень	Аналитическая чувствительность
Плазма крови	200	«РИБО-золь-Е»	Гены протеазы, обратной транскриптазы, интегразы, белка оболочки	500 РНК ВИЧ-1, копий/мл
Плазма крови	1000	«РИБО-золь-Е»	Гены протеазы, обратной транскриптазы, интегразы, белка оболочки	100 РНК ВИЧ-1, копий/мл
Лейкоцитарное кольцо, полученное из цельной крови	250	«РИБО-преп»	Ген белка оболочки	500 ГЭ/мл* ДНК ВИЧ-1
Сухая капля крови	- (один круг, d=12 мм)	«РИБО-преп»	Ген белка оболочки	5000 ГЭ/мл ДНК ВИЧ-1

* Количество геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК ВИЧ-1 в 1 мл образца клинического материала.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проводилась посредством добавления в реакцию геномной ДНК или РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека типы 6, 8, парвовирус B19, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки западного Нила, аденовирус типы 2, 3, 7, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Homo sapiens*. Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

Сравнительные испытания с референсным набором показали, что использование набора «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» в реальной клинической практике позволило не только выявить в гене протеазы те же минорные мутации резистентности и полиморфные аминокислотные позиции, что и при использовании референсного набора, но и определить дополнительно 1 минорную мутацию (F53L) и 5 полиморфизмов (L38F, I62V, L63P/T, I66V, I93L), которые не выявлялись референсным набором. Аналогичным образом, в гене *rev* при использовании набора «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» кроме таких же мутаций резистентности и полиморфизма, что при использовании референсного набора, были выявлены дополнительные замены: 1 мутация резистентности к ННИОТ (K101A/E/T) и 6 мутаций полиморфизма (K122E, I135K/R/T, N147D, S162N, S163R, T165I). Таким образом, было показано, что набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» работает адекватно и не уступает набору сравнения в диагностической чувствительности и эффективности обнаружения мутаций резистентности в генах протеазы и обратной транскриптазы, а по некоторым параметрам и превосходит его.

4.2 Разработка набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS»

Появление технологии массового параллельного секвенирования позволило осуществить разработку набора реагентов, являющегося более информативным и производительным по сравнению с описанными выше и основанными на технологии классического секвенирования по Сэнгеру. Основными преимуществами данного набора реагентов должны были стать:

- улучшенная чувствительность в отношении выявления минорных вариантов вируса в организме,
- увеличение протяженности секвенируемой области генома вируса,
- повышение пропускной способности лаборатории.

Кроме того, при анализе большого количества клинических образцов одновременно, стоимость исследования была бы ниже по сравнению с исследованием с помощью классического секвенирования.

Разработка набора реагентов осуществлялась с 2013-го по 2018-й годы.

Также как и в первом случае, разработка набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS» включала в себя этапы подбора олигонуклеотидов для амплификации, оптимизацию этапов ОТ, ПЦР, подготовки библиотек, секвенирования, анализа полученных данных, валидацию исследования целиком и регистрацию в качестве медицинского изделия для диагностики *in vitro*.

Кодирующая область генома ВИЧ-1 фланкируется длинными некодирующими повторами (long terminal repeat, LTR), позволяющими кДНК вируса встраиваться в геном инфицированной клетки. Для достижения максимальной информативности разрабатываемого набора реагентов олигонуклеотиды для амплификации были подобраны на 5-LTR и 3'-LTR области так, чтобы в результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность для всех структурных и неструктурных белков вируса. Итоговая схема получения фрагментов ДНК для последующей подготовки библиотек представляла из себя «гнездовую» ПЦР, где на первом этапе

проводилась ОТ, совмещенная с ПЦР, а на втором этапе амплификация с «вложенными» олигонуклеотидами. Для каждого клинического образца проводилась независимая амплификация в четырех пробирках перекрывающихся фрагментов ДНК размером от 2637 до 2927 пар нуклеотидов (п.н.). Общая протяженность этих фрагментов составляла 8998 нуклеотидов от 626-го до 9623-го нуклеотида относительно эталонного штамма ВИЧ-1 HXB2 (кодирующая область генома располагается в области от 634-го до 9417-го нуклеотида). Схема расположения олигонуклеотидов для амплификации представлена на рисунке 5.

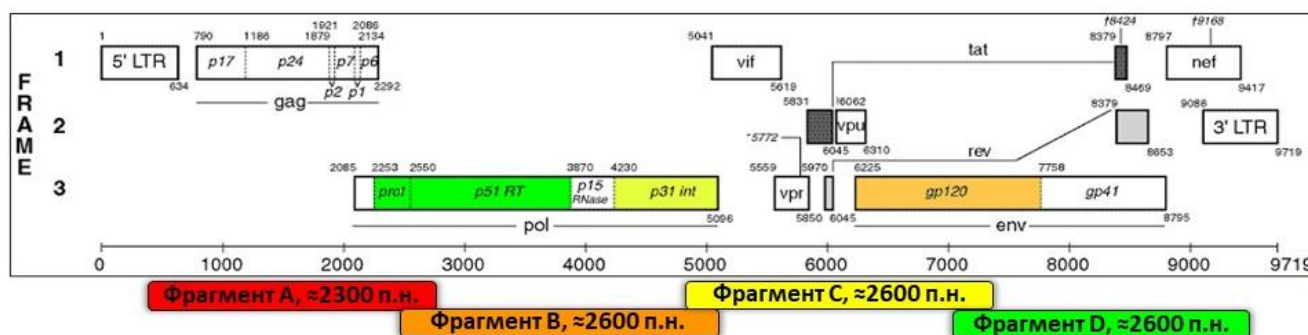


Рисунок 5 – Схема расположения 4-х перекрывающихся фрагментов ДНК (от А до D), амплифицирующихся в процессе подготовки к секвенированию, с указанием протяженности каждого. На карте генома ВИЧ-1 гены, подвергаемые секвенированию с помощью набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq», выделены различными цветами

Итоговая версия процедуры анализа с помощью разработанного набора реагентов выглядела следующим образом.

Экстракция РНК ВИЧ-1 осуществлялась с использованием набора реагентов РИБО-золь-Б (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ). Объем элюции составлял 50 мкл, и 10 мкл использовались для следующей стадии. Протокол получения специфических фрагментов ДНК ВИЧ-1 состоял из двух этапов. Первый этап представлял собой амплификацию в сочетании с ОТ, которую проводили с использованием SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA

Polymerase (кат. № 12574-035, Invitrogen, США). Амплификацию проводили по следующему протоколу: 50 °C - 30 мин; 94 °C - 2 мин; 30 циклов: 94 °C - 15 с, 50 °C - 30 с, 68 °C - 3 мин 30 с; 68°C - 7 мин. На втором этапе проводили гнездовую ПЦР с использованием Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (кат. № M0491S, New England Biolabs, США). Амплификацию проводили по следующему протоколу: 98 °C - 30 с; 30 циклов: 98°C - 10 с, 57°C - 30 с, 72°C - 2 мин; 72 °C - 5 мин.

Амплифицированные фрагменты генома ВИЧ-1 очищали из реакционной смеси с помощью магнитных частиц Sera-Mag Magnetic Speed-beads (диаметр: 1 мкм, 3 EDAC/PA5, GE Healthcare Biosciences), приготовленных, как описано ранее [210], а именно, 40 мкл магнитных частиц дважды промывали раствором консерванта с буфером TE и разводили в 1950 мкл буферного раствора, состоящего из 18% ПЭГ-8000, 1 М NaCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0) и 1 мМ ЭДТА (pH 8,0). Концентрацию фрагментов нуклеиновых кислот определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000с (Thermo Scientific, США) и флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США).

Очищенные препараты амплифицированных фрагментов ВИЧ-1 смешивали в равных пропорциях. Затем 50 нг полученной смеси использовали для приготовления библиотек секвенирования на платформе Illumina. Библиотеки создавали по протоколу Nextera (Illumina, США) с учетом следующих изменений: амплификацию проводили с использованием Q5 High-Fidelity DNA Polymerase и интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium, США). Для повышения производительности и снижения стоимости исследования за один запуск секвенатора анализировалось 48 клинических образцов одновременно.

Качество и распределение длин фрагментов полученных библиотек оценивали на анализаторе Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, США). Длина библиотеки составляла 500-800 п.н. Массовое параллельное секвенирование проводили на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) с набором MiSeq Reagent Kit V2 (500 циклов, кат. № MS-102-2003) или набором MiSeq Reagent Kit V3 (600 циклов, кат. № MS-102-3003).

Обработку результатов секвенирования генома, сборку генома и картирование прочтений проводили с помощью программы Trimmomatic [84] и сборщика переменного вирусного генома VirGenA [242]. Пары чтений, полученные из секвенатора, которые содержали последовательности адаптера и праймеров для ПЦР, укорачивались с помощью Trimmomatic. Затем полученные последовательности картировались на референсный геном HXB2 по алгоритму, аналогичному MOSAIK [171]: чтения локализовали на эталонной последовательности с помощью хэш-таблицы, содержащей положения коротких k-меров HXB2 эталону, а затем были точно выровнены по алгоритму Смита-Уотермана. В соответствии с полученными выравниваниями строилась консенсусная последовательность, которая использовалась в качестве эталона для повторного картирования чтений. Прочтения, полученные после повторного картирования сайтов консенсусной последовательности с плохим качеством выравнивания прочтений, удалялись и повторно собирались *de novo* с помощью итеративного «жадного» алгоритма, который увеличивает по одному нуклеотиду за раз с обеих сторон сайта рестрикции на основе прочтений, частично сопоставленных с последовательностями на краях разреза. Полученную таким образом последовательность использовали в качестве референса для построения окончательного выравнивания всех прочтений и создания окончательной консенсусной последовательности, которая представляла собой окончательную сборку. По завершении биоинформатического анализа получали нуклеотидную последовательность с информацией о покрытии (общее количество прочтений), и для каждого образца определялась степень распространенности каждого нуклеотида (А, Т, G или С) для каждого положения в последовательности.

Валидация разработанного набора реагентов была осуществлена с использованием ДНК плазмид стандартов pNL4-3 (кат. № 114) и pLAI.2 (кат. № 2532), которые представляли собой вектора (NIH AIDS Reagent, <https://www.aidsreagent.org>, США), содержащие полногеномную репликативно и инфекционно активную ДНК ВИЧ-1. Эти стандарты использовались для получения инфекционных вирусных частиц. Получение рекомбинантных

вирусных частиц путем трансфекции клеток НЕК плазмидами проводили по ранее описанной методике [121].

В рамках экспериментов по валидации разработанного набора реагентов были проведены оценки точности секвенирования и чувствительности выявления минорных вирусных вариантов.

Фермент обратная транскриптаза лишена 3'-5'-экзонуклеазной активности и обычно имеет низкую точность; следовательно, во время синтеза кДНК с цепи РНК относительно часто могут возникать ошибки. Другие артефактные изменения в получаемой нуклеотидной последовательности ВИЧ-1 могут возникать во время подготовки библиотеки и собственно секвенирования. Поэтому точность всего исследования оценивалась независимо с использованием матриц плазмидной ДНК и вирусной РНК. Во время этих экспериментов 100 копий плазмидной ДНК использовали в качестве исходных данных для амплификации. Для вирусной РНК использовали вирусы в концентрациях приблизительно $10E+05$ копий/мл.

Точность для образцов, приготовленных из матриц плазмидной ДНК и вирусной РНК, рассчитывали отдельно. Интересно, что точность анализа РНК была выше, чем точность анализа ДНК, хотя разница была статистически недостоверной. Снижение порога чувствительности к минорным нуклеотидам в консенсусных последовательностях приводило к значительно большему количеству вариабельных позиций. Поэтому с уменьшением порога снижалась и точность секвенирования (рисунок 6). При пороге 20% значения точности составили 99,5% для ДНК и 99,9% для РНК, при 5% — 98,7% и 99,6%, и при 1% — 95,0% и 96,9% соответственно.

Когда порог был ниже 1%, была получена отчетливая динамика снижения точности. При пороге 0,5% точность секвенирования ДНК составила 88,1%, а при пороге 0,25% она снизилась до 46,1%. Тем не менее, важно отметить, что все случаи расхождения между полученными последовательностями и последовательностями стандартов, указанных в их паспортах, были артефактными вариабельными позициями, а не полными расхождениями

(например, С против Т). Более того, во всех случаях вариабельность также включала нуклеотид, присутствующий в паспортной последовательности (например, Y (C/T) по сравнению с Т).



Рисунок 6 – Зависимость точности секвенирования стандартов рNL4-3/NL4-3 от установки порога чувствительности к минорным вариантам. Условные обозначения: Точность РНК оценена при анализе образцов, приготовленных из вирусной РНК. Точность ДНК определена путем анализа образцов, приготовленных из плазмидной ДНК. По оси X процентные изменения порога чувствительности представлены в логарифмической шкале

Точность секвенирования и способность выявлять минорные варианты вируса оценивали путем изучения образцов, содержащих смесь вирусов NL4-3 и LAI.2. Нуклеотидные последовательности в анализируемой области двух вирусов различались по 202 позициям (2,25% различий от всей секвенируемой области). Образцы, представляющие собой смесь двух вирусов в соотношении 1:1, 1:4, 1:9, 1:19 и 1:99 (NL4-3: LAI.2), позволили оценить чувствительность метода в отношении присутствия минорных вариантов вируса в смеси в количестве от 50

до 1%. Смеси вирусов NL4-3 и LAI.2 в этих соотношениях приготавливали непосредственно перед экстракцией РНК. Этапы выделения РНК, амплификации и подготовки библиотеки осуществлялись согласно протоколу, описанному выше. Для приготовления смесей использовали вирусы в концентрациях приблизительно $10E+05$ копий/мл. Таким образом, при соотношении 1:99 в биологическом материале для выделения нуклеиновых кислот содержалось около 1000 вирусных частиц минорного варианта, а к этапу ОТ-ПЦР в пробирке присутствовало приблизительно 40 копий. Среднее количество прочтений в проведенных экспериментах составило 3359 (508 - 9821).

В таблице 4 представлены результаты чувствительности, полученные при анализе смесей с различным соотношением вирусов и различными порогами чувствительности. Порог чувствительности варьировался от 1 до 20%.

Как показано в таблице 4, при равенстве порога чувствительности доле присутствия в смеси минорного варианта вероятность обнаружения полиморфного положения варьировала от 75,37 до 88,88 % (эти результаты выделены жирным шрифтом и подчеркнуты). Например, при анализе смеси, в которой NL4-3 составлял 1 %, а LAI.2 — 99 %, и установлении порога чувствительности на уровне 1% правильно идентифицировано 88,88% переменных позиций (2334 из 2626 среди всех 13 проанализированных образцов). Если порог чувствительности был вдвое меньше частоты присутствия минорного варианта в смеси, вероятность обнаружения возрастала до 92,82-96,04% (эти результаты выделены жирным синим цветом и подчеркнуты). Кроме того, вероятность выявления превышала 99%, если порог чувствительности был в 3-10 раз меньше доли присутствия минорного варианта в смеси. Однако, в случае минимального соотношения (1% присутствия минорного варианта) при понижении минимального порога чувствительности до 0,1%, максимальная чувствительность обнаружения минорного варианта с присутствием 1% составила 97,45% (выделено красным жирным шрифтом и подчеркнуто).

Таблица 4 – Вероятность выявления минорной вирусной популяции для различных пороговых значений чувствительности

		Соотношение вирусов в смеси (NL4-3:LAI.2)				
		1% (1:99), 13 образцов	5% (1:19), 11 образцов	10% (1:9), 12 образцов	20% (1:4), 3 образца	50% (1:1), 12 образцов
Порог чувствительности, %	0.1	97.45%	99.86%	99.92%	99.67%	99.83%
	0.25	97.33%	99.77%	99.79%	99.50%	99.67%
	0.5	95.66%	99.50%	99.63%	99.50%	99.55%
	0.75	92.88%	99.41%	99.55%	99.50%	99.50%
	1	88.88%	99.41%	99.50%	99.50%	99.50%
	2	67.67%	96.85%	98.93%	99.50%	99.50%
	3	53.39%	93.16%	98.64%	99.50%	99.50%
	4	45.51%	89.29%	95.96%	99.50%	99.50%
	5	39.03%	85.42%	92.82%	99.50%	99.50%
	6	35.99%	80.60%	89.15%	99.50%	99.50%
	7	32.41%	75.61%	85.11%	99.34%	99.50%
	8	30.58%	72.41%	81.81%	99.01%	99.50%
	9	27.80%	68.81%	78.01%	98.02%	99.50%
	10	24.71%	65.30%	75.37%	96.04%	99.46%
	11	22.51%	61.93%	72.24%	94.39%	99.46%
	12	20.75%	58.42%	69.72%	93.23%	99.42%
	13	18.01%	56.08%	67.20%	91.42%	99.26%
	14	15.54%	53.56%	64.48%	90.26%	99.17%
	15	12.76%	51.44%	62.09%	89.11%	99.05%
	16	10.59%	49.05%	59.03%	88.45%	98.27%
	17	8.19%	46.62%	55.90%	86.96%	97.85%
	18	6.85%	44.96%	53.05%	86.47%	97.52%
	19	5.41%	42.93%	50.58%	85.48%	96.82%
	20	4.15%	41.18%	47.77%	83.99%	96.58%

Градиентом цветов (от зеленого к красному) представлено снижение вероятности выявления минорной вирусной популяции.

В таблице 5 показана точность секвенирования смеси стандартов с различными порогами чувствительности. В этой таблице рассчитана суммарная точность, полученная в результате анализа 51 образца смесей вирусов.

Таблица 5 показывает, что точность лишь незначительно уменьшалась при снижении порога чувствительности с 20% (99,86%) до 4% (99,20%). Тем не менее, при дальнейшем уменьшении порога точность снижалась быстрее, достигая 93,79% при пороге в 1%. При очень низком пороге чувствительности 0,1% правильный нуклеотид в консенсусной последовательности соответствовал

только в 51,56% случаев. Это снижение точности было связано с появлением значительного количества артефактных вариабельных позиций в консенсусных последовательностях.

Таблица 5 – Точность определения нуклеотидной последовательности смеси стандартов при различных порогах чувствительности

Порог чувствительности, %	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2	3	4	5	10	15	20
Точность, %	51.56	71.77	84.89	90.76	93.79	98.00	98.90	99.20	99.37	99.68	99.79	99.86

В ходе экспериментов, выполненных в рамках регистрации в Росздравнадзоре (технические и клинические испытания), были получены следующие характеристики набора реагентов.

Аналитическая чувствительность составила 1000 копий/мл РНК ВИЧ-1 при экстракции из 1000 мкл плазмы крови.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК или РНК следующих организмов и вирусов: HAV (вирус гепатита А), HBV (вирус гепатита В), HCV (вирус гепатита С), HDV (вирус гепатита D), CMV (цитомегаловирус), EBV (вирус Эпштейн-Барра), HSV1, HSV2 (вирус простого герпеса 1 и 2 типов), VZV (вирус ветряной оспы), HHV6 (вирус герпеса 6 типа), Parvovirus B19, TBEV (вирус клещевого энцефалита), WNV (вирус Западного Нила), Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, а также геномной ДНК человека. При тестировании образцов ДНК или РНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Совместное тестирование с референсным набором сравнения (АмплиСенс HIV-Resist-Seq) было проведено на 254 образцах крови от пациентов с ВИЧ-инфекцией, имеющих различный опыт приема АРВ препаратов: 1) не имеющие опыта приема АРВ препаратов (134 образца); 2) имеющие опыт приема АРВ препаратов (120 образцов). Среди пациентов, принимающих АРВ препараты, 27 имели опыт смены терапии, 93 не имели опыта смены терапии. В каждом образце

были исследованы 205 точек возможного появления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, таким образом, общее количество исследованных точек составило 52070. Была получена 100%-ная сходимость результатов двух наборов реагентов. Расчетные значения диагностической чувствительности и диагностической специфичности представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® HIV-Resist-NGS»

Тип исследования	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность, (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %
Лекарственная устойчивость ВИЧ-1	99,6-100	99,9-100
Тропизм ВИЧ-1	90,1-100	98,1-100

На основании успешных результатов испытаний набор реагентов «АмплиСенс® HIV-Resist-NGS» был зарегистрирован в качестве медицинского изделия, что подтверждается регистрационным удостоверением от 16 марта 2018 года № РЗН 2018/6940 (Приложение 4).

Таким образом, были разработаны, валидированы и зарегистрированы в качестве медицинских изделий наборы реагентов, которые позволяют с помощью различных методов секвенирования определять нуклеотидные последовательности различных фрагментов генома ВИЧ-1 и оценивать лекарственную устойчивость ко всем используемым в Российской Федерации АРВ препаратам [15, 35, 116]. Аналитические и диагностические характеристики разработанных наборов превосходят характеристики зарубежной тест-системы Viroseq. При этом стоимость отечественных тестов, согласно исследованию, проведенному «Коалицией по готовности к лечению», в 2,3 раза меньше импортных [2]. В рамках государственных закупок в 2020-2021 годах было проведено 3770 исследований резистентности вируса отечественными тестами.

Важно отметить, что в 2022-м году производство зарубежной тест-системы было прекращено, поэтому в настоящее время разработанные наборы АмплиСенс являются единственными доступными тестами для диагностики *in vitro* на территории РФ, обеспечивая технологическую независимость страны в области клинических исследований ЛУ ВИЧ-1. В дополнение к реактивам было разработано отечественное программное обеспечение, уникальность которого подтверждает полученное свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ (приложение 3). Принцип «облачной» организации ПО позволяет осуществлять анализ нуклеотидной последовательности ВИЧ-1 с использованием наиболее современных алгоритмов интерпретации и выявлять все известные и охарактеризованные мутации резистентности.

Разработанные наборы реагентов используются лабораториями центров по профилактике и борьбе со СПИДом МинЗдрава РФ для выявления ЛУ ВИЧ-1 с целью оптимизации схем АРВ-терапии [22], научно-исследовательскими институтами Роспотребнадзора в ходе расследования случаев инфицирования, потенциально связанных с оказанием медицинской помощи [63], при осуществлении эпидемиологических исследований по надзору за резистентностью ВИЧ-1 в РФ и странах Восточной Европы и Центральной Азии [9, 196, 197], в рамках клинических исследований новых АРВ препаратов [33], а также в ходе исследований генетического разнообразия циркулирующих вариантов вируса [29].

Разработанные наборы реагентов применялись для получения и контроля качества нуклеотидных последовательностей, а также выявления мутаций резистентности вируса при выполнении всех последующих задач настоящего исследования.

ГЛАВА 5. СОЗДАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ БАЗ ДАННЫХ ДЛЯ СБОРА, ХРАНЕНИЯ И АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИЧ-1 И ИНФОРМАЦИИ О ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТАХ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

В рамках осуществления деятельности референс-центра по мониторингу и профилактике ВИЧ и ВИЧ-ассоциированных инфекций ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в 2009-м году была основана Российская база данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам (<https://hivresist.ru/>). На первом этапе в базе данных можно было осуществлять исключительно хранение информации о вирусе и ВИЧ-инфицированных пациентах. В течение продолжительного времени проводилось совершенствование базы данных в отношении удобства сбора информации, а в период с 2020-го по 2022-й годы были значительно расширены ее функциональные возможности. Основной задачей базы являлся сбор стандартизированной деперсонифицированной информации о результатах секвенирования ВИЧ-1 и клинико-эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных пациентах с целью проведения эпидемиологического надзора за резистентностью вируса на территории РФ. В то же время современные исследования показывают [86, 103], что возможности таких баз данных позволяют использовать их не только для мониторинга ЛУ ВИЧ, но и в рамках эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией. В связи с этим Российская база данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам была усовершенствована для применения ее в качестве инструмента в рамках оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа. Также была разработана база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам в странах Восточной Европы и Центральной Азии (ВЕЦА), имеющая аналогичные функции и содержащая информацию о нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1 и сопутствующую информацию о пациентах,

собранные в 6 странах ВЕЦА: Республика Азербайджан, Республика Армения, Республика Беларусь, Кыргызская Республика, Республика Таджикистан и Республика Узбекистан (<https://eecaiv.ru/>).

Разработка баз данных и инструментов для биоинформатического анализа.

Базы данных были написаны на языках PHP, JS, HTML и CSS, а также с использованием платформы Vitrix. На главных страницах баз представлена общедоступная информация, отражающая данные о количестве загруженной информации, зарегистрированных учреждениях (странах), результатах субтипирования и ЛУ ВИЧ-1 в разрезе ФО (Российская БД). Обновление этой информации осуществляется в автоматическом режиме ежедневно и ежемесячно. Получение данных для главной страницы сайта организовано посредством программных интерфейсов приложения в формате *json*.

Было разработано программное взаимодействие со Стэнфордской базой данных (<https://hivdb.stanford.edu/>) для осуществления анализа нуклеотидных последовательностей с целью субтипирования вируса, выявления мутаций резистентности и определения уровня распространенности ЛУ к АРВ препаратам.

Для определения тропизма вируса путем анализа V3-петли гена белка gp120 был применен алгоритм geno2pheno [82], разработанный институтом информатики Макса Планка (<https://coreceptor.geno2pheno.org/>).

Инструмент оценки загружаемых нуклеотидных последовательностей на предмет наличия контаминации был разработан путем адаптации алгоритма Basic Local Alignment Search (BLAST). Пороги, выше которых база данных указывает пользователю на нуклеотидные последовательности, имеющие необычно высокое генетическое сходство, были установлены на уровне 98% и 99% абсолютного и относительного генетического сходства соответственно. Указанные пороги были подобраны эмпирическим путем, а также на основании изучения эпидемиологически связанных пар ВИЧ-инфицированных [77, 217].

Внесение данных о вирусе и ВИЧ-инфицированных пациентах.

Были разработаны два различных подхода для эффективного внесения информации в базы данных. Первый подход удобен в случае внесения информации для небольшого количества пациентов. В таком случае карта пациента заполняется индивидуально для каждого. Пользователь базы, вносящий информацию, выбирает необходимые варианты из предлагаемого заранее подготовленного списка, что позволяет исключить какие-либо ошибки ввода данных. Для ряда параметров, например, регион проживания или АРВ препарат были разработаны соответствующие справочники. Общий вид карты пациента представлен на рисунке 7.

В карте возможно многократное внесение информации о результатах лабораторных исследований (вирусная нагрузка, уровень CD4, нуклеотидная последовательность ВИЧ-1). Возможно частичное внесение информации и последующее редактирование/дополнение записи о пациенте. Обязательными для заполнения являются следующие поля: уникальный номер пациента, участок генома, способ секвенирования и нуклеотидная последовательность.

Добавление записи

Общие сведения

Уникальный номер пациента (Номер карты) *

Тип исследовательского проекта

Пол

не задан

Дата рождения

день.месяц.год

Опыт получения АРВП

не задан

Код инфицирования

не задан

Предполагаемый путь инфицирования

не задан

Предполагаемая дата инфицирования

день.месяц.год

Дата первого ВИЧ+ блота

день.месяц.год

Код обследования

не задан

Страна проживания

Россия

Город проживания

не выбран

Регион проживания

не выбран

Федеральный округ проживания

не выбран

Страна заражения

не выбрана

Регион заражения

не выбран

Стадии заболевания

+ Добавить

Вирусная нагрузка

+ Добавить

Уровень CD4

+ Добавить

Наличие аллели HLA B5701

+ Добавить

ДКП

+ Добавить

Терапия

+ Добавить

Последовательность

+ Добавить

1

Удалить

Дата забора образца

день.месяц.год

Участок генома *

не задан

Способ секвенирования *

не задан

Последовательность *

После сохранения

Остаться на странице

Отправить

Рисунок 7 – Внешний вид индивидуальной карты пациента базы данных при использовании индивидуального внесения информации

Второй подход предпочтителен для использования в случае необходимости внесения информации о большом количестве пациентов. Он осуществляется путем заполнения шаблона в формате *.xls и его последующей загрузки в личном кабинете пользователя базы данных. При заполнении пользователь вносит следующую информацию:

- Тип исследовательского проекта,
- Уникальный номер пациента,
- Пол пациента,
- Дата рождения,
- Дата первого положительного иммунного блота,
- Код обследования,
- Код инфицирования,
- Предполагаемый путь инфицирования,
- Дата инфицирования,
- Получение АРВ препаратов (да/нет),
- Получение ДКП (да/нет),
- Регион проживания (страна, ФО, регион, город),
- Регион инфицирования (страна, регион),
- Стадия заболевания с указанием даты ее установления (возможно многократное последовательное заполнение),
- Вирусная нагрузка с указанием даты забора крови (возможно многократное последовательное заполнение),
- Уровень CD4 с указанием даты забора крови (возможно многократное последовательное заполнение),
- Аллель HLA B-5701 с указанием даты забора крови,
- Информация о схеме ДКП с указанием дат начала и окончания приема препаратов,
- Информация о схемах АРВ-терапии с указанием дат начала и

окончания приема препаратов, а также приверженности пациента (возможно многократное последовательное заполнение),

- Информация о нуклеотидной последовательности ВИЧ-1 с указанием даты забора крови, региона секвенирования (pro-rev, pro-rev-int, int, env, полный геном) и способа секвенирования,
- Дополнительные комментарии.

После завершения заполнения шаблона пользователь может загрузить его в своем личном кабинете базы данных. В момент загрузки происходит проверка правильности заполнения шаблона, в случае возникновения ошибок, база указывает на них, предлагая скорректировать информацию. В любое время пользователь может произвести редактирование, дополнение или удаление записей о пациентах.

Контроль качества и анализ вносимой информации.

База данных позволяет осуществлять контроль качества всей вносимой в нее информации. В отношении эпидемиологических данных оцениваются: уникальность номеров пациентов; корректность дат рождения, иммунного блота, проведенных лабораторных исследований; корректность кодов обследования и инфицирования; правильность перечисленных препаратов в составах ДКП и АРВ-терапии. При обнаружении повторного внесения пациента (в случае совпадения уникальных номеров) база предлагает подтвердить это событие, после чего дополняет более раннюю запись дополнительной информацией. Также во время загрузки информации о новых пациентах в базе проводится поиск возможных дубликатов на основании комбинации, состоящей из даты рождения пациента, даты первого положительного иммунного блота и пола пациента. В случае обнаружения совпадающих по этим характеристикам пациентов пользователю предлагается провести дополнительную проверку этих записей и подтвердить отсутствие в них ошибок.

Разработанная оценка качества нуклеотидных последовательностей

включает в себя анализ следующих характеристик: аминокислотная позиция начала и конца последовательности; число сдвигов рамки считывания, инсерций, делеций, стоп-кодонов, переменных позиций, АРОВЕС и нетипичных мутаций. Загружаемые последовательности анализируются с помощью разработанного в настоящем исследовании алгоритма и при несоответствии помечаются соответствующими флагами. Пользователь может отменить загрузку нуклеотидных последовательностей низкого качества, отредактировать их и затем загрузить повторно, либо подтвердить намерение загрузить последовательности в текущем виде.

Также пользователю доступен инструмент проверки на контаминацию среди загружаемых последовательностей. При запуске данного инструмента пользователь выбирает временной промежуток, за который загружались последовательности, которые он хочет подвергнуть анализу. В ходе работы происходит расчет генетических дистанций проверяемых последовательностей, и в случае обнаружения пар последовательностей с высокой генетической близостью, база данных представляет пользователю их попарный список с указанием абсолютного и относительного сходства в процентах.

После проведения анализа на предмет определения субтипа вируса, выявления мутаций резистентности, оценки уровня ЛУ к АРВ препаратам, а также определения вирусного тропизма, данная информация автоматически добавляется в индивидуальную карту пациента. В случае возникновения необходимости индивидуальная карта может быть сохранена в форматах *.xls или *.pdf.

Для удобства работы с загруженной и проанализированной информацией разработаны возможности экспорта всех данных в табличном формате. Кроме того, существует возможность генерации стандартизированного сводного отчета, содержащего информацию о распространенности генетических вариантов и ЛУ ВИЧ-1 со стратификацией по основным эпидемиологическим характеристикам (пол, возраст, предполагаемый путь инфицирования и т.д.).

Анализ молекулярных кластеров.

Выявление молекулярных кластеров, включающих последовательности ВИЧ-1 от эпидемиологически связанных ВИЧ-инфицированных пациентов, было основано на подходе, в котором после проведения выравнивания нуклеотидных последовательностей производится попарная оценка генетического расстояния между ними. Данный подход был реализован ранее зарубежными авторами и доказал свою эффективность [141, 163]. В отличие от методов, основанных на построении филогенетических деревьев [80], использованный подход является более воспроизводимым и значительно менее вычислительно затратным, что позволяет проводить анализ тысяч последовательностей за несколько минут.

После валидации подхода по выявлению молекулярных кластеров были разработаны методы их анализа. В зависимости от заданных целей пользователь может получить следующие результаты:

- в табличном виде, где произведено сравнение клинико-эпидемиологических характеристик групп пациентов внутри и вне кластеров,
- в виде списка, где пациенты объединены в группы согласно результатам кластеризации.

Использование базы данных.

Согласно СанПиН 3.3686-21, утвержденным 28 января 2021 года [55], лабораториям, проводящим исследования на резистентность ВИЧ-1 к АРВ препаратам, необходимо предоставлять результаты исследований в ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, а МУ от 2016-го года [28] регламентируют использование для осуществления этих действий Российскую базу данных ЛУ ВИЧ-1. Таким образом, усовершенствованная база данных в настоящее время представляет собой инструмент для сбора, хранения и анализа генетической информации о ВИЧ-1 всеми учреждениями, занимающимися изучением вируса на территории РФ.

К 2022-му году в стране около 34 государственных учреждений были оснащены генетическими анализаторами и осуществляли секвенирование ВИЧ-1. По состоянию на 01 июня 2023-го года в Российской базе данных было зарегистрировано 31 учреждения (91%-ный охват). На этот же период 17 учреждений осуществляли активную загрузку данных (таблица 7). Общее количество записей о пациентах составило 10 930, а общее количество нуклеотидных последовательностей – 13 466 штук.

Таблица 7 – Учреждения, являющиеся пользователями Российской базы данных, и объём загруженной информации по состоянию на 01.06.2023

№	Организация	Последовательности участков генома ВИЧ-1					Итого
		pro- rev	int	pro- rev-int	env	Полный геном	
1	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	4728	898	293	850	395	7164
2	Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи	3544	24	0	93	0	3661
3	ФБУН Ростовский НИИ Микробиологии и Паразитологии Роспотребнадзора	175	0	0	0	0	175
4	ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора	106	7	0	0	0	113
5	ГБУЗ «Ямало-Ненецкий окружной центр профилактики и борьбы со СПИД»	21	0	0	0	0	21

№	Организация	Последовательности участков генома ВИЧ-1					Итого
		pro- rev	int	pro- rev-int	env	Полный геном	
6	ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора Сибирский федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД	1548	0	0	0	0	1548
7	ГБУЗ «Клинический центр профилактики и борьбы со СПИД» Министерства здравоохранения Краснодарского края	10	0	0	0	0	10
8	ГУЗ «Липецкий областной Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями»	57	0	0	0	0	57
9	Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД	62	0	0	0	0	62
10	ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора	275	0	0	0	0	275
11	ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора	102	0	0	0	0	102
12	СПб ГБУЗ 'Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями'	208	7	0	0	0	215
13	ГКУЗ Ленинградской области 'Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями'	43	0	0	0	0	43

№	Организация	Последовательности участков генома ВИЧ-1					Итого
		pro-rev	int	pro-rev-int	env	Полный геном	
14	Государственное областное автономное учреждение здравоохранения 'Мурманский областной центр специализированных видов медицинской помощи'	3	0	0	0	0	3
15	ГКУЗ Московской области 'Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями'	3	0	0	0	0	3
16	ГБУЗ Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями	8	0	0	0	0	8
17	Автономное учреждение ХМАО - Югры 'Центр профессиональной патологии'	6	0	0	0	0	6
	Общее количество последовательностей	10899	936	293	943	395	13466

Примечание. Pro — нуклеотидная последовательность гена протеазы ВИЧ-1, rev – гена обратной транскриптазы ВИЧ-1, int – гена интегразы ВИЧ-1, env – гена белка оболочки ВИЧ-1.

Наибольший вклад внесли ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (53,2% от всех загруженных последовательностей), Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (27,2%) и ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора Сибирский федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД (11,5%).

В базе данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам в странах ВЕЦА по состоянию на 01 июня 2023 года содержалась информация о 2424 ВИЧ-инфицированных лицах, из которых 1804 пациента не имели опыта приема АРВ-терапии. Распределение по странам было следующее: Республика Азербайджан –

156 пациентов, Республика Армения – 1019 пациентов, республика Беларусь – 475 пациентов, Кыргызская Республика – 318 пациентов, Республика Таджикистан – 193 пациента, Республика Узбекистан – 263 пациента.

Авторское право пользователей базы данных.

Был тщательно проработан вопрос авторских прав и возможности использования информации, загруженной в базы данных. Каждый пользователь базы имеет возможность использования всех описанных инструментов для внесения, изменения, хранения и анализа информации. Пользователь имеет доступ только к той информации, которую загрузил он сам. Если другой пользователь базы в письменном виде дает согласие на использование своих данных, администратор базы открывает такой доступ другому или другим пользователям. Таким образом, база данных, с одной стороны, позволяет обеспечить полную конфиденциальность загруженной информации, и в то же время создает возможность удобного обмена стандартизированными данными между пользователями в случае осуществления совместных исследований.

Поскольку в рамках нормативных документов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, являющийся разработчиком и администратором баз данных, обязан отчитываться собранной статистической информацией, у сотрудников института присутствует доступ ко всей информации, находящейся в базах. В то же время сотрудники института имеют право использовать этот доступ только для подготовки отчетов о распространенности ЛУ ВИЧ-1 на территории РФ для Роспотребнадзора. Администратор не имеет права никаким другим образом использовать информацию, загруженную другими пользователями, в том числе для подготовки публикаций, докладов и т.д. В связи с этим авторство информации, загруженной определенным пользователем, остается за ним, также как и возможность использования этой информации, например, для создания публикации.

Исследуемая выборка.

В рамках данного исследования с 2014-го по 2022-й годы с помощью Российской базы данных сотрудниками лаборатории диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора была собрана выборка, содержащая 4812 пациентов с ВИЧ-инфекцией. На рисунке 8 представлены пациенты, включенные в настоящее исследование, в зависимости от времени забора крови для проведения секвенирования ВИЧ-1.

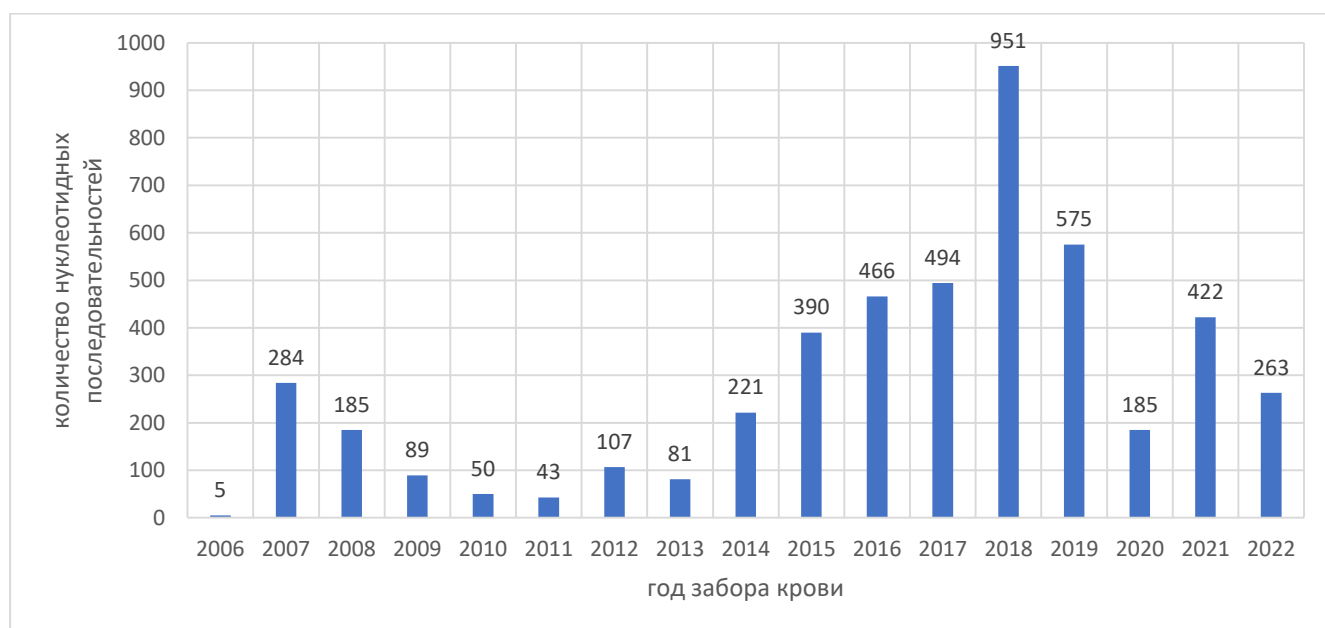


Рисунок 8 – Динамика количества нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от пациентов, включенных в исследование, в зависимости от периода забора крови

Молекулярно-эпидемиологические исследования подразумевают совместный анализ нуклеотидных последовательностей возбудителя и сопутствующих данных о пациенте. В связи с этим в рамках данной работы производился сбор клинико-эпидемиологической информации, при этом особое внимание было уделено сбору данных о поле, возрасте, регионе проживания, предполагаемом пути инфицирования и дате постановки диагноза пациента, а также об опыте приёма АРВ препаратов и применяемых схемах АРВ-терапии, в случае если пациент имел такой опыт. Информация о собранной наиболее значимой информации о ВИЧ-инфицированных пациентах представлена в

таблице 8.

Таблица 8 – Наиболее значимая сопутствующая информация о пациентах, включенных в исследование

Характеристики пациентов		Записи о пациентах	
		абс. число	%
Пол	известен	4678	97,22
	нет данных	134	2,78
Год рождения	известен	4520	93,93
	нет данных	292	6,07
Год первого положительного ИБ	известен	4675	97,15
	нет данных	137	2,85
Предполагаемый путь инфицирования	известен	3540	73,57
	нет данных	1272	26,43
Информация об опыте приема АРВ препаратов	известна	4745	98,61
	нет данных	67	1,39
Регион проживания (ФО)	известен	4681	97,28
	нет данных	131	2,72
Информация о схемах АРВ-терапии	известна	1285	76,17
	нет данных	402	23,83
Стадия заболевания	известна	3202	66,54
	нет данных	1610	33,46
Иммунный статус	известен	3955	82,19
	нет данных	857	17,81
Вирусная нагрузка	известна	3877	80,57
	нет данных	935	19,43

Каждый собранный клинический образец подвергался анализу методом секвенирования. Наиболее часто определялась нуклеотидная последовательность генов протеазы и обратной транскриптазы, этот регион ВИЧ-1 был определен у 4764 пациентов (99%). Ген интегразы был отсеквенирован у 1087 (22,6%) пациентов, фрагмент региона *env* у 845 (17,6%). Реже всего по причине трудоемкости и дороговизны исследования проводилось полногеномное секвенирование (354 чел., 7,4%).

Таким образом, в рамках настоящего исследования была создана база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам в странах ВЕЦА и

усовершенствована Российская база данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам.

Была проведена работа для того, чтобы функционал баз позволял осуществлять сбор клинико-эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных пациентах. Перечень собираемых параметров был составлен с учетом актуальных форм федерального статистического наблюдения, утвержденных к использованию Федеральной службой государственной статистики [45-47]. Разработанные базы данных позволяют собирать нуклеотидные последовательности различных фрагментов генома ВИЧ-1. При этом вся собираемая информация, как клинико-эпидемиологическая, так и геномная, подвергается контролю качества в процессе внесения. Это позволяет исключить ошибки и дублирование записей, а также способствует повышению качества лабораторных исследований ЛУ ВИЧ-1, поскольку базы данных сообщают о невалидных нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1.

Кроме усовершенствованных методик по анализу резистентности ВИЧ-1 к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП, ИИ и определению тропизма, был разработан инструмент по анализу молекулярных кластеров. Данный инструмент в настоящее время может применяться не только для оценки скорости распространения лекарственно-устойчивых вариантов вируса, но и в рамках эпидемиологического надзора. Анализ молекулярных кластеров был валидирован относительно аналогичных подходов, описанных другими научными коллективами. Указанный анализ позволяет сотрудникам эпидемиологического отдела профильных медицинских учреждений, не имеющим опыта в биоинформатике, применять его для оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа с целью выявления очагов заболевания, определения границ очагов, а также оценки эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий. Дополнительно с его помощью возможно осуществление анализа географического распространения возбудителя и выявление завозных случаев инфекции.

В результате выполненных работ был значительно расширен функционал баз данных. В настоящее время они могут использоваться не только для оценки уровня распространенности и структуры ЛУ ВИЧ-1, но и в рамках эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией. Современные работы, посвященные использованию электронных баз данных и биоинформатических методов анализа для оценки ЛУ ВИЧ-1 и изучения особенностей эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в Германии [103], США [75], Швейцарии [202], Бразилии [96], описывают схожий перечень инструментов анализа и объем собираемой клинико-эпидемиологической информации.

На разработанные базы данных и способы их организации были получены свидетельства о государственной регистрации в качестве баз данных и программ для ЭВМ (Приложения 5, 6, 7, 8).

ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ХОДЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РАССЛЕДОВАНИЙ СЛУЧАЕВ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИЧ-1, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Несмотря на то, что основными эпидемиологически значимыми путями передачи ВИЧ-инфекции в мире являются парентеральный при употреблении психоактивных препаратов и половой, случаи передача вируса при оказании медицинской помощи регистрируются достаточно часто с формированием групповых очагов этого заболевания. В СССР первым таким очагом была «Элистинская вспышка», в ходе которой было инфицировано ВИЧ более 260 детей и их матерей [8]. В настоящее время такие случаи продолжают происходить во всем мире, включая территорию Российской Федерации [18]. До 2010-го года в России расследование случаев заражения ВИЧ-1 при оказании медицинской помощи осуществлялось путем проведения эпидемиологического расследования, которое было четко регламентировано только в 2007-м году методическими рекомендациями № 6963-РХ «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» [24]. Использование молекулярно-биологических и биоинформатических методов в этом документе ограничивалось рекомендацией проведения генотипирования ВИЧ-1. При этом, в случае если предполагаемый источник инфекции и исследуемый инфицированный имели разные субтипы вируса, делался вывод о том, что заражение произошло из разных источников. Такой подход был малоэффективен, поскольку на территории страны в этот период более чем в 80% циркулировал (и продолжает циркулировать) вирус суб-субтипа А6. В то же время за рубежом уже с 1990-го года успешно применялся филогенетический анализ для оценки возможности наличия эпидемиологической связи между потенциальным источником и реципиентом инфекции [164, 168].

В 2010-м году нами был проведен анализ зарубежного опыта применения биоинформатических методов в ходе расследований очагов инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи, и впервые в Российской Федерации применен филогенетический анализ для верификации выводов, сделанных в ходе классического эпидемиологического подхода. В течение нескольких лет в рамках расследований нозокомиальных случаев инфицирования проводилась стандартизация использования молекулярных и биоинформатических методов [48, 63]. Они были адаптированы под существующую в стране систему организации эпидемиологического надзора, доступные лабораторные методики и особенности циркулирующих вариантов ВИЧ-1. Результатом этой работы стало создание раздела в методических указаниях 3.1.3342-16 «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией» об использовании филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции, который позднее был дополнительно уточнен [21].

Основные принципы применения филогенетического анализа были сформулированы следующим образом:

- филогенетический анализ является дополнительным инструментом и не может противоречить выводам, сделанным на основании эпидемиологических методов расследования,
- биоинформатический анализ применяется для обеспечения дополнительной доказательной базы, имеет высокую ценность отрицательного и ограниченную ценность положительного результата,
- в анализ должна быть включена контрольная группа сравнения, содержащая 20-30 клинических образцов, собранных от ВИЧ-положительных лиц, проживающих в том же регионе, относящихся к той же группе риска заражения и инфицированных в близкий к исследуемой группе период времени (несколько лет),

- секвенирование ВИЧ-1 может быть осуществлено как с использованием РНК, так и ДНК ВИЧ-1, однако необходимо стремиться, чтобы в рамках одного расследования использовался один тип матрицы для всех анализируемых клинических образцов,
- во избежание получения ложных результатов биоинформатического анализа в результате контаминации или механического перепутывания необходимо максимально внимательно относиться к этапам забора крови и маркировки пробирок,
- с целью повышения достоверности исследования рекомендуется проводить секвенирование не менее двух различных регионов генома вируса, имеющих различную скорость эволюции,
- анализ филогенетического дерева должен осуществляться по таким критериям, как группирование образцов исследуемой группы, величина бутстреп поддержки (достоверности) полученных кластеров и степень генетической близости между нуклеотидными последовательностями.

Все последующие расследования, которые проводились с использованием биоинформатического анализа, осуществлялись с учетом перечисленных принципов.

В период с 2010-го по 2022-й год филогенетический анализ был использован в качестве инструмента при расследовании 72 очагов инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи. Динамика регистрации случаев представлена на рисунке 9.



Рисунок 9 – Динамика регистрации очагов ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи, расследованных с применением филогенетического анализа. Пунктирной линией указана линия тренда

Диаграмма регистрации очагов ВИЧ-инфекции свидетельствует об увеличении частоты их возникновения, за исключением 2020-го и 2021-го годов, что, вероятно, объясняется протекавшей в тот период пандемии COVID-19. Динамика роста количества расследованных очагов может быть обусловлена как постепенным увеличением количества ЛЖВ в стране, так и все более широким применением метода секвенирования при изучении ВИЧ-инфекции с клиническими и научными целями.

С целью повышения эффективности использования молекулярных и биоинформатических методов и снижения доли неопределенных результатов в ходе их применения был осуществлен анализ документации проведенных расследований.

Среди проанализированных 72 очагов секвенирование и последующий филогенетический анализ не были успешно завершены для 14 очагов (19,4% случаев). В 7 случаях расследование не было завершено по причине невозможности получения образцов крови от всех потенциальных источников

инфекции или реципиентов, а в 4-х случаях – вследствие невозможности получения нуклеотидных последовательностей вируса для образцов от ВИЧ-инфицированных, входящих в исследуемую группу. Еще в трех случаях биоинформатический анализ показал 100%-ное сходство нуклеотидных последовательностей образцов исследуемой группы, что крайне маловероятно и требует верификации, однако необходимый для этого повторный забор крови не был произведен. Таким образом, из 72 расследований только в 4-х случаях (5,6%) отсутствие определенного результата было обусловлено ограничениями, связанными с молекулярными и биоинформатическими методами анализа.

Во всех случаях успешного секвенирования загруженные в Российскую базу данных ЛУ ВИЧ-1 нуклеотидные последовательности вируса и сопутствующая деперсонифицированная информация о ВИЧ-инфицированных были подвергнуты дальнейшему анализу.

Расследуемые очаги значительно различались по количеству человек, входящих в исследуемую группу. Они также варьировали по количеству клинических образцов, собранных в качестве группы сравнения. В таблице 9 представлены сводные данные, отражающие общее количество исследованных образцов.

Таблица 9 – Характеристика очагов, успешно расследованных с применением секвенирования и биоинформатического анализа

параметр	размер исследуемой группы	размер группы сравнения	размер группы сравнения, взятой из БД ЛУ ВИЧ-1	кол-во посл-тей, использованных для построения филогенетического дерева по региону pol	кол-во посл-тей, использованных для построения филогенетического дерева по региону env
минимальное количество, чел.	2	0	0	0	0
максимальное количество, чел.	65	48	231	270	104
медиана, чел.	3	15	18	35	31
среднее количество, чел.	6	17	23	42	31
всего, чел.	365	957	1328	2445	1810

Среднее количество ЛЖВ, входящих в исследуемую группу, включающую реципиента/реципиентов и потенциального источника/потенциальных источников, составило 6 человек; группу сравнения (контрольную группу) – 17 человек. При этом среднее количество дополнительно выгруженных из Российской базы данных устойчивости ВИЧ нуклеотидных последовательностей, использованных для повышения достоверности анализа, составило 23 человека. Суммарно, за 13 лет в ходе эпидемиологического расследования 58 очагов было проанализировано 1322 клинических образца. Практически столько же (1328 нуклеотидных последовательностей) было выгружено из базы данных. Таким образом, сбор молекулярных и эпидемиологических данных в Российской базе данных устойчивости ВИЧ позволил вдвое сократить затраты на проведение расследований с помощью метода секвенирования.

Среди 58 успешно расследованных очагов в 41 случае (70,7%) результаты биоинформатического анализа подтвердили наличие эпидемиологической связи между потенциальным источником и реципиентом инфекции, а в 17 случаях (29,3%) – его отсутствие. Необходимо отметить, что при расследовании 4 очагов потенциальные источники инфекции не были выявлены в ходе первоначального эпидемиологического расследования. В этих случаях отрицательный результат филогенетического анализа являлся причиной возобновления эпидемиологического расследования. Продолжение расследования в 3 случаях привело к обнаружению источника инфекции.

Далее был проведен анализ документации успешно расследованных очагов. Были проанализированы временные характеристики очагов: периоды их возникновения, регистрации и локализации. Для этого достаточная информация присутствовала в сопроводительной документации в отношении 31 очага. Краткое описание очагов представлено в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика очагов, использованных для анализа генетической дистанции между реципиентами и потенциальными источниками инфекции в РФ за период 2012-2022 гг.

№	город/регион	период регистрации очага	приблизительная продолжительность инфекции реципиента / реципиентов на момент регистрации очага, месяцы	размер исследуемой группы, чел.	краткое описание исследуемой группы	наличие молекулярного кластера между реципиентом и каким-либо лицом из исследуемой группы
1	Екатеринбург	2012.04	6	4	3 реципиента и 1 потенциальный источник	да
2	ХМАО	2014.08	5	7	2 реципиента и 5 потенциальных источников	нет
3	ХМАО	2015.06	7	21	1 реципиент и 20 потенциальных источников	нет
4	Вологда	2016.02	9	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
5	Бурятия	2016.04	10	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
6	Бурятия	2016.10	2	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	нет
7	Тольятти	2016.11	16	15	1 реципиент и 14 потенциальных источников	да
8	Бурятия	2016.12	33	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
9	Красноярск, 1-й очаг	2016.12	21	5	2 реципиента и 3 потенциальных источника	да
10	Красноярск, 2-й очаг	2016.12	3	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
11	Нижний Новгород	2017.06	5	4	1 реципиент и 3 потенциальных источника	да
12	Курган	2017.07	19	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
13	Курган	2017.08	3	3	1 реципиент и 2 потенциальных источника	да
14	Саратов	2017.10	15	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	нет
15	Московская область, Озеры	2017.12	1	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да

№	город/регион	период регистрации очага	приблизительная продолжительность инфекции реципиента / реципиентов на момент регистрации очага, месяцы	размер исследуемой группы, чел.	краткое описание исследуемой группы	наличие молекулярного кластера между реципиентом и каким-либо лицом из исследуемой группы
16	Курск	2018.04	22	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
17	Нижний Новгород	2018.08	4	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	нет
18	Пермь	2018.11	15	5	2 реципиента и 3 потенциальных источника	нет
19	Курск, 1-й очаг	2019.08	9	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
20	Курск, 2-й очаг	2019.08	15	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
21	Тула	2019.08	12	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
22	Оренбург	2019.11	63	3	1 реципиент и 2 потенциальных источника	да
23	Московская область, Дмитров	2019.12	6	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
24	Рязань	2019.12	7	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
25	Московская область, Солнечногорск	2020.04	64	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
26	Московская область, Раменки	2020.08	23	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да
27	Московская область, Химки	2020.10	12	3	1 реципиент и 2 потенциальных источника	да
28	Бурятия	2021.08	49	3	1 реципиент и 2 потенциальных источника	да
29	Бурятия	2022.06	8	3	1 реципиент и 2 потенциальных источника	нет
30	Московская область	2022.06	7	3	1 реципиент и 2 потенциальных источника	да
31	Московская область	2022.11	4	2	1 реципиент и 1 потенциальный источник	да

Наиболее часто очаги состояли из 1 реципиента и 1-3 потенциальных источников инфекции. В небольшом количестве случаев число потенциальных источников было значительным (от 5 до 20 человек). В 4 очагах количество реципиентов варьировало от 2 до 4 человек.

Промежуток времени между возникновением очага инфекции и его регистрацией значительно варьировал и находился в диапазоне между 1 и 49 месяцами (медиана 12 мес., среднее значение 15 мес.).

Для каждого очага были рассчитаны генетические дистанции между нуклеотидными последовательностями, полученными от реципиента/реципиентов и потенциальных источников. Результаты расчета генетических дистанций представлены в таблице 11 (по региону pol) и таблице 12 (по региону env).

Таблица 11 – Генетическое сходство нуклеотидной последовательности реципиента с нуклеотидными последовательностями потенциальных источников и пациентов контрольной группы по региону pol

№	город/регион	генетическое сходство между реципиентом и источником инфекции в случае НАЛИЧИЯ молекулярного кластера по региону pol, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и потенциальным источником инфекции в случае ОТСУТСТВИЯ молекулярного кластера по региону pol, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и образцом контрольной группы по региону pol, %
1	Екатеринбург	99,8; 99,9	-	90-97,4
2	ХМАО	-	94,1-97,9	86,9-98,6
3	ХМАО	-	94-96,3	87,4-96,8
4	Вологда	99,9	-	89-98,7
5	Бурятия	98,7	-	93,5-95,9
6	Бурятия	-	95,5-95,5	88-97,7
7	Тольятти	99,6	-	90,5-98,3
8	Бурятия	98,8	-	90,1-96,2
9	Красноярск, 1-й очаг	99; 99,7	-	87-97,9
10	Красноярск, 2-й очаг	99,9	-	87,5-94,7
11	Нижний Новгород	100	-	88,8-95,6
12	Курган	99,2	-	88-96,6
13	Курган	99,7	-	88,3-97

№	город/регион	генетическое сходство между реципиентом и источником инфекции в случае НАЛИЧИЯ молекулярного кластера по региону pol, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и потенциальным источником инфекции в случае ОТСУТСТВИЯ молекулярного кластера по региону pol, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и образцом контрольной группы по региону pol, %
14	Саратов	-	95,6-95,6	93,9-95,2
15	Московская область, Озеры	99	-	87,7-95,7
16	Курск	99	-	88,8-96
17	Нижний Новгород	-	95,8-95,8	89,2-95,5
18	Пермь	-	95,3-97,3	93,7-97,4
19	Курск, 1-й очаг	98,5	-	89,4-97
20	Курск, 2-й очаг	99,4	-	90,1-96,4
21	Тула	99,8	-	87,4-96,6
22	Оренбург	98,8	-	90,4-97,1
23	Московская область, Дмитров	99,6	-	88,2-95,5
24	Рязань	100	-	93,3-95,5
25	Московская область, Солнечногорск	99	-	86,9-96,1
26	Московская область, Раменки	99,4	-	92,1-96,4
27	Московская область, Химки	99,5	-	94,9-98
28	Бурятия	97,3	-	90-96,3
29	Бурятия	-	94,7-95,8	85,2-98,2
30	Московская область	99,6	-	89,8-96
31	Московская область	99,3	-	92,9-96

Как следует из таблицы 11, по региону pol в случае формирования молекулярного кластера, включающего нуклеотидные последовательности реципиента и какого-либо из предполагаемых источников инфекции, генетическое сходство между ними находилось в диапазоне 97,3-100%. В случае отсутствия формирования такого кластера генетическое сходство между последовательностью реципиента и наиболее генетически близким потенциальным источником варьировало в диапазоне 94-95,8%. При этом диапазон генетического сходства между образцом от реципиента и наиболее близким образцом контрольной группы составлял 94,7-98,7%.

Таблица 12 – Генетическое сходство нуклеотидной последовательности реципиента с нуклеотидными последовательностями потенциальных источников и пациентов контрольной группы по региону env

№	город/регион	генетическое сходство между реципиентом и источником инфекции в случае НАЛИЧИЯ молекулярного кластера по региону env, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и потенциальным источником инфекции в случае ОТСУТСТВИЯ молекулярного кластера по региону env, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и образцом контрольной группы по региону env, %
1	Екатеринбург	99,5; 99,7	-	78-97,2
2	ХМАО	-	80,6-89	64,5-94,4
3	ХМАО	-	86,1-94,3	73,9-93,6
4	Вологда	96,2	-	72,4-93,5
5	Бурятия	96,2	-	80,7-89,2
6	Бурятия	-	87,8-87,8	75,6-92
7	Тольятти	94	-	84,5-94
8	Бурятия	89,3	-	80,4-91,3
9	Красноярск, 1-й очаг	95,4; 96,6	-	78,1-93,5
10	Красноярск, 2-й очаг	99,4	-	77,9-92,3
11	Нижний Новгород	100	-	75,5-90,7
12	Курган	94,2	-	79,8-90,9
13	Курган	94,9	-	78-95,3
14	Саратов	-	89,1-89,1	86,7-91,4
15	Московская область, Озеры	98,3	-	78,8-91,6
16	Курск	97	-	78,2-91,3
17	Нижний Новгород	-	90-90	78,1-91,7
18	Пермь	-	80,3-91,4	80,3-94,8
19	Курск, 1-й очаг	93	-	75,4-90
20	Курск, 2-й очаг	97,5	-	75,8-89,7
21	Тула	93,1	-	76,9-87,3
22	Оренбург	92,7	-	71,8-95,6
23	Московская область, Дмитров	99,5	-	79,3-94,4
24	Рязань	99,5	-	79,4-90,4
25	Московская область, Солнечногорск	93,7	-	75,9-94,3
26	Московская область, Раменки	99,2	-	81,7-92,2

№	город/регион	генетическое сходство между реципиентом и источником инфекции в случае НАЛИЧИЯ молекулярного кластера по региону env, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и потенциальным источником инфекции в случае ОТСУТСТВИЯ молекулярного кластера по региону env, %	Диапазон минимального и максимального генетического сходства между реципиентом и образцом контрольной группы по региону env, %
27	Московская область, Химки	97,3	-	81,3-91,5
28	Бурятия	90	-	77,6-87,4
29	Бурятия	-	89,4-90,3	80,7-93,7
30	Московская область	98	-	79,2-92,8
31	Московская область	99,3	-	78,7-88,5

Как следует из таблицы 12, по региону env в случае формирования молекулярного кластера, включающего нуклеотидные последовательности реципиента и какого-либо из источников инфекции, генетическое сходство между ними находилось в диапазоне 89,3-100%. В случае отсутствия формирования такого кластера генетическое сходство между последовательностью реципиента и наиболее генетически близким потенциальным источником варьировало в диапазоне 80,3-90%. При этом диапазон генетического сходства между образцом от реципиента и наиболее близким образцом контрольной группы составлял 87,3-97,2%.

Полученные результаты показывают, что в очагах, где была обнаружена связь между реципиентом и потенциальным источником, по обоим регионам генома вируса диапазоны генетического сходства пересекаются:

- по региону pol для пар реципиент-источник – 97,3-100%, для реципиента с контрольной группой – 94,7-98,7%,
- по региону env для пар реципиент-источник – 89,3-100%, для реципиента с контрольной группой – 87,3-97,2%.

Таким образом, было установлено, что при расследовании очагов заболевания невозможно установить постоянный порог генетической дистанции, который может быть использован для оценки связанности между двумя ВИЧ-

инфицированными лицами. При расследовании каждого конкретного очага инфекции этот порог будет индивидуален. В то же время, во всех случаях расследования очагов, где обнаруживался молекулярный кластер из последовательностей региона *pol* (и в 20 из 24 случаев по региону *env*), включающий реципиента и потенциального источника, генетическое сходство последовательностей внутри кластера было выше, чем генетическое сходство с образцами контрольной группы. В очагах, где реципиент и потенциальный источник не образовывали единый кластер, генетическое сходство между ними было сопоставимо с генетическим сходством нуклеотидной последовательности реципиента и образцами контрольной группы. На рисунках 10 и 11 представлены показатели генетического сходства нуклеотидных последовательностей реципиентов, потенциальных источников и образцов контрольной группы для региона *pol* и региона *env* соответственно.

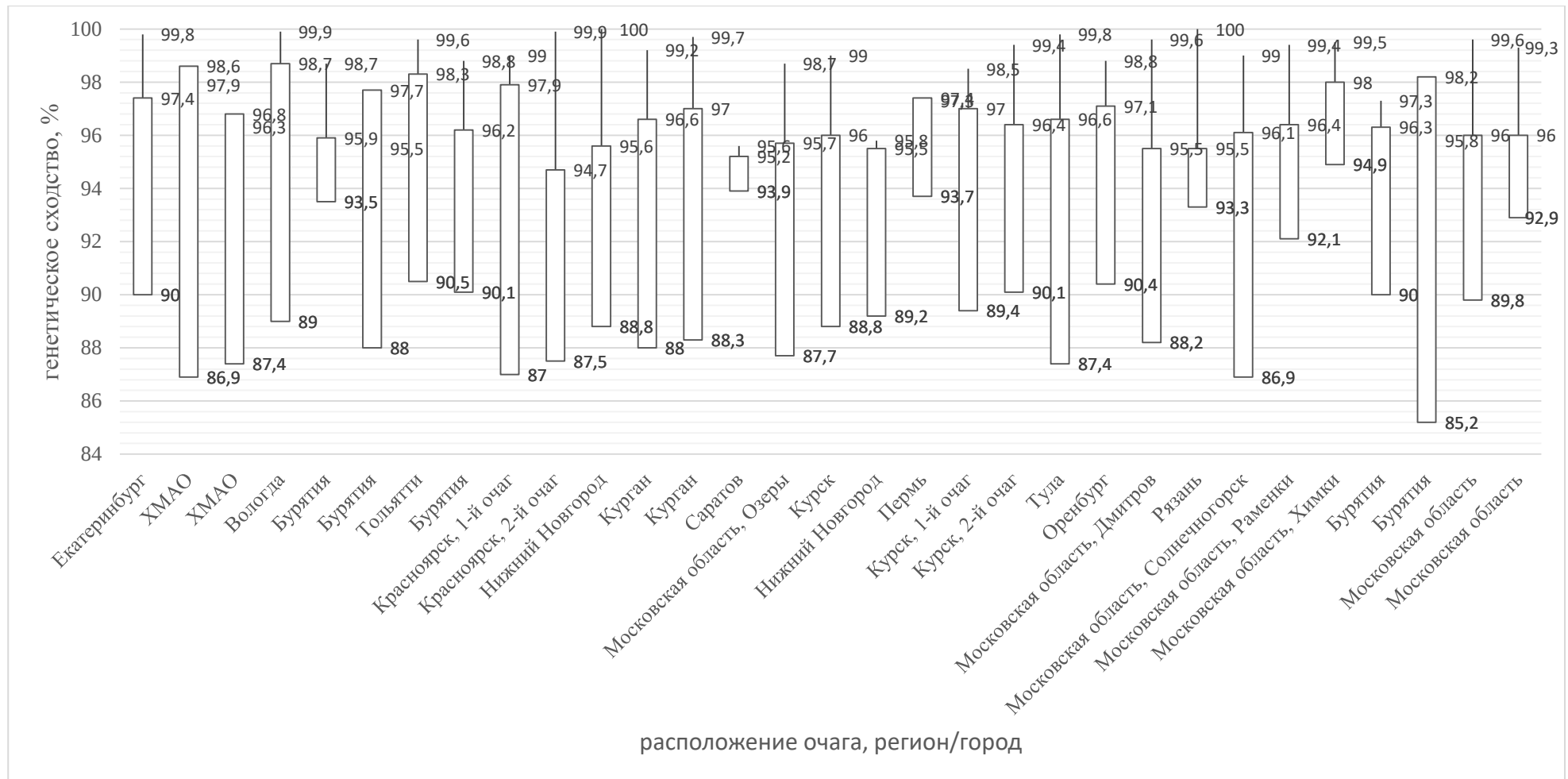


Рисунок 10 – Генетическое сходство нуклеотидных последовательностей реципиентов, потенциальных источников инфекции и образцов от контрольной группы ВИЧ-инфицированных лиц для региона роl

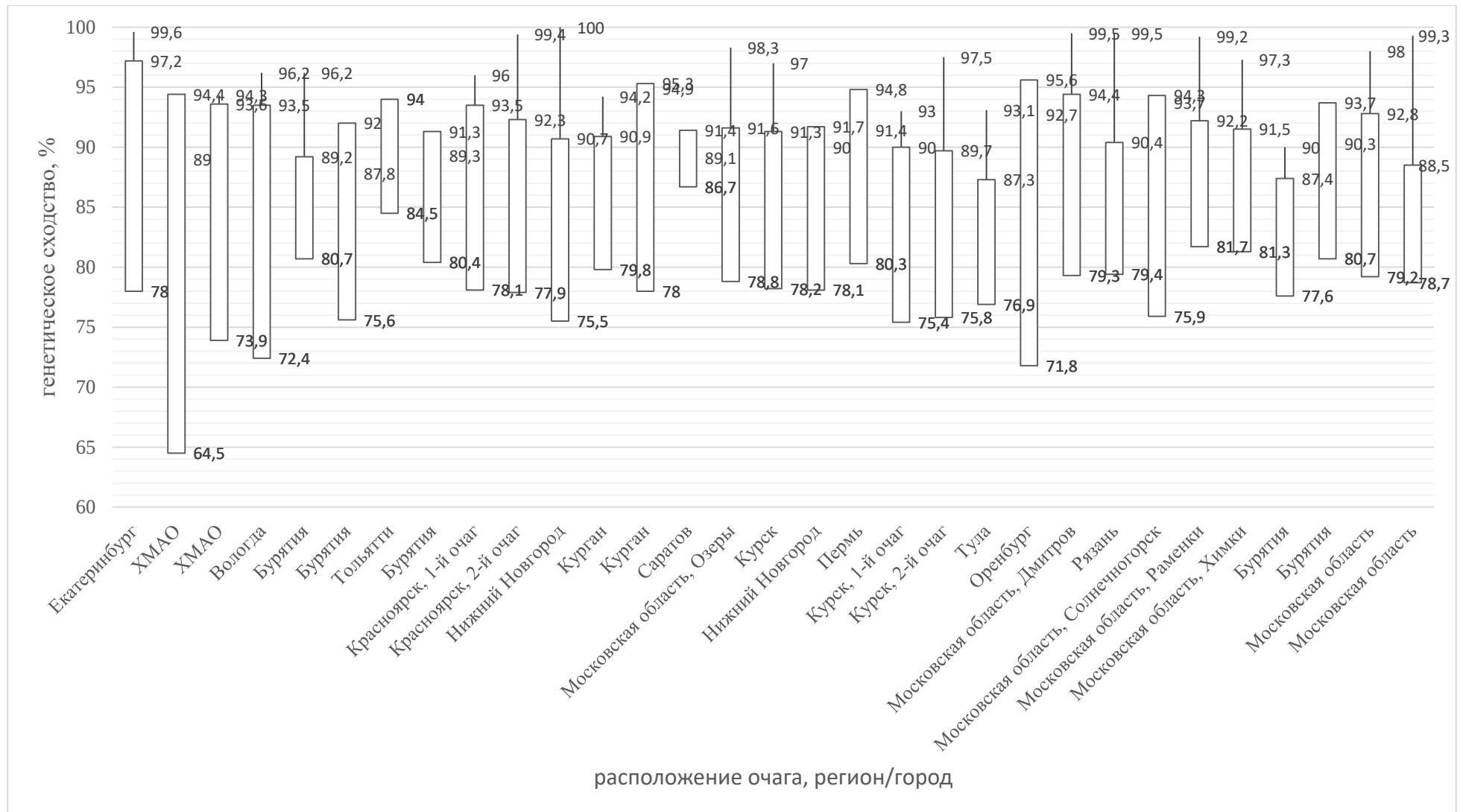


Рисунок 11 – Генетическое сходство нуклеотидных последовательностей реципиентов, потенциальных источников инфекции и образцов от контрольной группы ВИЧ-инфицированных лиц для региона enu

Был также проведен анализ роста генетической дистанции в очагах между кластеризовавшимися образцами от реципиента и потенциального источника с увеличением времени между передачей вируса, установленной на основании результатов эпидемиологических расследований, и забором крови для проведения секвенирования ВИЧ-1. На рисунках 12 и 13 представлены результаты для регионов *rol* и *env* соответственно. Снижение генетического сходства наблюдается для обоих регионов, однако для более консервативного региона *rol* оно происходит с меньшей скоростью. Поскольку подавляющее число очагов регистрировалось в течение 2 лет после возникновения, то достоверно о росте генетической дистанции можно говорить только в этом диапазоне. Как представлено на рисунке 12, для региона *rol* генетическое сходство падает, однако остается выше 98,5% для всех пар реципиент-источник в пределах 36 месяцев после передачи вируса. Для региона *env* генетическое сходство в тот же период времени снижается до уровня 93%, что подтверждает литературные данные [72] о значительно более высокой скорости эволюции генов, кодирующих поверхностные белки ВИЧ-1.

Анализ выборки показал, что средний рост генетической дистанции за 12 месяцев у нуклеотидных последовательностей от эпидемиологически связанных пациентов, не принимавших АРВ препараты, по региону *rol* составляет 0,41%, а по региону *env* 1,99%.

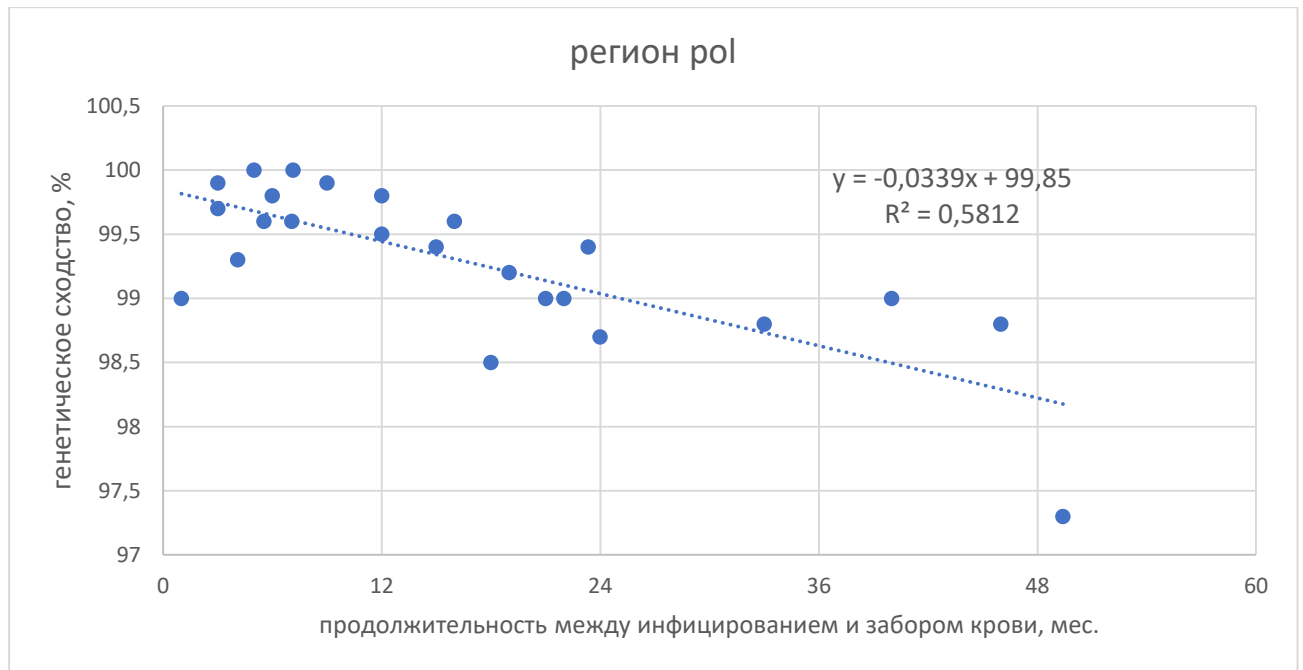


Рисунок 12 – Взаимосвязь генетического сходства нуклеотидных последовательностей региона pol для пар реципиент-источник в зависимости от времени, прошедшего между инфицированием и забором крови для проведения секвенирования ВИЧ-1

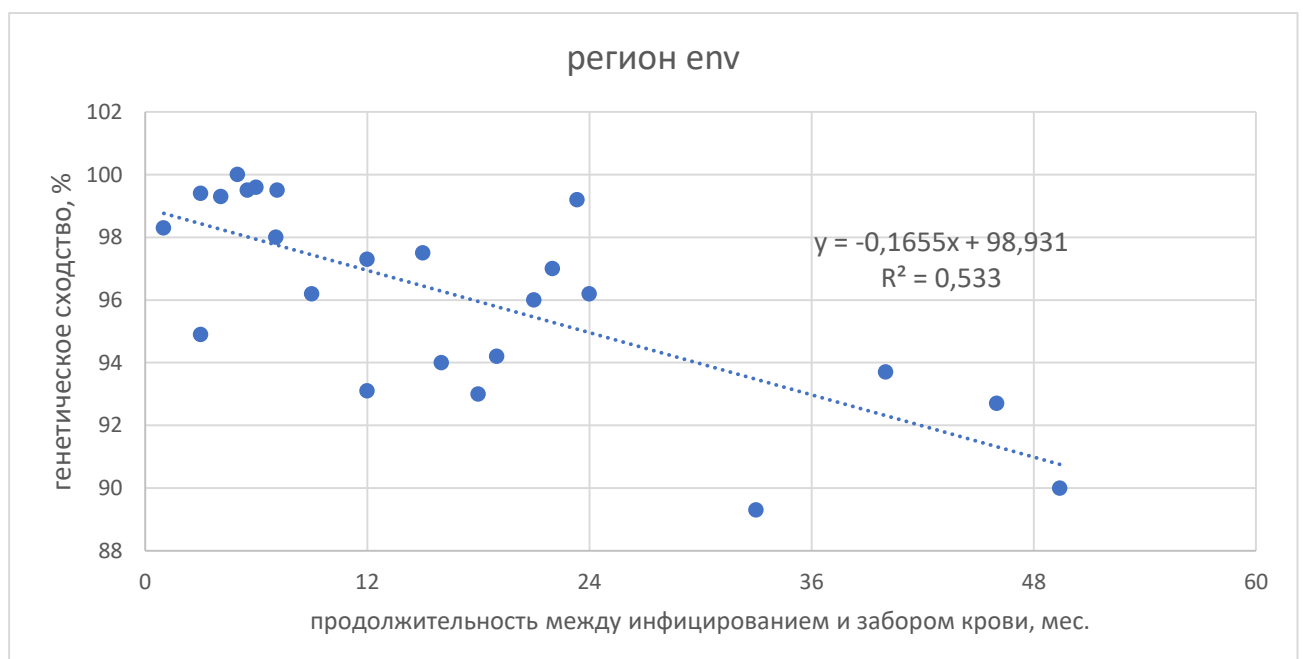


Рисунок 13 – Взаимосвязь генетического сходства нуклеотидных последовательностей региона env для пар реципиент-источник в зависимости от

времени, прошедшего между инфицированием и забором крови для проведения секвенирования ВИЧ-1

Таким образом, результаты проведенного анализа позволили сформулировать ряд рекомендаций, повышающих эффективность использования молекулярных и биоинформатических методов при использовании их в рамках исследований очагов ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи:

- Существующий рост количества расследуемых внутрибольничных очагов требует внедрения биоинформатических методов в работу окружных центров по профилактике и борьбе со СПИДом для децентрализации проводимых исследований,
- Использование при расследовании внутрибольничных очагов нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и клинико-эпидемиологической информации о пациентах, загруженных в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам, позволяет значительно сократить финансовые затраты и сэкономить ресурсы лаборатории,
- Применение в ходе исследований случаев инфицирования при оказании медицинской помощи нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и клинико-эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных пациентах, депонированных в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам, не менее эффективно чем подбор группы сравнения среди ВИЧ-инфицированных согласно критериям (регион проживания, уязвимая группа, период инфицирования), указанным в нормативных документах,
- Несмотря на невозможность установления постоянного порога генетической дистанции для определения связи в паре реципиент-источник, в подавляющем большинстве случаев для вариабельной

области генома (env) и во всех случаях для консервативной области (pol) эпидемиологические связанные ВИЧ-позитивные лица инфицированы вирусами с меньшей генетической дистанцией между собой по сравнению вариантами ВИЧ-1 контрольной группы,

- У эпидемиологически связанных ВИЧ-позитивных лиц скорость роста генетической дистанции между вирусами, которыми они инфицированы, составляет 0,41% для консервативной (регион pol) и 1,99% для вариабельной (регион env) областей генома ВИЧ-1 в год. Эти значения следует использовать для дополнительной верификации в ходе проводимых исследований очагов ВИЧ-инфекции,
- Расследование с помощью биоинформатических методов очагов, регистрация которых произошла более 3-х лет с момента их возникновения, может быть осложнено, поскольку генетическая дистанция между эпидемиологически связанными лицами исследуемой группы становится слишком высокой для проведения кластерного анализа нуклеотидных последовательностей. В таких случаях можно рекомендовать проведение полногеномного секвенирования вируса, поскольку с увеличением протяженности нуклеотидных последовательностей повышается достоверность проводимого филогенетического анализа.

ГЛАВА 7. ВЫЯВЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНЫХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1 И ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В рамках исследования был проведен анализ выборки в отношении ЛУ ВИЧ-1, содержащей 4812 пациентов с ВИЧ-инфекцией и собранной посредством Российской базы данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам сотрудниками лаборатории диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Была оценена резистентность вируса к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП и ИИ.

7.1 Распространенность мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, к препаратам классов ингибиторы протеазы и обратной транскриптазы среди пациентов без опыта терапии

На начальном этапе с использованием инструментов базы данных последовательно был проведен анализ контроля качества и поиск идентичных последовательностей. Из 4764 нуклеотидных последовательностей генов протеазы/обратной транскриптазы, подвергнутые анализу, валидными были признаны 4304 (90,34%) из них. Остальные 460 были исключены либо по причине недостаточной протяженности, либо вследствие низкого качества (наличие стоп-кодонов или значительное количество необычных мутаций). Базой с помощью инструмента, анализирующего результаты на предмет контаминации, также было обнаружено две пары последовательностей, идентичных друг другу. Анализ эпидемиологических данных этих четырех пациентов показал, что заражение первой пары пациентов произошло внутри одного внутрибольничного очага. Вторая пара пациентов являлась половой парой, выявленной и включенной в исследование в момент острой стадии инфекции. Поскольку эпидемиологические

данные подтверждали возможность наличия у пациентов генетически идентичных вариантов вируса, они не были исключены из исследования.

Среди 4304 пациентов 1513 имели опыт приема АРВ препаратов, 2740 не имели такого опыта, а для 51 пациента информация отсутствовала. При осуществлении надзора за распространенностью ЛУ ВИЧ-1 наиболее значимой группой пациентов являются лица, не имеющие опыта АРВ-терапии. Поэтому при оценке ЛУ ВИЧ-1 к препаратам класса НИОТ/ННИОТ/ИП группы пациентов с опытом приема АРВ препаратов, а также без информации о таком опыте, были исключены, и анализ проводился для 2740 пациентов без опыта приема АРВ препаратов.

Для оценки репрезентативности анализируемой выборки было проведено ее сравнение с популяцией граждан РФ с диагнозом ВИЧ-инфекция по таким параметрам, как: пол, год постановки диагноза, предполагаемый путь инфицирования, регион проживания. Для этого были использованы данные на конец 2021-го года, представленные в информационном бюллетене «ВИЧ-инфекция» [13]. Результаты сравнения представлены в таблице 13.

Исследуемая в работе выборка оказалась незначительно смещенной в отношении полового состава лиц с ВИЧ-инфекцией, а также года постановки диагноза. В отношении предполагаемого пути передачи в исследуемой выборке значительно чаще были представлены лица с гомосексуальными контактами, а также гетеросексуальными контактами, в то время как лица с опытом парентерального употребления наркотиков занимали меньшую долю. Значимая смещенность была обнаружена и в отношении распределения пациентов по ФО. Чрезмерная представленность исследуемой выборки по отношению ко всем выявленным ВИЧ-инфицированным лицам наблюдалась для Центрального и Южного ФО, а недостаточная представленность были для пациентов из Сибирского и Северо-Кавказского ФО. Все перечисленные различия между исследуемой выборкой и генеральной совокупностью были статистически достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 13 – Репрезентативность исследуемой выборки пациентов без опыта приема АРВ-терапии

параметр		исследуемая выборка		данные о ВИЧ-инфекции в РФ	
		чел	%	чел	%
пол	мужской	1 536	56,1	971 069	62,3
	женский	1 083	39,5	587 630	37,7
	нет данных	121	4,4	-	-
предполагаемый путь передачи	половой (гомосексуальный контакт)	205	7,5	10 791	0,7
	половой (гетеросексуальный контакт)	1 087	39,7	343 840	22,1
	половой без уточнения	165	6,0	-	-
	вертикальный	10	0,4%	9 743	0,6
	парентеральный (наркотический, ПИН)	530	19,3	467 355	30,0
	при оказании медицинской помощи	12	0,4	471	0,0
	нет данных	731	26,7	725 541	46,5
ФО	ЦФО	1 168	42,6	279 176	17,9
	СЗФО	183	6,7	148 096	9,5
	ЮФО	359	13,1	113 511	7,3
	СКФО	17	0,6	22 704	1,5
	ПФО	432	15,8	347 016	22,3
	УФО	339	12,4	252 830	16,2
	СФО	102	3,7	316 124	20,3
	ДВФО	67	2,4	51 892	3,3
	нет данных	73	2,7	27 350	1,8
год постановки диагноза	2005-2007 гг.	349	13,5	119 836	9,1
	2008-2010 гг.	280	10,8	171 343	13,1
	2011-2013 гг.	212	8,2	210 736	16,1
	2014-2016 гг.	744	28,8	286 922	21,9
	2017-2019 гг.	714	27,6	306 754	23,4
	2020-2022 гг.	288	11,1	215 271	16,4

Среди 2740 проанализированных нуклеотидных последовательностей, полученных от пациентов без опыта АРВ-терапии, хотя бы одна надзорная мутация ЛУ ВИЧ-1 (surveillance drug resistance mutation, SDRM) была обнаружена у 148 (5,40%, 95%-й ДИ 4,61%-6,31%) пациентов. Распространенность мутаций к

- к классу ИП – M46I (17; 0,62%), I85V (7; 0,26%);
- к классу НИОТ – M184V (8; 0,29%), M41L (4; 0,15%);
- к классу ННИОТ – K103N (58; 2,12%), G190S (16; 0,58%), K101E (11; 0,40%), K103S (7; 0,26%), Y181C (7; 0,26%).

мутация	распространенность мутаций (%)
D30N	0.03
M46I	0.62
M46L	0.15
I47V	0.08
I50L	0.03
F53L	0.03
F53Y	0.03
G73S	0.10
V82A	0.07
I84V	0.03
I85V	0.25
N88D	0.03
L90M	0.03
M41L	0.15
K65R	0.03
D67N	0.07
T69D	0.03
L74V	0.03
F116Y	0.03
Q151M	0.03
M184I	0.07
M184IV	0.03
M184V	0.28
T215DY	0.03
T215E	0.03
T215I	0.07
T215S	0.03
T215SY	0.07
T215Y	0.07
K101E	0.40
K101P	0.03
K103N	2.10
K103NS	0.03
K103S	0.25
Y181C	0.25
Y188H	0.03
Y188L	0.03
G190A	0.03
G190S	0.58
M230L	0.03

Рисунок 14 – Распространенность выявленных мутаций ЛУ ВИЧ-1 среди пациентов без опыта АРВ-терапии. Желтым цветом выделены мутации, вызывающие резистентность к классу ИП, синим – к классу НИОТ, зеленым – к классу ННИОТ

Среди мужчин частота встречаемости мутаций была выше ($p=0,02$) и составила 6,38% (98 из 1536) по сравнению с женщинами (4,16%; 45 из 1083).

Была проведена оценка распространенности мутаций в зависимости от региона проживания пациентов с ВИЧ-инфекцией (таблица 14). В зависимости от ФО доля лекарственно-устойчивых вариантов вируса варьировала от 2,94% в Сибирском ФО до 35,29% в Северо-Кавказском ФО. На втором месте по частоте встречаемости резистентных вариантов находился Дальне-Восточный ФО (7,46%). Важно отметить, что высокие цифры распространенности ЛУ ВИЧ-1 в СКФО должны быть более подробно изучены по двум причинам. Во-первых, из-за крайне ограниченного размера выборки (17 образцов) в настоящем исследовании, а, во-вторых, вследствие того, что все 6 образцов, содержащих ЛУ вариант вируса, являлись частью одного внутрибольничного очага. Достоверно реже мутации ЛУ ВИЧ-1 выявлялись в Приволжском ФО (3,01%).

Таблица 14 – Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, в зависимости от региона (федерального округа) проживания

регион	кол-во посл-й ВИЧ-1 с мутациями	общее кол-во посл-й	Распространенность, %	95%-й ДИ	Достоверность различий (p)*
ДВФО	5	67	7,46	2,86-16,68	0,45
ПФО	13	432	3,01	1,72-5,13	<0,001
СЗФО	10	183	5,46	2,88-9,88	0,97
СКФО	6	17	35,29	17,17-58,84	<0,001
СФО	3	102	2,94	0,64-8,66	0,26
УФО	22	339	6,49	4,28-9,67	0,34
ЦФО	70	1168	5,99	4,76-7,51	0,24
ЮФО	16	359	4,46	2,71-7,17	0,40
нет данных	3	73	4,11	0,93-11,88	0,62
ВСЕГО	148	2740	5,40	4,61-6,31	-

* Жирным шрифтом выделены достоверные различия ($p<0,05$)

Анализ выборки при стратификации по путям инфицирования показал, что наиболее часто варианты ВИЧ-1, содержащие мутации ЛУ, встречались среди пациентов, инфицированных в нозокомиальных очагах (25,0%), далее следовал вертикальный путь инфицирования (10,0%). Однако первая группа состояла всего из 12, а вторая – из 10 человек. Для остальных путей заражения распространенность ЛУ вариантов ВИЧ-1 была ниже 10% (таблица 15).

Таблица 15 – Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, в зависимости от пути инфицирования

путь инфицирования	кол-во посл-й ВИЧ-1 с мутациями	общее кол-во посл-й	Распространенность, %	95%-й ДИ	Достоверность различий (p)*
вертикальный	1	10	10,00	0,01-42,6	0,52
гетеросексуальный	51	1087	4,69	3,58-6,13	0,18
гомосексуальный	14	205	6,83	4,02-11,22	0,35
при оказании мед-кой помощи	3	12	25,00	8,27-53,85	<0,001
ПИН	34	530	6,42	4,60-8,85	0,25
половой	13	165	7,88	4,56-13,12	0,15
нет данных	32	731	4,38	3,10-6,13	0,15
ВСЕГО	148	2740	5,40	4,61-6,31	-

* Жирным шрифтом выделены достоверные различия ($p < 0,05$)

Далее была проанализирована распространенность мутаций ЛУ в зависимости от генетического варианта ВИЧ-1, который присутствовал у ВИЧ-инфицированного пациента. Результаты анализа представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, среди пациентов без опыта приема АРВ препаратов в зависимости от генетического варианта вируса у пациента

генетический вариант ВИЧ-1	кол-во посл-тей ВИЧ-1 с мутациями	общее кол-во посл-й ВИЧ-1	распространенность, %	95%-ный ДИ	Достоверность различий (p)*
A1	0	1	0%	-	0,81
A6	107	2245	4,77%	3,96-5,73	<0,001
B	11	187	5,88%	3,21-10,33	0,76
F1	0	1	0%	-	0,81
G	1	36	2,78%	<0,0001-15,42	0,48
CRF01_AE	0	4	0%	-	0,63
CRF02_AG	3	39	7,69%	1,94-21,03	0,52
CRF03_A6B	0	41	0%	-	0,12
CRF14_BG	0	3	0%	-	0,68
CRF19_cpx	1	5	20,00%	2,03-64,04	0,15
CRF20_BG	1	3	33,33%	5,63-79,76	0,03
CRF32_06A6	0	1	0%	-	0,81
CRF56_cpx	0	4	0%	-	0,63
CRF63_02A6	24	170	14,12%	9,62-20,21	<0,001
Всего	148	2740	5,40%	4,61-6,31	-

* Жирным шрифтом выделены достоверные различия ($p < 0,05$)

Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1 была достоверно выше общей распространенности мутаций для генетических вариантов CRF63_02A6 ($p < 0,001$) и CRF20_BG. Однако группа пациентов, инфицированных CRF20_BG, состояла всего из трех человек. Важно отметить также, что распространенность мутаций ЛУ среди ВИЧ-1 суб-субтипа A6 была достоверно ниже ($p < 0,001$) по сравнению с распространенностью в общей выборке. Для всех остальных генетических вариантов различия в частоте распространенности были статистически недостоверны. Среди генетических вариантов F1, CRF01_AE, CRF03_A6B, CRF14_BG, CRF32_06A6, CRF56_cpx не были выявлены вирусы, имеющие мутации резистентности, однако количество клинических образцов с такими вариантами вируса не превышало 50 для каждого в отдельности, поэтому можно предположить, что выборки были недостаточно крупными для анализа.

В связи с тем, что охват АРВ-терапией начал увеличиваться с середины нулевых годов и для повышения достоверности результатов исследования оценка распространенности мутаций ЛУ, важных с точки зрения надзора, была проведена для пациентов, выявленных начиная с 2005-го года с разбивкой на трехлетние периоды (таблица 17, рисунок 15). Было определено, что в целом, распространенность мутаций резистентности за исследуемый период оставалась стабильной с небольшой тенденцией к повышению. Достоверное повышение отмечалось только в последний временной период (2020-2022-й годы постановки диагноза) с ростом до 9,38% ($p < 0,001$).

Таблица 17 – Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, среди пациентов без опыта приема АРВ препаратов с разбивкой на трехлетние периоды

год ИБ "+"	кол-во посл- й ВИЧ-1 с мутациями	общее кол-во посл-й	Распространенност ь, %	95%-ный ДИ	Достоверност ь различий (p)*
2005- 2007	15	349	4,30%	2,57-7,03	0,48
2008- 2010	5	280	1,79%	0,64-4,23	0,01
2011- 2013	14	212	6,60%	3,89-10,86	0,29
2014- 2016	34	744	4,57%	3,27-6,34	0,47
2017- 2019	36	714	5,04%	3,65-6,92	0,98
2020- 2022	27	288	9,38%	6,48-14,85	<0,001

* Жирным шрифтом выделены достоверные различия ($p < 0,05$)

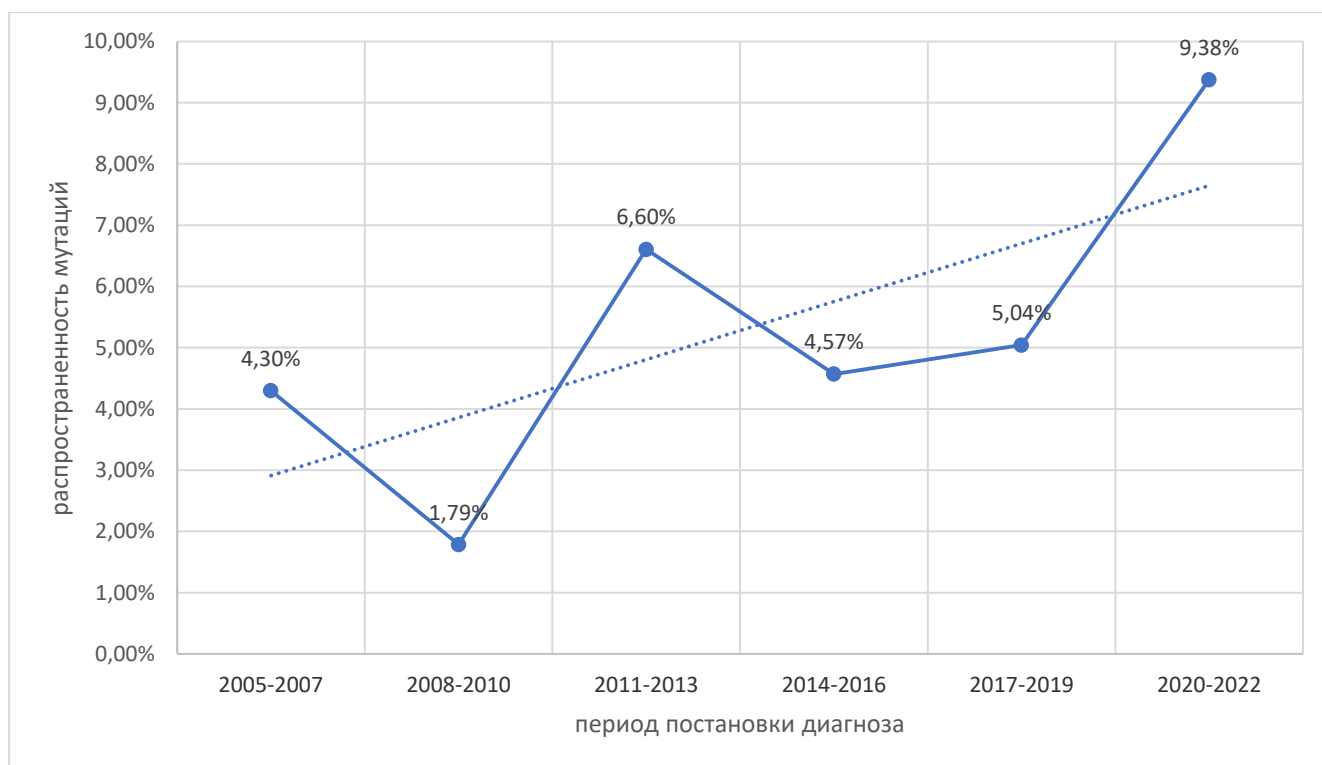


Рисунок 15 – Распространённость мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, среди пациентов без опыта приема АРВ препаратов в зависимости от года диагноза. Пунктирной линией представлена линия тренда

7.2 Резистентность ВИЧ-1 к препаратам классов ингибиторы протеазы и обратной транскриптазы среди пациентов без опыта терапии

Надзор за лекарственной устойчивостью может осуществляться не только путем анализа распространённости мутаций вируса, но также и путем оценки частоты возникновения резистентности ВИЧ-1 к АРВ препаратам. Данный подход рекомендуется ВОЗ в настоящее время [246], поскольку стратегия 95-95-95 подразумевает раннее начало терапии и максимальный охват лечением лиц с диагностированной ВИЧ-инфекцией. В связи с этим был проведен анализ уровня распространённости ЛУ ко всем АРВ препаратам, зарегистрированным в Российской Федерации, за исключением элсульфавирина (ESV), поскольку

существующий паттерн мутаций резистентности к этому препарату нуждается в уточнении [33]. Результаты анализа представлены на рисунке 16.

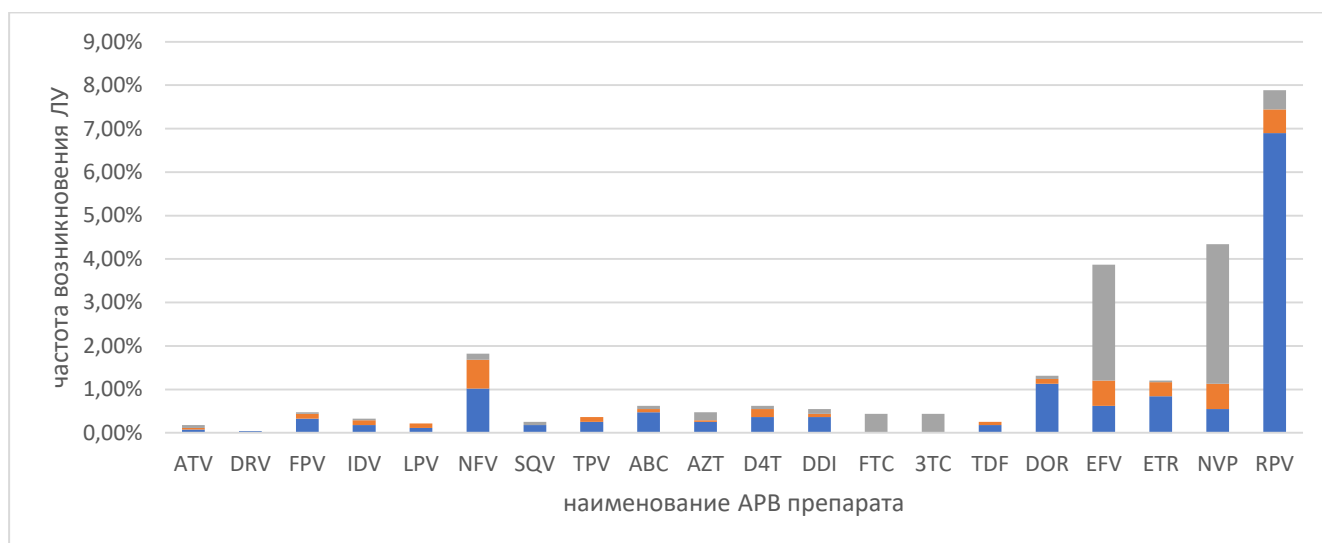


Рисунок 16 – Частота возникновения и уровень распространенности резистентности к АРВ препаратам классов НИОТ, ННИОТ и ИП среди пациентов без опыта терапии. Серым цветом указана ЛУ высокого уровня, оранжевым – среднего уровня и синим – низкого уровня

ЛУ хотя бы к одному АРВ препарату была обнаружена у 344 пациентов (12,56%, 95%-й ДИ 11,37%-13,85%). Самый высокий уровень ЛУ в 10,40% был выявлен в отношении препаратов группы ННИОТ (285 человек). К препаратам групп ИП и НИОТ частота встречаемости ЛУ ВИЧ-1 составила 1,90% (52 человека) и 0,99% (27 человек) соответственно. Резистентность одновременно к нескольким классам препаратов была выявлена у 18 человек (0,66%). Множественная лекарственная устойчивость ко всем трем классам была определена у одного пациента.

Уровень ЛУ выше 1% был выявлен для всех препаратов класса ННИОТ: RPV (7,88%), NVP (4,34%), EFV (3,87%), DOR (1,31%), ETR (1,20%), а также для ингибитора протеазы NFV (1,82%). Важно отметить, что для препаратов NVP и EFV преобладала резистентность высокого уровня. Ко всем препаратам класса НИОТ уровень ЛУ не превышал 1% для каждого препарата в отдельности.

7.3 Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 к препаратам класса ингибиторы интегразы

Мутации ЛУ ВИЧ-1 к препаратам класса ИИ возникают в гене интегразы, который подвергается секвенированию гораздо реже по сравнению с генами протеазы и обратной транскриптазы, в которых возникают мутации резистентности к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП. В связи с этим исследуемая выборка ВИЧ-инфицированных пациентов, для которых были известны нуклеотидные последовательности гена интегразы, была меньше. Также как и в случае с анализом последовательностей генов протеазы и обратной транскриптазы, перед оценкой ЛУ ВИЧ-1 к препаратам класса ИИ был проведен контроль качества последовательностей гена интегразы и проверка на контаминацию. Контроль качества прошли 1175 последовательностей из 1362 (86,3%). Остальные последовательности не прошли контроль качества по причине недостаточной протяженности, либо наличия стоп-кодонов. Проверка на контаминацию выявила 8 пар идентичных нуклеотидных последовательностей от 16 пациентов. Анализ собранной эпидемиологической информации пациентов из этих пар показал, что 12 пациентов пребывали в одном нозокомиальном очаге, а 4 пациента являлись сероконвертерами и партнерами ЛЖВ. Таким образом, у всех пар пациентов, имеющих идентичные нуклеотидные последовательности, была подтверждена эпидемиологическая связь друг с другом. Поскольку эпидемиологические данные подтвердили возможность наличия у пациентов идентичных вариантов вируса, они не были исключены из исследования. Далее проводился анализ 1175 последовательностей.

В отношении опыта приема АРВ-терапии пациенты разделялись на следующие группы: 750 человек не имели никакого опыта приема АРВ-терапии, 342 человека имели опыт приема препаратов, но не имели опыта приема АРВ препаратов класса ИИ, 73 пациента имели в том числе опыт приема ингибиторов интегразы, а для 10 человек опыт приема АРВ-терапии был неизвестен. В связи с

этим группа из 10 человек с неизвестным опытом приема АРВ препаратов была исключена из дальнейшего анализа.

Среди 750 пациентов без опыта АРВ-терапии не было обнаружено мутаций ЛУ, важных с точки зрения надзора, и только у одного человека была обнаружена резистентность к препаратам класса ИИ. Обнаруженная комбинация основной мутации Q164P и дополнительной G163R указывала на высокий уровень устойчивости к элвитегравиру (EVG), умеренный уровень устойчивости к каботегравиру (СAB) и низкий – к ралтегравиру (RAL).

У 342 пациентов, имевших опыт АРВ-терапии, но не принимавших никогда препараты класса ИИ, в двух случаях были обнаружены мутации ЛУ, важные с точки зрения надзора. У первого пациента была выявлена мутация R263K, которая является причиной низкого уровня устойчивости к RAL и умеренного уровня устойчивости к биктегравиру (BIC), долутегравиру (DTG), СAB и EVG. У второго пациента надзорная мутация Y143R была обнаружена вместе с дополнительной T97A, которые определили высокий уровень устойчивости к RAL, умеренный – к EVG и низкий – к СAB.

Таким образом, в рамках настоящего исследования были определены уровень распространенности и структура ЛУ ВИЧ-1 к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП, ИИ, а также проведена оценка клинико-эпидемиологических параметров, ассоциированных с резистентностью вируса.

Анализ мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, был проведен на выборке в 2740 пациентов, не имевших опыта приема АРВ препаратов. Общий уровень распространенности составил 5,40% (148 пациентов, 95%-й ДИ 4,61%-6,31%). Наиболее часто резистентность выявлялась к препаратам класса ННИОТ 3,47% (95 из 2740, 95%-й ДИ 2,84%-4,22%), в меньшей степени к классу ИП – 1,42% (39 из 2740, 95%-й ДИ 1,04%-1,94%) и к классу НИОТ – 0,99% (27 из 2740, 95%-й ДИ 0,67%-1,44%).

Достоверно чаще варианты ВИЧ-1, имеющие мутации ЛУ, важные с точки зрения надзора, присутствовали у мужчин; лиц, проживающих в СКФО (что, однако, было обусловлено смещенностью выборки); в группе пациентов с

нозокомиальным путем передачи; у пациентов, инфицированных генетическим вариантом CRF63_02A6.

Уровень распространенности мутаций ЛУ ВИЧ-1 в зависимости от времени постановки диагноза был достаточно стабилен и находился в диапазоне от 1,79% до 6,60% в период 2005-2019 гг. Однако в заключительном периоде исследования (2020-2022 гг.) был зарегистрирован его достоверный рост до 9,38% (95%-й ДИ 6,48%-14,85%).

Анализ резистентности ВИЧ-1 к АРВ препаратам показал, что хотя бы к одному АРВ препарату резистентность была выявлена у 12,56% пациентов (95%-й ДИ 11,37%-13,85%). Самый высокий уровень распространенности ЛУ в 10,40% регистрировался к препаратам группы ННИОТ, причем к EFV и NVP в основном высокого уровня.

Анализ ЛУ ВИЧ-1 к препаратам класса ИИ осуществлялся на выборке в 342 пациента, имевших опыт АРВ-терапии, но не принимавших никогда препараты класса ИИ, а также среди 750 пациентов без опыта приема каких-либо АРВ препаратов. Среди 342 пациентов у двух были выявлены мутации резистентности, что составило 0,59% распространенности. Среди 750 пациентов без опыта АРВ-терапии распространенность была еще меньше и составила 0,13%. При объединении двух выборок общая распространенность резистентности ВИЧ-1 к АРВ препаратам класса ИИ составила 0,28% (95%-й ДИ 0,05%-0,84%). Полученные результаты показывают, что уровень распространенности ЛУ к препаратам этого класса достоверно ниже 1%.

Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, более 5% и резистентности вируса к АРВ препаратам более 10%, согласно руководствам ВОЗ, обуславливает необходимость непрерывного мониторинга ЛУ среди пациентов без опыта приема АРВ-терапии. Такой мониторинг может осуществляться различными способами. Во-первых, это возможно путем проведения когортных исследований. Именно такой подход в настоящее время рекомендован существующими нормативно-методическими документами. Во-вторых, путем регулярного анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1,

собранных с помощью национальной базы данных. Анализ опубликованных исследований по теме ЛУ ВИЧ-1 в Российской Федерации показывает [71], что второй подход является более эффективным и предпочтительным.

ГЛАВА 8. АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Генетическое разнообразие ВИЧ-1 в РФ было определено путем анализа выборки, описанной в главе 7, а именно 4812 записей о ВИЧ-инфицированных пациентах, содержащих 7164 нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1. Из них 4764 являлись последовательностями генов протеазы и обратной транскриптазы и 354 последовательностями полных геномов вируса. Именно они были использованы для определения субтипа ВИЧ-1. На первом этапе из национальной библиотеки Лос-Аламоса (<http://hiv.lanl.gov>) были загружены референсные последовательности всех существующих субтипов и циркулирующих рекомбинантных форм (CRF), затем последовательности были выровнены относительно друг друга и нормализованы по длине. В дальнейшем было построено филогенетическое дерево. Неопределенные результаты субтипирования, полученные на основании анализа филогенетического дерева, были верифицированы с помощью инструмента BLAST. Итоговое распределение генетических вариантов представлено на рисунке 17.

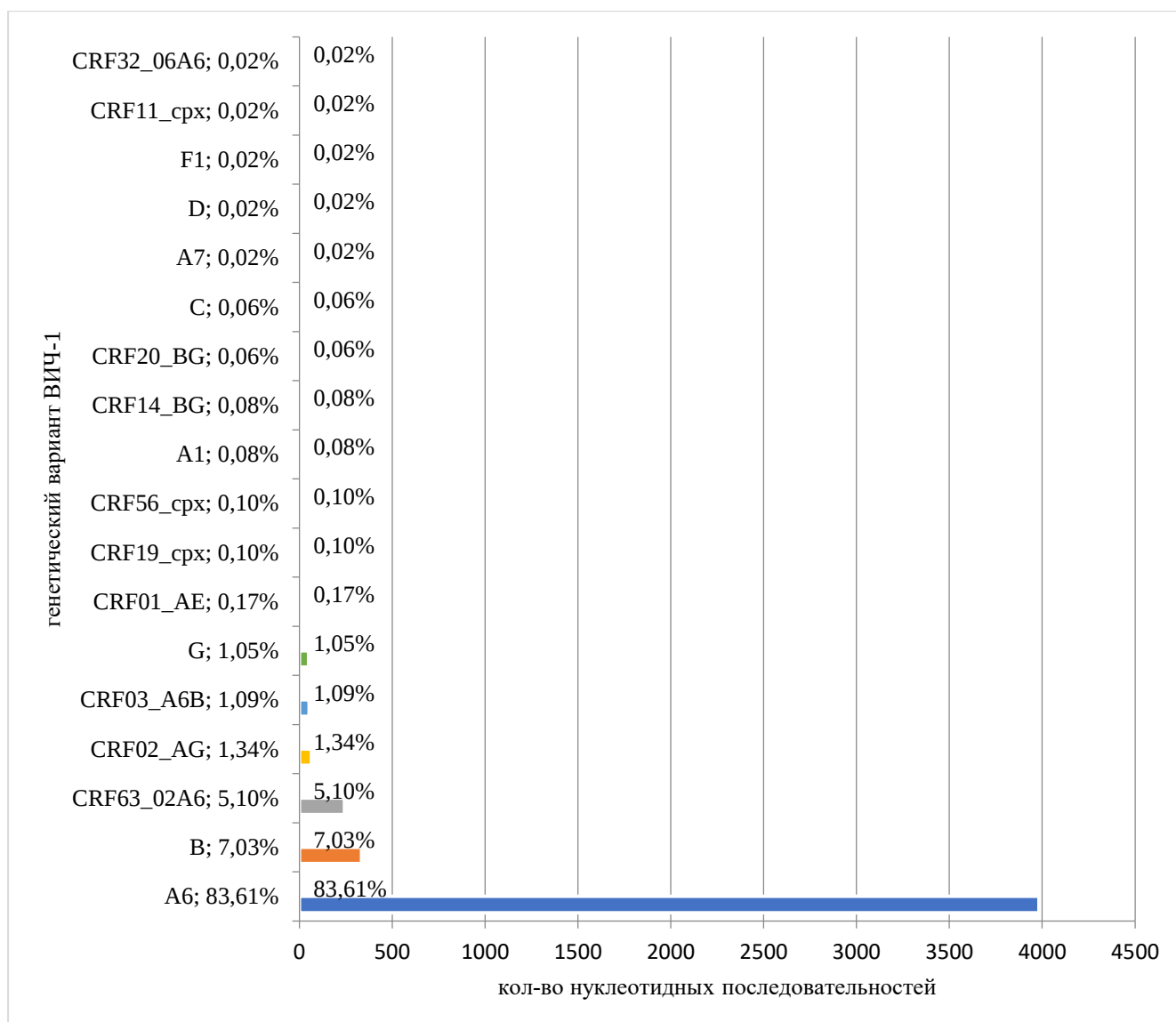


Рисунок 17 – Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 в проанализированной выборке

Наибольшую долю в проанализированной выборке составил суб-субтип A6 (3983 из 4764 последовательностей). На втором и третьем местах по частоте встречаемости находились вирусы субтипа B (335 последовательностей) и CRF63_02F6 (243 последовательности) соответственно. Также чаще 1% в исследуемой выборке встречались CRF02_AG (64 последовательности), CRF03_A6B (52 последовательности) и субтип G (50 последовательностей). Остальные 12 генетических вариантов ВИЧ-1 встречались крайне редко (37

последовательностей), и суммарно занимали менее 1% от всех проанализированных нуклеотидных последовательностей.

Далее были проанализированы изменения, происходившие в отношении распределения генетических вариантов вируса с течением времени. Для этого выборка была разделена на пятилетние периоды на основании даты первого положительного ИБ, за исключением начального периода эпидемии вследствие малого количества образцов (рисунок 18). Анализ был проведен только для нуклеотидных последовательностей, для которых была известна информация о дате/годе первого положительного ИБ пациента (4634 записи).

Результаты анализа показали, что на всех этапах развития эпидемии ВИЧ-инфекции в стране превалировал суб-субтип А6. Однако с течением времени его доля постепенно снижалась с более чем 90% в период до 2007-го года и до 78,4% на современном этапе с 2018 по 2022 гг. ($p < 0,001$). Важно также отметить, что CRF63_02A6, впервые зарегистрированный в период 2003-2007-го годов, имеет тенденцию к росту распространенности и в настоящее время встречается с частотой приблизительно 10%. Частота встречаемости остальных генетических вариантов хоть и варьирует в разные периоды, однако не имеет определенной тенденции. Также регистрируется рост минорных генетических вариантов. В период 2018-2022 гг. их частота встречаемости достоверно выросла ($p = 0,02$) до 1,3% по сравнению с предыдущими временными периодами.

На следующем этапе было проанализировано распределение генетических вариантов в зависимости от региона проживания ВИЧ-инфицированных пациентов (рисунок 19). Общее количество нуклеотидных последовательностей с информацией о регионе проживания (ФО) составило 4633 записи. Необходимо отметить, что количество пациентов в исследуемой выборке значительно варьировало для разных ФО. Наибольшая доля относилась к Центральному ФО – 2463 записи (53,2%). Также широко были представлены Приволжский (731 запись, 15,8%), Южный (442 записи, 9,5%) и Уральский ФО (421 запись, 9,1%). К Северо-Западному, Сибирскому и Дальневосточному относилось менее 5%

записей для каждого. Наиболее слабо в собранной выборке был представлен Северо-Кавказский ФО (27 записей, 0,6%).

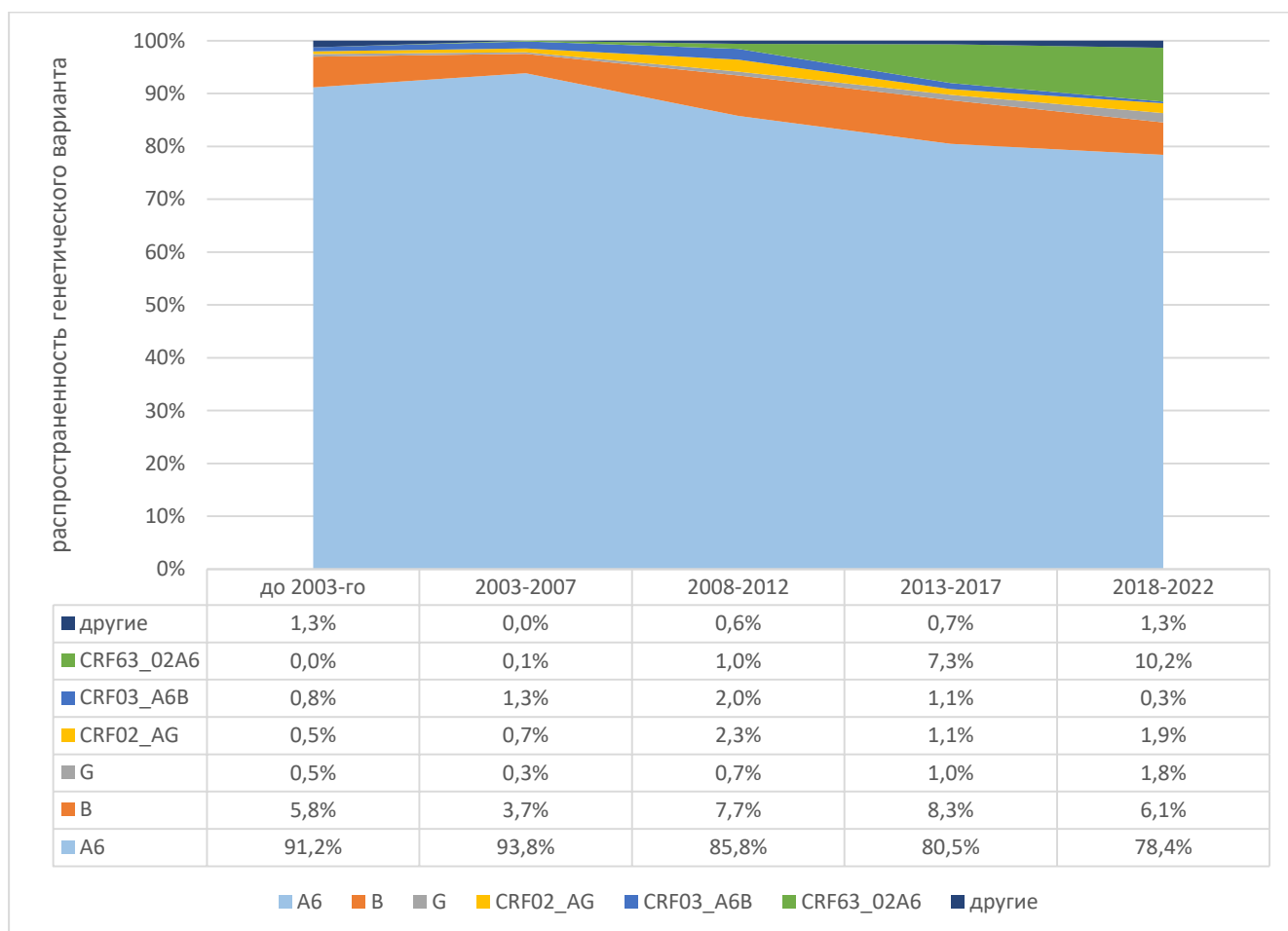


Рисунок 18 – Частота встречаемости различных генетических вариантов ВИЧ-1 в зависимости от времени постановки диагноза

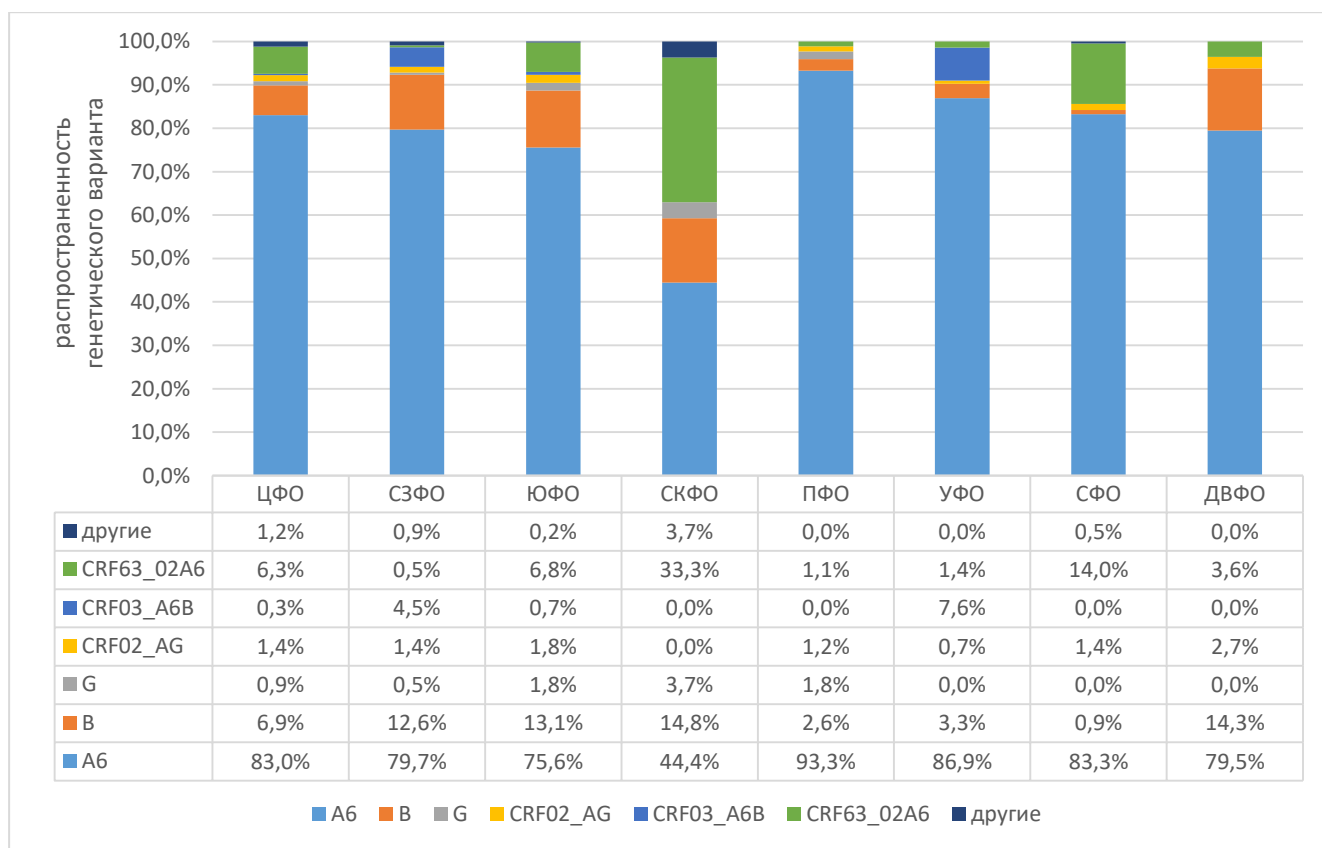


Рисунок 19 – Распространенность генетических вариантов ВИЧ-1 в зависимости от региона проживания ВИЧ-инфицированного пациента

Распространенность генетических вариантов в федеральных округах варьировала значительно. Наиболее отличалась она в Северо-Кавказском, однако вследствие малого размера выборки, различия были статистически недостоверны и округ был исключен из анализа. Суб-субтип A6 доминировал во всех ФО, в то же время в Дальневосточном он составлял 79,5%, а в Приволжском – 93,3% от всей анализируемой выборки. Субтип В более чем в 10% случаев встречался в Дальневосточном, Южном и Северо-Западном ФО, а наиболее редко в Сибирском (0,9%) и Приволжском (2,6%) ФО. Представленность субтипа G была выше в Южном (1,8%) и Приволжском ФО (1,8%), а в Уральском, Сибирском и Дальневосточном он полностью отсутствовал. CRF03_A6B обнаруживался достоверно чаще в Уральском (7,6%) и Северо-Западном (4,5%) ФО, при этом ни одного пациента с этим генетическим вариантом не было выявлено в четырех ФО. Также неравномерной была распространенность CRF63_02A6. Наиболее часто эта

генетическая форма вируса выявлялась в Сибирском ФО (14,0%). Все перечисленные различия в распространенности генетических вариантов в разных ФО были статистически достоверны ($p < 0,05$).

Далее был проведен анализ зависимости распределения генетических вариантов вируса от предполагаемого пути передачи. В таблице 18 и на рисунке 20 представлены данные о полученном распределении.

Таблица 18 – Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 по предполагаемым путям передачи вируса

предполагаемый путь передачи	генетический вариант ВИЧ-1							всего, кол-во	всего, %
	A6	B	G	CRF02_A G	CRF03_ A6B	CRF63_ 02A6	другие		
ПИН	862	13	1	11	7	92	1	987	20,7
половой (гетеросексуальный)	1526	57	14	26	19	88	5	1735	36,4
половой (гомосексуальный)	120	91	11	5	0	10	12	249	5,2
половой (без уточнения)	305	60	7	3	4	20	3	402	8,4
вертикальный	84	0	0	0	1	6	0	91	1,9
при оказании медицинской помощи	29	0	2	0	0	3	1	35	0,7
нет данных	1057	114	15	19	21	24	15	1265	26,6
ВСЕГО, кол-во	3983	335	50	64	52	243	37	4764	100,0
ВСЕГО, %	83,6	7,0	1,0	1,3	1,1	5,1	0,8	100,0	

В зависимости от пути передачи распределение генетических вариантов достаточно сильно различалось. Анализ показал, что достоверно чаще чем в среднем в генеральной совокупности выявлялись:

- суб-субтип A6 среди ПИН ($p < 0,001$), лиц с половым (гетеросексуальным) путем передачи ($p < 0,001$) и при вертикальном пути передачи ($p = 0,02$),
- субтип В среди лиц с половым (гомосексуальным) и половым (без уточнения) путями передачи ($p < 0,001$), а также среди лиц, для которых информация о пути передачи отсутствовала ($p < 0,001$),

- субтип G среди лиц с половым (гомосексуальным) путем передачи ($p<0,001$) и лиц, инфицированных при оказании медицинской помощи ($p=0,01$),
- генетическая форма CRF03_AB среди лиц, для которых информация о пути передачи отсутствовала ($p=0,02$),
- генетическая форма CRF63_02A6 среди ПИН ($p<0,001$).

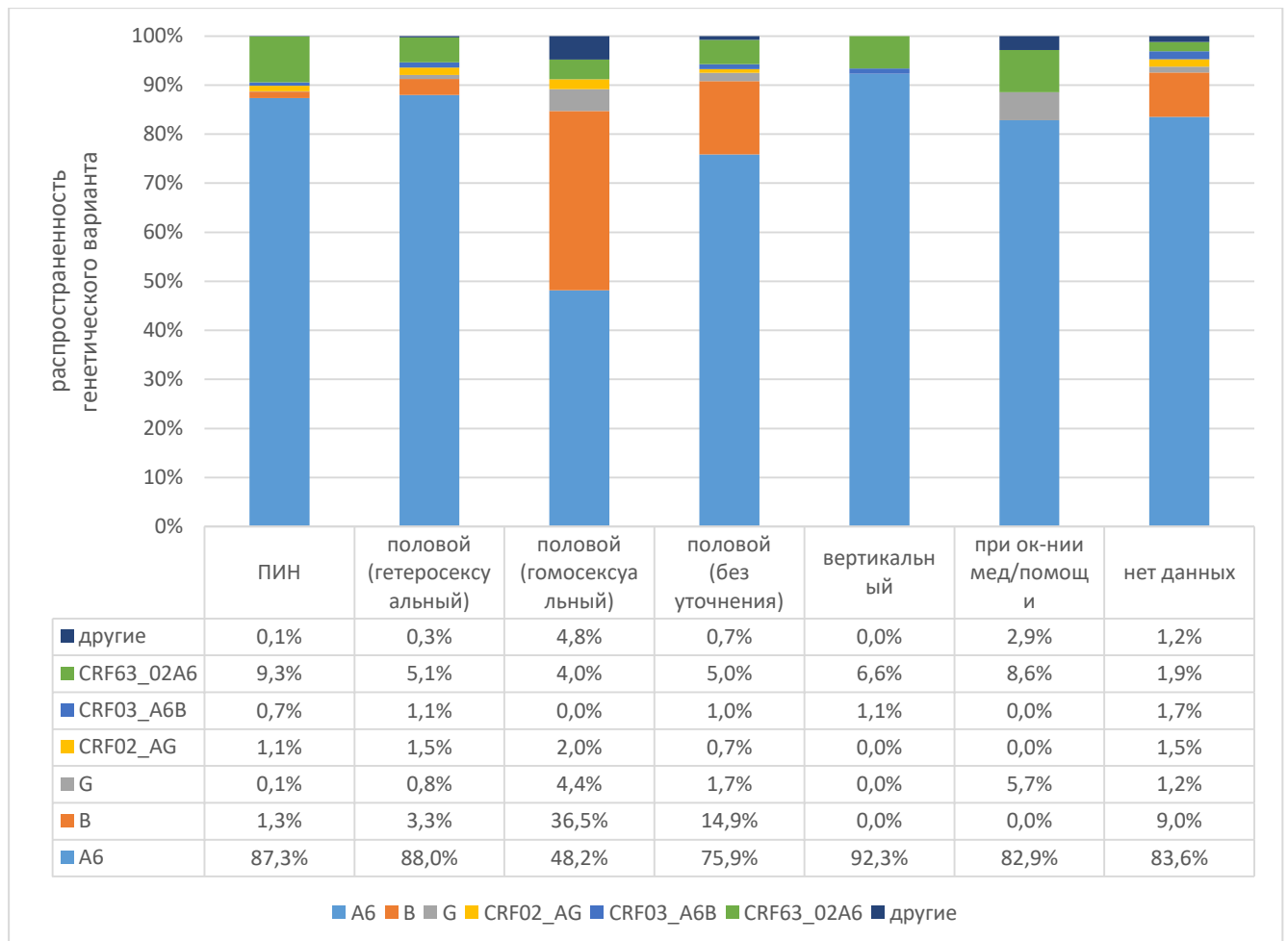


Рисунок 20 – Частота встречаемости различных генетических вариантов ВИЧ-1 у пациентов с различными путями передачи

Наибольшее генетическое разнообразие ВИЧ-1 было обнаружено у пациентов с половым (гомосексуальным) путем передачи, а также у пациентов, у которых информация о пути передачи отсутствовала.

Для генетических вариантов ВИЧ-1, представленных в анализируемой выборке более 1%, ранее были проведены исследования, описывающие период, в который произошла их интродукция на территорию РФ (СССР для суб-субтипа А6 и субтипов В и G), и особенности их последующего распространения на территории страны [81, 104, 145, 166, 195]. Однако отдельных исследований, посвященных редким генетическим вариантам ВИЧ-1, выполнено не было отчасти в связи с тем, что в опубликованных работах анализу подвергались выборки, меньшие по размерам по сравнению с настоящим исследованием. В связи с этим был проведен дополнительный анализ нуклеотидных последовательностей, относящихся к редким (менее 1% в исследуемой выборке) генетическим вариантам с целью выявления источника (источников) инфекции и предполагаемого времени заноса на территорию РФ.

Всего в анализируемой выборке среди 37 пациентов с редкими генетическими вариантами вируса было определено 12 различных субтипов и рекомбинантных форм. Поиск наиболее близкородственных нуклеотидных последовательностей в базе данных Лос-Аламоса с помощью инструмента BLAST показал, что потенциально занос инфекции мог произойти из более чем 40 стран. Последующий филогенетический анализ (рисунок 21) позволил сузить круг регионов-кандидатов. Итоговые результаты анализа стран, из которых мог произойти занос инфекции, и периоды их заноса представлены в таблице 19.

В некоторых случаях год выявления ВИЧ-инфицированного пациента в России был ранее года забора крови из предполагаемой страны-источника. Однако и в этих случаях предполагалось, что занос происходил извне. Данное предположение основывается на том, что, во-первых, год забора крови может значительно отстоять во времени от года инфицирования, а, во-вторых, анализ ветвей филогенетического дерева, представленного на рисунке 21, показывает, что нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 от граждан РФ находятся дальше от корня клады. Это означает, что наиболее вероятно они являлись реципиентами, а не источниками инфекции.

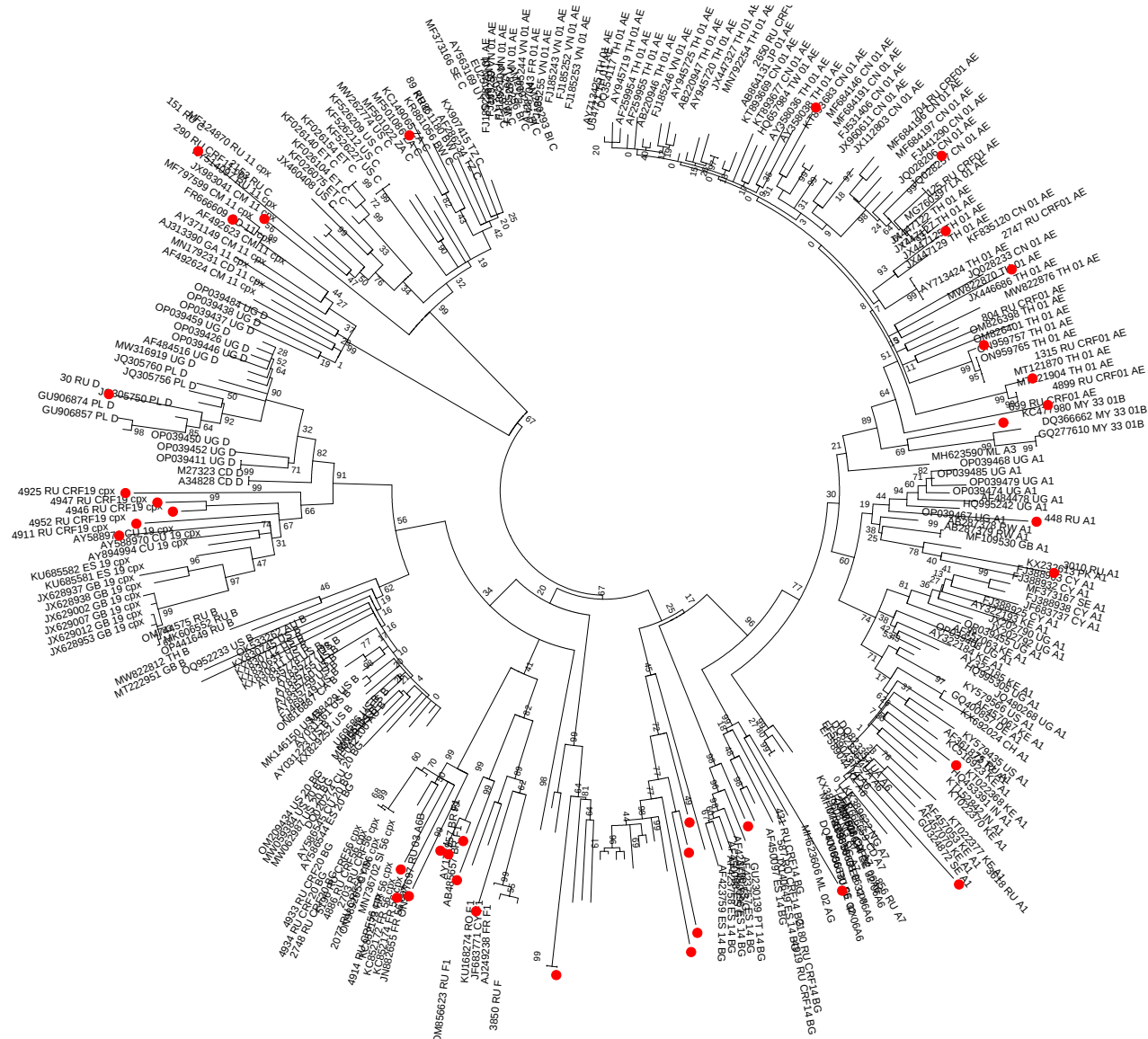


Рисунок 21 – Филогенетическое дерево (метод максимального правдоподобия, бутстреп 100, модель GTR+G+I, частичное удаление пробелов с порогом 95%)

генетических вариантов ВИЧ-1. Красными кружками выделены 37 пациентов исследуемой выборки. Остальные 235 нуклеотидных последовательностей получены из международной базы данных. Названия последовательностей состоят из кода пациента (номер GenBank в случае референсных последовательностей), двухбуквенного кода страны происхождения и субтипа

Таблица 19 – Пациенты исследуемой выборки с редкими генетическими вариантами ВИЧ-1 и их клинико-эпидемиологическая характеристика

Уникальный номер пациента	Пол	Год рождения	Год первого ВИЧ+ блота	возраст на момент постановки диагноза	Предполагаемый путь инфицирования	ФО	генетический вариант ВИЧ-1	Страна, из которой наиболее вероятно произошел занос инфекции (год забора крови)
75	мужской	1965	1987	21,9	нет данных	Центральный	A1	Швейцария (1995), США (2009)
448	женский	1985	2014	29,0	нет данных	Центральный		Уганда (1986-2008)
3010	мужской	1984	2015	31,2	при оказании медицинской помощи	Южный		Пакистан (2014), Великобритания (2014)
3618	мужской	1983	1992	9,3	нет данных	Центральный		Кения (2000-2005)
856	мужской	1942	2008	65,6	гетеросексуальный	Центральный	A7	Кипр (2005), ДРК (2007), Нигерия (2009-2011)
89	мужской	нет данных	2010	нет данных	нет данных	Центральный	C	Швеция (2011), Уругвай (2011)
151	мужской	1946	1990	44,0	нет данных	Центральный		США (2010), Эфиопия (2009)
2153	мужской	1982	2017	34,8	половой	Центральный		Танзания (1998-2004), ЮАР (2007), Ботсвана (2008)
30	мужской	1998	2000	2,6	нет данных	Центральный	D	Польша (1997-2009)
3850	женский	1983	2017	33,3	гетеросексуальный	Центральный	F1	Франция (1996), Кипр (2008), Румыния (2003)
125	мужской	1960	2001	40,9	нет данных	Центральный	CRF01_AE	Лаос (2011)
699	мужской	1985	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных		Китай (2010)
704	мужской	1987	2013	26,6	нет данных	нет данных		Китай (2005-2013)
804	мужской	1986	2012	26,6	нет данных	Центральный		Таиланд (2012)
1315	мужской	1988	2016	28,0	нет данных	Северо-Западный		Таиланд (2014-2016)
2650	мужской	1972	2017	45,4	гетеросексуальный	Центральный		Япония (2008)
2747	мужской	1979	2017	37,9	нет данных	Центральный		Таиланд (1990-2008)
4899	мужской	1984	2021	36,6	гомосексуальный	Центральный		Таиланд (1990-2001), Вьетнам (1997)
290	мужской	1979	2010	31,0	гетеросексуальный	Сибирский	CRF11_cpx	Камерун (2008)

Уникальный номер пациента	Пол	Год рождения	Год первого ВИЧ+ блота	возраст на момент постановки диагноза	Предполагаемый путь инфицирования	ФО	генетический вариант ВИЧ-1	Страна, из которой наиболее вероятно произошел занос инфекции (год забора крови)
431	мужской	1967	2012	45,4	нет данных	Центральный	CRF14_BG	Испания (1999-2005)
587	мужской	1993	2014	20,9	половой	Северо-Кавказский		Испания (1999-2005)
2180	мужской	1973	2017	44,5	гетеросексуальный	Центральный		Испания (1999-2005)
4919	мужской	1996	2022	26,2	гомосексуальный	Центральный		Испания (1999-2005)
4911	мужской	1989	2022	33,2	гомосексуальный	Центральный	CRF19_cpx	Куба (1999), Великобритания (2009), Испания (2014)
4925	мужской	2000	2022	21,8	гомосексуальный	Центральный		Куба (1999), Великобритания (2009), Испания (2014)
4946	мужской	1995	2022	27,7	гомосексуальный	Центральный		Куба (1999), Великобритания (2009), Испания (2014)
4947	мужской	1996	2022	26,2	гомосексуальный	Центральный		Куба (1999), Великобритания (2009), Испания (2014)
4952	мужской	1962	2022	60,4	гомосексуальный	Центральный		Куба (1999), Великобритания (2009), Испания (2014)
2748	мужской	1989	2018	28,5	нет данных	Центральный	CRF20_BG	Куба (1999-2003), США (2018)
4933	мужской	1992	2022	30,6	гомосексуальный	Центральный		Куба (1999-2003), США (2018)
4934	мужской	1981	2019	38,2	гомосексуальный	Центральный		Куба (1999-2003), США (2018)
2231	женский	1989	2017	28,3	ПИН	Центральный	CRF32_06A6	Эстония (2001-2006)
2077	мужской	1998	нет данных	нет данных	гомосексуальный	Северо-Западный	CRF56_cpx	Словения (2012), Кипр (2017), Франция (2010-2011)
2703	мужской	1993	2017	23,6	нет данных	Центральный		Словения (2012), Кипр (2017), Франция (2010-2011)
4886	мужской	1995	2021	26,0	гомосексуальный	Центральный		Словения (2012), Кипр (2017), Франция (2010-2011)
4914	мужской	1997	2022	24,9	гомосексуальный	Центральный		Словения (2012), Кипр (2017), Франция (2010-2011)
5196	мужской	1991	2022	31,1	половой	Центральный		Словения (2012), Кипр (2017), Франция (2010-2011)

* ДРК – Демократическая Республика Конго, ЮАР – Южно-Африканская Республика.

Для ряда пациентов результаты анализа позволили однозначно определить страну, из которой произошел занос. В частности, наиболее близкородственные генетические варианты ВИЧ-1 для пациента №30, инфицированного ВИЧ-1 субтипа D, обнаруживались в Польше с 1997 по 2009 годы; а вирус пациента №2231 с CRF32_06F6 был генетически близок вирусам у ВИЧ-позитивных пациентов, проживающих в Эстонии в 2001-2006 годах.

Для некоторых случаев (пациент №856, инфицированный ВИЧ-1 субтипа A7 и пациент № 3850 с ВИЧ-1 субтипа F1) оказалось невозможным определить страну происхождения вируса, поскольку близкородственные варианты вируса обнаруживались в различных странах: Кипр, ДРК и Нигерия в первом случае, и Франция, Кипр, Румыния во втором.

В случае выявления определенного генетического варианта ВИЧ-1 у нескольких человек анализируемой когорты, было возможно оценить особенности распространения вируса. В частности, было показано, что 5 человек, инфицированных CRF19_crx, более вероятно являются следствием однократного заноса на территорию РФ с последующим распространением вируса внутри страны. Схожая ситуация была обнаружена для 3 человек, инфицированных ВИЧ-1 CRF20_BG и для 5 человек с ВИЧ-1 CRF56_crx. Совершенно иная ситуация наблюдалась для генетических вариантов A1 (3 человека), C (3 человека) и CRF01_AE (8 человек). Каждый из них был инфицирован генетическим вариантом, достоверно отличающимся от других, что позволило предположить отдельный занос возбудителя инфекции в каждом случае. Например, источниками ВИЧ-1 8 пациентов исследуемой когорты, инфицированных CRF01_AE, являлись граждане Лаоса, Китая (2 эпидемиологически несвязанных случая), Таиланда (3 несвязанных случая), Японии, и в одном случае Таиланда, либо Вьетнама.

Таким образом, в рамках работ по оценке разнообразия генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории РФ, было показано, что в стране продолжает превалировать вирус суб-субтипа A6 (83,61%). Чаше 1% случаев регистрируются случаи инфекции, вызываемые вирусами субтипов B (7,03%) и G (1,05%), а также циркулирующими рекомбинантными формами

CRF02_AG (1,34%), CRF03_A6B (1,09%) и CRF63_02A6 (5,10%). В то же время доля случаев инфекции, вызванной суб-субтипом А6, достоверно снижается. А с 2010-го года достоверно увеличивается распространенность CRF63_02A6. Также было показано, что с развитием эпидемии увеличивается генетическое разнообразие.

Генетические варианты ВИЧ-1 имеют особенности распространения и зависят от региона проживания пациента, а также от пути передачи вируса. В частности, в разрезе ФО (для которых размер выборки был достаточно велик) CRF63_02A6 достоверно чаще встречался в Сибирском ФО (14,0%), CRF03_A6B – в Северо-Западном и Уральском ФО (4,5% и 7,6% соответственно), субтип В – в Северо-Западном, Южном и Дальневосточном ФО (12,6%, 13,1% и 14,3% соответственно). Данные результаты подтверждают и дополняют результаты ранее опубликованных исследований, показывающих появление и активное распространение CRF63_02A6 в Сибирском ФО [49].

Субтип G достоверно чаще встречался при заражении в ходе оказания медицинской помощи и в группе пациентов с половым (гомосексуальным) путем передачи. В первом случае это обусловлено крупной внутрибольничной вспышкой, произошедшей на юге страны в 1988-1990 гг. [8]. А во втором случае заносом и последующим активным распространением генетического варианта ВИЧ-1 среди мужчин-гомосексуалистов [166].

Также было обнаружено, что при общей распространенности ВИЧ-1 субтипа В в 7,03% в выборке пациентов с половым путем передачи, осуществляемым посредством гомосексуальных контактов, распространенность этого генетического варианта составила 36,5%. Важно отметить, что в группе пациентов с половым неуточненным половым путем передачи и группе пациентов, для которых данные о пути передачи отсутствовали, распространенность ВИЧ-1 субтипа В была также повышена и составила 14,9% и 9,0% соответственно. Это позволяет предположить сокрытие пациентами опыта гомосексуальных контактов вследствие страха и стигматизации и, как следствие, недорепортирование случаев инфекции при гомосексуальных контактах.

Большой размер анализируемой выборки позволил выявить значимое количество редких для РФ генетических вариантов ВИЧ-1. Всего у 37 пациентов было обнаружено 12 различных вариантов вируса, встречающихся в популяции ЛЖВ в стране менее чем в 1% случаев. С помощью биоинформатических методов для всех 37 пациентов с такими вариантами ВИЧ-1 были определены географические регионы, граждане которых могли послужить источниками инфекции. Также были определены особенности последующего распространения этих вариантов вируса на территории РФ. Было показано, что эпидемиологическая характеристика пациентов, инфицированных необычными вариантами ВИЧ-1, значительно отличалась от общей выборки. В ней преобладали лица мужского пола с половым (гомосексуальным) путем передачи, проживающие на территории Центрального ФО. Наиболее часто предполагаемыми регионами, из которых происходил занос инфекции, являлись страны Западной Европы (Великобритания, Франция, Испания, Кипр), США, а также популярные в РФ страны для «курортного» отдыха (Таиланд, Куба).

ГЛАВА 9. ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЦЕНТРАЛЬНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ С ПОМОЩЬЮ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИЧ-1 И СОПУТСТВУЮЩЕЙ ИНФОРМАЦИИ О ПАЦИЕНТАХ

9.1 Применение биоинформатических методов при изучении особенностей распространения эпидемии ВИЧ-инфекции

Биоинформатический анализ геномных данных возбудителя в сочетании с клинико-эпидемиологической информацией о пациентах позволяет уточнить особенности динамики и структуры заболеваемости ВИЧ-инфекции. Однако достоверность результатов зависит от доли инфицированных лиц, для которых известны нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 [146]. Вследствие неравномерности и малого количества последовательностей ВИЧ-1, полученных из различных регионов РФ, определение характеристик развития эпидемии ВИЧ-инфекции было осуществлено на примере Центрального ФО, для которого в настоящем исследовании была получена наибольшая «плотность выборки».

Информация, загруженная в Российскую базу данных, была отобрана по следующим характеристикам:

- Известный регион проживания – Центральный ФО,
- Известный пол пациента,
- Известный год получения первого положительного результата ИБ,
- Наличие нуклеотидной последовательности генов протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1.

Среди 4812 проанализированных записей о ВИЧ-инфицированных пациентах, указанным характеристикам отвечало 2396 записей. Сформированная

выборка была использована для проведения кластерного анализа нуклеотидных последовательностей.

На первом этапе для оценки репрезентативности анализируемой выборки было проведено ее сравнение с популяцией граждан РФ с диагнозом ВИЧ-инфекция, проживающих на территории ЦФО, по таким параметрам, как пол, предполагаемый путь инфицирования и год постановки диагноза. Статистические данные о ВИЧ-инфекции в ЦФО были взяты из бюллетеня «ВИЧ-инфекция» и опубликованных работ [13, 20]. Результаты анализа представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Эпидемиологическая характеристика пациентов с ВИЧ-инфекцией и репрезентативность анализируемой выборки

Параметр		исследуемая выборка		данные о ВИЧ-инфекции в ЦФО	
		чел	%	чел	%
пол	мужской	1 479	61,73%	144058	62,00%
	женский	917	38,27%	88287	38,00%
предполагаемый путь передачи	*гомосексуальный контакт	153	6,39%	3960	1,70%
	*гетеросексуальный контакт	904	37,73%	49485	21,30%
	**половой без уточнения	317	13,23%	0	0,00%
	вертикальный	27	1,13%	1625	0,70%
	ПИН	534	22,29%	54493	23,45%
	*при оказании медицинской помощи	14	0,58%	70	0,03%
	*нет данных	447	18,66%	122712	52,81%
год постановки диагноза	*до 2005 г.	351	14,65%	61795	26,60%
	2005-2007 гг.	169	7,05%	23192	9,98%
	2008-2010 гг.	241	10,06%	26915	11,58%
	2011-2013 гг.	263	10,98%	23806	10,25%
	*2014-2016 гг.	490	20,45%	31373	13,50%
	*2017-2019 гг.	614	25,63%	37055	15,95%
	2020-2022 гг.	268	11,19%	28209	12,14%

* выделены группы пациентов, для которых по указанным параметрам исследуемая выборка достоверно ($p > 0,05$) отличалась от генеральной совокупности.

** выделена группа пациентов, которая отсутствовала в генеральной совокупности.

Сравнение клинико-эпидемиологических характеристик показало, что в исследуемой выборке по параметру «предполагаемый путь передачи» по сравнению с генеральной совокупностью больше представлены пациенты с нозокомиальным и гомосексуальным контактом. В исследуемой выборке присутствовала значительная группа людей с половым путем без уточнения, полностью отсутствовавшая в генеральной совокупности. В то же время в исследуемой выборке доля пациентов с неустановленным путем передачи была значительно меньше.

По параметру «год постановки диагноза» исследуемая выборка достоверно отличалась от генеральной совокупности в группах «до 2005-го года», «2014-2016» и «2017-2019». По остальным временным группам, а также по параметру «пол» исследуемая выборка и генеральная совокупность не имели достоверных различий.

Следующим этапом было проведение анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 2396 пациентов выборки. После осуществления выравнивания и обрезки последовательностей по длине полученный элайнмент был проанализирован на предмет выявления молекулярных кластеров. Поскольку в ранее опубликованных работах было показано, что различные программы могут давать различные результаты [75], было использовано 4 наиболее распространенных [111]: IQ-TREE [154], FastTree [198], RAxML [220] и MicrobeTrace [163]. В первых трех случаях в указанных программах сначала было построено филогенетическое дерево методом максимального правдоподобия с бутстреп поддержкой не менее 100. А затем полученные деревья были проанализированы с помощью программы Cluster Picker [80] с бутстреп поддержкой не ниже 0,9 и различными порогами генетического сходства: 0,5%, 1,5%, 3% и 4,5%. В четвертом случае, поскольку программа MicrobeTrace при поиске кластеров использует только параметр генетической дистанции, при ее

применении построение филогенетического дерева не проводилось, и использовались только вышеуказанные пороги генетического сходства нуклеотидных последовательностей.

Результаты кластеризации нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от 2396 пациентов, включенных в исследуемую выборку представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты кластеризации пациентов выборки при использовании различных видов программного обеспечения и порогов генетической дистанции

метод выявления молекулярных кластеров	порог генетической дистанции, %	кол-во посл-тей внутри кластеров	кол-во кластеров	максимальный размер кластера
FastTree	0,5	35	17	3
IQ-TREE		32	16	2
RAxML		36	18	2
MicrobeTrace		97	32	20
FastTree	1,5	137	63	5
IQ-TREE		129	61	5
RAxML		136	63	5
MicrobeTrace		418	114	80
FastTree	3	378	162	5
IQ-TREE		356	154	5
RAxML		358	153	5
MicrobeTrace		1244	136	742
FastTree	4,5	569	207	15
IQ-TREE		477	184	15
RAxML		481	184	15
MicrobeTrace		2178	28	2037

Результаты кластерного анализа, выполненного с помощью 4-х различных программ, различались между собой. При этом три филогенетических подхода (FastTree, IQ-TREE и RAxML) имели значительно большую сходимость друг с другом по сравнению с подходом, анализирующим только генетическую дистанцию (MicrobeTrace). Во всех случаях при использовании последнего подхода внутри кластеров оказывалось значительно больше нуклеотидных

последовательностей, кроме этого, сильно отличался максимальный размер кластера.

Подход, основанный только на основании анализа генетической дистанции (MicrobeTrace) при использовании любых проанализированных порогов (0,5%, 1,5%, 3%, 4,5%) во всех случаях показывал количество кластеризовавшихся последовательностей значительно больше по сравнению с методами, учитывающими бутстреп поддержку, причем при увеличении порога с 0,5% до 4,5% это отношение увеличивалось (с 2,83 до 4,28 раза).

Среди трех методов, использующих филогению, программа FastTree являлась наиболее чувствительной и выявила наибольшее количество кластеров. При пороге генетической дистанции в 0,5% нуклеотидные последовательности внутри кластеров составляли 1,46% от всех анализируемых, при пороге 1,5% - 5,72%, при пороге 3% - 15,78%, а при пороге 4,5% уже 23,75% последовательностей кластеризовались друг с другом. Согласно ранее опубликованным работам, рекомендуется уменьшать порог генетической дистанции в случае необходимости выявления свежих очагов заболевания и повышать его при ретроспективном анализе долгосрочных тенденций развития эпидемии [101]. В связи с этим в рамках настоящего исследования для изучения особенностей распространения эпидемии ВИЧ-инфекции в Центральном ФО РФ был использован метод, основанный на анализе филогенетического дерева, построенного с помощью программы FastTree с порогом 4,5%.

Результаты многочисленных исследований показывают, что попадание нуклеотидной последовательности пациента внутрь молекулярного кластера свидетельствует о высоком генетическом сходстве его вируса с вирусами других ВИЧ-инфицированных пациентов внутри этого кластера [217]. А размер кластера прямо пропорционален скорости передачи вируса от человека человеку [86]. В связи с этим было проведено сравнение групп пациентов, оказавшихся внутри кластеров, с некластеризовавшимися (находящимися вне кластеров). Для проведения максимально подробного анализа пациенты были разделены на следующие группы:

- Пациенты вне кластеров (одиночные),
- Пациенты, попавшие внутрь мелких кластеров (2-3 человека в кластере),
- Пациенты, попавшие в крупные кластеры (4 и более человек в кластере).

Кроме размера кластера важными характеристиками являются также время его появления и последующего роста. Под ростом в данном случае подразумевается период времени, в котором регистрировалось выявление ВИЧ-инфицированных лиц внутри кластера. Например, если кластеризовавшиеся нуклеотидные последовательности принадлежат ЛЖВ с современной датой диагноза, это свидетельствует о продолжающейся передаче вируса в этой группе лиц. Такой кластер называется «растущим», либо «свежим» в случае его недавнего возникновения. Если же в кластере присутствуют только пациенты с давно установленным диагнозом, он называется «старым». Старый кластер не имеет важного эпидемиологического значения на текущий момент, поскольку распространение вируса в этой группе ВИЧ-инфицированных лиц было в свое время эффективно локализовано соответствующими противоэпидемическими мероприятиями. В связи с этим в ходе исследования была разработана классификация молекулярных кластеров, представленная на рисунке 22. Сравнение характеристик пациентов, таких как пол, возраст, предполагаемый путь передачи и др., которые группируются в различные квадраты, представленные на рисунке, позволяет определять особенности развития эпидемического процесса на исследуемой территории. Кроме того, изменяя значения по осям абсцисс и ординат, можно адаптировать анализ для различных временных горизонтов и контингентов ВИЧ-инфицированных лиц.

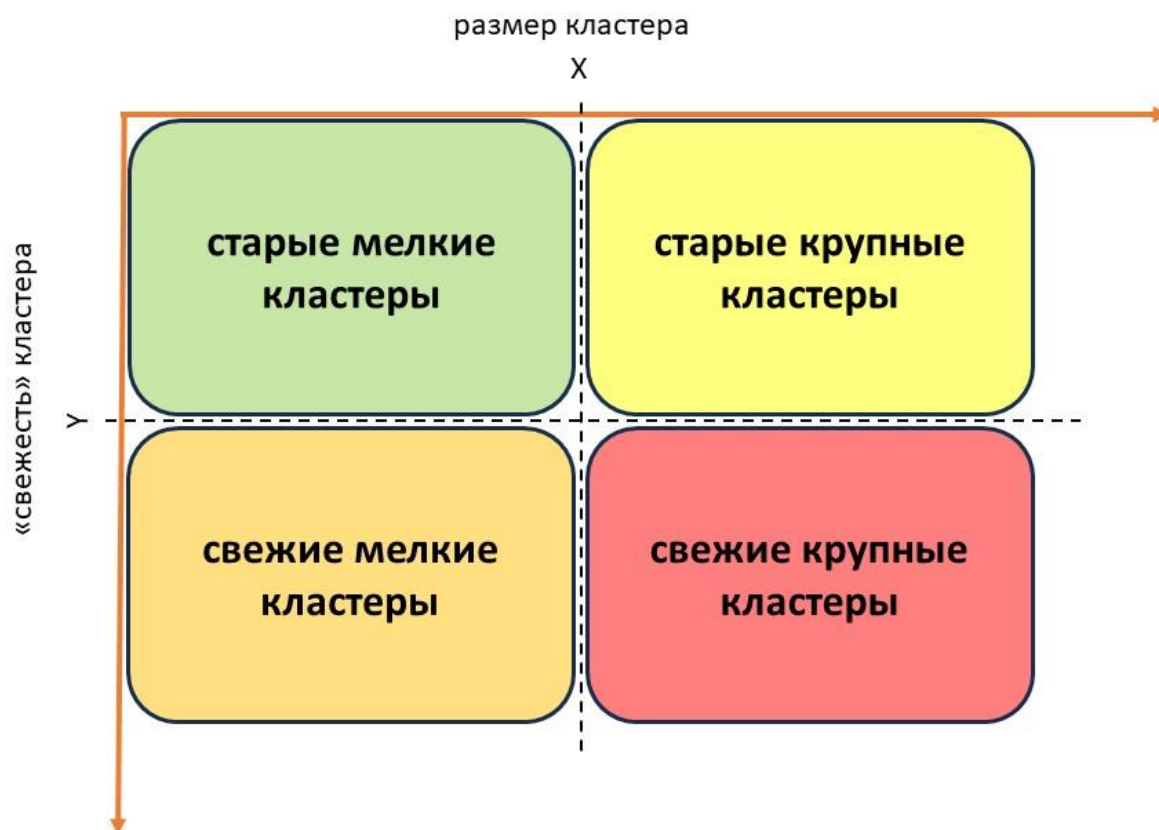


Рисунок 22 – Классификация молекулярных кластеров в зависимости от их размера и периода выявления ВИЧ-инфекции у входящих в кластеры пациентов

В данном разделе исследования под «свежими» кластерами подразумевались кластеры, включающие хотя бы одного пациента с результатом положительного иммунного блота, полученного в течение последних двух лет периода проанализированной выборки, то есть с 01.01.2021 по 31.12.2022.

Результаты распределения проанализированной выборки согласно принципу, описанному на рисунке 22, а также некластеризовавшихся пациентов, представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Характеристики пациентов исследуемой выборки в зависимости от их кластеризации

кол-во пациентов в выборке, чел., %		1827	76%	327	14%	136	6%	71	3%	35	1%	2396
характеристика		GD* 4,5%, вне кластеров		GD 4,5%, старые (до 2021-го) мелкие кластеры (2-3 чел.)		GD 4,5%, старые (до 2021-го) крупные кластеры (>=4 чел.)		GD 4,5%, свежие (2021-2022) мелкие кластеры (2-3 чел.)		GD 4,5%, свежие (2021-2022) крупные кластеры (>=4 чел.)		исследуемая выборка, чел.
пол	мужской	1114	75%	205	14%	91	6%	46	3%	23	2%	1479
	женский	713	78%	122	13%	45	5%	25	3%	12	1%	917
путь передачи	гетеросексуальный	660	73%	152	17%	49	5%	29	3%	14	2%	904
	ПИН	421	79%	60	11%	45	8%	4	1%	4	1%	534
	половой без уточнения	261	82%	28	9%	10	3%	10	3%	8	3%	317
	гомосексуальный	82	54%	27	18%	13	8%	23	15%	8	5%	153
	вертикальный	20	74%	5	19%	2	7%	0	0%	0	0%	27
	при мед помощи	2	14%	7	50%	4	29%	1	7%	0	0%	14
	нет данных	381	85%	48	11%	13	3%	4	1%	1	0%	447
Генетический вариант ВИЧ-1	A6	1535	77%	260	13%	124	6%	44	2%	28	1%	1991
	B	113	70%	31	19%	11	7%	6	4%	1	1%	162
	CRF63_02A6	111	74%	21	14%	1	1%	12	8%	6	4%	151
	CRF02_AG	24	71%	7	21%	0	0%	3	9%	0	0%	34
	G	12	57%	7	33%	0	0%	2	10%	0	0%	21
	остальные	32	86%	1	3%	0	0%	4	11%	0	0%	37
возраст на момент постановки диагноза	0-17	74	73%	17	17%	10	10%	0	0%	0	0%	101
	18-29	763	80%	114	12%	40	4%	26	3%	9	1%	952
	30-39	582	73%	128	16%	59	7%	13	2%	16	2%	798
	40-49	274	75%	48	13%	17	5%	20	5%	7	2%	366
	50 и старше	99	69%	20	14%	10	7%	12	8%	3	2%	144
	нет данных	35	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	35
опыт АРВТ на момент исследования	да	999	87%	114	10%	32	3%	8	1%	1	0%	1154
	нет	820	67%	211	17%	104	8%	63	5%	33	3%	1231
	нет данных	8	73%	2	18%	0	0%	0	0%	1	9%	11

*GD - genetic distance (генетическая дистанция).

Исследуемая выборка распределилась следующим образом: некластеризовавшиеся пациенты – 76%; пациенты, попавшие в старые мелкие кластеры – 14%; в старые крупные кластеры – 6%; в свежие мелкие кластеры – 3%, и в свежие крупные кластеры – 1%.

Мужчины попадали в кластеры незначительно чаще ($p=0,17$) женщин (25% против 22%). Такая тенденция сохранялась на протяжении всего изучаемого периода.

Достоверные различия в кластеризации были получены при распределении пациентов в зависимости от предполагаемого пути передачи. На рисунке 23 представлены результаты кластеризации пациентов с гетеросексуальным, гомосексуальным и парентеральным путями передачи. Остальные пациенты не были включены в анализ либо по причине отсутствия данных, либо вследствие малого размера выборки. Половой путь без уточнения также был исключен, поскольку включал только ВИЧ-инфицированных лиц мужского пола и по этой причине имел значительную смещенность.

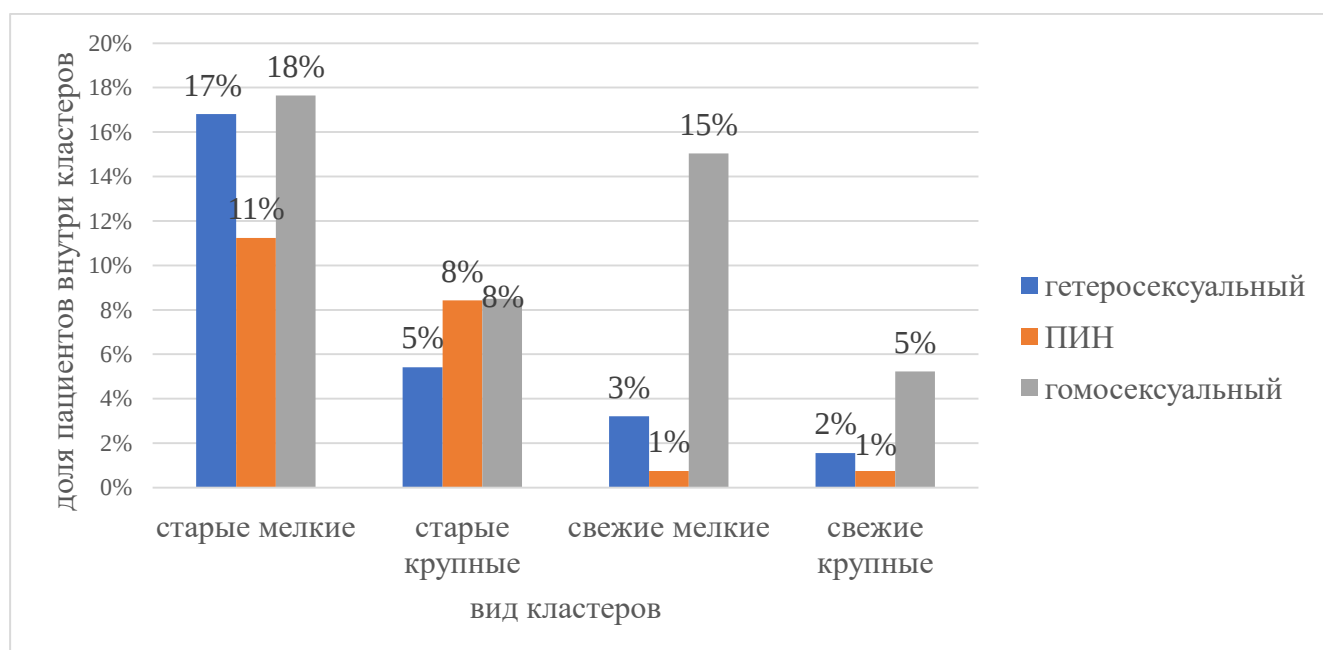


Рисунок 23 – Распределение по кластерам пациентов с различными путями передачи ВИЧ-1

Среди трех перечисленных путей передачи доля пациентов вне кластеров была достоверно ($p < 0,001$) ниже у группы мужчин-гомосексуалистов (54%). У пациентов с гетеросексуальным путем и имевших опыт парентерального употребления наркотиков, доля некластеризовавшихся была схожа с долей по всей исследуемой выборке, 73% и 79% соответственно.

Внутри кластеров динамика также достоверно различалась. Для групп с гетеросексуальным и парентеральным путями передачи было характерно значительное снижение доли кластеризовавшихся пациентов в свежих мелких кластерах по сравнению со старыми мелкими: 3% против 17% ($p < 0,001$), и 1% против 11% ($p < 0,001$). При этом у группы ПИН динамика была наиболее выраженной. В то же время снижение в группе с гомосексуальным путем передачи было незначительным – 15% в свежих мелких кластерах против 18% в старых мелких. Схожая ситуация наблюдалась и в крупных кластерах – снижение кластеризации было наиболее выражено в группе ПИН и наименее в группе с гомосексуальным путем передачи.

Также важно отметить, что соотношение доли крупных кластеров к мелким различалось для разных групп:

- Гетеросексуальный: 5% против 17% у старых и 2% против 3% у свежих,
- ПИН: 8% против 11% у старых и 1% против 1% у свежих,
- Гомосексуальный: 8% против 18% у старых и 5% против 15% у свежих.

То есть, в группе ПИН соотношение количества пациентов, находящихся в составе крупных кластеров, к количеству пациентов, находящихся внутри мелких кластеров, было наиболее высоким.

Значимые различия в кластеризации были получены также для пациентов, инфицированных различными генетическими вариантами ВИЧ-1. На рисунке 24 представлены результаты кластеризации пациентов, зараженных вирусами субтипами A6, B и CRF63_02A6. Пациенты, инфицированные другими

генетическими вариантами (CRF02_AG, G и другими) не были включены в анализ по причине малых размеров выборок в каждой из них.

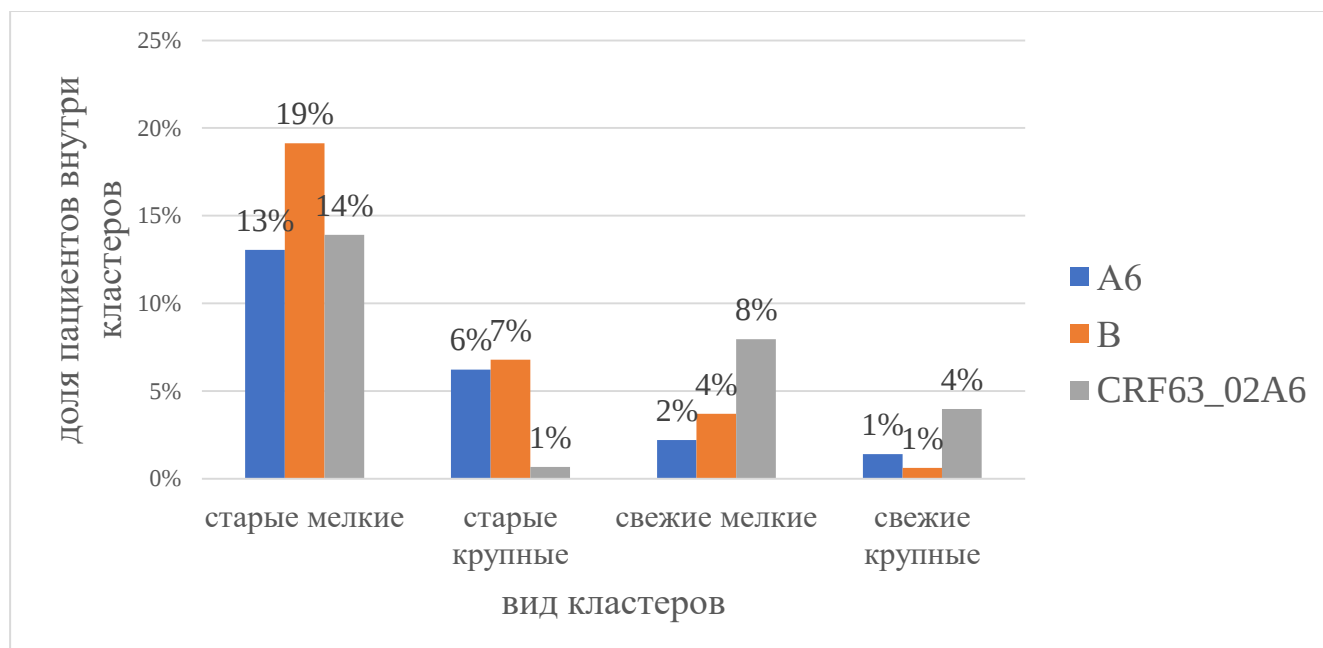


Рисунок 24 – Распределение по кластерам пациентов, инфицированных различными генетическими вариантами ВИЧ-1

Среди трех указанных генетических вариантов доля кластеризовавшихся последовательностей была достоверно выше ($p=0,04$) для субтипа В (30% кластеризовавшихся последовательностей) и достоверно ниже ($p=0,03$) для суб-субтипа А6, где кластеризовалось 23% последовательностей.

Обращает на себя внимание, что снижение доли крупных кластеров во времени (от старых к мелким) было обнаружено для субтипов А6 (от 6% до 1%) и В (от 7% до 1%), но не для CRF63_02A6, где был выявлен рост от 1% до 4%. Для CRF63_02A6 была также зарегистрирована наибольшая доля последовательностей, попавших в свежие мелкие кластеры (8%). В целом, если внутри старых кластеров преобладали пациенты с субтипом В (26%), а пациентов с суб-субтипом А6 было 19% и CRF63_02A6 всего 15%, то внутри свежих кластеров на первом месте оказались пациенты, инфицированные CRF63_02A6 (12%), затем с субтипом В (5%) и далее с суб-субтипом А6 (3%).

При анализе кластеризации пациентов в зависимости от их возраста на момент постановки диагноза были обнаружены некоторые различия между возрастными группами, которые, однако, были недостоверны вследствие их малых размеров. Для повышения достоверности группы «мелкие кластеры» и «крупные» кластеры» были объединены между собой. Результаты представлены на рисунке 25.

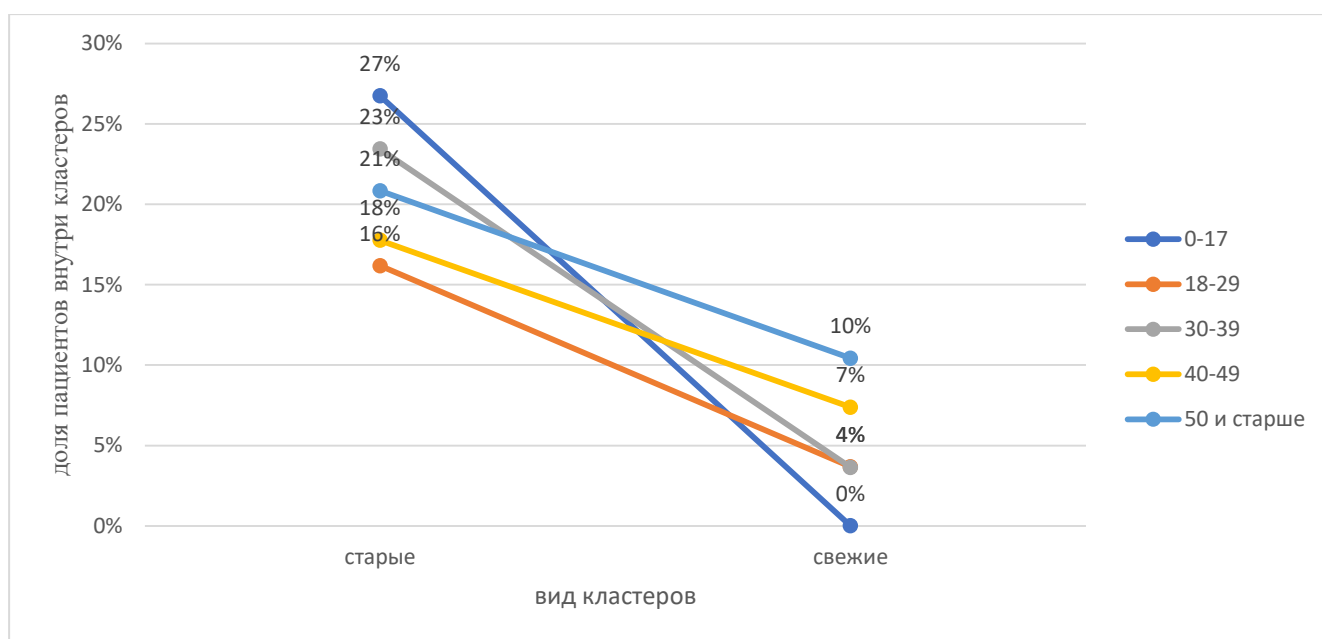


Рисунок 25 – Распределение по кластерам пациентов в зависимости от их возраста на момент постановки диагноза «ВИЧ-инфекция»

Во всех возрастных группах доля пациентов внутри свежих кластеров была меньше, чем их доля внутри старых кластеров. Однако максимально эта тенденция проявлялась (снижение от 27% до 0%) в группе пациентов, которым диагноз устанавливался в возрасте от 0 до 17 лет. Напротив, в группах, получивших диагноз в возрасте 50 лет и старше, а также от 40 до 49 лет, тенденция была наименее выражена. Пациенты этих двух возрастных групп, имели наибольшую степень кластеризации на современном этапе.

Заключительным параметром, который был изучен с помощью кластерного анализа, был опыт приема АРВ препаратов на момент забора крови. На рисунке

26 представлены результаты кластеризации исследуемой выборки пациентов, для которых была известная информация об опыте приема терапии (2385 пациентов из 2396).

По данному параметру у пациентов было наиболее значимое различие ($p < 0,001$). Если в целом в исследуемой выборке кластеризовалось 24% пациентов, то в группе пациентов, имевших опыт приема АРВ препаратов, таких было всего 13%, а в группе без опыта – 33% пациентов.

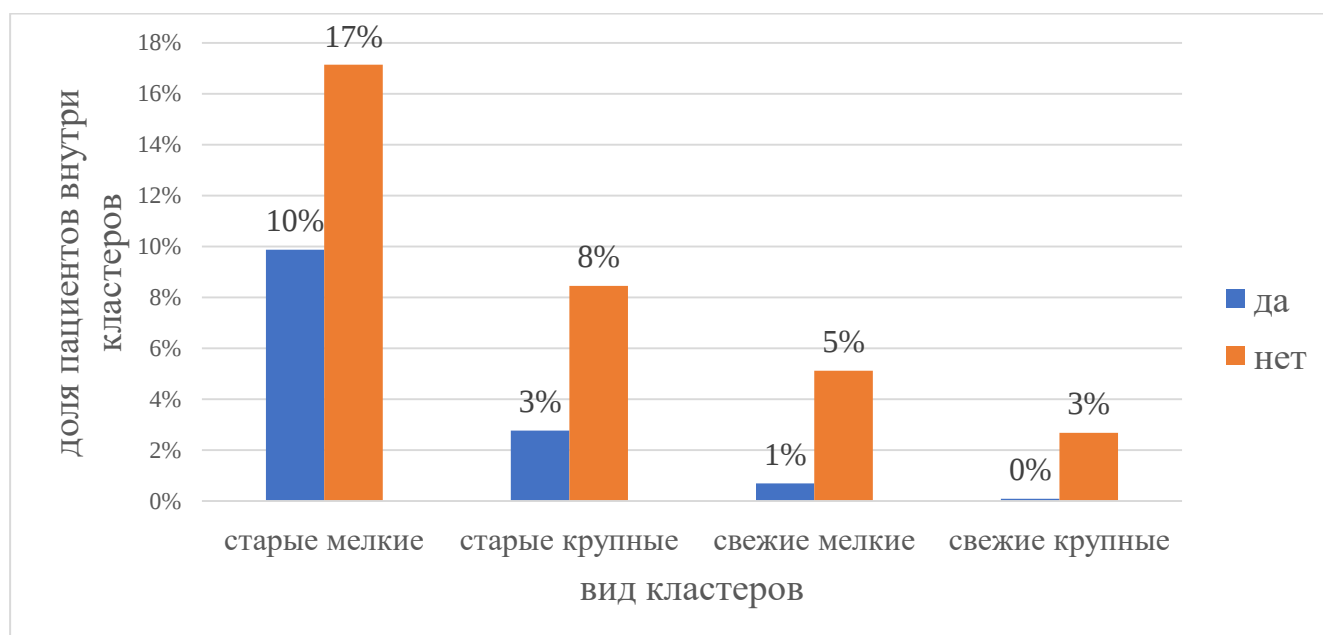


Рисунок 26 – Распределение по кластерам пациентов в зависимости от наличия опыта приема АРВ препаратов на момент забора крови

При этом в обеих группах (как с опытом приема АРВ препаратов, так и без него) доля пациентов внутри свежих кластеров была меньше по сравнению с пациентами, попавших в старые кластеры. Также снижение кластеризовавшихся пациентов было пропорционально друг другу.

Во всех видах кластеров было получено достоверное различие ($p < 0,001$) при сравнении пациентов с опытом и без такового. Пациенты без опыта всегда кластеризовались значительно чаще, чем пациенты с опытом, причем в свежих кластерах это различие было больше, чем в старых.

Таким образом, в ходе анализа выборки ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Центрального ФО, было проведено сравнение между собой наиболее широко используемых методов выявления молекулярных кластеров. Была определена чувствительность этих методов, а также проведена оценка сходимости результатов их применения. Методы, основанные на филогении, то есть, использующие для выявления кластеров филогенетические деревья, имели хорошую сходимость между собой, однако выявляли значительно меньше кластеров по сравнению с методом, использующим только значение генетической дистанции. В то же время именно эти методы используются для оценки развития эпидемии ВИЧ-инфекции, как наиболее надежные, поскольку используют не только параметр генетического сходства, но и достоверность узлов филогенетического дерева.

Было показано, что с увеличением порога генетической дистанции доля кластеризующихся нуклеотидных последовательностей вырастала, причем для метода, использующего только генетическую дистанцию (MicrobeTrace), она росла в геометрической прогрессии. Эти результаты указывают на ограничения в его применении в исследованиях молекулярных кластеров, выявляемых в широком временном диапазоне. С другой стороны, методы, использующие филогенетический анализ для выявления молекулярных кластеров, имели ограничение в отношении объема анализируемой информации и значительно большую продолжительность анализа.

В ходе исследования была разработана и предложена классификация молекулярных кластеров по их размеру и периоду роста. Такая классификация позволила провести анализ изменения динамики заболеваемости ВИЧ-инфекции и структуры путей передачи возбудителя.

Для анализа развития эпидемии ВИЧ-инфекции в Центральном ФО был применен наиболее чувствительный метод, основанный на филогении и использующий программу FastTree с порогом генетической дистанции 4,5%. Результаты анализа показали, что среди таких характеристик, как пол, предполагаемый путь передачи, субтип вируса, возраст пациента на момент

постановки диагноза и опыт АРВ-терапии, только в отношении пола не было получено достоверной разницы. Все остальные характеристики позволили выявить ряд особенностей развития эпидемии.

В частности, пациенты с гомосексуальным путем передачи кластеризовались достоверно чаще других групп, при этом превалировали мелкие кластеры, и доля последовательностей внутри кластеров мало снижалась со временем. Напротив, пациенты с путем передачи, связанным с парентеральным употреблением наркотиков, часто оказывались внутри крупных старых кластеров, а внутри свежих кластеров практически отсутствовали. Полученные результаты указывают на то, что активность распространения ВИЧ-1 в группе ПИН с течением времени снижается, в то время как среди мужчин, практикующих секс с мужчинами, этого не наблюдается.

Анализ кластеризации пациентов в зависимости от субтипа ВИЧ-1, которым они были инфицированы, показал, что внутри старых кластеров наиболее часто оказывались пациенты ВИЧ-1 субтипа В, в то время как внутри свежих кластеров превалировали пациенты, имеющие CRF63_02A6. Эти результаты подтверждают исследования, показывающие замещение в Сибирском и в меньшей степени Уральском ФО суб-субтипа А6 циркулирующей рекомбинантной формой CRF63_02A6 [49].

Анализ кластеризации пациентов в зависимости от возраста, в котором им был поставлен диагноз «ВИЧ-инфекция», показал, что наибольшее снижение доли кластеризованных случаев было среди молодых людей младше 18 лет, в то время, как среди пациентов старших возрастных групп (50 лет и старше и 40-49 лет) наоборот эта динамика была наименее слабой. Этим результаты настоящего исследования подтверждают официальные статистические данные, указывающие на снижение количества новых случаев ВИЧ-инфекции среди молодых людей (менее 18 лет) и повышение доли людей среднего и старшего возраста [14]. Такое изменение в структуре заболеваемости связано в первую очередь со снижением количества случаев передачи ВИЧ-1 в ходе парентерального употребления наркотиков.

И, наконец, было показано, что хотя как среди пациентов с опытом приема АРВ препаратов, так и среди наивных пациентов обнаруживалась схожая тенденция снижения кластеризации со временем, пациенты без опыта приема терапии более чем в 2,5 раза чаще оказывались внутри молекулярных кластеров. Безусловно, это связано с тем, что АРВ-терапия, подавляя репликацию и приводя к уменьшению концентрации вируса в крови и других биологических жидкостях человека, значительно снижает его инфекционную опасность.

9.2 Применение кластерного анализа нуклеотидных последовательностей в ходе ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа

Выявление и анализ молекулярных кластеров с целью ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа возможен только в случае, когда секвенирование ВИЧ-1 в исследуемом регионе происходит на регулярной основе. При этом доля отсеквенированных ЛЖВ, которая в иностранной литературе формулируется, как «плотность выборки», должна составлять не менее 10% от всех выявляемых ЛЖВ [146].

В связи с этим перед проведением дальнейших исследований собранная в Российской базе данных ЛУ ВИЧ-1 к АРВ препаратам информация о количестве ЛЖВ была соотнесена с данными о заболеваемости, пораженности ВИЧ-инфекцией и количестве всех выявленных случаев ВИЧ-инфекции по каждому из 89 субъектов РФ. Информация о заболеваемости и пораженности была получена из информационного бюллетеня «ВИЧ-инфекция» [14].

Как и предыдущем анализе характеристик развития эпидемии ВИЧ-инфекции в РФ, необходимой информацией являлись следующие параметры: регион проживания, пол пациента, дата получения первого положительного результата ИБ, наличие нуклеотидной последовательности генов протеазы и

обратной транскриптазы ВИЧ-1. В Российской базе данных присутствовало 3842 записи о пациентах, для которых вся перечисленная информация была известна.

В результате анализа данных о регионе проживания 3842 записей и сопоставления с информацией о количестве всех случаев ВИЧ-инфекции в субъекте РФ было обнаружено, что тремя субъектами с наибольшей плотностью выборки являются Орловская область, Тульская область и Рязанская область Центрального ФО. При этом только для Орловской области присутствовала достаточная для проведения исследования плотность выборки, для остальных субъектов она составляла менее 2% (таблица 23).

Таблица 23 – Доля ЛЖВ, для которых известны нуклеотидные последовательности ВИЧ-1, в наиболее хорошо изученных субъектах РФ

субъект РФ	кол-во записей в базе данных	Кол-во лиц, инфицированных ВИЧ-1, зарегистрированных в субъекте на 31.12.2022 г., исключая детей с неустановленным диагнозом	плотность выборки
Орловская область	987	3932	25,10%
Тульская область	213	14134	1,51%
Рязанская область	83	6049	1,37%
Тверская область	175	17265	1,01%
Краснодарский край	347	35589	0,98%
Самарская область	281	83202	0,34%
Челябинская область	197	67335	0,29%
Московская область	162	74547	0,22%

В связи с этим дальнейший анализ был осуществлен на основании данных о пациентах с ВИЧ-инфекцией, проживающих на территории Орловской области.

Для оценки смещенности анализируемой выборки по времени выявления инфекции была проведена оценка доли ЛЖВ, у которых было проведено секвенирование вируса, по годам. Результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Общее количество выявленных в Орловской области ВИЧ-инфицированных лиц и распределение пациентов с проведенным секвенированием ВИЧ-1 по годам постановки диагноза ВИЧ-инфекция

год	кол-во последовательностей от уникальных пациентов, шт.	выявлено ВИЧ+*, чел.	доля пациентов с известными последовательностями ВИЧ-1
1999	12	118	10%
2000	11	67	16%
2001	44	241	18%
2002	20	106	19%
2003	11	58	19%
2004	18	87	21%
2005	11	94	12%
2006	9	78	12%
2007	16	98	16%
2008	16	107	15%
2009	21	106	20%
2010	16	108	15%
2011	30	128	23%
2012	30	142	21%
2013	37	138	27%
2014	32	168	19%
2015	81	285	28%
2016	106	285	37%
2017	112	285	39%
2018	149	295	51%
2019	67	261	22%
2020	14	216	6%
2021	73	234	31%
2022	51	227	23%
Итого	987	3932**	25%

* выявлено ВИЧ-инфицированных граждан РФ (код 100) по данным статистической формы №4.

** Количество инфицированных ВИЧ-1, зарегистрированных в Орловской области на 31.12.2022 г., исключая детей с неустановленным диагнозом

За исключением 2020-го года, когда плотность выборки составила 6%, в остальные года, начиная с 1999-го, она колебалась в диапазоне от 10% до 51% (среднее 25%), что было достаточно для проведения кластерного анализа с получением достоверных результатов.

Кластерный анализ 987 ВИЧ-инфицированных граждан РФ, находящихся на учете и получающих медицинскую помощь в БУЗ Орловской области "Орловский центр СПИД" был осуществлен с помощью программы MicrobeTrace и порогом генетического сходства в 1%. В результате анализа 178 нуклеотидных последовательностей оказались внутри кластеров, что составило 18% от всей исследуемой выборки. Подробное распределение образцов в зависимости от размера кластера представлено в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты кластерного анализа ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в Орловской области

размер кластера	кол-во кластеров	доля от всех выявленных кластеров	общее кол-во посл-тей в кластерах	доля посл-тей от всех посл-тей в кластерах
2	25	66%	50	28%
3	6	16%	18	10%
4	1	3%	4	2%
5	2	5%	10	6%
9	1	3%	9	5%
10	1	3%	10	6%
12	1	3%	12	7%
65	1	3%	65	37%

Среди выявленных кластеров наиболее часто обнаруживались диады (66%) и триады (16%). Они содержали 28% и 10% от всех кластеризовавшихся пациентов соответственно. Однако внутри средних и больших кластеров, содержащих 4 и более пациентов и встречающихся значительно реже (всего в 18% случаях), находилось 62% кластеризовавшихся ВИЧ-инфицированных

пациента. Анализ характеристик пациентов, группирующихся в больших и средних кластерах, представляет собой наибольший интерес, поскольку такие кластеры представляют собой групповые очаги заболевания, и противоэпидемические мероприятия, направленные на локализацию таких очагов, имеют наибольшую эффективность.

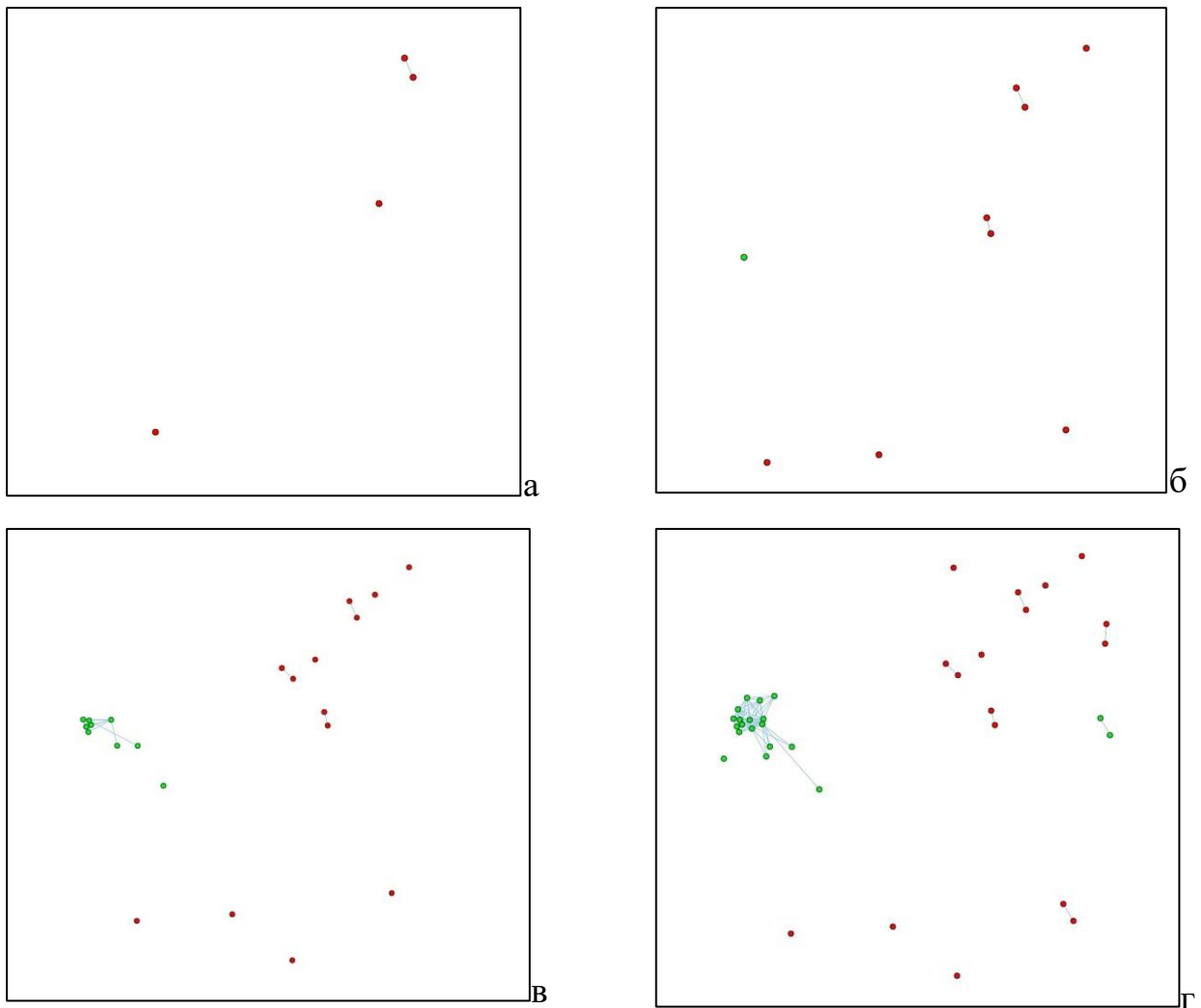
На первом этапе были изучены появление и рост молекулярных кластеров с течением времени. Анализ показал, что первая диада сформировалась в октябре 2014-го года (рисунок 26а). Затем в апреле 2015-го года был выявлен первый пациент (3982) из кластера (кластер №22), который впоследствии стал наиболее крупным кластером, зарегистрированным в изучаемом регионе (рисунок 26б). Уже в декабре 2015-го года было выявлено 9 ВИЧ-инфицированных пациентов, входящих в него (рисунок 26в). По-видимому, очаг заболевания, вызванный этим генетическим вариантом вируса, оставался невыявленным, потому что в июне 2016-го года молекулярный кластер вырос до 18 (рисунок 26г), к концу 2016-го года – до 26 человек (рисунок 26д), а в декабре 2017-го года насчитывал 40 ВИЧ-инфицированных пациентов. Активное распространение данного варианта вируса продолжалось и в 2018-м году (15 новых случаев в кластере), однако затем скорость передачи начала снижаться (2019 – 7 случаев, 2020 – 0 случаев, 2021 – 1 случай, 2022 – 2 случая).

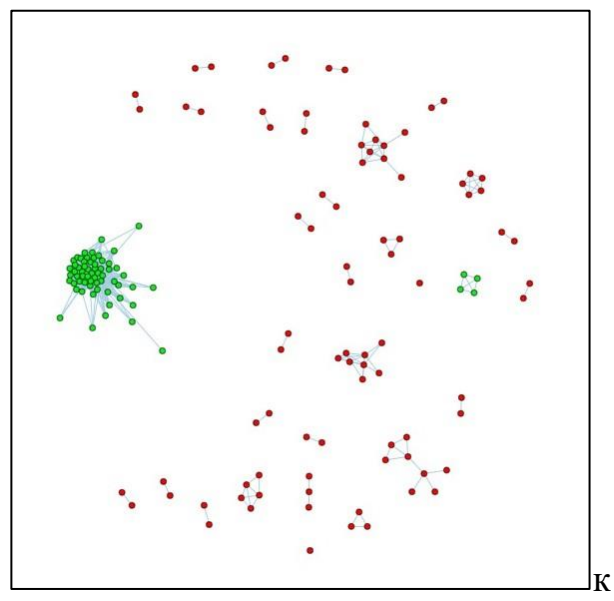
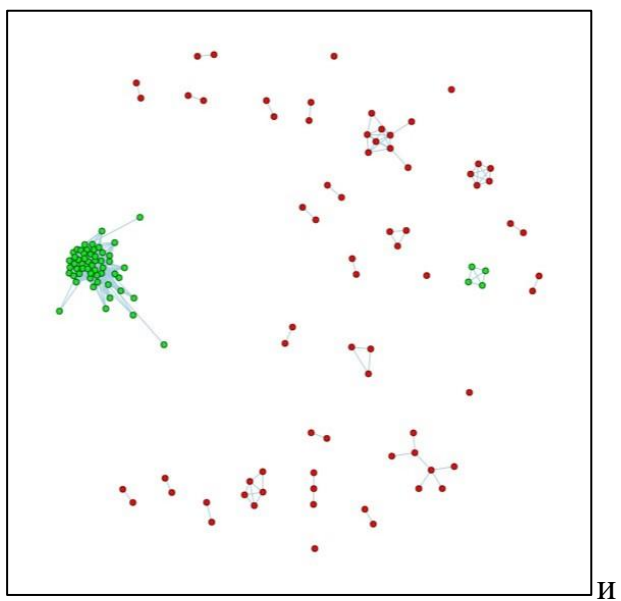
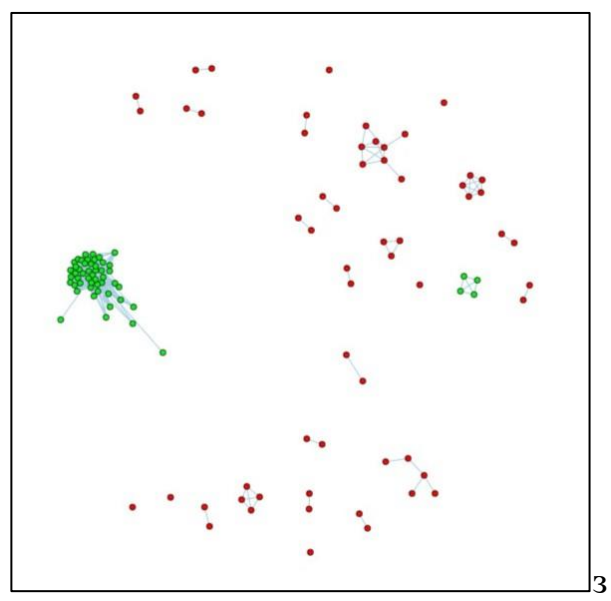
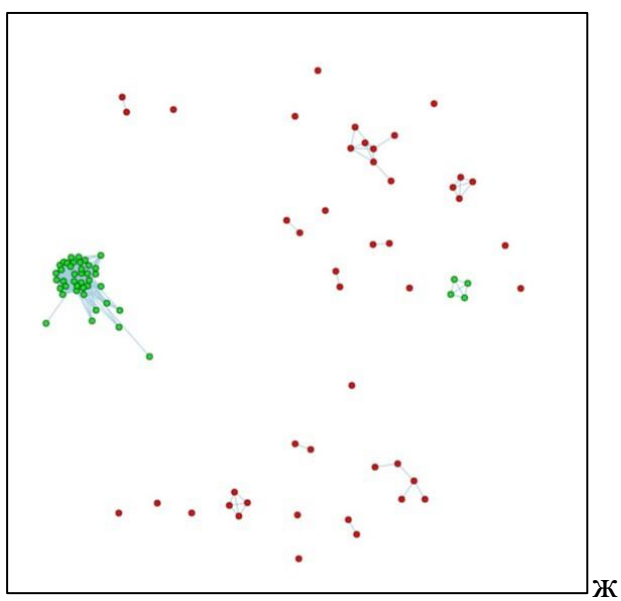
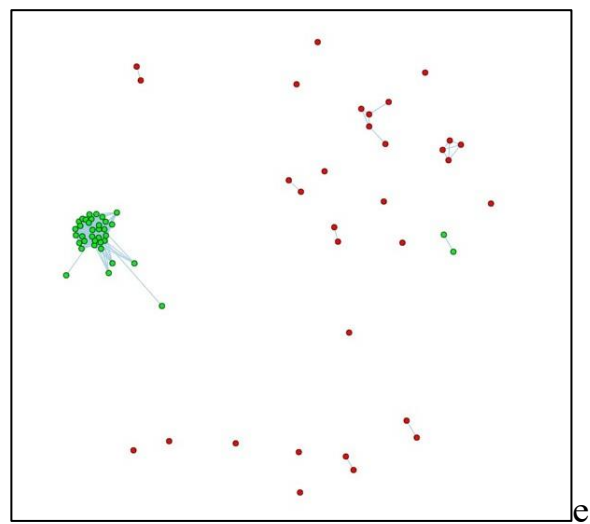
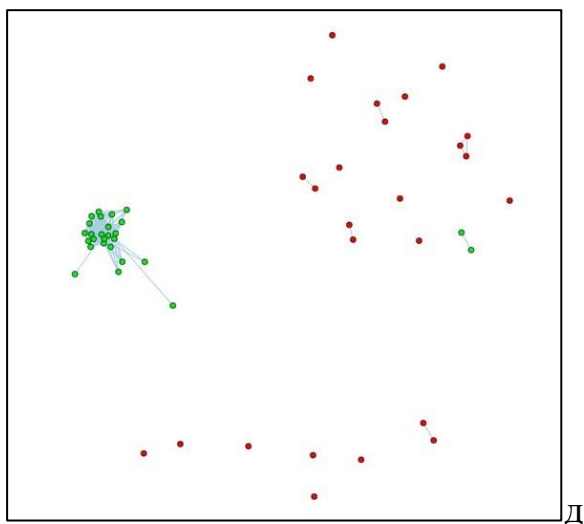
В 2017-м году было выявлено четыре других крупных кластера, насчитывающих к концу года от 4 до 7 пациентов каждый – №88, 97, 145, 291 (рисунки 26е и 26ж). В 2018-м году рост этих кластеров продолжился (рисунки 26з и 26и). В 2019-м году было зарегистрировано снижение количества новых случаев инфекции у пациентов, относящихся к крупным кластерам. Дополнительно был выявлен только один кластер (№102), который к концу года включал в себя 8 человек (рисунки 26к и 26л).

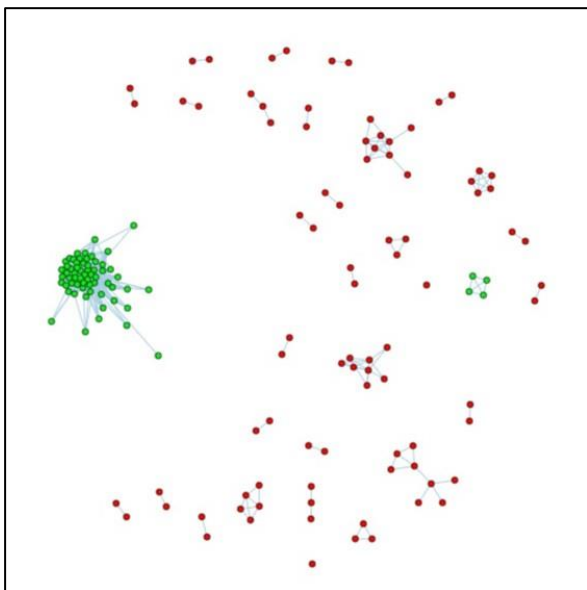
Появление новых и рост ранее выявленных молекулярных кластеров значительно замедлился в 2020-м и первой половине 2021-го года. Однако начиная со второй половины 2021-го года и до конца изучаемого периода (декабрь 2022-го) регистрация новых пациентов внутри кластеров начала расти

(рисунки 26м-26с). Наиболее вероятно, что снижение регистрации новых случаев ВИЧ-инфекции в течение полуторалетнего периода (01.2020-06.2021) связано со снижением охвата тестированием на ВИЧ, ухудшением выявляемости и обусловлено развивавшейся в тот период пандемией COVID-19.

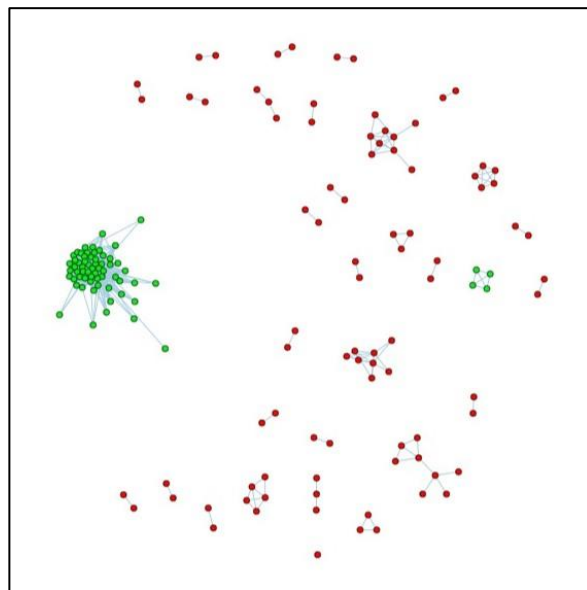
На рисунке 26 представлен рост количества и размеров выявляемых кластеров с разбивкой на 6-месячные интервалы.



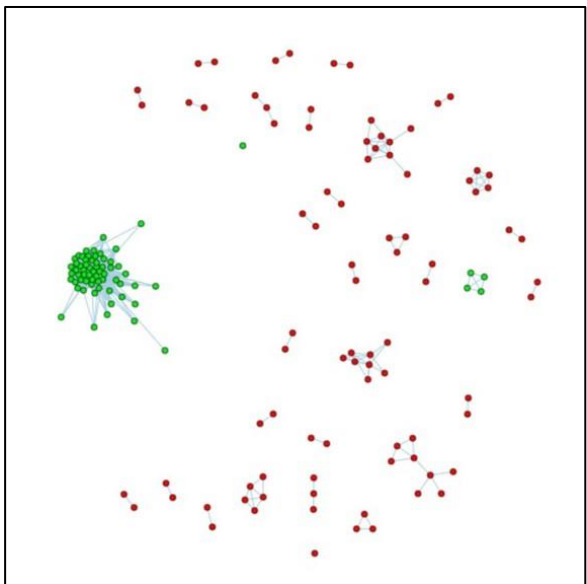




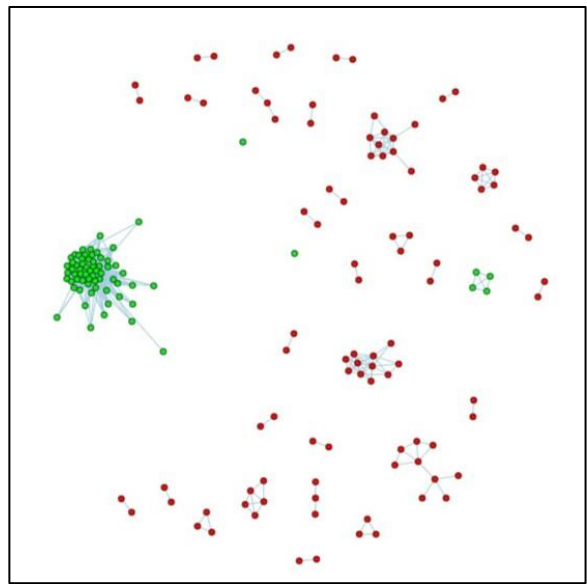
J



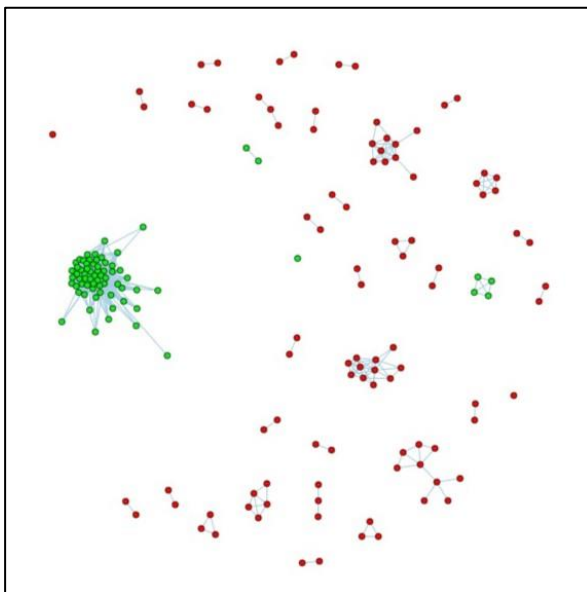
M



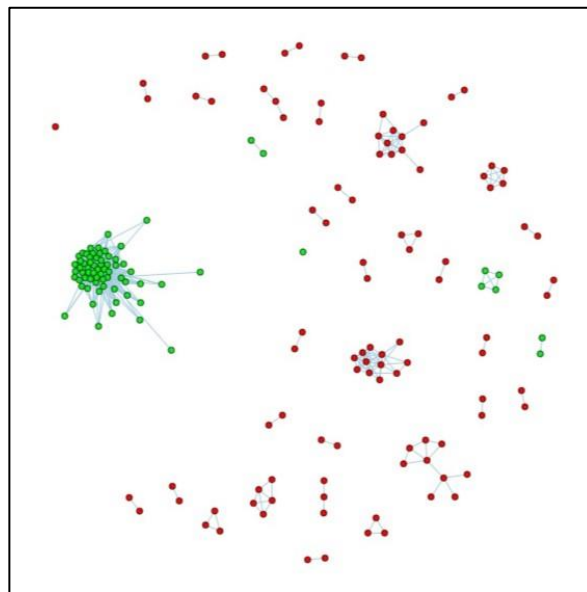
H



O



II



p

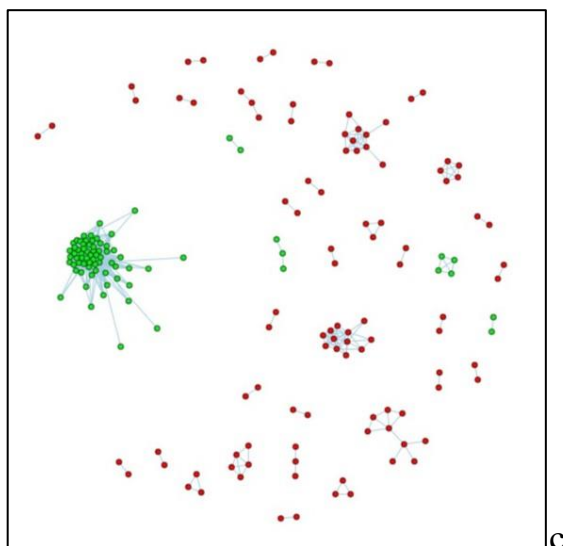


Рисунок 26 – Молекулярные кластеры, выявляемые в период с 2014-го по 2022-й гг. Зеленым цветом представлены кластеры, формируемые пациентами, инфицированными генетическим вариантом CRF63_02A6, красным – суб-субтипом A6

Анализ данных официальной статистики по ВИЧ-инфекции в Орловской области показал, что наиболее активный рост крупных молекулярных кластеров, выявленный в 2015-2018 гг. по времени почти полностью совпал с повышением регистрируемой заболеваемости в регионе в 2015-2018 гг. Анализ формы 4 показал, что в указанный период не происходило значимых изменений, связанных с охватом или особенностями тестирования населения на ВИЧ-1. В связи с этим полученные результаты указывают на то, что повышенная заболеваемость была обусловлена увеличением скорости передачи вируса в регионе (рисунок 27).

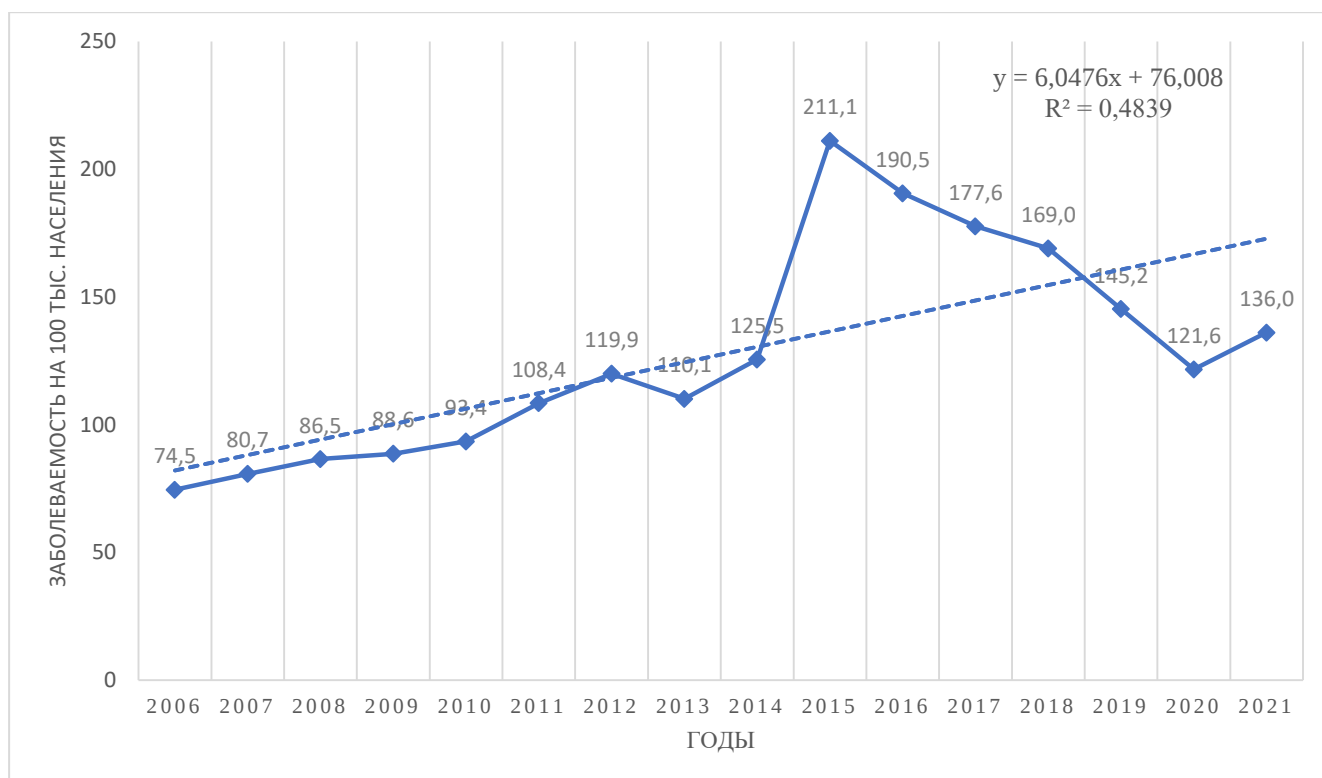


Рисунок 27 – Динамика заболеваемости ВИЧ-инфекцией на территории Орловской области с 2006 по 2021 гг. Пунктиром представлена линия тренда

Анализ молекулярных кластеров, выполняющийся на регулярной основе, позволяет своевременно выявлять очаги заболевания. В качестве примера был проведен анализ, учитывающий всех ВИЧ-инфицированных пациентов, попавших внутрь свежих кластеров. Под свежими кластерами подразумевались кластеры, в которых присутствовал хотя бы один пациент, которому был поставлен диагноз в 2022-м году, то есть, в последнем календарном году анализируемого периода. Результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Отчет, содержащий основные клиническо-эпидемиологические данные о пациентах, попавших в свежие кластеры

Уникальный номер пациента	номер кластера	размер кластера	Пол	Дата/год рождения	Дата первого ВИЧ+ блота	возраст на момент постановки и диагноза	Предп-й путь инф-ния	Получение АРВ препаратов	регион проживания	генетический вариант ВИЧ-1	дата забора крови	РНК ВИЧ-1, коп/мл
3982	22	65	муж	19.05.1974	21.04.2015	41	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	17.10.2018	2 600
3819	22	65	муж	20.06.1985	11.08.2015	30	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	14.08.2018	22 925
1015	22	65	муж	04.03.1980	18.08.2015	35	ПИН	да	Орел	CRF63_02A6	06.07.2016	6 000
2623	22	65	муж	1967	08.09.2015	48	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	07.06.2018	128 470
4158	22	65	муж	17.08.1989	08.09.2015	26	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	03.04.2019	4 119
4121	22	65	жен	12.01.1989	27.10.2015	26	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	12.01.2019	16 076
4137	22	65	жен	28.10.1987	27.10.2015	28	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	20.03.2019	1 273
5169	22	65	жен	12.09.1997	03.11.2015	18	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	23.08.2022	15 000
2329	22	65	муж	15.06.1968	10.11.2015	47	ПИН	да	Орел	CRF63_02A6	24.09.2018	9 080
4055	22	65	муж	25.07.1981	02.02.2016	35	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	12.12.2018	42 445
2572	22	65	муж	1990	17.03.2016	26	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	20.03.2018	42 029
2638	22	65	муж	1977	05.04.2016	39	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	13.06.2018	794 910
4050	22	65	жен	18.07.1984	05.04.2016	32	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	06.12.2018	2 185
4052	22	65	муж	15.11.1972	19.04.2016	44	ПИН	да	Орл. обл.	CRF63_02A6	11.12.2018	32 664
4053	22	65	муж	03.09.1983	19.04.2016	33	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	11.12.2018	1 885
2602	22	65	жен	1991	24.05.2016	25	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	30.05.2018	2 990
3903	22	65	муж	01.06.1979	21.06.2016	37	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	11.09.2018	152 148
4135	22	65	муж	13.04.1977	28.06.2016	39	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	19.03.2019	5 369
3880	22	65	муж	10.09.1971	05.07.2016	45	ПИН	да	Орл. обл.	CRF63_02A6	03.09.2018	31 680
2936	22	65	жен	26.05.1984	04.08.2016	32	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	16.07.2018	18 415
3991	22	65	муж	08.12.1979	01.09.2016	37	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	30.10.2018	119 940
2885	22	65	муж	07.07.1968	27.09.2016	48	половой	нет	Орел	CRF63_02A6	02.07.2018	15 454
3789	22	65	жен	14.01.1988	04.10.2016	28	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	30.07.2018	3 005

Уникальный номер пациента	номер кластера	размер кластера	Пол	Дата/год рождения	Дата первого ВИЧ+ блота	возраст на момент постановки и диагноза	Предп-й путь инф-ния	Получение АРВ препаратов	регион проживания	генетический вариант ВИЧ-1	дата забора крови	РНК ВИЧ-1, коп/мл
3981	22	65	жен	20.09.1984	13.12.2016	32	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	16.10.2018	19 716
2937	22	65	жен	21.07.1982	20.12.2016	34	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	16.07.2018	1 050
2621	22	65	муж	1982	27.12.2016	34	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	06.06.2018	117 244
2865	22	65	муж	07.01.1982	17.01.2017	35	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	25.06.2018	13 155
3813	22	65	муж	07.06.1975	19.01.2017	42	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	13.08.2018	174 315
4072	22	65	муж	18.05.1987	02.02.2017	30	ПИН	да	Орел	CRF63_02A6	17.01.2019	8 831
4148	22	65	жен	04.01.1991	21.02.2017	26	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	26.03.2019	3 256
2890	22	65	муж	28.07.1978	09.03.2017	39	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	02.07.2018	38 695
2603	22	65	жен	1989	23.03.2017	28	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	30.05.2018	69 870
3911	22	65	жен	19.03.1990	25.04.2017	27	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	17.09.2018	12 888
2639	22	65	муж	1986	03.05.2017	31	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	13.06.2018	2 859
4047	22	65	муж	22.09.1980	01.06.2017	37	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	05.12.2018	12 150
2921	22	65	муж	16.01.1981	10.07.2017	36	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	11.07.2018	34 895
3986	22	65	жен	29.12.1989	10.07.2017	28	гетеро	да	Орел	CRF63_02A6	22.10.2018	23 055
4250	22	65	жен	21.05.1991	04.10.2017	26	ПИН	да	Орел	CRF63_02A6	29.05.2019	25 883
4201	22	65	муж	28.12.1973	27.10.2017	44	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	24.04.2019	1 363 231
3888	22	65	муж	02.06.1988	10.11.2017	29	гетеро	да	Орл. обл.	CRF63_02A6	05.09.2018	23 555
2559	22	65	муж	1978	01.02.2018	40	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	06.02.2018	71 490
2557	22	65	жен	30.05.1968	06.02.2018	50	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	06.02.2018	542 340
2561	22	65	жен	1981	13.02.2018	37	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	15.02.2018	19 223
3994	22	65	муж	05.03.1974	01.03.2018	44	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	30.10.2018	51 440
2568	22	65	муж	1973	02.03.2018	45	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	06.03.2018	3 842 615
2578	22	65	муж	1975	16.03.2018	43	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	09.04.2018	1 316 070
4147	22	65	муж	27.08.1979	16.03.2018	39	ПИН	да	Орл. обл.	CRF63_02A6	25.03.2019	7 588
4156	22	65	муж	20.09.1984	25.04.2018	34	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	03.04.2019	39 721
2848	22	65	жен	24.10.1984	04.05.2018	34	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	19.06.2018	172 558

Уникальный номер пациента	номер кластера	размер кластера	Пол	Дата/год рождения	Дата первого ВИЧ+ блота	возраст на момент постановки и диагноза	Предп-й путь инф-ния	Получение АРВ препаратов	регион проживания	генетический вариант ВИЧ-1	дата забора крови	РНК ВИЧ-1, коп/мл
2861	22	65	жен	10.07.1979	04.06.2018	39	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	21.06.2018	15 253
3854	22	65	муж	27.01.1966	19.07.2018	52	ПИН	да	Орел	CRF63_02A6	23.08.2018	10 493
5137	22	65	жен	17.03.1982	25.08.2018	36	гетеро	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	31.01.2022	1 359 955
4171	22	65	муж	29.11.1989	11.09.2018	29	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	10.04.2019	96 599
3964	22	65	жен	15.02.1995	21.09.2018	23	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	04.10.2018	1 963
4165	22	65	муж	08.11.1981	24.09.2018	37	ПИН	да	Орел	CRF63_02A6	08.04.2019	5 302
5160	22	65	муж	05.11.1982	10.01.2019	37	нет данных	нет	Орел	CRF63_02A6	21.07.2022	38 000
4080	22	65	жен	29.10.1984	24.01.2019	35	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	25.01.2019	44 979
4154	22	65	жен	10.03.1986	27.03.2019	33	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	02.04.2019	3 247 524
4155	22	65	муж	24.07.1987	01.04.2019	32	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	03.04.2019	106 633
4200	22	65	муж	03.09.1986	22.04.2019	33	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	24.04.2019	41 435
4287	22	65	муж	08.04.1973	25.05.2019	46	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	02.04.2021	508 673
4275	22	65	муж	24.09.1982	24.06.2019	37	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	24.06.2019	75 350
4538	22	65	муж	10.01.1975	15.03.2021	46	ПИН	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	16.03.2021	3 325
5162	22	65	жен	14.02.1992	08.02.2022	30	гетеро	нет	Орел	CRF63_02A6	01.08.2022	9 896
5191	22	65	муж	25.04.1991	14.10.2022	31	половой	нет	Орел	CRF63_02A6	16.11.2022	3 800
4318	681	3	жен	17.09.1990	09.02.2021	31	гетеро	да	Орл. обл.	CRF63_02A6	09.02.2021	15 993
5170	681	3	муж	10.03.1981	26.08.2022	41	половой	нет	Орел	CRF63_02A6	29.08.2022	20 000
5183	681	3	муж	05.11.1986	31.10.2022	36	половой	нет	Орл. обл.	CRF63_02A6	01.11.2022	31 000
4554	744	2	муж	15.04.1986	26.07.2021	35	гетеро	нет	Орел	A6	29.07.2021	3 724
5200	744	2	муж	24.08.1977	05.12.2022	45	половой	нет	Орел	A6	12.12.2022	1 800 000
4558	748	2	муж	11.06.1979	27.08.2021	42	гетеро	нет	Орел	A6	01.09.2021	83 589
5152	748	2	жен	18.04.1988	20.06.2022	34	гетеро	нет	Орел	A6	01.07.2022	210 000
5144	800	2	муж	08.03.1994	04.04.2022	28	ПИН	нет	Орел	CRF63_02A6	07.04.2022	51 020
5172	800	2	муж	11.09.2001	25.04.2022	21	нет данных	нет	Орел	CRF63_02A6	07.09.2022	16 000

Всего было выявлено 74 пациента, относящихся к 5 кластерам. Среди всех выявленных пациентов ВИЧ-инфекция была диагностирована в 2022-м году у 8 из них. Три кластера из пяти были сформированы ЛЖВ, инфицированными рекомбинантной формой CRF63_02A6, два оставшихся ВИЧ-1 суб-субтипа А6. При этом крупным кластером являлся только один из них. Им был описанный выше кластер №22, появившийся в 2015-м году и к концу исследуемого периода насчитывающий 65 человек. В 2022-м году было зарегистрировано 2 новых случая ВИЧ-инфекции у пациентов, входящих в него.

Анализ генетической близости 65 нуклеотидных последовательностей, входящих в кластер №22, показал, что сходство находится в диапазоне от 98,3% до 100% (среднее 99,4%). Генетическое сходство более 98% позволило дополнительно подтвердить, что все 65 пациентов с высокой степенью достоверности относились к одному эпидемиологическому очагу. Согласно результатам, полученным в главе 6 «Применение биоинформатических методов в ходе эпидемиологических расследований случаев инфицирования ВИЧ-1, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи» и ранее опубликованного исследования [34], была рассчитана средняя продолжительность болезни. Оказалось, что на момент постановки диагноза она не превышала одного года.

Клинические и демографические характеристики пациентов, входящих в кластер №22, были сравнены с характеристиками всей исследованной выборки ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в данном субъекте РФ. Результаты сравнения представлены в таблице 27.

Пациенты двух групп не различались достоверно по таким характеристикам, как пол, возраст на момент постановки диагноза и концентрации РНК ВИЧ-1 в плазме крови на момент включения в исследование. В то же время пациенты, входящие в кластер №22, с высокой достоверностью ($p < 0,001$) чаще инфицировались в ходе парентерального употребления наркотических средств (62% против 30%), не имели опыта приема АРВ препаратов (83% против 65%) и проживали в г. Орел (78% против 54%).

Таблица 27 – Сравнительный анализ клинико-демографических характеристик ВИЧ-инфицированных пациентов кластера №22 с генеральной совокупностью

характеристика		кластер №22, 65 пациентов		генеральная совокупность, 987 пациентов	
		чел	%	чел	%
Пол	муж	42	65%	565	57%
	жен	23	35%	422	43%
возраст на момент постановки диагноза, лет		35	-	34	-
Предполагаемый путь инфицирования	половой	2	3%	103	10%
	гетеро	22	34%	541	55%
	гомо	0	0%	7	1%
	ПИН	40	62%	298	30%
	вертикальный	0	0%	7	1%
	нет данных	1	2%	31	3%
Получение АРВ препаратов	да	11	17%	347	35%
	нет	54	83%	640	65%
регион проживания	Орел	51	78%	537	54%
	Орловская область	14	22%	450	46%
РНК ВИЧ-1, среднее значение, коп/мл		231501	-	215415	-

Результаты проведенного исследования показали, что появление и последующий активный рост молекулярных кластеров во времени практически совпал с повышением уровня заболеваемости в исследуемом регионе. Также выявлен рост количества ЛЖВ внутри молекулярных кластеров, начиная со второй половины 2021 г. и до конца исследуемого периода. Это позволяет предположить, что в краткосрочной перспективе в изучаемом регионе возможен рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией.

В рамках выполненной работы был выявлен кластер №22, содержащий приблизительно 3,4% ЛЖВ от всех ВИЧ-инфицированных, выявленных на территории субъекта РФ со времени появления кластера (с 2015 г.).

Ретроспективный анализ медицинских карт пациентов, оказавшихся внутри этого кластера, показал, что в рамках проведенного эпидемиологического расследования вновь выявленные ВИЧ-инфицированные не указывали других пациентов этого кластера, как контактных, что явилось одной из причин продолжения передачи вируса и роста очага.

Выявление крупных молекулярных кластеров позволяет определять осуществлять характеристику ВИЧ-инфицированных лиц, входящих в очаг заболевания, и на основании этих данных организовывать более эффективные профилактические и противоэпидемические мероприятия, направленные на снижение заболеваемости. В частности, пациенты кластера №22 характеризовались определенным регионом проживания (г. Орел), более частым наличием опыта парентерального употребления наркотических средств и отсутствием опыта приема АРВ препаратов. Мероприятия, направленные на эти факторы, при своевременном выявлении ЛЖВ, позволили бы снизить число случаев заражения внутри данного очага.

Таким образом, в рамках настоящего исследования было продемонстрировано, каким образом с помощью анализа молекулярных кластеров возможно совершенствование и повышение эффективности эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

На первом этапе биоинформатические методы, позволяющие выявлять молекулярные кластеры, были сравнены между собой. Для изучения особенностей развития эпидемии в течение продолжительного временного горизонта более эффективно оказалось использование методов, основанных на филогении. В то же время, для осуществления ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа предпочтительным являлся подход, выявляющий молекулярные кластеры только на основании расчета попарной генетической дистанции между нуклеотидными последовательностями.

Было показано, что анализ молекулярных кластеров может использоваться с целью уточнения особенностей развития эпидемии ВИЧ-инфекции, в том числе в отношении периодов, значительно отстоящих по времени от текущего момента.

Кроме того, биоинформатические методы могут использоваться в качестве инструмента для осуществления ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа. В случае применения кластерного анализа оперативно, возникает возможность выявления очагов заболевания вскоре после их появления, а также оценки эффективности противоэпидемических мероприятий непосредственно в период их проведения. При этом сокрытие информации в ходе проведения эпидемиологического расследования, например, о предполагаемом пути инфицирования ВИЧ-инфицированным лицом вследствие стигматизации в данном случае не будет являться препятствием, поскольку нуклеотидная последовательность ВИЧ-1 является объективной характеристикой каждого ЛЖВ. Необходимо учитывать, что для осуществления ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа с использованием биоинформатических методов необходимо осуществление секвенирования ВИЧ-1 от значительной доли всех выявляемых ВИЧ-инфицированных лиц, в противном случае достоверность полученных результатов будет снижена. В проведенном исследовании доля ЛЖВ, у которых был отсеквенирован ВИЧ-1, составила 25% от всех зарегистрированных ВИЧ-инфицированных пациентов, что по литературным данным является достаточным для проведения анализа.

ГЛАВА 10. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

К моменту начала выполнения диссертационного исследования в РФ сформировалась система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией, позволяющая в разрезе субъектов страны осуществлять сбор информации, для оценки динамики и структуры заболеваемости. В то же время согласно проведенному анализу, результаты которого представлены в главе 3 (таблица 2), молекулярно-генетические и биоинформатические методы к 2009-му году в системе эпидемиологического надзора практически не использовались. Результаты настоящего исследования, представленные в главах 4-7, позволили разработать МР [26] и МУ [28], а также внести дополнения в СанПиН [54]. В действующей версии Санитарных Правил 3.3686-21 «Санитарно-Эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [55] указано, что:

- генотипирование (определение субтипа вируса) и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей должны быть использованы в качестве дополнительного инструмента при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи или других сложных случаев (пункт 615),
- для оценки распространенности ЛУ ВИЧ-1 осуществляется анализ первичной резистентности вируса к АРВ препаратам как у пациентов без опыта приема терапии, так и у пациентов, столкнувшихся с вирусологическим неуспехом (пункт 667).

Кроме этого, указано, что лабораториям, проводящим исследования на резистентность ВИЧ к АРВ препаратам, необходимо предоставлять результаты исследований на ЛУ ВИЧ во ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»

Роспотребнадзора и ФГБУ Национальный исследовательский медицинский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава РФ (пункт 668). Однако процедура и формат передачи информации не были отражены в формах, предназначенных для сбора эпидемиологической информации.

В рамках эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией сбор сведений об этой инфекции осуществляется в разрезе следующих форм статистической отчетности:

- форма федерального статистического наблюдения № 4 «Сведения о результатах исследования крови на антитела к ВИЧ», утвержденная приказом № 66 от 14 февраля 2020 года Федеральной службой государственной статистики,
- форма № 61 «Сведения о ВИЧ-инфекции», утвержденная приказом № 863 от 30 декабря 2020 года Федеральной службой государственной статистики,
- формы №1 и №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», утвержденные приказом № 867 от 30 декабря 2020 года Федеральной службой государственной статистики.

Форма №4 месячная и годовая предоставляется медицинскими организациями всех профилей, проводящими исследования крови на антитела к ВИЧ, центру по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями или иной специализированной медицинской организации и содержит сведения о количестве обследованных лиц на антитела к ВИЧ и количестве выявленных положительных результатов с распределением по контингенту обследованных (доноры; лица, употребляющие психоактивные вещества; мужчины, имеющие секс с мужчинами; лица, занимающиеся оказанием коммерческих сексуальных услуг; беременные; дети, рожденные ВИЧ-инфицированными матерями, и т.д.), полу и возрасту.

Форма №61 годовая предоставляется медицинскими организациями органу местного самоуправления, осуществляющему полномочия в сфере охраны здоровья, и содержит сведения:

- о числе пациентов с впервые в жизни установленным диагнозом болезни, вызванной ВИЧ, числе контактных лиц и лиц с бессимптомным инфекционным статусом. Данная информация предоставляется с разбивкой на пол и возраст пациентов, а также указанием наличия сопутствующих заболеваний и величины иммунного статуса,
- о числе зарегистрированных пациентов, находившихся под диспансерным наблюдением и количестве снятых с диспансерного наблюдения с указанием о путях передачи ВИЧ-инфекции и разбивкой на группы согласно наличию у пациентов сопутствующих заболеваний, величины иммунного статуса и клинической стадии заболевания,
- о числе обследований пациентов с ВИЧ-инфекцией на сопутствующие заболевания,
- о результатах лабораторного обследования на антитела к ВИЧ с разбивкой по возрасту и указанием числа обследованных, количества положительных,
- о числе обследований пациентов с ВИЧ-инфекцией для определения вирусной нагрузки ВИЧ, оценки концентрации CD4 и выявления резистентности,
- о числе пациентов с ВИЧ-инфекцией, получавших АРВ-терапию с разбивкой на группы по уровню CD4 и величине вирусной нагрузки.

Формы №1 и №2 месячная и годовая передаются Федеральными бюджетными учреждениями здравоохранения субъектов РФ Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и содержат информацию о количестве зарегистрированных заболеваний и случаев смерти с распределением по возрасту.

Таким образом, среди утвержденных форм в рамках эпидемиологического надзора только посредством формы №61 осуществляется сбор информации о

числе проведенных исследований резистентности ВИЧ-1. Однако данная форма не предусматривает осуществление сбора результатов самих исследований – нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют, что нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 вместе с клинико-эпидемиологическими данными о ВИЧ-инфицированных пациентах, позволяют дополнить эпидемиологический надзор не только в области мониторинга ЛУ ВИЧ-1 и расследований случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи. Современные возможности молекулярно-генетических и биоинформатических методов позволяют предложить дальнейшее усовершенствование системы эпидемиологического надзора. Это подтверждается и данными мировых исследований. В 2022-м году ВОЗ опубликовала глобальную стратегию геномного эпиднадзора за возбудителями болезней, обладающих пандемическим и эпидемическим потенциалом, с новым направлением развития эпидемиологии – геномным эпидемиологическим надзором [244]. В опубликованной стратегии для организации геномного эпиднадзора определены следующие мероприятия:

- обеспечение соответствующих конкретным условиям и устойчивых технологических решений,
- согласование норм, стандартов, контрольных показателей и справочных материалов,
- обеспечение возможностей для использования геномных методов исследований в повседневной практике в системе эпиднадзора.

Научно обоснованные результаты проведенного диссертационного исследования позволяют предложить меры по модернизации всех трех (информационной, диагностической и управленческой) подсистем эпидемиологического надзора путем внедрения биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и сопутствующей информации о пациентах.

Модернизация информационной подсистемы.

Информационная подсистема должна обеспечивать поступление в эпидемиологический отдел медицинской организации информации об инфекционной заболеваемости, сведений о возбудителе и его биологических свойствах, а также сведения о проводимых противоэпидемических мероприятиях и эффективности их выполнения.

В настоящее время в существующих нормативных документах не представлена информация об объеме и перечне собираемых данных, касающихся возбудителя, а в утвержденных формах отсутствует указание о необходимости сбора нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1. С нашей точки зрения целесообразно осуществить модернизацию информационной подсистемы по следующему ряду направлений.

1. Необходим сбор информации о геномах вируса одновременно с клинико-эпидемиологической информацией о ВИЧ-инфицированном лице. При этом минимальный объем информации о пациенте, который позволит осуществлять геномный эпиднадзор, должен включать в себя: пол пациента, дату (год) рождения, регион проживания с точностью до субъекта РФ, дату (год) постановки диагноза (первого положительного иммунного блота), предполагаемый путь инфицирования (код заражения), опыт приема АРВ препаратов, включая до- и постконтактную профилактику, на момент забора крови.
2. Секвенирование клинических образцов и представление информации о вирусе и пациенте следует осуществлять на регулярной основе, при этом продолжительность между забором крови и передачей информации в эпидемиологический отдел не должна превышать 30 дней.
3. Представляемые данные о геноме ВИЧ-1 должны прежде всего представлять собой информацию о нуклеотидной последовательности фрагмента гена *pol* (позиции 2253-3350 референсного штамма HXB2, GenBank №K03455).

4. Секвенирование ВИЧ-1 необходимо осуществлять не менее чем для 10% вновь выявленных пациентов.

Сбор нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и сопутствующих данных о ВИЧ-инфицированных пациентах наиболее эффективно осуществлять в электронном виде посредством Российской базы данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам. При этом с нашей точки зрения целесообразно внести изменения в форму № 61 «Сведения о ВИЧ-инфекции» для осуществления сбора информации о числе обследованных на резистентность ВИЧ-1, для которых была получена нуклеотидная последовательность ВИЧ-1, а также о количестве нуклеотидных последовательностей вируса, загруженных в базу данных ЛУ. С целью сохранения конфиденциальности пациентов вносимая в базу информацию должна быть деперсонифицированной. В то же время представляемая информация должна подвергаться оперативному эпидемиологическому анализу (ОЭА) с целью выявления причин активизации эпидемического процесса. В свою очередь результаты ОЭА необходимо использовать в качестве основы для формирования или корректировки противоэпидемических мероприятий. В связи с этим медицинская организация должна иметь соответствующую кодировку загружаемой информации, позволяющую ей возвращать персонификацию данных пациентов

Дополнительно необходимо обеспечить сбор и загрузку результатов секвенирования ВИЧ-1 за весь предыдущий период проведения исследования на ЛУ ВИЧ-1 в медицинской организации. Собранная информация позволит повысить точность проводимого ретроспективного эпидемиологического анализа (РЭА).

Модернизация диагностической подсистемы.

На текущий момент диагностическая подсистема эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией практически не содержит биоинформатических методов анализа. Единственный раздел в МУ 3.1.3342-16 «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией» и МР 3.1.1.0075/1-13 «Надзор за распространением

штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам» определяет порядок анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 на предмет наличия мутаций резистентности к АРВ препаратам при проведении когортных исследований. В связи с этим в диагностическую подсистему необходимо внести наиболее существенные изменения. Предлагается ее модернизация по следующим направлениям:

1. В каждом субъекте РФ на основании представляемых данных, содержащих нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 и сопутствующую информацию о ВИЧ-инфицированных лицах, осуществлять ОЭА. В рамках ОЭА информация, загруженная в базу данных, будет использоваться для выявления молекулярных кластеров. Их анализ позволит своевременно выявлять групповые очаги заболевания в субъекте РФ, а также определять причины и условия их формирования. Результаты ОЭА позволят формировать противоэпидемические мероприятия, необходимые для локализации выявленных очагов.
2. На страновом уровне, на уровне ФО и субъектов РФ ежегодно осуществлять РЭА. Также как и в случае ОЭА, РЭА будет основываться на биоинформатическом анализе нуклеотидных последовательностей вируса и клинико-эпидемиологических данных пациентов. Результатами РЭА будут являться выявление территорий и групп риска, в которых распространение инфекции происходит наиболее активно, а также оценка эффективности противоэпидемических мероприятий.
3. Необходимо проводить отдельный РЭА в отношении случаев ВИЧ-инфекции, вызываемых лекарственно-устойчивыми вариантами ВИЧ-1, поскольку их активное распространение имеет дополнительный негативный эффект на заболеваемость и смертность, а также увеличивает причиняемый социально-экономический ущерб. Проведение такого РЭА наиболее эффективно путем анализа информации, загруженной в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам.

Модернизация управленческой подсистемы.

Поставленный эпидемиологический диагноз позволяет своевременно обнаружить очаги заболевания, определить структуру заболеваемости и сформировать предложения по организации противоэпидемических мероприятий, которые будут иметь наибольшую эффективность.

Результаты ранее выполненных работ [131, 153, 203], а также проведенного диссертационного исследования, показали, что анализ молекулярных кластеров позволяет выявлять групповые очаги заболевания, не обнаруженные с помощью классических методов, а также использоваться при определении границ очагов. Кроме этого, биоинформатические методы позволяют оценивать эффективность проведенных противоэпидемических мероприятий [134]. При этом производится секвенирование всех новых выявляемых случаев инфекции, после чего проводится кластерный анализ. Количество нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, которое группируется с последовательностями вируса от пациентов внутри группового очага, позволяет определить скорость распространения инфекции. Снижение числа эпидемически связанных случаев среди свежесвыявляемых ВИЧ-инфицированных лиц указывает на высокую эффективность проводимых мероприятий.

В связи с этим результаты ОЭА необходимо использовать на постоянной основе при составлении и уточнении планов противоэпидемических мероприятий. Основными инструментами мероприятий могут быть: увеличение охвата скрининговыми тестами, дополнительное консультирование ВИЧ-инфицированных лиц, назначение АРВ-терапии, повышение приверженности пациентов, принимающих АРВ препараты. При этом противоэпидемические мероприятия следует корректировать в зависимости от выявленных с помощью биоинформатических методов путей передачи ВИЧ-1, являющихся драйвером эпидемии в текущий момент времени.

Результаты РЭА в отношении структуры заболеваемости ВИЧ-инфекции, вызываемой лекарственно-устойчивыми вариантами ВИЧ-1, следует

дополнительно использовать для оценки и корректировки планов по закупке АРВ препаратов.

Таким образом, в ходе настоящего исследования были сформулированы пути совершенствования эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией с использованием биоинформатических методов. Подготовленные предложения (рисунок 28) позволят усовершенствовать существующую нормативно-методическую документацию по теме ВИЧ-инфекции и таким образом повысить эффективность эпидемиологического надзора за данной инфекцией.



Рисунок 28 – Пути усовершенствования системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией, и перечень мероприятий, проводимых в рамках эпидемиологического контроля

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпидемия ВИЧ-инфекции в мире продолжает развиваться, несмотря на прикладываемые усилия и огромные финансовые затраты. По данным программы Организации Объединенных Наций по СПИДу (ЮНЭЙДС) в 2023 г. число новых случаев инфицирования ВИЧ составило 1,3 млн (1-1,7 млн) человек, а число людей, умерших от связанных со СПИДом болезней, составило 630.000 (500.000-820.000) человек. Количество лиц, живущих с ВИЧ, в 2023 г. составляло 39,9 млн (36,1-44,6 млн) человек. Всего же с начала эпидемии в мире 88,4 млн (71,3-112,8 млн) человек инфицировались ВИЧ [65]. Ситуация с ВИЧ-инфекцией в РФ отличается в худшую сторону по сравнению с другими развитыми странами. Согласно опубликованным данным, заболеваемость в стране в 2022 г. варьировала по ФО от 15 до 80 случаев на 100 тыс. населения (в среднем 43,29 на 100 тыс. населения) [20, 98]. В связи с тем, что болезнь является неизлечимым заболеванием, и количество новых случаев превышает количество случаев смерти ВИЧ-инфицированных, пораженность продолжает непрерывно расти и на 31 декабря 2022 г. составила 794,7 на 100 тыс. населения. ВИЧ-инфекция является одной из основных причин смерти среди мужчин трудоспособного возраста в РФ [19], негативно влияя на среднюю продолжительность жизни и трудовой потенциал в стране. Важно учитывать и значительный экономический ущерб. В 2022 г. по прямым и косвенным затратам ВИЧ-инфекция находилась на втором месте среди всех инфекционных заболеваний [32].

Нормативная база, определяющая порядок осуществления эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией, начала свое формирование еще в СССР в 1987 г. вскоре после регистрации первых случаев заболевания на территории страны. К настоящему времени сложилась эффективная система выявления и оказания помощи ВИЧ-инфицированным лицам, а также профилактики распространения инфекции. При первичном обнаружении ВИЧ-инфицированного лица, результаты подтверждаются в референсных лабораториях

государственных учреждений центров по профилактике и борьбе со СПИДом, расположенных в каждом субъекте РФ. По каждому лабораторно подтвержденному случаю ВИЧ-инфекции проводится эпидемиологическое расследование с целью выявления источника инфекции, путей и факторов передачи ВИЧ, определения границ очага инфекции. По результатам составляется донесение, которое представляется в органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор. На регулярной основе (ежемесячно и ежегодно) в территориальные органы Роспотребнадзора и Министерство Здравоохранения направляются сведения о результатах исследований крови на наличие маркеров ВИЧ-инфекции [45, 46] согласно утвержденным формам, содержащим данные, необходимые для оценки заболеваемости и смертности в разрезе клинико-эпидемиологических показателей и по территориям.

Однако на момент начала выполнения настоящего исследования система эпидемиологического надзора практически не включала в себя применение молекулярных и биоинформатических методов. При этом активное развитие методов секвенирования, увеличение объема геномных данных и рост вычислительных компьютерных мощностей стали причиной появления нового направления, получившего название в зарубежной литературе «молекулярная эпидемиология». Его суть заключается в том, что с помощью биоинформатических методов осуществляется анализ как клинико-эпидемиологических характеристик пациентов, так и геномных данных возбудителя инфекции [189]. Поскольку нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 являются объективной и уникальной характеристикой каждого ВИЧ-инфицированного пациента, такой анализ позволяет уточнить информацию, получаемую в ходе эпидемиологического расследования [85, 101, 149]. За последние 20 лет биоинформатические методы были успешно применены [223] в целом ряде направлений сначала в науке, а затем и в практическом здравоохранении [86]. В связи с этим, разработка подобных инструментов, их валидация и включение в структуру отечественного эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией представлялись важной задачей.

На первом этапе исследования был проведен анализ системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ с целью определения областей применения биоинформатических методов анализа. Подробное изучение нормативно-методических документов показало, что существующая система позволяет эффективно регистрировать новые выявленные случаи ВИЧ-инфекции в разрезе контингентов и субъектов РФ с помощью классических эпидемиологических методов. Однако на момент начала проведения настоящего исследования молекулярно-биологические и биоинформатические методы были описаны только в двух МР [23, 24]. Рекомендуемый алгоритм мониторинга ЛУ ВИЧ-1, описанный в первом документе [23] не был адаптирован для эффективного применения вследствие территориальных особенностей страны и неодинаковой пораженности населения ВИЧ-инфекцией. Проведенный в 2023-м году [71] анализ опубликованных результатов исследований распространенности ЛУ ВИЧ-1 на территории РФ за весь период широкомасштабного применения АРВ-терапии показал, что ни одно исследование в полной мере не соответствовало критериям включения, перечисленным в МР. При этом в настоящее время количество анализов ЛУ ВИЧ-1, выполняемых ежегодно для ВИЧ-инфицированных лиц с клиническими целями, значительно превышает объемы, требуемые для мониторинга резистентности ВИЧ-1. Поэтому централизованный сбор и последующий анализ геномных данных вируса и сопутствующей информации о пациентах позволил бы значительно улучшить точность надзора за распространением лекарственно-устойчивых вариантов вируса.

Также по ситуации на 2009-й год в нормативных документах не использовались возможности филогенетического анализа при расследовании случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи, несмотря на то что к тому времени этот анализ широко использовался в других развитых странах.

И, наконец, отечественные нормативно-методические документы не предусматривали применение биоинформатических методов при проведении

оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа. При этом вследствие ряда особенностей ВИЧ-инфекции, в частности, стигматизации заболевания, классические эпидемиологические методы не всегда эффективны при изучении особенностей развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции. Например, в ходе проведения эпидемиологических исследований при выявлении новых случаев ВИЧ-инфекции с 1987 по 2022 гг. только для 53,3% случаев был определен главный фактор риска заражения [14]. Причем доля инфицированных, для которых фактор риска не был установлен, имеет достоверную тенденцию к росту.

Анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от выявляемых ВИЧ-инфицированных лиц в ряде случаев позволяет улучшить эффективность эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией. Однако на момент начала диссертационного исследования в РФ присутствовала только одна зарубежная тест-система Viroseq (Selera Diagnostics, США) для секвенирования ВИЧ-1, технические возможности которой не позволяли решать задачи, необходимые для осуществления геномного эпидемиологического надзора.

В связи с этим следующей задачей исследования явилась необходимость разработки лабораторных методик и диагностических наборов, с помощью которых было бы возможно проведение секвенирования ВИЧ-1 и получение информации о вирусных геномах. Поскольку наиболее клинически значимым направлением анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 являются исследования по оценке лекарственной устойчивости вируса к АРВ препаратам, в рамках настоящего исследования были разработаны наборы реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» и «АмплиСенс HIV-Resist-NGS», позволяющие выявлять мутации резистентности ко всем широко используемым классам препаратов (НИОТ, ННИОТ, ИП, ИИ, CCR5-антагонисты). Кроме самих наборов реагентов было разработано ПО «АмплиСенс Resist», которое в формате облачного сервиса позволяет пользователям осуществлять редактирование и анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, а затем формировать стандартизированный отчет об исследовании ЛУ для лечащего врача.

Разработанные наборы реагентов были зарегистрированы в качестве медицинских изделий, о чем были получены соответствующие регистрационные удостоверения (Приложения 2, 4), а на ПО «АмплиСенс Resist» получено свидетельство о регистрации программы для ЭВМ (Приложение 3). С 2022-го года наборы реагентов АмплиСенс для определения ЛУ ВИЧ-1 являются единственными диагностическими тестами, которые могут использоваться на территории РФ в области диагностики *in vitro*.

Набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» позволяет проводить амплификацию и последующее секвенирование по Сэнгеру генов протеазы, обратной транскриптазы, интегразы и V3 петли гена белка оболочки, в отличие от тест-системы Viroseq, которая позволяла получать нуклеотидные последовательности только генов протеазы и обратной транскриптазы. Ген белка оболочки, в отличие от остальных перечисленных, является быстро эволюционирующим регионом генома ВИЧ-1. В связи с этим при одновременном секвенировании гена белка оболочки и медленно эволюционирующих генов протеазы, обратной транскриптазы и интегразы, появляется достаточное количество информации для применения биоинформатических методов анализа, в частности осуществления филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей при расследовании очагов инфекции, связанных с оказанием медицинской помощи [133].

Набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS» был разработан для получения нуклеотидной последовательности всей кодирующей области генома ВИЧ-1 с помощью массового параллельного секвенирования. Данный способ секвенирования является гораздо более производительным и чувствительным в отношении минорных генетических вариантов вируса [89, 100]. Эти преимущества не только позволяют с помощью секвенирования следующего поколения увеличить пропускную способность диагностической лаборатории, но и повышают информативность исследований за счет более высокой чувствительности в отношении лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ-1 у пациента. Разработанный набор «АмплиСенс HIV-Resist-NGS» по своим

техническим характеристикам не уступает зарубежным аналогичным методикам [116, 142, 182]. На момент обращения 01 июля 2024 г. к международной открытой базе данных Лос-Аламоса (<https://www.hiv.lanl.gov/content/index>) в ней присутствовало 300 полногеномных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в РФ. Из них более 75% были получены с использованием разработанного набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS».

Наборы реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» и «АмплиСенс HIV-Resist-NGS» применялись для получения всех нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, использованных в настоящем исследовании.

Для осуществления эффективного геномного эпидемиологического надзора необходим сбор нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и клинико-эпидемиологических данных о пациентах. Существующие на тот момент формы статистического наблюдения, утвержденные федеральной службой государственной статистики, не предусматривали сбор последовательностей ВИЧ-1. Кроме того, специфика геномных данных заключается в том, что они должны передаваться только в электронном виде, техническая возможность для такой передачи отсутствовала. Заключительным необходимым элементом являлись инструменты для анализа собранной информации. Применяемые для этого биоинформатические методы являлись сложными специализированными программами со множеством настроек, рассчитанными для решения широкого круга биоинформатических задач. Поэтому их применение сотрудниками эпидемиологических отделов, не имеющих соответствующего образования, было в значительной степени затруднено.

В связи с этим на следующем этапе исследования были проведены работы по созданию баз данных, позволяющих осуществлять сбор и проверку качества необходимой информации, ее хранение и анализ в соответствии с задачами эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

В качестве объекта для разработки была использована Российская база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам, основанная в 2009

г. в рамках деятельности «Референс-центра по мониторингу и профилактике ВИЧ и ВИЧ-ассоциированных инфекций». На момент начала работ база данных являлась только хранилищем собираемой информации. В ходе работ был гармонизирован перечень собираемых данных с формами федерального статистического наблюдения, внедрен контроль качества загружаемых геномной и клинико-эпидемиологической информации и разработан набор инструментов для проведения биоинформатического анализа данных. Инструменты включили в себя контроль качества нуклеотидных последовательностей и анализ на наличие контаминации, оценку ЛУ ВИЧ-1 к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП, ИИ, определение тропизма вируса. На заключительном этапе был разработан и добавлен в качестве инструмента базы кластерный анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, что позволило расширить область ее использования. Если ранее база данных использовалась для оценки уровня распространенности и структуры резистентности ВИЧ-1, то после окончания работ стало возможным применять ее для геномного эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией. Возможность и необходимость использования Российской базы данных была отражена в ряде нормативно-методических документов, а именно, в МУ от 2013 года [26], МР по эпидемиологическому надзору от 2016 года [28] и СанПиН по профилактике инфекционных болезней от 2021 года [55]. С помощью Российской базы данных в рамках настоящего исследования были собраны и проанализированы данные о 4812 ВИЧ-инфицированных гражданах РФ.

В дополнение к Российской базе данных была разработана база данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам в странах ВЕЦА. Ее функциональные возможности аналогичны возможностям Российской базы данных. В базу данных ВЕЦА к 01 июня 2023 года была загружена информация о 2424 ВИЧ-инфицированных лицах, являющихся гражданами шести стран: Республик Армения, Азербайджан, Беларусь, Кыргызстан, Таджикистан и Узбекистан.

На разработанные базы данных и способы их организации были получены свидетельства о государственной регистрации в качестве баз данных и программ для ЭВМ (Приложения 5, 6, 7, 8).

Одной из наиболее актуальных областей применения биоинформатических методов в отношении нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 является оценка уровня распространенности и структуры ЛУ. Во-первых, это связано с тем, что АРВ-терапия является одним из наиболее эффективных средств профилактики распространения болезни. А, во-вторых, затраты на закупку АРВ препаратов составляют значимую часть всех средств, расходуемых на борьбу с ВИЧ-инфекцией. Согласно Государственному докладу в 2022-м году прямые медицинские затраты по противодействию распространению ВИЧ-инфекции составили 76,8 млрд. руб. [32]. В том же году общая сумма всех закупок АРВ препаратов составила 42,5 млрд. рублей [1]. Таким образом, затраты на АРВ-терапию для ВИЧ-инфицированных граждан РФ составили более 50% от всех прямых затрат на ВИЧ-инфекцию. Согласно опубликованным данным [13] и результатам настоящего исследования заболеваемость и пораженность населения РФ ВИЧ-инфекцией в ближайшие годы будет возрастать. Охват ВИЧ-инфицированных лиц АРВ-терапией еще не достиг заявленных целей 95-95-95, поэтому доля пациентов, находящихся на лечении, должна расти опережающими темпами. При этом более чем 10% пациентов, принимающих АРВ препараты, ежегодно сталкиваются с вирусологическим неуспехом терапии, что зачастую связано с появлением у них лекарственно-устойчивых вариантов вируса [17]. Таким образом, выполнение исследований ЛУ ВИЧ-1 необходимо как с клинической, так и с эпидемиологической целями.

В связи с этим собранные в настоящем исследовании клинико-эпидемиологические данные и нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 были проанализированы в отношении распространенности резистентности ВИЧ-1 на территории РФ. Исследуемая выборка содержала 2740 пациентов, не имевших опыта приема АРВ препаратов. Выборка имела некоторую смещенность относительно общей популяции ВИЧ-инфицированных граждан РФ, однако необходимо отметить, что она являлась одной из самых крупных среди всех проведенных исследований ЛУ ВИЧ-1 в России [71]. Выборка включала пациентов с годом постановки диагноза от 2005 по 2022 гг., таким образом

обеспечивая возможность анализа ЛУ за весь период широкомасштабного применения АРВ-терапии в РФ. Анализ выборки был проведен как в отношении наличия мутаций, важных с точки зрения надзора, так и в отношении распространенности резистентности ВИЧ-1 к АРВ препаратам.

Общий уровень распространенности мутаций, важных с точки зрения надзора, составил 5,4% (95%-й ДИ 4,61%-6,31%). При этом было показано, что в последние годы исследуемого периода (2020-2022 гг.) распространенность изученных мутаций достоверно увеличилась до 9,38% (95%-й ДИ 6,48%-14,85%). Было показано, что резистентность ВИЧ-1 к АРВ препаратам составила 12,56% (95%-й ДИ 11,37-13,85%). При этом наиболее часто (10,40%) ЛУ обнаруживалась к препаратам класса ННИОТ, а к двум его наиболее широко распространенным препаратам эфавиренз и невирапин регистрировалась резистентность высокого уровня.

На выборке несколько меньшего объема (1092 пациента) была проведена оценка распространенности ЛУ ВИЧ к препаратам класса ИИ. Результаты анализа выборки показали, что распространенность резистентности ВИЧ-1 к этому классу составляет 0,28% (95%-й ДИ 0,05%-0,84%).

Полученные результаты позволяют рекомендовать минимизировать закупки таких АРВ препаратов, как EFV и NVP, а в случае назначения схем АРВ-терапии, содержащей эти препараты, предварительно проводить тест для оценки ЛУ ВИЧ-1. Переход от препаратов класса ННИОТ первого поколения к препаратам класса ИИ увеличит долю пациентов, достигших неопределяемой вирусной нагрузки, и тем самым не только повысит качество и продолжительность их жизни, но и снизит количество новых случаев инфекции.

Одним из первых направлений применения биоинформатических методов в эпидемиологическом надзоре было расследование очагов ВИЧ-инфекции, потенциально связанных с оказанием медицинской помощи [164]. В зарубежных странах с середины 90-х годов XX века филогенетический анализ стал широко применяться с целью подтверждения или опровержения наличия эпидемиологической связи между потенциальным источником инфекции и

реципиентом. Однако в РФ только в 2010-м году анализ нуклеотидных последовательностей был впервые применен в ходе расследования внутрибольничного очага ВИЧ-инфекции. Накопленный опыт применения филогенетического анализа позволил сформулировать основные принципы, которые были представлены в методических указаниях по эпидемиологическому надзору за ВИЧ-инфекцией [28]. В период с 2010 по 2022 гг. сотрудниками ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора биоинформатические методы были использованы при расследовании 72 очагов ВИЧ-инфекции. В рамках настоящего исследования были проанализированы материалы расследований, включая медицинские карты амбулаторных больных, успешность секвенирования, особенности проведения и результаты филогенетического анализа для каждого случая. Анализ обобщенного материала позволил определить причины неопределенных результатов расследований и сформулировать перечень рекомендаций, которые повысят эффективность применения биоинформатических методов при использовании их в ходе расследований очагов ВИЧ-инфекции.

Наиболее значимыми ограничениями являлись, во-первых, невозможность получения нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 (4 случая из 72) и, во-вторых, 100%-ное сходство геномов от потенциального источника и реципиента (3 случая из 72). Второе ограничение является более серьезным, поскольку полученный результат не позволяет сделать определенный вывод о наличии эпидемиологической связи. В исследовании было рассчитано, что средняя ежегодная скорость роста генетической дистанции вирусов эпидемиологически связанных пациентов составляет 0,41% для консервативной (регион *pol*) и 1,99% для вариабельной (регион *env*) областей. В связи с этим в качестве преодоления ограничения абсолютного сходства ВИЧ-1 у двух пациентов можно рекомендовать повторный забор крови через 6-12 месяцев и проведение полногеномного секвенирования ВИЧ-1 у лиц, входящих в исследуемую группу. Рассчитанные значения следует также использовать в тех случаях, когда, согласно результатам эпидемиологического расследования, определен период возможной

передачи инфекции от потенциального источника реципиенту. Генетическая дистанция должна подтверждать продолжительность инфекции реципиента. В случае же отсутствия данных о периоде инфицирования, результаты филогенетического анализа следует использовать как предварительную оценку для сужения временного периода, когда могло произойти инфицирование.

Дополнительно были также предложены рекомендации по снижению трудоемкости и себестоимости проведения филогенетического анализа. В исследовании было показано, что использование нуклеотидных последовательностей вируса и сопутствующей информации, загруженных в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам, не снижает эффективности применения биоинформатических методов. Поэтому возможно осуществление подбора в группу сравнения ВИЧ-инфицированных лиц из Российской базы данных, если оно проводится с учетом критериев, перечисленных в методических указаниях [28]. Дополнительно было показано объективное ограничение филогенетического анализа, заключающееся в том, что по прошествии длительного времени (более 4-х лет) с момента инфицирования реципиента достоверность результатов снижается. Снижение достоверности обусловлено тем, что за длительный период генетическая дистанция между вирусами эпидемиологически связанных ВИЧ-инфицированных лиц увеличивается настолько сильно, что они перестают образовывать достоверный молекулярный кластер. Данное ограничение может быть частично нивелировано увеличением протяженности сравниваемых нуклеотидных последовательностей, то есть, применением полногеномного секвенирования. Тем не менее при проведении эпидемиологических исследований необходимо учитывать этот фактор и стремиться осуществлять забор крови у лиц исследуемой группы в максимально ранние сроки после регистрации очага заболевания.

Высокая генетическая вариабельность ВИЧ-1 оказывает значительное негативное влияние на разработку и эффективность лекарственных препаратов и вакцин, чувствительность и специфичность диагностических тест-систем. Однако она же позволяет изучать развитие эпидемического процесса ВИЧ-инфекции.

Благодаря непрерывному секвенированию геномов ВИЧ-1 и сбору клинико-эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных пациентах, в настоящее время у исследователей появляется возможность оценивать особенности распространения возбудителя.

Проведенный в настоящем исследовании анализ разнообразия генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории РФ, показал, что в стране продолжает передаваться в основном ВИЧ-1 суб-субтипа А6. Однако если до 2007 г. он выявлялся более чем у 90% ВИЧ-инфицированных лиц, то в период с 2018 по 2022 гг. он регистрировался уже только в 78,4% новых случаев инфекции. Вторым по частоте встречаемости (7,0%) являлся ВИЧ-1 субтипа В. При этом вирус субтипа В достоверно чаще обнаруживался в группе пациентов с половым путем передачи, осуществляемым посредством гомосексуальных контактов (36,5%), а также в таких регионах, как Северо-Западный, Южный и Дальневосточный ФО. Интересно, что у пациентов с неуточненным половым путем передачи и пациентов, для которых информация о пути передачи отсутствовала, частота регистрации вируса субтипа В также была повышена (14,9% и 9,0% соответственно), что позволяет предположить недорепортирование случаев инфицирования посредством гомосексуальных контактов. У этих двух групп пациентов (лиц с гомосексуальным путем передачи и лиц с неуточненным половым путем передачи), несмотря на их небольшую долю в общей выборке (суммарно 13,6%), было зарегистрировано наибольшее генетическое разнообразие вируса. Высокое генетическое разнообразие указывает на значительное количество внешних заносов и косвенно подтверждает наиболее высокую скорость передачи возбудителя в уязвимой группе мужчин, имеющих секс с мужчинами.

На третьем месте по распространенности находилась генетическая форма CRF63_02A6, выявляющаяся в среднем в 5,1% случаев инфекции. Однако необходимо отметить, что первые случаи этого генетического варианта появились только в середине нулевых годов XXI века, и тех пор его доля постоянно возрастает. В период с 2018 по 2022 гг. CRF63_02A6 выявлялась уже в 10,2%,

наиболее часто встречаясь у ВИЧ-инфицированных, проживающих в Сибирском ФО (14,0%).

Благодаря значительному размеру исследуемой выборки в настоящем исследовании у 37 пациентов были выявлены редкие (менее 1% встречаемости) генетические варианты вируса, которые были проанализированы в отношении определения предполагаемого региона и времени заноса. Редкие генетические варианты ВИЧ-1 наиболее часто передавались посредством гомосексуальных контактов, а география стран-источников была обширна и насчитывала 28 стран. Наиболее часто граждане РФ инфицировались вариантами вируса, циркулирующими на территории стран Западной Европы, США, а также Таиланда и Кубы. При этом с помощью биоинформатических методов оказалось возможным дифференцировать циркуляцию возбудителя в РФ вследствие однократного заноса (5 пациентов, инфицированных CRF19_cpx) от множественных заносов, как, например, в случае CRF01_AE, где 8 ВИЧ-инфицированных являлись следствием целого ряда эпидемиологически несвязанных между собой случаев инфицирования.

Наиболее современным биоинформатическим методом, использующимся в целях уточнения особенностей развития эпидемии, выявления очагов заболевания, оценки эффективности противоэпидемических мероприятий, является кластерный анализ нуклеотидных последовательностей. С его помощью в исследуемой выборке выявляются группы нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 (кластеры), которые имеют между собой более высокое генетическое сходство, чем с другими последовательностями выборки. Высокое генетическое сходство указывает на то, что пациенты, инфицированные этими вирусами, с высокой долей вероятности являются звеньями одной эпидемиологической цепочки. Чем выше генетическое сходство ВИЧ-1 и чем больше пациентов находится в кластере, тем быстрее происходило распространение инфекции в этой группе лиц.

Важно отметить, что эффективность кластерного анализа высока только в том случае, если доля лиц, для которых известна последовательность ВИЧ-1,

достаточно велика. В связи с этим в рамках настоящего исследования анализу была подвергнута выборка пациентов, проживающих на территории Центрального ФО, поскольку в этом регионе была достигнута наибольшая плотность секвенирования. Исследуемая выборка по сравнению с генеральной совокупностью состояла из пациентов с более свежими датами диагноза. Также она была лучше охарактеризована по параметру «предполагаемый путь передачи» - отсутствовала информация только для 18,7% пациентов по сравнению с 52,8% в генеральной совокупности.

Исследуемая выборка была подвергнута анализу с помощью наиболее широко используемых биоинформатических методов по выявлению молекулярных кластеров. В частности, были использованы как подходы, выявляющие кластеры на основе анализа филогенетических деревьев, так и подход, базирующийся только на генетической дистанции. Было показано, что филогенетические методы имеют хорошую корреляцию (более 90%) между собой и значительно отличаются от метода, не использующего филогению. Количество кластеров, выявляемых с помощью последнего подхода, было больше в 2,8 и 4,3 раза при порогах генетической дистанции в 0,5% и 4,5% соответственно.

В опубликованных ранее работах исследователи осуществляли сравнение групп в зависимости от результатов кластерного анализа. Наиболее часто производится сравнение характеристик пациентов внутри и вне кластеров [178]. В некоторых работах авторы формировали несколько групп внутри кластеров в зависимости от их размеров [184, 229]. В ряде работ также применялось разделение кластеров на «свежие» (растущие) и «старые» в зависимости от присутствия, либо отсутствия в них пациентов с недавно выявленной инфекцией [88]. В настоящем исследовании эти подходы были объединены (рисунок 22), поскольку наибольшее эпидемиологическое значение имеют «свежие крупные» кластеры. Клинико-эпидемиологическая информация о ВИЧ-инфицированных лицах внутри таких кластеров позволяет охарактеризовать популяцию ЛЖВ, внутри которой на современном этапе происходит наиболее быстрое распространение инфекции. Причем значения «свежести» кластера и его размера

должны адекватно подбираться в зависимости от поставленных целей исследования и размера исследуемой выборки. В настоящем исследовании «свежим» кластером считался такой, где присутствовал хотя бы один пациент с поставленным диагнозом за последние два года исследования (01.01.2021-31.12.2022). Под крупным кластером подразумевались кластеры, содержащие 4 и более человек.

Предложенная классификация позволила оценить особенности развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в РФ. В частности, было показано, что наиболее негативный тренд в скорости передачи инфекции, указывающий на активное распространение возбудителя в настоящее время, регистрировался в группах мужчин, имеющих секс с мужчинами; лиц, инфицированных генетической формой CRF63_02A6, а также в старших (на основании возраста, в котором был поставлен диагноз) возрастных группах 40-49 лет и 50 лет и старше. Важно также отметить, что наиболее активное снижение скорости передачи возбудителя регистрировалось в группах лиц, употребляющих парентеральные наркотики, а также детей и подростков в возрасте от 0 до 17 лет. Динамика снижения кластеризации со временем была схожей как для пациентов, принимающих АРВ препараты, так и для наивных пациентов. Однако последовательности от лиц, находящиеся на терапии, кластеризовались в 2,5 раза реже, что указывает на значительное более медленную передачу среди них инфекции.

Полученные результаты позволяют рекомендовать применение биоинформатических методов на регулярной основе в качестве дополнительного инструмента эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией с целью анализа особенностей развития эпидемического процесса в различных группах населения.

Наибольшую информативность биоинформатический анализ имеет в том случае, если плотность выборки, то есть доля ЛЖВ, для которых известна нуклеотидная последовательность ВИЧ-1, превышает 10% [146]. В таких случаях появляется возможность его использования в ходе проведения оперативного эпидемиологического анализа. Оценка информации, собранной с помощью

Российской базы данных, показала, что только для одного субъекта РФ (Орловская область) полностью выборки превышает 10%. Для указанного региона она составила 25%. В связи с этим углубленный биоинформатический анализ был проведен для указанного региона.

Кластерный анализ показал, что 178 пациентов (18% от исследуемой выборки) группировались между собой. При этом 38% из них (68 пациентов) оказались внутри мелких кластеров (28% в диадах и 10% в триадах). Однако остальные 110 пациентов образовали крупные кластеры, при этом наиболее крупный кластер №22 насчитывал 65 ЛЖВ.

Анализ динамики появления и роста крупных кластеров показал, что они начали появляться в 2015 году, и их активное увеличение продолжалось до 2018 года включительно. Снижение скорости роста было зарегистрировано в 2019 году и продолжалось до середины 2021-го. Однако начиная со второй половины 2021 года до конца исследуемого периода (декабрь 2022 г.), скорость роста больших кластеров вновь начала увеличиваться. Проведенный анализ заболеваемости ВИЧ-инфекции в изучаемом регионе показал, что ее динамика практически полностью совпала с количеством новых случаев инфекции внутри крупных молекулярных кластеров.

Дополнительный филогенетический анализ подтвердил, что пациенты, находящиеся внутри крупных кластеров, с высокой вероятностью эпидемиологически связаны между собой. Сравнение клинико-эпидемиологических характеристик кластера №22 со всей исследуемой выборкой показало, что пациенты кластера достоверно чаще инфицировались в ходе парентерального употребления наркотических средств, не имели опыта приема АРВ препаратов и проживали в г. Орел.

Таким образом, при использовании биоинформатического анализа возможно с большей точностью выявлять групповые очаги заболевания и определять уязвимые группы, являющиеся основными источниками новых случаев инфекции, что позволяет формировать наиболее эффективные противоэпидемические мероприятия. Кроме того, на основании оценки скорости

роста крупных кластеров можно осуществлять краткосрочный прогноз заболеваемости ВИЧ-инфекцией в исследуемом регионе.

Анализ нормативно-методической документации, описывающей систему эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ, проведенный в рамках настоящего исследования, показал, что на момент начала его выполнения биоинформатические методы практически не могли быть использованы. Только в МР по расследованию случаев заражения ВИЧ от 2007 г. [24] было указано о возможности проведения генотипирования вируса, и если предполагаемый источник и исследуемый инфицированный имели различные субтипы ВИЧ, делался вывод о том, что вновь выявленный ВИЧ-инфицированный получил вирус не от предполагаемого источника. Однако как показали обширные исследования [29], подобный подход был малоэффективен, поскольку на всем протяжении развития эпидемии в стране превалировал ВИЧ-1 субтипа А.

В результате настоящего исследования были сформированы МР от 2013 г., описывающие порядок эпидемиологического надзора за циркулирующими лекарственно-устойчивыми вариантами ВИЧ-1 [26]. А также МУ от 2016 г., определяющие применение филогенетического анализа в качестве дополнительного инструмента в ходе эпидемиологических расследований случаев передачи ВИЧ-1, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи или других сложных с эпидемиологической точки зрения случаев [28]. Необходимость применения биоинформатических методов по двум указанным направлениям была дополнительно закреплена в Санитарных Правилах и Нормах, утвержденных в 2021 г. с дополнениями от 2022 г. [55].

В то же время результаты, описанные в главах 9 и 10 настоящего исследования, показывают, что биоинформатический анализ геномных и клинико-эпидемиологических данных может быть применен гораздо шире, чем это описано в нормативно-методических документах в настоящий момент. В связи с этим был сформулирован ряд предложений (рисунок 28) по модернизации всех трех подсистем эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ.

Меры, предлагаемые в отношении совершенствования информационной подсистемы, касаются обеспечения поступления необходимой информации о геномах ВИЧ-1. В рамках модернизации необходимо осуществлять регулярное секвенирование гена *pol* вируса у не менее чем 10% ВИЧ-инфицированных пациентов и производить загрузку полученных нуклеотидных последовательностей в электронном виде. Одновременно с геномными данными необходимо загружать клинико-эпидемиологические данные о пациентах. Значительно повысит эффективность биоинформатических методов загрузка ранее полученных данных о нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1. В дополнение к перечисленным можно рекомендовать провести изменение формы № 61 федеральной службы государственной статистики «Сведения о ВИЧ-инфекции» и дополнить ее информацией о количестве лиц, для которых по результатам исследования ЛУ ВИЧ-1 была получена нуклеотидная последовательность вируса, и количестве записей, внесенных в Российскую базу данных резистентности ВИЧ.

Собираемые данные позволят модернизировать диагностическую подсистему. На основании информации о геномных данных возбудителя станет возможно проведение оперативного эпидемиологического анализа и раннего выявления групповых очагов заболевания в субъекте РФ. Кроме оперативного эпидемиологического анализа предлагается проведение ежегодного ретроспективного эпидемиологического анализа, как в разрезе субъектов РФ, так и по стране в целом. Ретроспективный эпидемиологический анализ следует также использовать при оценке эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий, поскольку биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 позволяет в ряде случаев точнее определить границы эпидемического очага инфекции и оценить количество новых эпидемиологически связанных случаев после начала проведения мероприятий. Отдельно следует упомянуть о необходимости проведения ретроспективного эпидемиологического анализа для оценки динамики распространенности резистентных вариантов ВИЧ-1. Как было показано в ряде работ [88, 167, 204], применение

биоинформатических методов в таких случаях позволяет не только определить частоту выявления лекарственно-устойчивых вариантов вируса, но и рассчитать скорость их распространения в будущем.

Предложения по совершенствованию управленческой подсистемы заключаются в разработке и корректировке профилактических и противоэпидемических мероприятий, основанных на результатах эпидемиологического диагноза, поставленного с учетом результатов биоинформатического анализа геномных данных ВИЧ-1.

Предложенные в настоящем исследовании пути усовершенствования эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ с помощью биоинформатических методов анализа сформулированы и описаны в проекте МР «Применение молекулярно-биологических и биоинформатических методов в рамках эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией».

ВЫВОДЫ

1. В нормативных документах, регламентирующих систему эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в РФ, отсутствует описание применения биоинформатических методов для выявления завозных случаев болезни, анализа передачи вируса, определения границ очагов, уточнения структуры путей передачи возбудителя и проведения оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа.
2. Разработанные и зарегистрированные в качестве медицинских изделий для диагностики *in vitro* наборы реагентов дают возможность осуществлять секвенирование различных областей генома ВИЧ-1 и определять ЛУ возбудителя к АРВ препаратам классов ингибиторы протеазы, обратной транскриптазы, интегразы и CCR5-антагонисты. Анализ как консервативного (*pol*), так и вариабельного (*env*) регионов генома вируса позволяет использовать наборы реагентов в ходе проведения эпидемиологических исследований.
3. Разработанная база данных ЛУ ВИЧ-1 ВЕЦА и усовершенствованная Российская база данных резистентности ВИЧ позволяют проводить сбор и биоинформатический анализ геномной информации о возбудителе и клинико-эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных лицах. Функциональные возможности баз данных позволяют осуществлять геномный эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией на территории РФ и стран ВЕЦА.
4. Сформулированные и подтвержденные на практике рекомендации повышают эффективность применения в ходе исследований очагов ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи, биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей. Установленная скорость роста генетической дистанции между вирусами от эпидемиологически связанных ВИЧ-инфицированных лиц, составляющая

0,41% в год для консервативной и 1,99% в год для вариабельной областей генома ВИЧ-1, позволяет верифицировать результаты филогенетического анализа.

5. Установлено увеличение распространенности важных для надзора за ЛУ ВИЧ-1 мутаций резистентности к препаратам классов ингибиторы протеазы и обратной транскриптазы у пациентов без опыта приема АРВ-терапии на территории РФ с 1,79-6,60% в 2005-2019 гг. до 9,38% в 2020-2022 гг. Наиболее высокий уровень распространенности резистентности в 10,40% зарегистрирован к препаратам невирапин и эфавиренз. Уровень распространенности ЛУ ВИЧ-1 к препаратам класса ингибиторы интегразы оставался низким и составил 0,28% (95%-й ДИ 0,05%-0,84%).
6. Развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в РФ характеризуется изменением генетического разнообразия ВИЧ-1, зависящего от региона проживания пациента, а также от путей передачи вируса. С 2003-го года по 2022-й доля не А6 вариантов ВИЧ-1 повысилась с 8,8% до 21,6%. С помощью биоинформатических методов были определены происхождение и приблизительный период заноса таких редких для РФ генетических вариантов, как А1, А7, С, D, F1, CRF01_AE, CRF11_cpx, CRF14_BG, CRF19_cpx, CRF20_BG, CRF32_06A6, CRF56_cpx.
7. Анализ молекулярных кластеров показал, что наибольшая скорость передачи ВИЧ-1 в период 2021-2022 гг. отмечалась в группе мужчин, имеющих секс с мужчинами; среди лиц, инфицированных генетической формой CRF63_02A6, а также в возрастной группе старше 40 лет. Результаты биоинформатического анализа свидетельствуют о значительном недорепортировании случаев передачи вируса посредством гомосексуальных контактов. На основании анализа генетического сходства ВИЧ-1 определена связанность пациентов, находящихся внутри групповых эпидемических очагов, что позволило охарактеризовать группу ВИЧ-инфицированных лиц, среди которых скорость распространения вируса была наиболее высокой.

8. С целью оптимизации эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией разработаны подходы по включению биоинформатических методов анализа в систему надзора за данной инфекцией. Рекомендовано увеличение количества исследований методом секвенирования и изменение статистических форм. Сформирована стратегия применения результатов биоинформатического анализа в рамках оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа, а также для оценки эффективности профилактических и противоэпидемических мероприятий.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В целях совершенствования системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией необходимо:

- Внести изменения в СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" о необходимости секвенирования ВИЧ-1 у вновь выявляемых лиц с минимальным охватом не менее 10%.
- Дополнить форму 61 Федеральной службы государственной статистики «Сведения о ВИЧ-инфекции» сведениями о количестве лиц, у которых было успешно проведено секвенирование ВИЧ-1, а также количестве нуклеотидных последовательностей, внесенных в Российскую базу данных резистентности ВИЧ.
- На региональном уровне осуществлять оперативный эпидемиологический анализ с использованием биоинформатических методов с целью раннего выявления очагов заболевания.
- На региональном и национальном уровнях использовать собранные геномные данные о возбудителе при осуществлении ежегодного ретроспективного эпидемиологического анализа для уточнения структуры путей передачи возбудителя, а также оценки эффективности противоэпидемических мероприятий.
- На национальном уровне осуществлять ежегодный ретроспективный эпидемиологический анализ для оценки динамики распространенности лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ-1.
- Проводить корректировку профилактических и противоэпидемических мероприятий с использованием результатов биоинформатического анализа.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективами дальнейшей разработки темы являются:

1. Внедрение в систему оказания медицинской помощи ВИЧ-инфицированным лицам проведения исследования ЛУ ВИЧ-1 для каждого пациента перед назначением первой схемы АРВ-терапии.
2. Организация сбора геномных данных о ВИЧ-1, полученных за весь период развития эпидемии ВИЧ-инфекции, и внесения собранной информации в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам.
3. Организация на базе учреждений Роспотребнадзора центров по анализу ВИЧ-1 с помощью технологии массового параллельного секвенирования.
4. Использование Российской базы данных устойчивости ВИЧ в работе отделений эпидемиологии центров по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями с целью проведения оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа.
5. Разработка рекомендаций по проведению противоэпидемических мероприятий при локализации очагов заболевания с учетом результатов биоинформатических методов анализа.
6. Разработка инструментов биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, позволяющих определять направление передачи возбудителя и продолжительность инфекции.
7. Объединение Российской базы данных устойчивости ВИЧ к АРВ препаратам и базы данных устойчивости ВИЧ в странах ВЕЦА для эффективного межстранового геномного эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АРВ – антиретровирусный

АРВП – антиретровирусные препараты

АРВТ – антиретровирусная терапия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВИЧ-инфекция – инфекция, вызываемая вирусом иммунодефицита человека

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГБУЗ - государственное бюджетное учреждение здравоохранения

ГКУЗ - государственное казенное учреждение здравоохранения

ГУЗ - государственное учреждение здравоохранения

ГЭ – геномный эквивалент

ДВФО – Дальне-Восточный Федеральный Округ

ДКП – доконтактная профилактика

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДРК – Демократическая Республика Конго

ИБ – иммунный блот

ИИ – ингибиторы интеграции

ИП – ингибиторы протеазы

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛЖВ – лица, живущие с ВИЧ

ЛУ – лекарственная устойчивость

ЛУИН – лица, употребляющие инъекционные наркотические вещества

МР – методические рекомендации

МСМ – мужчины, имеющие секс с мужчинами

МУ – методические указания

НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ННИОТ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

НИР – научно-исследовательская работа

НР – набор реагентов

ООН – Организации Объединенных Наций

ОТ – обратная транскрипция

ОЭА – оперативный эпидемиологический анализ

ПИН – лица, употребляющие парентеральные наркотики

ПФО – Приволжский Федеральный Округ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РФ – Российская Федерация

РЭА – ретроспективный эпидемиологический анализ

СанПиН – санитарные правила и нормы

СЗФО – Северо-Западный Федеральный Округ

СКФО – Северо-Кавказский Федеральный Округ

СНИОП СПИД – Специализированный научно-исследовательский отдел по профилактике и борьбе со СПИДом

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита человека

СССР – Союз Советских Социалистических Республик

СФО – Сибирский Федеральный Округ

США – Соединенные Штаты Америки

УФО – Уральский Федеральный Округ

ФБУН – Федеральное Бюджетное Учреждение Науки

ФО – Федеральный Округ

ХМАО – Ханты-Мансийский Автономный округ

ЦНИИ – Центральный научно-исследовательский институт

ЦФО – Центральный Федеральный Округ

ЭА – эпидемиологический анализ

ЮАР – Южно-Африканская Республика

ЮНЭЙДС – программы Организации Объединенных Наций по СПИДу

ЮФО – Южный Федеральный Округ

ABC – абакавир

ATV – атазанавир

AZT – азидотимидин

BIC - биктегравир

BLAST – basic local alignment search

CAB - каботегравир

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CMV - Cytomegalovirus

COVID-19 - COronaVirus Disease 2019

CRF – circulating recombinant form

D4T – ставудин

DDI – диданозин

DOR – доравирин

DRV – дарунавир

DTG – долутегравир

EBV - Epstein–Barr virus

EFV – эфавиренз

ESV – элсульфавирин

ETR – этравирин

EVG - элвитегравир

FPV – фосампренавир

FTC – эмтрицитабин

GD – genetic distance

HAV – hepatitis A virus

HBV – hepatitis B virus

HCV – hepatitis C virus

HSV – herpes simplex virus

HIV – human immunodeficiency virus

HLA – Human leukocyte antigen

IDV – индинавир

LPV – лопинавир

LTR – long terminal repeat

NFV – нелфинавир

NVP – невирапин

NGS – next generation sequencing

RAL – ралтегравир

R_0 – базовое репродуктивное число

Re – эффективное репродуктивное число

RPV – рилпивирин

SDRM – surveillance drug resistance mutation, надзорная мутация лекарственной устойчивости

SQV – саквинавир

TBEV - Tick-borne encephalitis virus

TDF – тенофовир

TPV – типранавир

VZV - Varicella zoster virus

WNV - West Nile virus

ZDV – зидовудин

ЗТС – ламивудин

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

амплификация нуклеиновых кислот:	Многократное копирование (амплифицирование) определенного участка ДНК или РНК в условиях <i>in vitro</i> , используемое для синтеза с оригинальной матрицы большого количества копий молекул соответствующих нуклеиновых кислот
биоинформатический анализ:	Компьютерный анализ биологических данных, например, нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1
вирусная нагрузка:	Концентрация вирусных частиц в крови/плазме крови пациента
кластерный анализ (анализ молекулярных кластеров):	Процесс выявления и сравнения между собой групп (кластеров), включающих в себя нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 с высоким генетическим сходством
молекулярный кластер (нуклеотидных последовательностей):	Нуклеотидные последовательности ВИЧ-1, имеющие более высокое генетическое сходство между собой, которое позволяет им группироваться отдельно от остальных последовательностей исследуемой выборки
секвенирование:	Определение нуклеотидной последовательности ДНК
филогенетический анализ:	Процесс определения эволюционных взаимоотношений между вариантами ВИЧ-1, присутствующих у различных ВИЧ-инфицированных лиц

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ закупок АРВ-препаратов в Российской Федерации в 2022 году. Коалиция по готовности к лечению. – 2023. Режим доступа: <https://itpseeeca.org/monitoring/rezultaty-monitoringa-gosudarstvennyh-zakupok-arv-preparatov-v-2022-godu-2/>.
2. Анализ закупок средств диагностики для лечения ВИЧ в России в 2020-2021 годах. Коалиция по готовности к лечению – 2022. – Режим доступа: <https://itpseeeca.org/wp-content/uploads/2022/07/monitoring-testov-vich-2020-21-gg-1.pdf>.
3. Анализ уровня распространенности первичной резистентности ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам на территории Москвы и Московской области / М.Н. Носик, К.А. Рыжов, А.В. Кравченко [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 3. – С. 27-31.
4. Антиретровирусная терапия в России / О.Г. Юрин, Н.Н. Ладная, А.В. Кравченко [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2021. – Т. 11. – № 3. – С. 46-52.
5. Балакин, А. В. Социально-управленческие технологии противодействия наркотизации и ВИЧ-инфицированию населения на муниципальном уровне / автореферат дисс. канд. социол. наук / А.В. Балакин. – Екатеринбург. – 2005. – 21 с.
6. Бобкова, М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ / М. Р. Бобкова. – Москва: Человек, 2014. – 288 с.
7. Влияние случаев ВИЧ-инфекции, связанных с нозокомиальными очагами, на дальнейшее развитие эпидемического процесса / С.Р. Саухат, В.В. Покровский, Д.В. Воронцов [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – № 4. – С. 16-20.
8. Внутрибольничная вспышка ВИЧ-инфекции в Элисте / В.В. Покровский, И.Ю. Ерамова, М.О. Деулина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1990. – Т. 67. – № 4. – С. 17-23.

9. Генетический профиль ВИЧ-1 на территории Республики Саха, Якутия / В. О. Котова, О. Е. Троценко, Л. А. Балахонцева [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2023. – Т. 15, № 3. – С. 73-83.
10. Генетический профиль и характеристика мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на территории Краснодарского края в период 2014–2019 гг. / А.А. Антонова, А.С. Туманов, А.В. Лебедев [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2022. – Т. 14. – № 2. – С. 20–30.
11. Информационный бюллетень № 19 «ВИЧ-инфекция» Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ. – 2000.
12. Информационный бюллетень № 21 «ВИЧ-инфекция» Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ. – 2001.
13. Информационный бюллетень № 47 «ВИЧ-инфекция» ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2023. – Режим доступа: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2023/05/Byulleten-47-VICH-infektsiya-za-2021-g.pdf>.
14. Информационный бюллетень № 48 «ВИЧ-инфекция» ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2024. – Режим доступа: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2024/11/hiv-infection-info-bulletin-48.pdf>.
15. Корреляция результатов высокопроизводительного и классического методов секвенирования при анализе лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека у пациентов на фоне неэффективной антиретровирусной терапии / А.А. Кириченко, А.А. Свиридова, А.Э. Лопатухин [и др.] // Инфекционные болезни. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 12-19.
16. Косолапов, А.Б. Наркомания в России и Приморском крае как социальная и медико-биологическая проблема / А. Б. Косолапов, Р. Б. Спиридонов // Вестник Дальневосточной государственной академии экономики и управления. – 2004. – Т. 2. – № 30. – С. 121-131.
17. Кравченко, А.В. 25 лет применения отечественных оригинальных антиретровирусных препаратов в схемах первой линии терапии ВИЧ-

- инфекции / А.В. Кравченко, О.Г. Юрин, А.В. Покровская // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2023. – Т. 12, № 2(45). – С. 75-82.
- 18.Ладная, Н.Н. Передача ВИЧ-инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации / Н. Н. Ладная, Е. В. Соколова, В.В. Покровский // Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2023) : Сборник тезисов XI конгресса с международным участием, Москва, 23–24 ноября 2023 года. – Москва: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, 2023. – С. 53-54.
- 19.Ладная, Н.Н. Смертность среди людей, живущих с ВИЧ в 2021 г. в Российской Федерации / Н.Н. Ладная, В.В. Покровский, Е.В. Соколова // 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. 123.
- 20.Ладная, Н.Н. Эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации в 2022 г. / Н.Н. Ладная, В.В. Покровский, Е.В. Соколова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2023. – Т. 13. – № 3. – С. 13-20.
- 21.Лаповок, И.А. Молекулярно-генетические методы анализа в расследовании нозокомиальных вспышек ВИЧ-инфекции / И.А. Лаповок, А.Э. Лопатухин, Д.Е. Киреев // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 18. – № 1. – С. 53–59.
- 22.Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в России (2013–2021 гг.) / А.А. Кириченко, Д.Е. Киреев, А.В. Шлыкова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2021. – Т. 11. – № 3. – С. 53–62.
- 23.Методические рекомендации МР № 5958-РХ «О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека,

- включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам» от 6 августа 2007 года.
- 24.Методические рекомендации МР № 6963-РХ «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» от 20 сентября 2007 года.
- 25.Методические рекомендации МР 3.1.0087-14 «Профилактика заражения ВИЧ» от 18 марта 2014 года.
- 26.Методические рекомендации МР 3.1.1.0075/1-13 «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам» от 20.08.2013.
- 27.Методические рекомендации «Формирование системы оценочных данных распространения ВИЧ-инфекции в Российской Федерации». М.: ЦНИИОИЗ МЗ РФ. – 2019. - 31 стр.
- 28.Методические указания Роспотребнадзора МУ 3.1.3342-16 «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией» от 26 февраля 2016 года.
- 29.Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987-2015 гг. / И.А. Лаповок, А.Э. Лопатухин, Д.Е. Киреев [и др.] // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89. – № 11. – С. 44-49.
- 30.Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-инфекции в северных портовых городах России / Е.В. Казеннова, В.Ю. Лага, К.Б. Громов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62. – № 4. – С. 154-161.
- 31.Ожмегова, Е.Н. Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции / Е.Н. Ожмегова, М.Р. Бобкова // Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67. – № 3. – С. 193–205.
- 32.О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. – 368 с.
- 33.Оценка лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к элсульфаविрину и эффективность его применения среди Российских пациентов, ранее не

- получавших антиретровирусные препараты / А.А. Кириченко, Д.Е. Киреев, А.В. Кравченко [и др.] // Журнал Инфектологии. – 2020. – Т. 12. – №5. – С. 29-39.
34. Оценка эффективности определения длительности ВИЧ-инфекции путем анализа генетической вариабельности вируса / Д.Е. Киреев, А.В. Мурзакова, А.Э. Лопатухин [и др.] // Инфекционные болезни. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 61–66.
35. Первый опыт применения стандартизированной генотипической методики определения тропизма ВИЧ / А.Э. Лопатухин, Д.Е. Киреев, А.Н. Поляков А.Н. [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №6. – С.46-48.
36. Покровский, В.В. Организация медицинской помощи при инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека / В.В. Покровский, Г.Э. Улумбекова, И. В. Петрачков // ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучение. Вестник ВШОУЗ. – 2022. – Т. 8. – № 2. – С. 108-130.
37. Покровский, В.В. СПИД и ВИП (околонаучные мемуары) / В. В. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2014. – № 2. – С. 8-15.
38. Покровский, В.В. Эпидемия ВИЧ-инфекции в России – социальная и экономическая проблема / В.В. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1996. – № 3. – С. 10.
39. Покровский, В.В. Эпидемия инфекции, вызываемой ВИЧ, среди потребителей психотропных препаратов в России / В.В. Покровский, Н.Н. Ладная, М. С. Бочкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2002. – № 4. – С. 9.
40. Приказ Минздрава РСФСР № 501-ДСП от 10.07.1987 «О расширении мероприятий по борьбе со СПИД в РСФСР».
41. Приказ Минздрава РСФСР № 62 от 24.04.1989 «Об организации службы профилактики СПИДа в РСФСР».
42. Приказ Минздрава СССР № 173 от 16.03.1989 «О создании Центров по предупреждению и борьбе со СПИД».

- 43.Приказ Минздрава СССР № 239 от 10.04.1989 «Об организации службы профилактики СПИД в СССР».
- 44.Приказ Минздрава СССР № 776 от 10.06.1985 "Об организации поиска больных СПИД и контроле доноров на наличие возбудителя СПИД".
- 45.Приказ Росстата № 66 от 14 февраля 2020 г. «Об утверждении формы федерального статистического наблюдения с указаниями по ее заполнению для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за санитарно-эпидемиологической ситуацией по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации».
- 46.Приказ Росстата № 863 от 30.12.2020 «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения с указаниями по их заполнению для организации Министерством здравоохранения Российской Федерации федерального статистического наблюдения в сфере охраны здоровья» (с изменениями на 20 декабря 2021 года).
- 47.Приказ Росстата № 867 от 30 декабря 2020 года «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения с указаниями по их заполнению для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за санитарным состоянием субъекта Российской Федерации».
- 48.Применение методов генотипирования ВИЧ и филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции / А.Э. Лопатухин, Н.Н. Ладная, Л.Д. Кириллова [и др.] // Врач. – 2015. – №2. – С. 2-5.
- 49.Развитие современной эпидемии ВИЧ-инфекции в Омске определяется распространением генетического варианта CRF63_02A1 ВИЧ-1 / А.А. Нефедова, И.П. Осипова, Е.М. Астахова [и др.] // Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции : Материалы Международной научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 10–11 июня 2019 года. – Санкт-Петербург: Санкт-

- Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2019. – С. 312-313.
50. Распоряжение Правительства РФ № 2203-р от 20 октября 2016 года «О Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в РФ на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу».
51. Распоряжение Правительства РФ № 3468-р от 21 декабря 2020 года «О Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в РФ на период до 2030 г.».
52. Распространение инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека, на территориях Российской Федерации в 2021 г. / Н.Н. Ладная, В.В. Покровский, Е.В. Соколова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2022. – Т. 12. – № 3. – С. 8-12.
53. Российская база данных лекарственной устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам / Д. Е. Киреев, А.А. Кириченко, А. Э. Лопатухин [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – Т. 100. – № 2. – С219-227.
54. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» от 11 января 2011 года.
55. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача РФ 28 января 2021 г. (с изменениями на 25 мая 2022 г.).
56. Сосин, Д. В. Молекулярные механизмы генетической изменчивости ВИЧ-1 / Д. В. Сосин, Н. А. Чуриков // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – № 4. – С. 547-560.
57. Сравнительный анализ особенностей стигматизирующей установки при различных социально значимых заболеваниях / В.В. Беляева, М.М. Адигамов, М.О. Орлова, Е.В. Соколова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2016. – № 4. – С. 27-32.

58. Суханова, А.Л. Генетическое тестирование лекарственной устойчивости при ВИЧ-инфекции: проблемы и перспективы / А. Л. Суханова, А. Ф. Бобков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – № 4. – С. 54-58.
59. Указание Минздрава СССР № 460-у от 22.12.1987 «О порядке сбора, передачи информации и регистрации заболеваний СПИД и инфицированных ВИЧ».
60. Уровень и структура лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди пациентов без опыта приема антиретровирусных препаратов с момента начала применения антиретровирусной терапии в Российской Федерации / А.А. Кириченко, Д.Е. Киреев, А.Э. Лопатухин [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2019. – Т. 11. – № 2. С. 75–83.
61. Федеральный закон № 38-ФЗ от 30.03.1995 «О предупреждении распространения в Российской Федерации заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция)».
62. Федеральный закон № 52-ФЗ от 30 марта 1999 г. «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
63. Филогенетический анализ в эпидемиологических расследованиях случаев ВИЧ-инфекции / Т.П. Сандырева, Н.А. Герасимова, А.Э. Лопатухин [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – №1. – С. 17-21.
64. Эпидемиологическое расследование случаев инфицирования детей вирусом гепатита С в онкогематологическом отделении медицинской организации / Н.Н. Ладная, Л. А. Дементьева, О. П. Курганова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2022. – Т. 12, № 4. – С. 52-60.
65. ЮНЭЙДС. Информационный бюллетень 2024. Глобальная статистика по ВИЧ. – 2024. Режим доступа: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_ru.pdf.
66. 1970s and 'Patient 0' HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America / M. Worobey, T. D. Watts, R. A. McKay [et al.] // Nature. – 2016. – Vol. 539, № 7627. – P. 98-101.

67. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses / A.N. Kolomeets, V. Varghese, P. Lemey [et al.] // *AIDS*. – 2014. – Vol. 28, № 17. – P. F1–F8.
68. Abecasis, A. Origin and Distribution of HIV-1 Subtypes / A. Abecasis, A.M. Vandamme // In: T. Hope, M. Stevenson, D. Richman (eds) *Encyclopedia of AIDS*. – Springer, New York, NY. – 2015. – P. 1-16.
69. Achieving the 95 95 95 targets for all: A pathway to ending AIDS / L. Frescura, P. Godfrey-Faussett, A.A. Feizzadeh [et al.] // *PLoS One*. – 2022. – Vol. 17, № 8. – P. e0272405.
70. Added Value of Next Generation over Sanger Sequencing in Kenyan Youth with Extensive HIV-1 Drug Resistance / V. Novitsky, W. Nyandiko, R. Vreeman [et al.] // *Microbiology spectrum*. – 2022. – Vol. 10, № 6. – P. e0345422.
71. Alarming Rise of Primary HIV Drug Resistance in Major Regions of Russia / D. Kireev, A. Kirichenko, A. Lebedev, M. Bobkova // *Current HIV research*. – 2023. – Vol. 21, № 6. – P. 347–353.
72. Alizon, S. Within-host and between-host evolutionary rates across the HIV-1 genome / S. Alizon, C. Fraser // *Retrovirology*. – 2013. – Vol. 10. – P. 49.
73. Ambiguous nucleotide calls from population-based sequencing of HIV-1 are a marker for viral diversity and the age of infection / R.D. Kouyos, V. von Wyl, S. Yerly [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 52, № 4. – P. 532–539.
74. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic / T. Zhu, B.T. Korber, A.J. Nahmias [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 391. – P. 594-597.
75. An Automated Bioinformatics Pipeline Informing Near-Real-Time Public Health Responses to New HIV Diagnoses in a Statewide HIV Epidemic / M. Howison, F.S. Gillani, V. Novitsky [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, №3. – P. 737.
76. An exploratory study on the social and genotypic clustering of HIV infection in men having sex with men / S.S. Lee, D.K.P. Tam, Y. Tan [et al.] // *AIDS*. – 2009. – Vol. 23, № 13. – P. 1755–64.

77. Application of a new informatics tool for contamination screening in the HIV sequencing laboratory / M.T. Ebbert, M.A. Mallory, A.R. Wilson [et al.] // *Journal of clinical virology*. – 2013. – Vol. 57, № 3. – P. 249–253.
78. Are We Ready for NGS HIV Drug Resistance Testing? The Second “Winnipeg Consensus” Symposium / H. Ji, P. Sandstrom, R. Paredes [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 6. – P. 586.
79. Assessment of HIV molecular surveillance capacity in the European Union, 2016 / P. Keating, A. Pharris, K. Leitmeyer [et al.] // *Euro surveillance*. – 2017. – Vol. 22, № 49. – P. 17-00269.
80. Automated analysis of phylogenetic clusters / M. Ragonnet-Cronin, E. Hodcroft, S. Hué [et al.] // *BMC bioinformatics*. – 2013. – Vol. 14. – P. 317.
81. Baryshev, P.B. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia / P.B. Baryshev, V.V. Bogachev, N.M. Gashnikova // *AIDS research and human retroviruses*. – 2014. – Vol. 30, № 6. – P. 592–597.
82. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage / T. Lengauer, O. Sander, S. Sierra [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2007. – Vol. 25, № 12. – P. 1407–1410.
83. Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus Type 1 may require two different amplification targets / M. Chudy, M. Weber-Schehl, L. Pichl [et al.] // *Transfusion*. – 2012. – Vol. 52, № 2. – P. 431–439.
84. Bolger, A.M. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data / A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, № 15. – P. 2114–20.
85. Brenner, B. Phylogenetic inferences on HIV-1 transmission: implications for the design of prevention and treatment interventions / B. Brenner, M.A. Wainberg, M. Roger // *AIDS*. – 2013. – Vol. 27, № 7. – P. 1045–1057.
86. CDC. A guide for health departments: detecting and responding to HIV Transmission Clusters, 2018. – 2019. – 131 p.
87. CDC. *Pneumocystis pneumonia* — Los Angeles // *MMWR* – 1981. – Vol. 30. – P. 250–252.

- 88.Characterization of Human Immunodeficiency Virus-1 Transmission Clusters and Transmitted Drug-Resistant Mutations in Croatia from 2019 to 2022 / A. Planinić, J. Begovac, F. Rokić [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 12. – P. 2408.
- 89.Clinically relevant thresholds for ultrasensitive HIV drug resistance testing: a multi-country nested case-control study / S.C. Inzaule, R.L. Hamers, M. Noguera-Julian [et al.] // *The lancet. HIV*. – 2018. – Vol. 5, № 11. – P. e638–e646.
- 90.Clustering of HCV coinfections on HIV phylogeny indicates domestic and sexual transmission of HCV / R.D. Kouyos, A. Rauch, J. Böni [et al.] // *International journal of epidemiology*. – 2014. – Vol. 43, № 3. – P. 887–896.
- 91.Cohort Profile Update: The Swiss HIV Cohort Study (SHCS) / A. U. Scherrer, A. Traytel, D. L. Braun [et al.] // *International journal of epidemiology*. – 2022. – Vol. 51, № 1. – P. 33–34j.
- 92.Combining molecular network analysis and field epidemiology to quantify local HIV transmission and highlight ongoing epidemics / J. Zhang, K. Xu, J. Jiang [et al.] // *International journal of infectious diseases*. – 2023. – Vol. 128, 187–193.
- 93.Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure / S. Mohamed, G. Penaranda, D. Gonzalez [et al.] // *AIDS*. – 2014. – Vol. 28, № 9. – P. 1315–1324.
- 94.Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III / L. Ratner, W. Haseltine, R. Patarca [et al.] // *Nature*. – 1985. – Vol. 313, № 6000. – P. 277–284.
- 95.Concurrent evolution of human immunodeficiency virus type 1 in patients infected from the same source: rate of sequence change and low frequency of inactivating mutations / P. Balfe, P. Simmonds, C. A. Ludlam [et al.] // *Journal of virology*. – 1990. – Vol. 64, № 12. – P. 6221–6233.
- 96.Crispim, M.A.E. HIV-1 genetic diversity and drug resistance mutations in the northern Brazilian region / M.A.E. Crispim, M.N.D.G. Reis, M.M.A. Stefani // *The Brazilian journal of infectious diseases*. – 2021. – Vol. 25, № 3. – P. 101596.
- 97.Current approaches to HIV vaccine development: a narrative review / J. Kim, S. Vasan, J.H. Kim, J.A. Ake // *Journal of the International AIDS Society*. – 2021. – Vol. 24. – Suppl 7 (Suppl 7). – P. e25793.

98. Current Trends of HIV Infection in the Russian Federation / D. Ogarkova, A. Antonova, A. Kuznetsova [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 11. – P. 2156.
99. DBCollHIV: a database system for collaborative HIV analysis in Brazil / L. V. Araújo, M. A. Soares, S. M. Oliveira [et al.] // *Genetics and molecular research*. – 2006. – Vol. 5, № 1. – P. 203–215.
100. Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology / M.E. Quiñones-Mateu, S. Avila, G. Reyes-Teran, M.A. Martinez // *Journal of clinical virology*. – 2014. – Vol. 61, № 1. – P. 9–19.
101. Defining HIV-1 transmission clusters based on sequence data / A.S. Hassan, O.G. Pybus, E.J. Sanders [et al.] // *AIDS*. – 2017. – Vol. 31, № 9. – P. 1211–1222.
102. Detection of Patient HIV-1 Drug Resistance Mutations in Russia's Northwestern Federal District in Patients with Treatment Failure / A.N. Shchemelev, Y.V. Ostankova, E.B. Zueva [et al.] // *Diagnostics*. – 2022. – Vol. 12, № 8. – P. 1821.
103. Developing a next level integrated genomic surveillance: Advances in the molecular epidemiology of HIV in Germany / K. Hanke, V. Rykalina, U. Koppe [et al.] // *International journal of medical microbiology*. – 2024. – Vol. 314. – P. 151606.
104. Díez-Fuertes, F. Bayesian phylogeographic analyses clarify the origin of the HIV-1 subtype A variant circulating in former Soviet Union's countries / F. Díez-Fuertes, M. Cabello, M.M. Thomson // *Infection, genetics and evolution*. – 2015. – Vol. 33. – P. 197–205.
105. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960 / M. Worobey, M. Gemmel, D.E. Teuwen [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 455. – P. 661–664.
106. Dispersion of the HIV-1 Epidemic in Men Who Have Sex with Men in the Netherlands: A Combined Mathematical Model and Phylogenetic Analysis / D. Bezemer, A. Cori, O. Ratmann [et al.] // *PLoS medicine*. – 2015. – Vol. 12, № 11. – P. e1001898.
107. Dunn, D. UK HIV drug resistance database: background and recent outputs / D. Dunn, D. Pillay // *Journal of HIV therapy*. – 2007. – Vol. 12, № 4. – P. 97–98.

108. Dynamics of two separate but linked HIV-1 CRF01_AE outbreaks among injection drug users in Stockholm, Sweden, and Helsinki, Finland / H. Skar, M. Axelsson, I. Berggren I [et al.] // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – P. 510–518.
109. EACS Guidelines version 12.0. – 2023 – URL: <https://www.eacsociety.org/guidelines/eacs-guidelines/> (дата обращения 11.04.2024).
110. Emergence of acquired HIV-1 drug resistance almost stopped in Switzerland: a 15-year prospective cohort analysis / A.U. Scherrer, V. von Wyl, W.L. Yang [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 62. – P. 1310–1317.
111. Empirical comparison of analytical approaches for identifying molecular HIV-1 clusters / V. Novitsky, J.A. Steingrimsson, M. Howison [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 18547.
112. Ending the HIV Epidemic: A Plan for the United States / A.S. Fauci, R.R. Redfield, G. Sigounas [et al.] // *JAMA*. – 2019. – Vol. 321, № 9. – P. 844–845.
113. Episodic sexual transmission of HIV revealed by molecular phylodynamics / F. Lewis, G.J. Hughes, A. Rambaut [et al.] // *PLoS Medicine*. – 2008. – Vol. 5. – P. e50.
114. Estimating HIV Incidence, Time to Diagnosis, and the Undiagnosed HIV Epidemic Using Routine Surveillance Data / A. van Sighem, F. Nakagawa, D. De Angelis [et al.] // *Epidemiology*. – 2015. – Vol. 26, № 5. – P. 653–660.
115. Estimating the basic reproductive number from viral sequence data / T. Stadler, R. Kouyos, V. von Wyl [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2012. – Vol. 29. – P.347–357.
116. Evaluating the accuracy and sensitivity of detecting minority HIV-1 populations by Illumina next-generation sequencing / D.E. Kireev, A.E. Lopatukhin, A.V. Murzakova [et al.] // *Journal of virological methods*. – 2018. – Vol. 261. – P. 40–45.
117. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation / B. Korber, B. Gaschen, K. Yusim [et al.] // *British Medical Bulletin*. – 2001. – Vol. 58. – P. 19–42.

118. Exploring Evolutionary and Transmission Dynamics of HIV Epidemic in Serbia: Bridging Socio-Demographic With Phylogenetic Approach / L. Jovanović, M. Šiljić, V. Ćirković [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10, № 287.
119. From hospital to the community: redesigning the human immunodeficiency virus (HIV) clinical service model to respond to an outbreak of HIV among people who inject drugs / R. Metcalfe, M. Ragonnet-Cronin, A. Bradley-Stewart [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 222. – P. S410–9.
120. Gallo, R.C. The Discovery of HIV as the Cause of AIDS / R.C. Gallo, L.N. Montagnier // *The New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol. 349. – P. 2283–2285.
121. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium / L. Cervera, S. Gutierrez-Granados, M. Martinez [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 166, № 4. – P. 152-65.
122. Genetic analysis reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups / S. Hué, D. Pillay, J.P. Clewley, O.G. Pybus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102, № 12. – P. 4425–4429.
123. Genetic Features of HIV-1 Integrase Sub-Subtype A6 Predominant in Russia and Predicted Susceptibility to INSTIs / A. Kirichenko, I. Lapovok, P. Baryshev [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 8. – P. 838.
124. German, D. Enhanced use of phylogenetic data to inform public health approaches to HIV among men who have sex with men / D. German, M.K. Grabowski, C. Beyrer // *Sexual Health*. – 2017. – Vol. 14. – P. 89–96.
125. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // *Nucleic Acids Symposium Series*. – 1999. – Vol. 41. – P. 95-98.
126. Hatanaka, M. The pX region of HTLV-I / M. Hatanaka, N. Kobayashi // *Proceedings of the International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*. – 1984. – Vol. 15. – P. 205–217.

127. High level of pre-treatment HIV-1 drug resistance and its association with HLA class I-mediated restriction in the Pumwani Sex Worker cohort / R. Willim, E. Shadabi, R. Sampathkumar [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 273.
128. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry / S. Ambardar, R. Gupta, D. Trakroo [et al.] // *Indian journal of microbiology*. – 2016. – Vol. 56, № 4. – P. 394–404.
129. HIITE: HIV-1 incidence and infection time estimator / S.Y. Park, T.M.T. Love, S. Kapoor, H.Y. Lee // *Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 34, № 12. – P. 2046–2052.
130. HIV and Drug-Resistant Subtypes / B.M. Nastri, P. Pagliano, C. Zannella [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11, № 1. – P. 221.
131. HIV Cluster and Outbreak Detection and Response: The Science and Experience / A.M. Oster, S.B. Lyss, R.P. McClung [et al.] // *American journal of preventive medicine*. – 2021. – Vol. 61, № 5 (Suppl 1). – P. S130–S142.
132. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations / N.R. Faria, A. Rambaut, M.A. Suchard [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 346, № 6205. – P. 56–61.
133. HIV forensics: pitfalls and acceptable standards in the use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigations of HIV transmission / E. J. Bernard, Y. Azad, A. M. Vandamme [et al.] // *HIV medicine*. – 2007. – Vol. 8, № 6. – P. 382–387.
134. HIV Infection Linked to Injection Use of Oxymorphone in Indiana, 2014-2015 / P.J. Peters, P. Pontones, K.W. Hoover [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 375, № 3. – P. 229–239.
135. HIV Response Interventions that Integrate HIV Molecular Cluster and Social Network Analysis: A Systematic Review / D.J. Gore, K. Schueler, S. Ramani [et al.] // *AIDS and Behavior*. – 2022. – Vol. 26, № 6. – P. 1750–1792.
136. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview / E. Fanales-Belasio, M. Raimondo, B. Suligoi, S. Buttò // *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. – 2010. – Vol. 46, № 1. – P. 5–14.

137. HIV-1 A1 Subtype Epidemic in Italy Originated from Africa and Eastern Europe and Shows a High Frequency of Transmission Chains Involving Intravenous Drug Users / A. Lai, G. Bozzi, M. Franzetti [et al.] // PloS one. – 2016. – Vol.11, № 1. – P. e0146097.
138. HIV-1 Drug Resistance among Treatment-Naïve Patients in Russia: Analysis of the National Database, 2006–2022 / A. Kirichenko, D. Kireev, I. Lapovok [et al.] // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – P. 991.
139. HIV-1 molecular diversity in Brazil unveiled by 10 years of sampling by the national genotyping network / T. Gräf, G. Bello, P. Andrade [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 15842.
140. HIV-1 transmission during early infection in men who have sex with men: a phylodynamic analysis / E. M. Volz, E. Ionides, E. O. Romero-Severson [et al.] // PLoS medicine. – 2013. – Vol. 10, № 12. – P. e1001568.
141. HIV-TRACE (TRANsmiSSion Cluster Engine): a Tool for Large Scale Molecular Epidemiology of HIV-1 and Other Rapidly Evolving Pathogens / S.L. Kosakovsky Pond, S. Weaver, A. J. Leigh Brown, J. O. Wertheim // Molecular biology and evolution. – 2018. – Vol. 35, № 7. – P. 1812–1819.
142. Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: Evaluation of a new ultra-deep sequencing-based protocol and comparison with the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit / E. Stelzl, J. Pröll, B. Bizon [et al.] // Journal of virological methods. – 2011. – Vol. 178, № (1-2). – P. 94–97.
143. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Phylodynamics to Detect and Characterize Active Transmission Clusters in North Carolina / A.M. Dennis, S. Hué, R. Billock [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 221, № 8. – P. 1321–1330.
144. Identifying Clusters of Recent and Rapid HIV Transmission Through Analysis of Molecular Surveillance Data / A.M. Oster, A.M. France, N. Panneer [et al.] // Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2018. – Vol. 79, № 5. – P. 543–550.

145. Identifying HIV-1 Transmission Clusters in Uzbekistan through Analysis of Molecular Surveillance Data / A. Lebedev, A. Kuznetsova, K. Kim [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 8. – P. 1675.
146. Impact of sampling density on the extent of HIV clustering / V. Novitsky, S. Moyo, Q. Lei [et al.] // *AIDS research and human retroviruses*. – 2014. – Vol. 30, № 12. – P. 1226–1235.
147. Incident infection in high-priority HIV molecular transmission clusters in the United States / J. O. Wertheim, N. Panneer, A. M. France [et al.] // *AIDS*. – 2020. – Vol. 34, № 8. – P. 1187–1193.
148. In-depth analysis of HIV-1 drug resistance mutations in HIV-infected individuals failing first-line regimens in West and Central Africa / C.J. Villabona-Arenas, N. Vidal, E. Guichet [et al.] // *AIDS*. – 2016. – Vol. 30. – P. 2577–2589.
149. Inference of Transmission Network Structure from HIV Phylogenetic Trees / F. Giardina, E.O. Romero-Severson, J. Albert [et al.] // *PLoS computational biology*. – 2017. – Vol. 13, № 1. – P. e1005316.
150. Insights into HIV-1 Transmission Dynamics Using Routinely Collected Data in the Mid-Atlantic United States / S.G. Kassaye, Z. Grossman, P. Vengurlekar [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 15, № 1. – P. 68.
151. Insights Into Persistent HIV-1 Infection and Functional Cure: Novel Capabilities and Strategies / T.M. Ta, S. Malik, E.M. Anderson [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 862270.
152. Integration of Contact Tracing and Phylogenetics in an Investigation of Acute HIV Infection / A.M. Dennis, D.K. Pasquale, R. Billock [et al.] // *Sexually transmitted diseases*. – 2018. – Vol. 45, № 4. – P. 222–228.
153. Interstate response to a rapid increase of HIV among persons who inject drugs in northern Kentucky and Hamilton County, Ohio / D. Carlson, Z. Raney, A. Grimes Trotter [et al.] // In: Paper presented at: National HIV Prevention Conference. – March 2019.

154. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies / L.T. Nguyen, H.A. Schmidt, A. von Haeseler, B.Q. Minh // *Molecular biology and evolution*. – 2015. – Vol. 32, № 1. – P. 268–274.
155. Isolation of drug-resistant variants of HIV-1 from patients on long-term zidovudine therapy / R. Rooke, M. Tremblay, H. Soudeyns [et al.] // *AIDS*. – 1989. – Vol. 3, № 7. – P. 411–415.
156. Katusiime, C. Basis of selection of first and second line highly active antiretroviral therapy for HIV/AIDS on genetic barrier to resistance: a literature review / C. Katusiime, P. Ocama, A. Kambugu // *African Health Sciences*. – 2014. – Vol. 14, № 3. – P. 679–681.
157. Larder, B.A. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy / B.A. Larder, G. Darby, D.D. Richman // *Science*. – 1989. – Vol. 243. – P. 1731–1734.
158. Larder, B.A. Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants with altered inhibitor sensitivity / B. A. Larder, S. D. Kemp, D.J. Purifoy // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1989. – Vol. 86, № 13. – P. 4803–4807.
159. Longitudinal typing of molecular HIV clusters in a statewide epidemic / V. Novitsky, J. Steingrimsson, M. Howison [et al.] // *AIDS*. – 2021. – Vol. 35, № 11. – P. 1711–1722.
160. Mansky, L.M. HIV Mutagenesis and the Evolution of Antiretroviral Drug Resistance / L.M. Mansky // *Drug Resist. Updat.* – 2002. – Vol. 5. – P. 219–223.
161. Mansky, L.M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase / L.M. Mansky, H.M. Temin // *Journal of Virology*. – 1995. – Vol. 69, N.8. – P. 5087-5094.
162. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson [et al.] // *Molecular biology and evolution*. – 2013. – Vol. 30, № 12. – P. 2725–2729.

163. MicrobeTrace: Retooling molecular epidemiology for rapid public health response / E. M. Campbell, A. Boyles, A. Shankar [et al.] // PLoS computational biology. – 2021. – Vol. 17, № 9. – P. e1009300.
164. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice / C. Y. Ou, C. A. Ciesielski, G. Myers [et al.] // Science. – 1992. – Vol. 256, № 5060. – P. 1165–1171.
165. Molecular epidemiology of HIV-1 in the former Soviet Union: analysis of env V3 sequences and their correlation with epidemiologic data / A. Bobkov, M.M. Garaev, A. Rzhaninova [et al.] // AIDS. – 1994. – Vol. 8, № 5. – P. 619–624.
166. Molecular Epidemiology of HIV-1 Subtype G in the Russian Federation / A. Murzakova, D. Kireev, P. Baryshev [et al.] // Viruses. – 2019. – Vol. 11, № 4. – P. 348.
167. Molecular Epidemiology of the HIV Epidemic in Three German Metropolitan Regions - Cologne/Bonn, Munich and Hannover, 1999-2016 / M. Stecher, A. Chaillon, J. Eberle [et al.] // Scientific reports. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 6799.
168. Molecular investigation of transmission of human immunodeficiency virus type 1 in a criminal case / R. Machuca, L.B. Jørgensen, P. Theilade, C. Nielsen // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2001. – Vol. 8, № 5. – P. 884–890.
169. Molecular phylodynamics of the heterosexual HIV epidemic in the United Kingdom / G.J. Hughes, E. Fearnhill, D. Dunn [et al.] // PLoS Pathogens. – 2009. – Vol. 5. – P. e1000590.
170. Montagnier, L. 25 Years after HIV Discovery: Prospects for Cure and Vaccine / L. Montagnier // Virology. – 2010. – Vol. 397. – P. 248–254.
171. MOSAIK: A Hash-Based Algorithm for Accurate Next-Generation Sequencing Short-Read Mapping / W-P. Lee, M.P. Stromberg, A. Ward [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. e90581.
172. Near real-time monitoring of HIV transmission hotspots from routine HIV genotyping: an implementation case study / A.F. Poon, R. Gustafson, P. Daly [et al.] // Lancet. HIV. – 2016. – Vol. 3, № 5. – P. e231–e238.

173. Ng'uni, T. Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions / T. Ng'uni, C. Chasara, Z.M. Ndhlovu // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 590780.
174. Nucleotide sequence analysis of human T-cell leukemia virus type II / K. Shimotohno, Y. Takahashi, N. Shimizu [et al.] // *Proceedings of the International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*. – 1984. – Vol. 15. – P. 165–175.
175. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2) / R. Sanchez-Pescador, M.D. Power, P.J. Barr [et al.] // *Science*. – 1985. – Vol. 227, № 4686. – P. 484–492.
176. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV / S. Wain-Hobson, P. Sonigo, O. Danos [et al.] // *Cell*. – 1985. – Vol. 40, № 1. – P. 9–17.
177. Opioid use fueling HIV transmission in an urban setting: an outbreak of HIV infection among people who inject drugs - Massachusetts, 2015–2018 / C. Alpren, E.L. Dawson, B. John [et al.] // *American Journal of Public Health*. – 2020. – Vol. 110. – P. 37–44.
178. Optimized phylogenetic clustering of HIV-1 sequence data for public health applications / C. Chato, Y. Feng, Y. Ruan [et al.] // *PLoS computational biology*. – 2022. – Vol. 18, № 11. – P. e1010745.
179. Origin and evolution of HIV-1 subtype A6 / S.H. Abidi, L. Aibekova, S. Davlidova [et al.] // *PloS One*. – 2021. – Vol. 16, № 12. – P. e0260604.
180. Oster, A. M. Molecular Epidemiology and the Transformation of HIV Prevention / A.M. Oster, A.M. France, J. Mermin // *JAMA*. – 2018. – Vol. 319, № 16. – P. 1657–1658.
181. Outbreak of human immunodeficiency virus infection among heterosexual persons who are living homeless and inject drugs - Seattle, Washington, 2018 / M.R. Golden, R. Lechtenberg, S.N. Glick [et al.] // *MMWR*. – 2019. – Vol. 68. – P. 344–349.

182. Performance of ultra-deep pyrosequencing in analysis of HIV-1 pol gene variation / M. Mild, C. Hedskog, J. Jernberg, J. Albert // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6, № 7. – P. e22741.
183. Phylodynamic analysis of HIV sub-epidemics in Mochudi, Botswana / V. Novitsky, D. Kühnert, S. Moyo [et al.] // *Epidemics*. – 2015. – Vol. 13. – P. 44–55.
184. Phylodynamics of HIV in the Mexico City Metropolitan Region / S. Avila-Rios, C. García-Morales, G. Reyes-Terán [et al.] // *Journal of virology*. – 2022. – Vol. 96, № 14. – P. e0070822.
185. Phylodynamics of infectious disease epidemics / E.M. Volz, S.L. Kosakovsky Pond, M.J. Ward [et al.] // *Genetics*. – 2009. – Vol. 183, № 4. – P. 1421–1430.
186. Phylogenetic analysis of HIV-1 shows frequent cross-country transmission and local population expansions / M. Bennedbæk, A. Zhukova, M. E. Tang [et al.] // *Virus evolution*. – 2021. – Vol. 7, № 2. – P. veab055.
187. Phylogenetic evidence for underreporting of male-to-male sex among human immunodeficiency virus-infected donors in the Netherlands and Flanders / T.J. van de Laar, D. Bezemer, K. van Laethem [et al.] // *Transfusion*. – 2017. – Vol. 57, № 5. – P. 1235–1247.
188. Phylogenetic Investigation of a Statewide HIV-1 Epidemic Reveals Ongoing and Active Transmission Networks Among Men Who Have Sex With Men / P.A. Chan, J.W. Hogan, A. Huang [et al.] // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2015. – Vol. 70, № 4. – P. 428–435.
189. Phylogenetic studies of transmission dynamics in generalized HIV epidemics: an essential tool where the burden is greatest? / A.M. Dennis, J.T. Herbeck, A.L. Brown, [et al.] // *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. – 2014. – Vol. 67, № 2. – P. 181–195.
190. Phylogeographical Analysis Reveals Distinct Sources of HIV-1 and HCV Transmitted to Former Blood Donors in China / L. Du, J. Wu, P. Qian [et al.] // *AIDS research and human retroviruses*. – 2017. – Vol.33, № 3. – P. 284–289.

191. Phylogeography of HIV-1 suggests that Ugandan fishing communities are a sink for, not a source of, virus from general populations / N. Bbosa, D. Ssemwanga, R. N. Nsubuga [et al.] // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1051.
192. PHYLOSCANNER: Inferring Transmission from Within- and Between-Host Pathogen Genetic Diversity / C. Wymant, M. Hall, o. Ratmann [et al.] // *Molecular biology and evolution*. – 2018. – Vol. 35, № 3. – P. 719–733.
193. Predicted levels of HIV drug resistance: potential impact of expanding diagnosis, retention, and eligibility criteria for antiretroviral therapy initiation / V. Cambiano, S. Bertagnolio, M.R. Jordan [et al.] // *AIDS*. – 2014. – Vol. 28 (suppl 1). – P. S15–S23.
194. Predicting the course of AIDS in Australia / P.J. Solomon, S.R. Wilson, C.E. Swanson, D.A. Cooper // *Medical Journal of Australia*. – 1990. – Vol. 153, № 7. – P. 386-394.
195. Prevalence and spatiotemporal dynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Form 03_AB (CRF03_AB) in the Former Soviet Union countries / A. Lebedev, O. Pasechnik, E. Ozhmegova [et al.] // *PloS one*. – 2020. – Vol. 15, № 10. – P. e0241269.
196. Prevalence and Structure of HIV-1 Drug Resistance to Antiretrovirals in the Volga Federal District in 2008–2019 / O. Peksheva, E. Kuzovatova, O. Parfenova, N. Zaytseva // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – P. 1898.
197. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries / A. Kirichenko, D. Kireev, A. Lopatukhin [et al.] // *PloS one*. – 2022. – Vol. 17, № 1. – P. e0257731.
198. Price, M.N. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix / M.N. Price, P.S. Dehal, A.P. Arkin // *Molecular biology and evolution*. – 2009. – Vol. 26, № 7. – P. 1641–1650.
199. Primary *Pneumocystis carinii* and cytomegalovirus infections / R.M. du Bois, M.A. Branthwaite, J.R. Mikhail, J.C. Batten // *Lancet*. – 1981. – Vol. 2, № 8259. – P. 1339.
200. Priority Intervention Targets Identified Using an In-Depth Sampling HIV Molecular Network in a Non-Subtype B Epidemics Area / B. Zhao, W. Song, M. An

- [et al.] // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 642903.
201. Public availability of HIV-1 drug resistance sequence and treatment data: a systematic review / S.Y. Rhee, S.G. Kassaye, M.R. Jordan [et al.] // *Lancet Microbe*. – 2022. – Vol. 3, № 5. – P. e392–e398.
 202. Quantifying and Predicting Ongoing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission Dynamics in Switzerland Using a Distance-Based Clustering Approach / M. Labarile, T. Loosli, M. Zeeb [et al.] // *The Journal of infectious diseases*. – 2023. – Vol. 227, № 4. – P. 554–564.
 203. Quantifying HIV transmission flow between high-prevalence hotspots and surrounding communities: a population-based study in Rakai, Uganda / O. Ratmann, J. Kagaayi, M. Hall [et al.] // *The lancet. HIV*. – 2020. – Vol. 7, № 3. – P. e173–e183.
 204. Quantifying the fitness cost of HIV-1 drug resistance mutations through phylodynamics / D. Kühnert, R. Kouyos, G. Shirreff [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2018. – Vol. 14, № 2. – P. e1006895.
 205. Rapid identification and investigation of an HIV risk network among people who inject Drugs -Miami, FL, 2018 / H. Tookes, T.S. Bartholomew, S. Geary [et al.] // *AIDS and Behavior*. – 2020. – Vol. 24. – P. 246–56.
 206. Rapid spread of HTLV-III infection among drug addicts in Italy / G. Angarano, G. Pastore, L. Monno [et al.] // *Lancet*. – 1985. – Vol. 2, № 8467. – P. 1302.
 207. Reconstructing the Temporal Origin and the Transmission Dynamics of the HIV Subtype B Epidemic in St. Petersburg, Russia / M. Siljic, V. Cirkovic, L. Jovanovic [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 12. – P. 2748.
 208. Reconstruction of the Genetic History and the Current Spread of HIV-1 Subtype A in Germany / K. Hanke, N. R. Faria, D. Kühnert [et al.] // *Journal of virology*. – 2019. – Vol.93, № 12. – P. e02238-18.
 209. Rennie, S. HIV Molecular Epidemiology: Tool of Oppression or Empowerment? / S. Rennie, K. Sullivan, A. Dennis // *The American journal of bioethics*. – 2020. – Vol. 20, № 10. – P. 44–47.

210. Rohland, N. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture / N. Rohland, D. Reich // *Genome Research*. – 2012. – Vol. 22. – P. 939–946.
211. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1977. – Vol. 74, № 12. – P. 5463–5467.
212. Serological diagnosis and prevalence of HIV-1 infection in Russian metropolitan areas / D.E. Kireev, V.P. Chulanov, G.A. Shipulin [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 24.
213. Shafer, R.W. Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Protease Sequence Database / R. W. Shafer, D. Stevenson, B. Chan // *Nucleic acids research*. – 1999. – Vol. 27, № 1. – P. 348–352.
214. Sharp, P.M. Origins of HIV and the AIDS pandemic / P.M. Sharp, B.H. Hahn // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2011. – Vol. 1, № 1. – P. a006841.
215. Shin, Y.H. An Overview of Human Immunodeficiency Virus-1 Antiretroviral Drugs: General Principles and Current Status / Y.H. Shin, C.M. Park, C.H. Yoon // *Infection & chemotherapy*. – 2021. – Vol. 53, № 1. – P. 29–45.
216. Single-point mutations causing more than 100-fold underestimation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) load with the Cobas TaqMan HIV-1 real-time PCR assay / K. Korn, B. Weissbrich, C. Henke-Gendo [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 1238–1240.
217. Social and Genetic Networks of HIV-1 Transmission in New York City / J.O. Wertheim, S.L. Kosakovsky Pond, L.A. Forgiione [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2017. – Vol. 13, № 1. – P. e1006000.
218. Social meets molecular: combining phylogenetic and latent class analyses to understand HIV-1 transmission in Switzerland / D. Avila, O. Keiser, M. Egger [et al.] // *American Journal of Epidemiology*. – 2014. – Vol. 179, № 12. – P. 1514–25.
219. Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in East Africa / R.R. Gray, A.J. Tatem, S. Lamers [et al.] // *AIDS*. – 2009. – Vol. 23. – P. F9–17.

220. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies / A. Stamatakis A. // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, № 9. – P. 1312–1313.
221. Structural and antigenic characterization of the proteins of human T-cell leukemia viruses and their relationships to the gene products of other retroviruses / S. Oroszlan, T.D. Copeland, N.R. Rice [et al.] // *Proceedings of the International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*. – 1984. – Vol. 15. – P. 147–157.
222. Targeting HIV prevention based on molecular epidemiology among deeply sampled subnetworks of men who have sex with men / X. Wang, Y. Wu, L. Mao [et al.] // *Clinical infectious diseases*. – 2015. – Vol. 61, № 9. – P. 1462–8.
223. The application of HIV molecular epidemiology to public health / D. Paraskevis, G.K. Nikolopoulos, G. Magiorkinis [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 46. – P. 159–168.
224. The challenge of HIV-1 subtype diversity / B.S. Taylor, M.E. Sobieszczyk, F.E. McCutchan, S.M. Hammer // *The New England Journal of Medicine*. – 2008. – Vol. 358, № 15. – P. 1590–1602.
225. The global spread of HIV-1 subtype B epidemic / G. Magiorkinis, K. Angelis, I. Mamais [et al.] // *Infection, genetics and evolution*. – 2016. – Vol. 46. – P. 169–179.
226. The impact of clinical, demographic and risk factors on rates of HIV transmission: a population-based phylogenetic analysis in British Columbia, Canada / A.F. Poon, J.B. Joy, C.K. Woods [et al.] // *The Journal of infectious diseases*. – 2015. – Vol. 211, № 6. – P. 926–935.
227. The impact of transmission clusters on primary drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection / S. Yerly, T. Junier, A. Gayet-Ageron [et al.] // *AIDS*. – 2009. – Vol. 23, № 11. – P. 1415–1423.
228. The phylogenetic approach for viral infectious disease evolution and epidemiology: an updating review / M. Ciccozzi, A. Lai, G. Zehender [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2019. – Vol. 91. – P. 1707–24.

229. The Role of Late Presenters in HIV-1 Transmission Clusters in Europe / M.N.S. Miranda, V. Pimentel, P. Gomes [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 12. – P. 2418.
230. The Role of Phylogenetics as a Tool to Predict the Spread of Resistance / A. Zhukova, T. Cutino-Moguel, O. Gascuel, D. Pillay // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 216, № suppl_9. – P. S820–S823.
231. The Role of Phylogenetics in Unravelling Patterns of HIV Transmission towards Epidemic Control: The Quebec Experience (2002-2020) / B.G. Brenner, R.I. Ibanescu, N. Osman [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 8. – P. 1643.
232. The social structural production of HIV risk among injecting drug users / T. Rhodes, M. Singer, P. Bourgois [et al.] // *Social science & medicine*. – 2005. – Vol. 61, № 5. – P. 1026–44.
233. The World Health Organization's Response to Emerging Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance and a Call for Global Action / S. Bertagnolio, R.L. Beanland, M.R. Jordan [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 216. – Suppl_9. – P. S801–S804.
234. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains / B. Korber, M. Muldoon, J. Theiler [et al.] // *Science*. – 2000. – Vol. 288, № 5472. – P. 1789–1796.
235. Transmission network parameters estimated from HIV sequences for a nationwide epidemic / A. J. Leigh Brown, S. J. Lycett, L. Weinert [et al.] // *The Journal of infectious diseases*. – 2011. – Vol. 204, № 9. – P. 1463–1469.
236. Transmitted Drug Resistance in Antiretroviral Therapy-Naive Persons With Acute/Early/Primary HIV Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis / C. Guo, Y. Wu, Y. Zhang [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 718763.
237. UNAIDS data 2022. – Режим доступа: https://www.unaids.org/en/resources/documents/2023/2022_unaids_data.
238. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens / B.T. Grenfell, O.G. Pybus, J.R. Gog [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol.303. – P. 327–332.

239. Using HIV networks to inform real time prevention interventions / S.J. Little, S.L. Kosakovsky Pond, C.M. Anderson [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. e98443.
240. Vahlne, A. A Historical Reflection on the Discovery of Human Retroviruses / A. Vahlne // Retrovirology. – 2009. – Vol. 6. – P. 40.
241. Van de Vijver, D.A.M.C. Insights on transmission of HIV from phylogenetic analysis to locally optimize HIV prevention strategies / D.A.M.C. van de Vijver, C.A.B. Boucher // Current Opinion in HIV and AIDS. – 2018. – Vol. 13. – P. 95–101.
242. VirGenA: a reference-based assembler for variable viral genomes / G.G. Fedonin, Y.S. Fantin, A.V. Favorov [et al.] // Briefings in bioinformatics. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 15–25.
243. Volz, E.M. Viral phylodynamics / E.M. Volz, K. Koelle, T. Bedford // PLoS Computational Biology. – 2013. – Vol. 9. – P. e1002947.
244. WHO. Global genomic surveillance strategy for pathogens with pandemic and epidemic potential, 2022-2032. – 2022. – 32 p.
245. WHO. Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030. – 2022. – 134 p.
246. WHO. Guidelines on the public health response to pretreatment HIV drug resistance, July 2017. – 2017. – 84 p.
247. WHO. HIV drug resistance report 2021. – 2021. – 138 p.
248. WHO. HIV drug resistance strategy, 2021 update. – 2021. – 26 p.
249. WHO. WHO HIV drug resistance network steering group meeting report, June 2021. – 2021. – 22 p.
250. WHO. WHO HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework. – 2017. – 82 p.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Соглашение о сотрудничестве

в исследованиях по внедрению новых методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней и связанных с ними заболеваний

В связи с необходимостью скорейшего внедрения новых методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней и связанных с ними заболеваний Специализированный научно-исследовательский отдел эпидемиологии и профилактики СПИД федерального бюджетного учреждения науки Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (в дальнейшем СНИО ЭП СПИД)

и _____ ,
добровольно пожелавший принять участие в этих исследованиях, соглашаются со следующими условиями и положениями:

- Группа участников исследований, находящихся под наблюдением СНИО СПИД, создана для проведения работ, направленных на изучение инфекций и связанных с ними заболеваний, и разработку методов их профилактики, диагностики и лечения.
- В группу участников исследований на принципе добровольности могут включаться лица, соответствующие критериям включения в конкретное исследование, и руководствующиеся желанием внести свой вклад в ускорение внедрения новых методов предупреждения и лечения заболеваний, как в собственных интересах, так и в интересах других людей.
- Вступление в группу добровольцев, участвующих в клинических исследованиях, может обеспечить участнику доступ к новейшим методам

обследования и лечения, еще не применяющимся в широкой клинической практике, а также к консультациям ведущих специалистов СНИО ЭП СПИД, но сопряжено с соблюдением определенных условий и возможным возникновением неудобств и нежелательных явлений.

- Обследование и лечение, которые участник исследований будет получать в СНИО ЭП СПИД, проводятся не в рамках медицинской помощи, предоставляемой гражданину государственной системой здравоохранения, а в рамках научных исследований, проводимых этим учреждением, поэтому объем и номенклатура проводимых исследований и назначение лекарственных препаратов могут не совпадать с действующими рекомендациями и стандартами лечения заболеваний.
- Все исследования, в которых предполагается участие добровольцев, будут одобрены и разрешены Этическим Комитетом и другими ответственными инстанциями надлежащего уровня в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.
- Решение о включении человека в группу добровольцев, находящихся под наблюдением СНИО ЭП СПИД, принимается руководителем СНИО ЭП СПИД, или лицом им уполномоченным. Решение об исключении человека из группы добровольцев может приниматься на основании его собственного решения, а также в соответствии с критериями исключения данного конкретного исследования, по решению руководителя СНИО ЭП СПИД или уполномоченного им лица.
- Добровольцы, участвующие в исследованиях СНИО ЭП СПИД, могут наблюдаться в СНИО ЭП СПИД и быть включены в группы, получающие разные схемы лечения или наблюдения, формируемые для выполнения протоколов исследований.
- Включение участника в конкретную группу исследования или наблюдения будет осуществляться на основании соответствия критериям включения или исключения, предусмотренным для каждого конкретного исследования, и с

применением предусмотренной этим исследованием системы рандомизации (специального распределения, исключающего влияния субъективных факторов). Доброволец будет подробно ознакомлен с протоколом каждого исследования и допущен к участию в нем только после подписания информированного согласия на участие в этом исследовании.

- Все лекарственные препараты, как испытуемые, так и уже широко применяемые, могут вызывать побочные реакции. СНИО ЭП СПИД будет информировать участника об известных побочных эффектах препаратов, которые ему предлагается принимать в каждом конкретном исследовании. Если в результате приема лекарственных препаратов возникнут побочные эффекты, добровольный участник исследования не будет предъявлять претензии к СНИО ЭП СПИД и лечащему врачу.
- Если в процессе участия в исследовании у добровольца будут выявлены нежелательные эффекты, предположительно обусловленные проводимым исследованием, участник будет переведен по его согласию на другую схему лечения до окончания срока исследования.
- Лечение, применяемое участником исследования в других учреждениях, в том числе в специализированных учреждениях по диагностике и лечению инфекционных заболеваний (включая ВИЧ-инфекцию, туберкулез или гепатит инфекционного происхождения), должно быть скоординировано с лечением, проводимым в СНИО ЭП СПИД, в связи с чем эти учреждения могут быть уведомлены руководством СНИО ЭП СПИД об участии добровольца в проводимых исследованиях для предупреждения нежелательных последствий.
- Если в процессе исследования у участника будет выявлено инфекционное заболевание, о котором, согласно существующим санитарным нормам, должно быть сообщено в органы Роспотребнадзора, такое сообщение будет отправлено.
- Научные данные, полученные в результате проведенных исследований, могут быть использованы в научных и учебных целях: для написания монографий, учебников и публикаций в научных журналах, при подготовке докладов на

конференциях, лекций, в кандидатских и докторских диссертациях, для получения патентов. При этом данные для этих публикаций и презентаций будут представляться только в обезличенном виде, и идентифицировать по ним конкретного участника исследований будет невозможно.

- При прекращении действия протокола исследования (плановом или внеплановом), его участник может быть исключен из группы исследования, или ему будет предложено продолжить нахождение в ней, войдя в другой протокол. О решении вывести участника из исследуемой группы после прекращения протокола исследования, в котором он участвует, если этот протокол предполагает получение антиретровирусной терапии, ему должно быть сообщено не менее, чем за 2 месяца до даты последнего визита по этому протоколу.
- В случае невыполнения участником требований протокола исследования, нарушения режима лечения, отказа проходить предусмотренные протоколом исследования обследования и опросы, действие соглашения может быть прекращено.
- Если в рамках проводимого исследования участнику будет назначена антиретровирусная терапия, то информация об этом будет передана в Центр по профилактике и борьбе со СПИДом по месту его регистрации.
- Часть взятых у участника образцов биологических материалов будут храниться в архиве СНИО ЭП СПИД, и эти образцы могут быть использованы в будущем для проведения исследований, которые в настоящее время еще невозможны или не запланированы, и участник может не получить информации об этом факте.
- Схема проводимого добровольцу лечения может быть изменена по решению лечащего врача или в связи с изменением протокола лечения. В этом случае ему должны быть разъяснены причины этого решения.
- Если в процессе наблюдения у добровольца будут выявлены заболевания или состояния, требующие дополнительных исследований, консультаций

специалистов или назначения лекарственных препаратов, не предусмотренных протоколом исследования, в котором он участвует, ему будет сообщено об этом.

- Личные идентификационные данные, (фамилия, имя отчество, адрес регистрации, номер паспорта и СНИЛС), сообщаемые во время регистрации для участия в исследуемой группе, будут внесены в амбулаторную карту пациента, которая будет храниться в архиве СНИО ЭП СПИД в течение не менее 15 лет. В электронную базу данных, которая будет использоваться для научного анализа, эти данные вноситься не будут. Доступ к амбулаторной карте, содержащей идентификационные данные, помимо лечащего врача, могут получить, ряд уполномоченных к этому сотрудников СНИО ЭП СПИД, а в исключительных случаях и с учетом строгого соблюдения конфиденциальности - мониторы, аудиторы, представители Этического Комитета и официальных инстанций, имеющие согласно законодательству РФ доступ к конфиденциальным документам для проверки правильности выполнения процедур клинического исследования, расхода препаратов и реактивов.

В рамках выполнения договора стороны принимают на себя следующие обязательства:

СНИО ЭП СПИД обязуется:

- Получать необходимые разрешения на проведение исследований от инстанций соответствующего уровня.
- Обеспечивать материально-техническую базу проведения исследований, включая лекарственные препараты, диагностические наборы и процедуры, предусмотренные конкретными протоколами исследований.
- Подробно информировать участника о целях и задачах исследования, в котором он будет участвовать.

- Предоставлять участникам исследования для предварительного ознакомления и для подписания информированное согласие на участие в каждом отдельном исследовании или в контрольной группе исследований.
- Предоставлять участнику исследования всю имеющуюся информацию об эффективности, безопасности, переносимости и возможных побочных эффектах лекарственных препаратов и методов медицинского воздействия, которые ему предполагается назначать, и которые он уже получает.
- Проводить обследования участников в соответствии с утвержденными протоколами исследований.
- Предоставлять лекарственные и диагностические препараты и проводить лабораторные исследования в соответствии с протоколами исследований.
- Предоставлять участнику по первому требованию выписку из медицинской карты с результатами исследований, проведенных в рамках стандартов оказания медицинской помощи.
- Предоставлять участнику подробную выписку о проведенном лечении и результатах диагностических исследований по окончании его наблюдения в СНИО ЭП СПИД
- Предоставлять препараты для продолжения лечения в течение не менее 1 месяца после досрочного прекращения участия в клиническом исследовании или при прекращении участия в группе контрольного наблюдения.
- Сообщать участнику исследования о выявленных у него сопутствующего заболеваниях.
- Проводить для участника исследования регулярные консультации лечащего врача инфекциониста в рамках протокола исследования, в котором он участвует, а также, в случае необходимости, проводить внеплановые консультации, в том числе и врачей других специальностей состоящих в штате СНИО СПИД.

обязуется:

- Проходить предусмотренные протоколами исследований, на участие в которых которое он даст информированное согласие, медицинские обследования, заполнять предусмотренные для этого анкеты, сдавать на анализы кровь, мочу и другие биологические материалы, принимать назначенную схему лечения по установленному графику, принимать назначенные лекарственные препараты строго в соответствии с предписанием лечащего врача.
- Сообщать лечащему врачу о всех нарушениях приема назначенных препаратов или прекращении их приема по каким-либо причинам.
- Сообщать лечащему врачу (или лицу его замещающему) о всех изменениях в состоянии здоровья и делать это незамедлительно (в течение суток), если считает, что эти изменения связаны с приемом назначенных препаратов.
- Не принимать, не посоветовавшись с лечащим врачом (или лицом его замещающим), какие-либо другие лекарственные препараты (даже если они назначаются другим врачом). Если же прием этих лекарств неизбежен (например, в неотложных или экстренных случаях), обязательно сообщать лечащему врачу о том, что эти препараты принимались
- В случае наступления беременности незамедлительно сообщить об этом лечащему врачу.

Соглашение о сотрудничестве не предусматривает каких-либо финансовых обязательств сторон и может быть расторгнуто по желанию любой из сторон в любое время без объяснения причин.

Договор составлен в 2-х экземплярах.

Участник

ФИО _____

Паспорт _____ выдан _____

г. _____, зарегистрирован по адресу:

_____.

Дата рождения _____ Контактный телефон _____

Подпись _____ Дата _____

Со стороны СНИО ЭП СПИД ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Руководитель СНИО ЭП СПИД, академик РАН, профессор

Покровский Вадим Валентинович

Подпись _____ Дата _____

Контактный телефон: 8-495-365-3009.

Юридический адрес: Федеральное бюджетное учреждение науки Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва Новогиреевская улица 3А.

Регистрационное удостоверение на набор реагентов**«АмплиСенс HIV-Resist-Seq»**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**
№ ФСР 2008/02414

от 11 апреля 2012 года

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А и подтверждает, что медицинское изделие

Набор реагентов для определения тропизма и выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «АмплиСенс® HIV-Resist-Seq» по ТУ 9398-013-01897593-2011

производства
Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

место производства:
111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

класс потенциального риска **3** ОКП 93 9816

вид медицинского изделия –

соответствующее регистрационному досье № 3108 от 03.02.2012

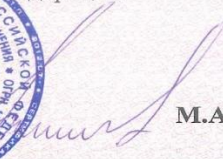
приказом Росздравнадзора от 11 апреля 2012 года № 1724-Пр/12

и приказом от 02 октября 2013 года № 5436-П/13 о замене

допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Приложение: на 2 листах

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения


М.А. Мурашко
0004171



Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ

«АмплиСенс Resist»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2020610175

«АмплиСенс® Resist»

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *Акимкин Василий Геннадьевич (RU), Остроушко Алексей
Александрович (RU), Глазов Максим Борисович (RU), Савельер Евгений
Викторович (RU), Зотов Евгений Анатольевич (RU), Киреев Дмитрий
Евгеньевич (RU), Мурзакова Анастасия Вениаминовна (RU), Лопатухин
Алексей Эдуардович (RU), Неверов Алексей Дмитриевич (RU)*

Заявка № **2019666893**
Дата поступления **18 декабря 2019 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре программ для ЭВМ **10 января 2020 г.**



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Извлев

Регистрационное удостоверение на набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS»



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 16 марта 2018 года № РЗН 2018/6940

На медицинское изделие
Набор реагентов для выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим массовым параллельным секвенированием продуктов амплификации "АмплиСенс® HIV-Resist-NGS" по ТУ 9398-240-01897593-2015

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Производитель
Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Место производства медицинского изделия
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А

Номер регистрационного досье № РД-10517/11748 от 11.03.2016

Вид медицинского изделия **104410**

Класс потенциального риска применения медицинского изделия **3**

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности **21.20.23.110**

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе приказом Росздравнадзора от 16 марта 2018 года № 1647 допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0037807

**Свидетельство о государственной регистрации базы данных устойчивости
ВИЧ к антиретровирусным препаратам**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации базы данных
№ 2020620803

**База данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным
препаратам**

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *Акимкин Василий Геннадьевич (RU), Глазов Максим
Борисович (RU), Киреев Дмитрий Евгеньевич (RU), Кириченко Алина
Алексеевна (RU), Лопатухин Алексей Эдуардович (RU), Мурзакова
Анастасия Вениаминовна (RU), Савельер Евгений Викторович (RU)*

Заявка № **2020620646**
Дата поступления **20 апреля 2020 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных **19 мая 2020 г.**


Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности
 **Г.П. Излиев**

**Свидетельство о государственной регистрации базы данных устойчивости
ВИЧ к антиретровирусным препаратам в странах Восточной Европы и
Центральной Азии**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации базы данных

№ 2023620937

**«База данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным
препаратам в странах Восточной Европы и Центральной
Азии»**

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *Кириченко Алина Алексеевна (RU), Галкин Николай Юрьевич
(RU), Киреев Дмитрий Евгеньевич (RU), Лопатухин Алексей
Эдуардович (RU), Шлыкова Анастасия Вениаминовна (RU), Лаповок
Илья Андреевич (RU), Глазов Максим Борисович (RU), Акимкин
Василий Геннадьевич (RU)*

Заявка № **2023620565**
Дата поступления **06 марта 2023 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных **21 марта 2023 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности


Ю. С. Зубов

документ подписан электронной подписью
Сертификат: 88b8807b164870294cedb324145d5c7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен: с 2014 по 26.05.2023

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ
«Система агрегирования информации об устойчивости ВИЧ к
антиретровирусным препаратам «ЕЕСАНIV»»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации программы для ЭВМ
№ 2023615805

**Система агрегирования информации об устойчивости
ВИЧ к антиретровирусным препаратам «ЕЕСАНIV»**

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН
ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *Галкин Николай Юрьевич (RU), Кириченко Алина
Алексеевна (RU), Киреев Дмитрий Евгеньевич (RU), Глазов
Максим Борисович (RU), Акимкин Василий Геннадьевич (RU)*

Заявка № **2023614036**
Дата поступления **06 марта 2023 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре программ для ЭВМ **20 марта 2023 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности


документ подписан Аналитическим подразделением
Сертификат: 64b88077c2-6-1010a9fedcb2d4145d5c7
Инициалы: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен до: 2023-03-20 00:00:00

Ю. С. Зубов

**Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ
«Российская система агрегирования информации об устойчивости ВИЧ-1 к
антиретровирусным препаратам «RuHIV»**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2024617383

**Российская система агрегирования информации об
устойчивости ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам
«RuHIV»**

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *Галкин Николай Юрьевич (RU), Кириченко Алина Алексеевна
(RU), Киреев Дмитрий Евгеньевич (RU), Шлыкова Анастасия
Вениаминовна (RU), Глазов Максим Борисович (RU), Акимкин Василий
Геннадьевич (RU)*



Заявка № **2024615366**

Дата поступления **15 марта 2024 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре программы для ЭВМ **01 апреля 2024 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Документ подписан электронной подписью
Сертификат 429b609c1961064ba796f83b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.01.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов