

Киреев Дмитрий Евгеньевич

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

3.2.2. Эпидемиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва 2025

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

Научный консультант

Покровский Вадим Валентинович – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Захарова Юлия Александровна – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель института дезинфектологии Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Лиознов Дмитрий Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Троценко Ольга Евгеньевна – доктор медицинских наук, директор Федерального бюджетного учреждения науки «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

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

Защита состоится «___» _____ 2025 года в ____ час. на заседании диссертационного совета 64.1.010.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

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

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Николаева Светлана Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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. [Государственный доклад, 2023]. 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 [Государственный доклад, 2023]. 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 [Ладная Н.Н., 2022].

Несмотря на обширную нормативно-методическую базу, регламентирующую эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией в 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. В то же время ВИЧ-инфекция является пожизненным заболеванием с высоким уровнем стигматизации [Беляева В.В., 2016]. А вследствие неспецифических клинических признаков острой стадии болезни, выявление ВИЧ-инфекции происходит иногда много позже заражения человека. 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 [Wertheim J.O., 2017]. При этом чем короче эпидемиологическая цепочка, тем выше генетическое сходство геномов ВИЧ этих пациентов [Novitsky V., 2020]. Поскольку нуклеотидная последовательность вируса является объективной

характеристикой ВИЧ-инфицированного пациента, сравнение геномов вируса позволяет уточнить характеристики, невыясненные при эпидемиологическом расследовании [CDC, 2019].

Совершенствование лабораторной базы для секвенирования позволило в развитых странах определять нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 для каждого пациента уже в момент постановки диагноза [EACS Guidelines, 2023]. 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 [Gore D.J., 2022].

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 (ЛУ) 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» 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»

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 (АРВ) препаратам, а также разработаны методические рекомендации 3.1.5.0075/1-13, утвержденные 20 августа 2013 г.

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

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 исследования

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

Задачи исследования

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 исследования

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 исследования

- 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 EECANIV, 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.

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» (ПУ № 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» (ПУ № 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы 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 клинических и эпидемиологических НИР.

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.

В исследовании были использованы эпидемиологические, молекулярно-биологические, биоинформатические и статистические методы.

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 (Федеральный округ (ФО)), дата или год лабораторного подтверждения наличия ВИЧ-инфекции, дата или год забора крови для проведения секвенирования ВИЧ-1, опыт приема АРВ препаратов на момент забора крови.

Критериями невключения в исследование являлись:

- Отсутствие гражданства РФ,
- Отсутствие обязательной сопутствующей информации о пациенте.

Критерием исключения из исследования являлась невозможность получения специфического фрагмента ДНК ВИЧ-1 для секвенирования.

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

Молекулярно-биологические методы.

Для исследования РНК ВИЧ-1 использовалась плазма или сыворотка крови. Для этого первичные пробирки центрифугировались в течение 15-20 минут при 1500 g. Бесклеточная фракция крови (плазма или сыворотка) переносилась в пробирки типа эппендорф на 1,5 мл. Дальнейшее хранение клинических образцов осуществлялось при температуре не выше минут 18 °С в течение не более 3 месяцев, либо при температуре минус 70 °С 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. Отмывку лейкоцитов осуществляли с использованием Гемолитика (ЦНИИ Эпидемиологии, РФ). 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, 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.

Амплификация специфических фрагментов генома ВИЧ-1. Амплификация специфических фрагментов генома состояла из двух этапов. На первом этапе проводили ОТ и 1-ю стадию полимеразной цепной реакции (ПЦР) совместно. На втором – проводили 2-ю стадию ПЦР.

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.

Определение субтипа ВИЧ-1 осуществлялось несколькими способами. Для предварительного определения субтипа использовались автоматические алгоритмы базы данных Стэнфордского университета, а также института REGA. Для более точного определения субтипа применялся филогенетический анализ с использованием набора референсных нуклеотидных последовательностей субтипов и циркулирующих рекомбинантных форм из базы данных Лос-Аламоса, 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. Использовался алгоритм CPR (<https://hivdb.stanford.edu/cpr/>) для выявления мутаций, свидетельствующих о наличии передаваемой лекарственной устойчивости ВИЧ-1, либо инструмент для выявления мутаций, имеющих клиническое значение (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>). Определение тропизма вируса осуществлялось с помощью инструмента geno2pheno (<https://coreceptor.geno2pheno.org/>).

Построение филогенетических деревьев и расчет генетической дистанции проводилось в следующих программах: MEGA 6.06, IQ-TREE, FastTree, RAxML.

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 с бутстрепом 0.9 и порогами генетической дистанции в диапазоне 1%-4,5%,
- MicrobeTrace (<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 разрабатывалась на платформе Bitrix. Процесс получения данных для главной страницы осуществлялся посредством API в формате json.

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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 утвержденных нормативно-методических документов Министерства Здравоохранения и Роспотребнадзора по темам диагностики, профилактики, а также диспансерного наблюдения и лечения ВИЧ-инфекции.

В результате анализа документации были определены документы, в которых присутствовало описание применения молекулярно-генетических и биоинформатических методов в эпидемиологическом надзоре (таблица 1).

Таблица 1 – Перечень утвержденных документов, регламентирующих применение молекулярно-генетических и биоинформатических методов

Нормативно-методический документ / год утверждения	Разделы документа	Примечание
МР 5958-РХ «О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам» / 2007	Весь документ	Документ был разработан до начала выполнения диссертационного исследования
МР 6963-РХ «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий» / 2007	Раздел «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции»	Документ был разработан до начала выполнения диссертационного исследования
СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» / 2011	Раздел «Организация диспансерного наблюдения за больными ВИЧ-инфекцией»	Раздел был разработан с учетом результатов диссертационного исследования

Нормативно-методический документ / год утверждения	Разделы документа	Примечание
МР 3.1.5.0075 «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам» / 2013	Весь документ	Раздел был разработан с учетом результатов диссертационного исследования
МУ 3.1.3342-16 «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией» / 2016	Разделы «Мониторинг за резистентностью ВИЧ к АРВП и циркуляцией генетических вариантов ВИЧ» и «Использование генотипирования ВИЧ и филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции»	Разделы были разработаны на основании результатов диссертационного исследования
СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» / 2022	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
МР 3.1.0366-25 «Использование генотипирования и филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции и гепатита С» / 2025	Весь документ	Раздел был разработан на основании результатов диссертационного исследования

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 в отношении применения биоинформатических методов. Во-первых, возможность осуществления мониторинга ЛУ ВИЧ-1 только в формате когортных исследований, либо путем анализа клинических образцов после обследования на ВИЧ в рамках скрининговых исследований [МР 5958-РХ, 2007]. 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 [Kireev D., 2023]. 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 [МР 6963-РХ, 2007]. 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 значимым 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.

Таким образом, проведенный анализ показал, 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.

Разработка наборов реагентов для получения нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1

На момент выполнения настоящего исследования в РФ 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 классу ингибиторов интегразы (ИИ) и применения в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией (расследования внутрибольничных очагов), поэтому были разработаны два набора реагентов, которые позволили секвенировать более обширные области генома ВИЧ-1 различными способами.

Набор 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.

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.

Разработанный набор реагентов позволил 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.

Для осуществления анализа полученных в результате секвенирования хроматограмм, редактирования консенсусной последовательности вируса и поиска мутаций ЛУ ВИЧ-1 было разработано два вида программного обеспечения для обработки результатов секвенирования нуклеотидных последовательностей: «ДЕОНА» и «АмплиСенс Resist», на каждое из которых были получены свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Сравнительные испытания показали, 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.

Набор реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-NGS».

Появление технологии массового параллельного секвенирования позволило осуществить разработку набора реагентов, являющегося более информативным и производительным по сравнению с наборами, основанными на технологии классического секвенирования по Сэнгеру. 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*.

Для достижения максимальной информативности разрабатываемого набора реагентов олигонуклеотиды для амплификации были подобраны на длинные терминальные повторы 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. Общая протяженность этих фрагментов составляла 8998 нуклеотидов от 626-го до 9623-го нуклеотида относительно эталонного штамма ВИЧ-1 HXB2. Схема фрагментов для амплификации представлена на рисунке 1.

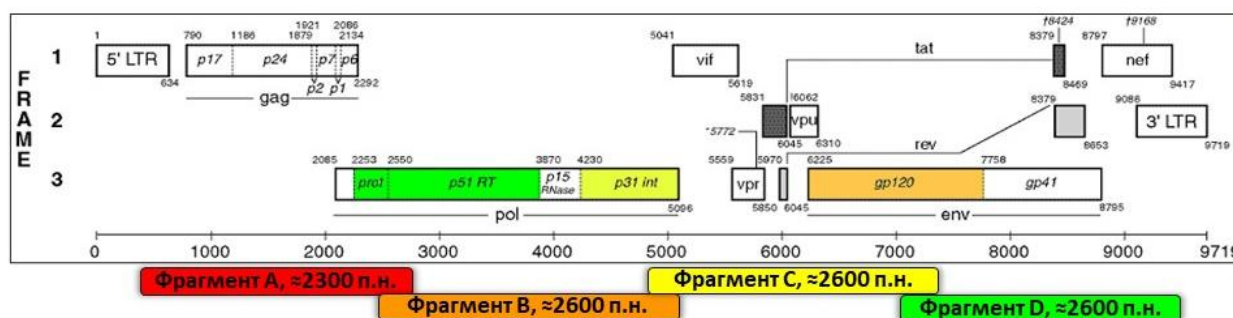


Рисунок 1 – Схема расположения 4-х перекрывающихся фрагментов ДНК (от А до D) с указанием протяженности каждого. На карте генома ВИЧ-1 гены, подвергаемые секвенированию с помощью набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq», выделены различными цветами

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.

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 РФ АРВ препаратам. В настоящее время 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, научно-исследовательскими институтами Роспотребнадзора в ходе расследования случаев инфицирования, потенциально связанных с оказанием медицинской помощи, при осуществлении эпидемиологических исследований по надзору за резистентностью ВИЧ-1 в РФ и странах Восточной Европы и Центральной Азии (ВЕЦА), в рамках клинических исследований новых АРВ препаратов, а также в ходе исследований генетического разнообразия циркулирующих вариантов вируса.

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

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/>), которая позволяла осуществлять исключительно хранение информации о вирусе и ВИЧ-инфицированных пациентах. В рамках настоящего исследования 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 клинко-эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных пациентах с целью мониторинга резистентности вируса на территории РФ. В то же время современные исследования показывают, 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. Дополнительно была разработана база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам в странах ВЕЦА, имеющая аналогичные функции и содержащая информацию о нуклеотидных последовательностях ВИЧ-1 и ВИЧ-инфицированных пациентах, собранную в 6 странах ВЕЦА: Республика Азербайджан, Республика Армения, Республика Беларусь, Кыргызская Республика, Республика Таджикистан и Республика Узбекистан (<https://eecaiv.ru/>).

Базы данных были написаны на языках PHP, JS, HTML и CSS, а также с использованием платформы Bitrix. 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 ежесуточно и ежемесячно. 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 (<https://coreceptor.geno2pheno.org/>).

Базы данных позволяют осуществлять контроль качества всей вносимой в них информации. В отношении эпидемиологических данных оцениваются: уникальность номеров пациентов; корректность дат рождения, иммунного блота, проведенных лабораторных исследований; корректность кодов обследования и инфицирования; правильность перечисленных АРВ препаратов. Разработанная оценка качества нуклеотидных последовательностей включает в себя анализ следующих характеристик: аминокислотная позиция начала и конца последовательности; число сдвигов рамки считывания, инсерций, делеций, стоп-кодона, варибельных позиций, АРОВЕС и нетипичных мутаций. Загружаемые последовательности анализируются с помощью разработанного в настоящем исследовании алгоритма и при несоответствии помечаются соответствующими флагами. Также пользователю доступен инструмент проверки на контаминацию загружаемых последовательностей.

Базы данных в автоматическом режиме проводят анализ нуклеотидных последовательностей на предмет определения субтипа вируса, выявления мутаций резистентности, оценки уровня ЛУ к АРВ препаратам, а также определения вирусного тропизма, после чего данная информация автоматически добавляется в индивидуальную карту пациента.

Также был разработан алгоритм по выявлению молекулярных кластеров, включающих последовательности ВИЧ-1 от эпидемиологически связанных ВИЧ-инфицированных пациентов, основанный на попарной оценке генетического расстояния между ними. В многочисленных исследованиях данный подход доказал свою эффективность и в отличие от методов, основанных на построении филогенетических деревьев, является более воспроизводимым и значительно менее вычислительно затратным, что позволяет проводить анализ тысяч последовательностей за короткий промежуток времени.

Таким образом, усовершенствованная Российская база данных в настоящее время представляет собой инструмент для сбора, хранения и анализа генетической информации о ВИЧ-1 и сопутствующей информации о пациентах. По состоянию на 01 июня 2023-го года в Российской базе данных было зарегистрировано 31 учреждение. На этот же период общее количество записей о пациентах составило 10 930, а общее количество нуклеотидных последовательностей – 13 466 штук.

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.

В рамках настоящего 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 2 представлены пациенты, включенные в настоящее исследование, в зависимости от времени забора крови для проведения секвенирования ВИЧ-1.

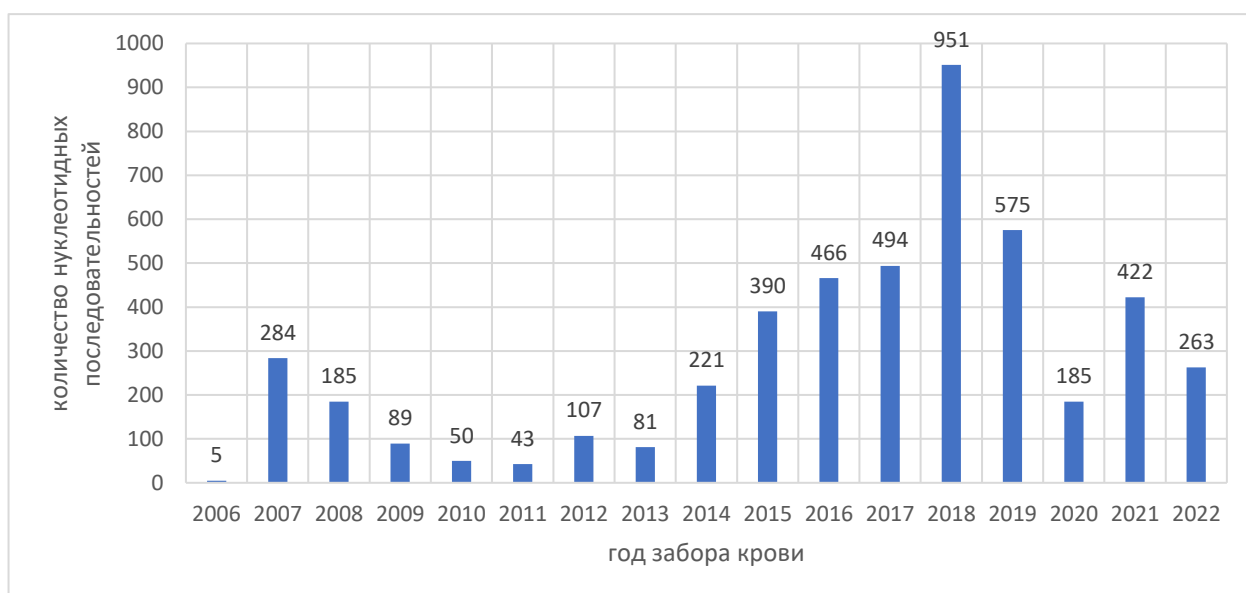


Рисунок 2 – Динамика количества нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от пациентов, включенных в исследование, в зависимости от периода забора крови

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. При этом функционал баз позволяет осуществлять сбор клинико-эпидемиологической информации о ВИЧ-инфицированных пациентах, а перечень собираемых параметров составлен с учетом актуальных форм федерального статистического наблюдения, утвержденных к использованию Федеральной службой государственной статистики.

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.

На разработанные базы данных и способы их организации были получены свидетельства о государственной регистрации в качестве баз данных и программ для ЭВМ.

Применение биоинформатических методов в ходе эпидемиологических расследований случаев инфицирования ВИЧ-1, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи

До 2010-го года в России расследование случаев заражения ВИЧ-1 при оказании медицинской помощи осуществлялось путем проведения эпидемиологического расследования, которое регламентировалось МР № 6963-РХ. Использование молекулярно-биологических и биоинформатических методов в этом документе ограничивалось рекомендацией проведения генотипирования ВИЧ-1. 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 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 РФ применен филогенетический анализ для верификации выводов, сделанных в ходе классического эпидемиологического анализа. В 2016-м году такой подход был описан в МУ 3.1.3342-16.

В период с 2010-го по 2022-й год филогенетический анализ был использован при расследовании 72 очагов инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи. Динамика регистрации случаев представлена на рисунке 3.

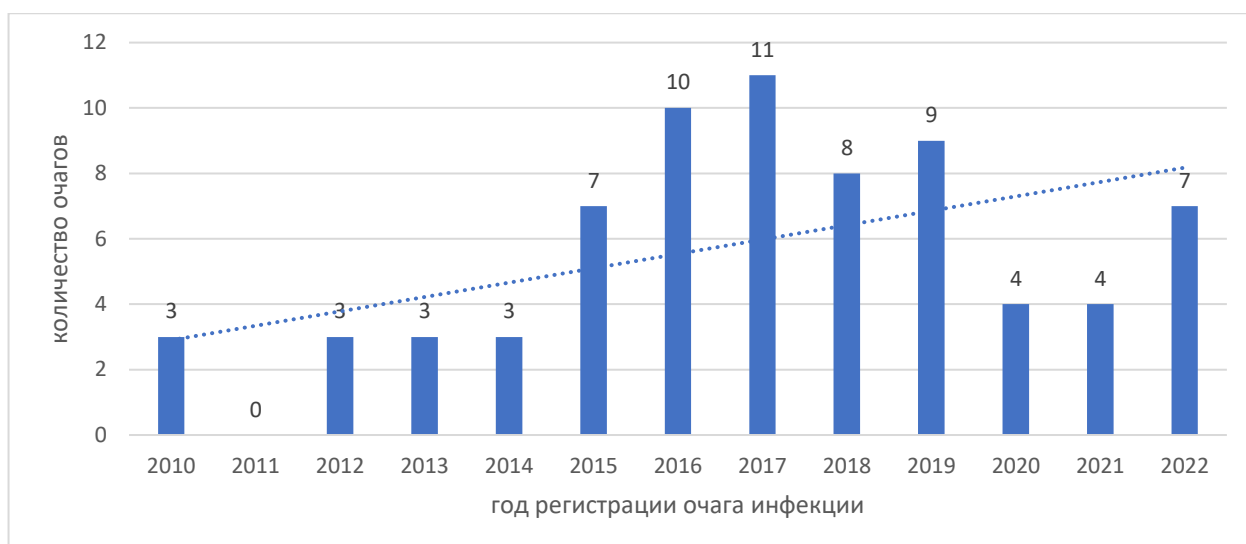


Рисунок 3 – Динамика регистрации очагов ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи, расследованных с применением филогенетического анализа. Пунктирной линией указана линия тренда

Среди проанализированных 72 очагов секвенирование и последующий филогенетический анализ не были успешно завершены для 14 очагов (19,4% случаев). С целью повышения эффективности использования молекулярных и биоинформатических методов и снижения доли неопределенных результатов был осуществлен анализ документации проведенных расследований. В частности, в ходе анализа документации успешно расследованных очагов были проанализированы их временные характеристики: периоды возникновения, регистрации и локализации. Такая информация присутствовала в сопроводительной документации в отношении 31 очага.

Был также проведен анализ роста генетической дистанции в очагах между вирусами в образцах от эпидемиологически связанных реципиента и потенциального источника с увеличением времени между передачей ВИЧ-1, установленной на основании результатов эпидемиологических расследований, и забором крови для проведения секвенирования ВИЧ-1. На рисунке 4 представлены результаты для региона pol.

Для региона pol генетическое сходство падает, однако остается выше 98,5% для всех пар реципиент-источник в пределах 36 месяцев после передачи вируса. Анализ выборки показал, что средний рост генетической дистанции за 12 месяцев у нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 от эпидемиологически связанных пациентов, не принимавших АРВ препараты, по региону pol составляет 0,41%, а по региону env 1,99%.

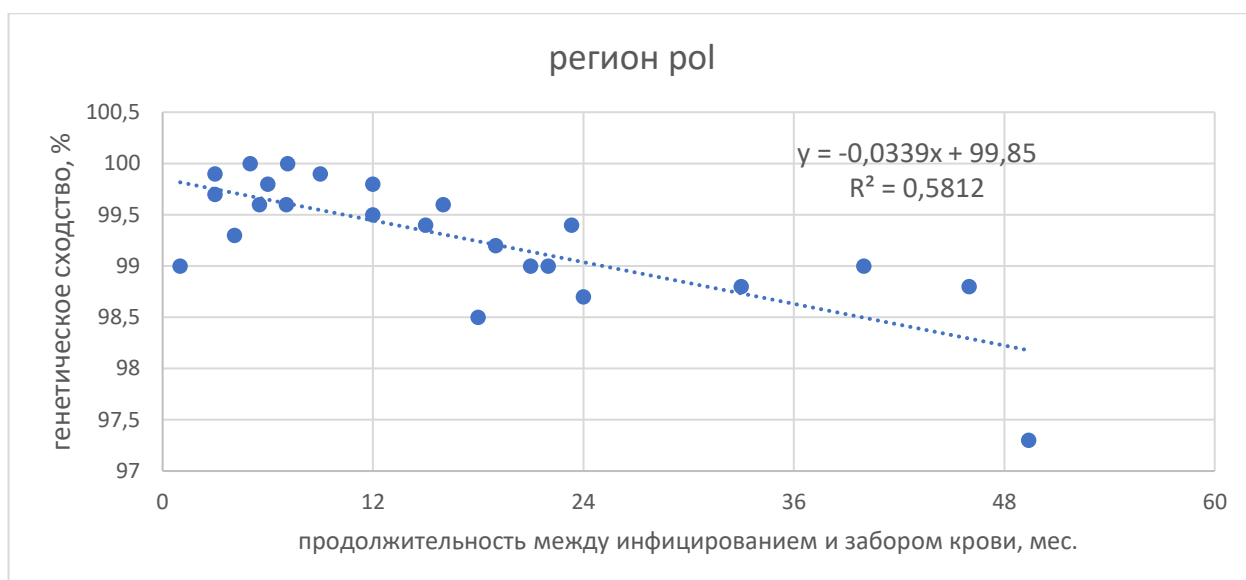


Рисунок 4 – Взаимосвязь генетического сходства нуклеотидных последовательностей региона pol для пар реципиент-источник в зависимости от времени, прошедшего между инфицированием и забором крови для проведения секвенирования ВИЧ-1

Таким образом, результаты проведенного анализа позволили сформулировать ряд рекомендаций, повышающих эффективность использования молекулярных и биоинформатических методов при использовании их в рамках расследований 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,
- 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 расследований 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. В таких случаях можно рекомендовать проведение полногеномного секвенирования вируса.

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. Среди 2740 проанализированных нуклеотидных последовательностей региона *pol*, полученных от пациентов без опыта АРВ-терапии, хотя бы одна надзорная мутация ЛУ ВИЧ-1 была обнаружена у 148 (5,40%, 95%-й ДИ 4,61%-6,31%) пациентов. Распространенность мутаций к препаратам различных классов была неодинаковой. Доля последовательностей с резистентностью к препаратам класса ННИОТ составила 3,47% (95 из 2740, 95%-й ДИ 2,84%-4,22%), к классу ИП – 1,42% (39 из 2740, 95%-й ДИ 1,04%-1,94%), к классу НИОТ – 0,99% (27 из 2740, 95%-й ДИ 0,67%-1,44%). Все выявленные мутации ЛУ ВИЧ-1 представлены на рисунке 5.

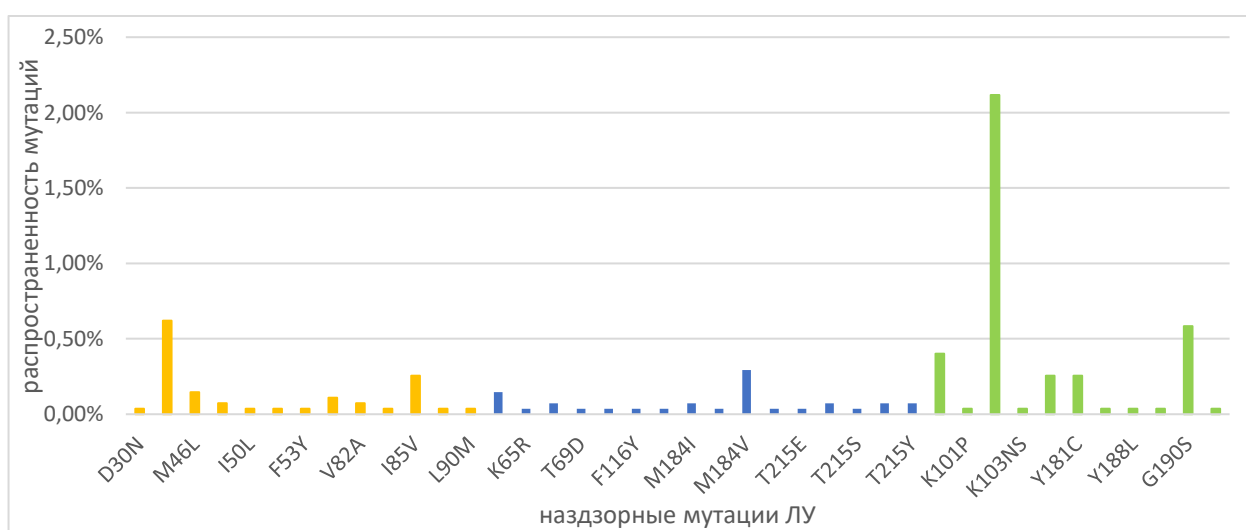


Рисунок 5 – Распространенность выявленных мутаций ЛУ ВИЧ-1 среди пациентов без опыта АРВ-терапии. Желтым цветом выделены мутации, вызывающие резистентность к классу ИП, синим – к классу НИОТ, зеленым – к классу ННИОТ

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 после Северо-Кавказского находился Дальне-Восточный ФО (7,46%).

Анализ выборки при стратификации по путям инфицирования показал, что для основных путей инфицирования распространенность ЛУ вариантов ВИЧ-1 была ниже 10%, достоверных различий выявлено не было.

Также была проанализирована распространенность мутаций ЛУ в зависимости от генетического варианта ВИЧ-1. Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1 была достоверно выше для генетического варианта CRF63_02A6 ($p < 0,001$). 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.

Оценка распространенности мутаций ЛУ, важных с точки зрения надзора, была проведена для пациентов, выявленных начиная с 2005-го года с разбивкой на трехлетние периоды (рисунок 6). 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) с ростом до 9,38% ($p < 0,001$).

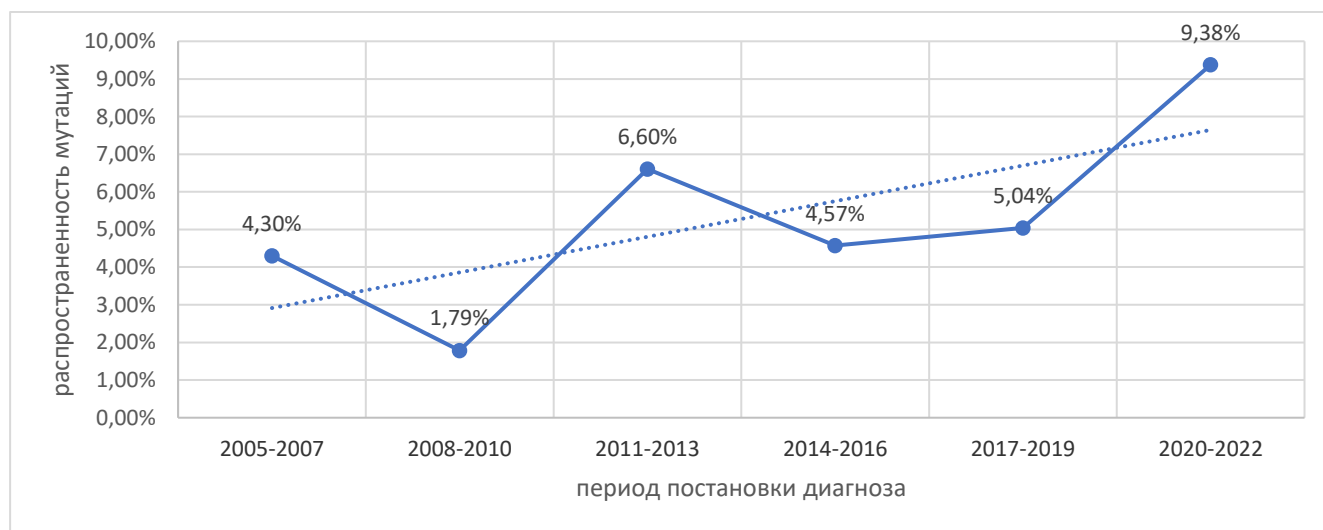


Рисунок 6 – Распространенность мутаций ЛУ ВИЧ-1, важных с точки зрения надзора, среди пациентов без опыта приема АРВ препаратов в зависимости от года диагноза.

Пунктирной линией представлена линия тренда

Был также проведен анализ уровня распространенности ЛУ ко всем АРВ препаратам, зарегистрированным в РФ (рисунок 7).

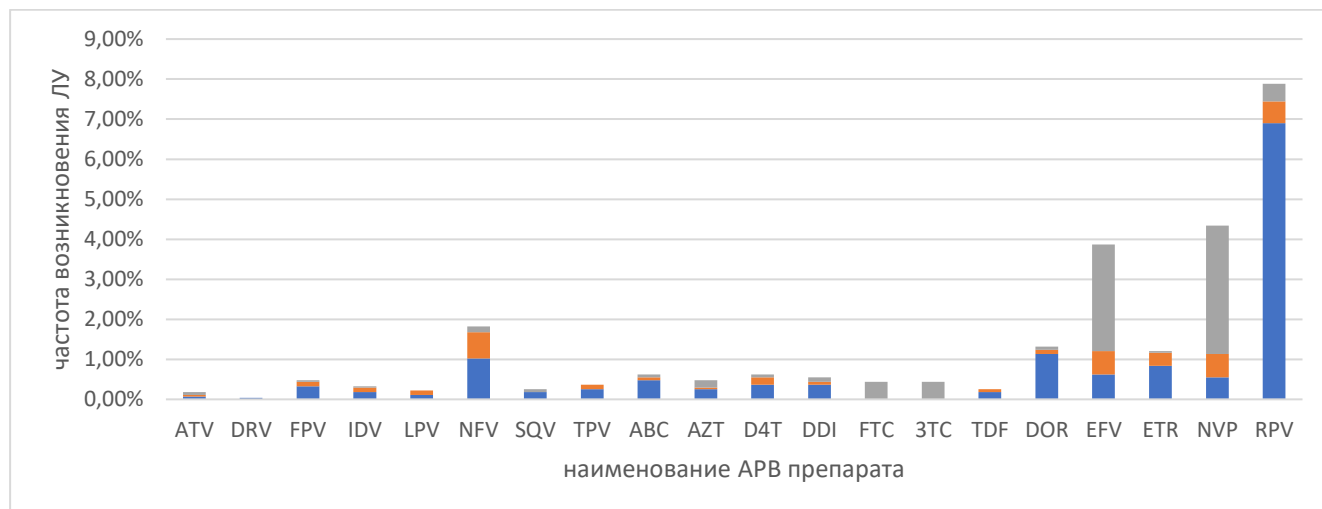


Рисунок 7 – Уровень распространенности резистентности к АРВ препаратам классов НИОТ, ННИОТ и ИП среди пациентов без опыта терапии. Серым цветом указана ЛУ высокого уровня, оранжевым – среднего уровня и синим – низкого уровня

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. 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%).

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%.

Анализ разнообразия генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации

Генетическое разнообразие ВИЧ-1 в РФ было определено путем анализа 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. Итоговое распределение генетических вариантов представлено на рисунке 8.

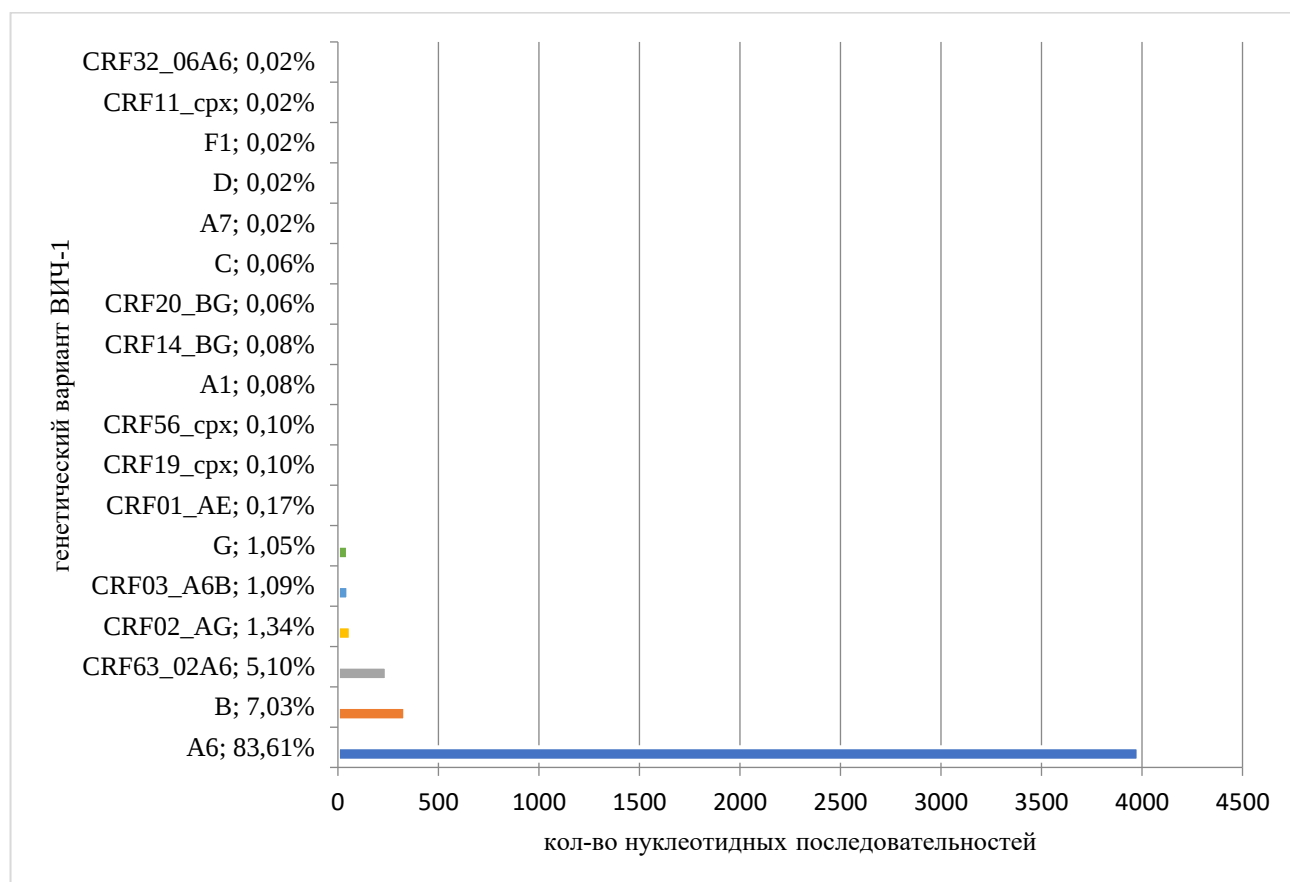


Рисунок 8 – Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 в проанализированной выборке

Далее были проанализированы изменения, происходившие в отношении распределения генетических вариантов вируса с течением времени. 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%.

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 А6 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 ($p < 0,001$).

Также был проведен 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 позволил для всех 37 пациентов с редкими вариантами ВИЧ-1 определить географические регионы, граждане которых могли послужить источниками инфекции. Наиболее часто регионами, из которых предположительно произошел занос инфекции, являлись страны Западной Европы (Великобритания, Франция, Испания, Кипр), США, а также популярные в РФ страны для «курортного» отдыха (Таиланд, Куба). 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.

Оценка развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в Центральном федеральном округе с помощью кластерного анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 и сопутствующей информации о пациентах
Применение биоинформатических методов при изучении особенностей распространения эпидемии ВИЧ-инфекции.

Определение характеристик развития эпидемии ВИЧ-инфекции было осуществлено на примере Центрального ФО, для которого в настоящем исследовании был получен наибольший охват секвенированием ВИЧ-инфицированных лиц.

Нуклеотидные последовательности от пациентов, отвечающих необходимым критериям (Центральный ФО, наличие информации о поле пациента, предполагаемом

пути передачи и годе постановки диагноза) были проанализированы на предмет выявления молекулярных кластеров с помощью 4-х различных программ (IQ-TREE, FastTree, RAxML и MicrobeTrace). В ходе сравнения указанных программ между собой была определена их чувствительность, а также проведена оценка сходимости результатов. 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 (MicrobeTrace).

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 (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 происходит.

Анализ кластеризации пациентов в зависимости от субтипа ВИЧ-1, которым они были инфицированы, показал, что 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.

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 среди людей среднего и старшего возраста. 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 пациенты без опыта приема терапии более чем в 2,5 раза чаще оказывались внутри молекулярных кластеров, что указывает на недостаточный охват АРВ-терапией ВИЧ-инфицированных граждан РФ.

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. В связи с этим дальнейший анализ был осуществлен на основании данных о пациентах с ВИЧ-инфекцией, проживающих на территории Орловской области, для которой плотность выборки в период с 1999 по 2022 гг. составила в среднем 25%.

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.

На первом этапе были изучены появление и рост молекулярных кластеров с течением времени. 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 практически полностью совпал с повышением регистрируемой заболеваемости в регионе в 2015-2018 гг.

Анализ молекулярных кластеров, выполняющийся на регулярной основе, позволяет своевременно выявлять и охарактеризовывать групповые очаги заболевания. В качестве примера был проведен анализ генетической близости 65 нуклеотидных последовательностей, входящих в наиболее крупный кластер №22. Генетическое сходство последовательностей, входящих в кластер, более 98% позволило дополнительно подтвердить, что все 65 пациентов с высокой степенью достоверности относились к одному эпидемическому очагу. Клинические и демографические характеристики пациентов, входящих в кластер №22, были сравнены с таковыми всей исследованной выборки ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в данном субъекте РФ.

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%). Таким образом, выявление крупных молекулярных кластеров позволяет осуществлять характеристику ВИЧ-инфицированных лиц, входящих в очаг заболевания, и на основании этих данных организовывать наиболее эффективные профилактические и противоэпидемические мероприятия.

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 (таблица 1) молекулярно-генетические и биоинформатические методы к 2009-му году в системе эпидемиологического надзора практически не использовались. Результаты настоящего исследования позволили разработать МР 3.1.5.0075, МР 3.1.0366-25 и МУ 3.1.3342-16, а также внести дополнения в СанПиН 3.3686-21.

Кроме этого, результаты 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. 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.
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*.
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. Представляемая информация должна подвергаться оперативному эпидемиологическому анализу (ОЭА) с целью выявления причин активизации эпидемического процесса.

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

Модернизация диагностической подсистемы.

Модернизация диагностической подсистемы предлагается 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 ВИЧ-1 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, 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. 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 9) позволят усовершенствовать существующую нормативно-методическую документацию по теме ВИЧ-инфекции и таким образом повысить эффективность эпидемиологического надзора за данной инфекцией.

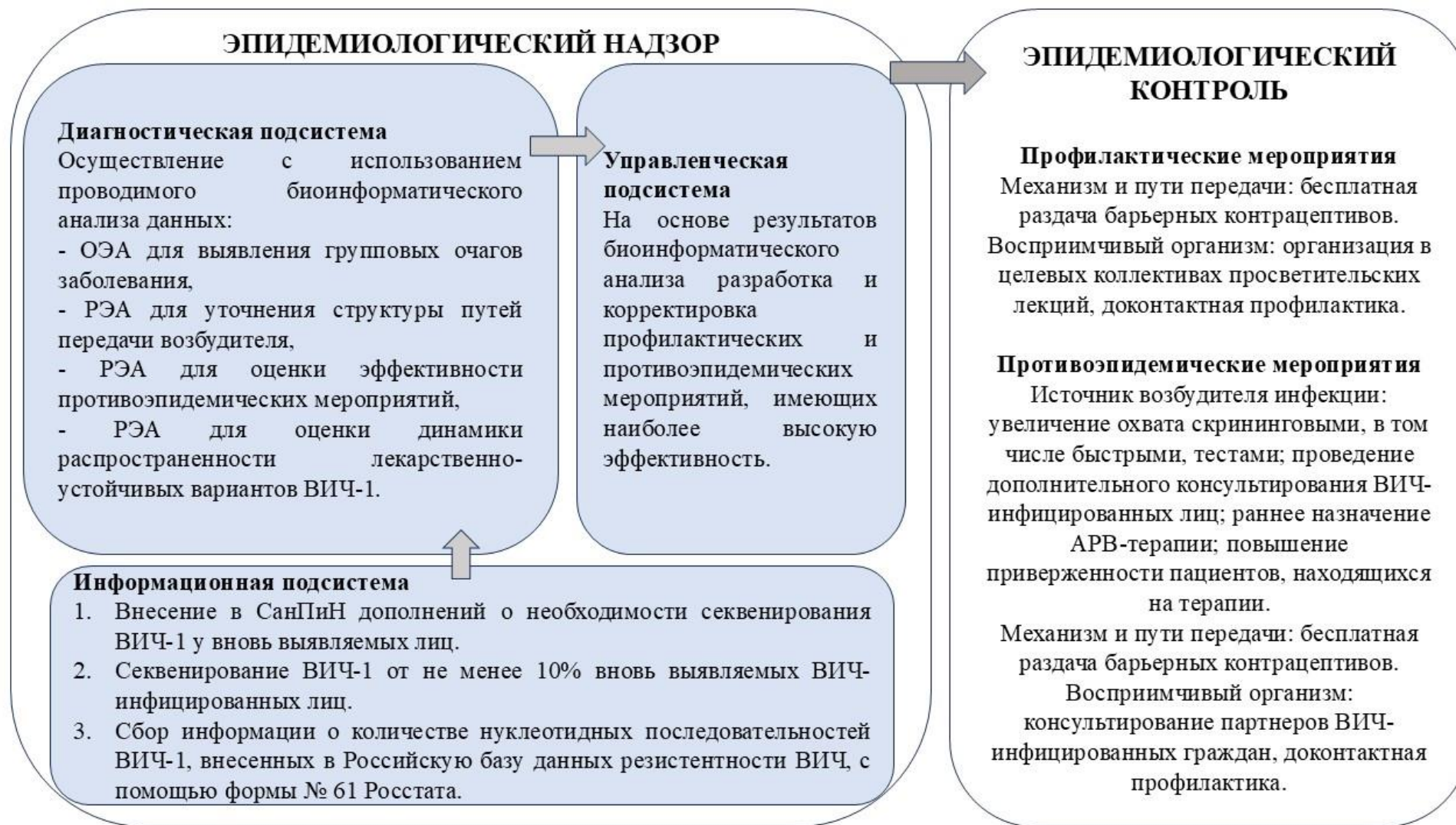


Рисунок 9 – Пути усовершенствования системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией, и перечень мероприятий, проводимых в рамках эпидемиологического контроля

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 варибельного (*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 варибельной 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 A1, A7, C, 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

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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Лопатухин А.Э. Первый опыт применения стандартизированной генотипической методики определения тропизма ВИЧ / А.Э. Лопатухин, Д.Е. Киреев, А.Н. Поляков, Е.К. Букин, R. Kaiser, N. Luebke, Д.А. Куевда, Г.А. Шипулин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №6. – С.46-48.*
2. Сандырева Т.П. Филогенетический анализ в эпидемиологических

расследованиях случаев ВИЧ-инфекции / Т.П. Сандырева, Н.А. Герасимова, А.Э. Лопатухин, Д.Е. Киреев, Д.А. Кувда, Г.А. Шипулин, А.С. Подымова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – №1. – С. 17-21.*

3. Лопатухин А.Э. Применение методов генотипирования ВИЧ и филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции / А.Э. Лопатухин, Н.Н. Ладная, Л.Д. Кириллова, Д.Е. Киреев, Л.Д. Никотина, О.Н. Щепинова, Т.Н. Коннова // Врач. – 2015. – №2. – С. 2-5.*

4. Дмитриюкова М.Ю. Точность определения субтипа ВИЧ-1 на основании анализа нуклеотидных последовательностей V3 петли гена *gp120* / М.Ю. Дмитриюкова, Д.Е. Киреев, А.Э. Лопатухин, И.А. Лаповок, Г.А. Шипулин // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2015. – Т. 7. – №1. – С. 40-44.*

5. Матиевская Н.В. Клинико-иммунологические и эпидемиологические особенности ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ-1 / Н.В. Матиевская, Д.Е. Киреев, М.Ю. Дмитриюкова, И.О. Токунова, И.А. Кондратович // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2015. – Т. 7. – №1. – С. 52-59.

6. Лысенко Е.В. Характеристика вариантов вируса иммунодефицита человека, циркулирующих на территории Российской Федерации, с различной тропностью к корецепторам в помощь практикующему врачу / Е.В. Лысенко, А.Э. Лопатухин, М.Ю. Дмитриюкова, Г.М. Цыганова, А.В. Покровская, Д.Е. Киреев, Г.А. Шипулин // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2015. – № 2. – С. 77-81.

7. Lopatukhin A. HIV-1 genotyping tropism profile in an HIV-positive population throughout the Russian Federation / A. Lopatukhin, D. Kireev, D. Kuevda, A. Pokrovskaya, G. Tsyganova, G. Korovina, A. Pinsker, N. Dementeva, N. Sizova, O. Peksheva, N. Zaytseva, N. Nosov, N. Urazov, V. Gerasimov, N. Ermolinskaya, N. Gerasimova, T. Sandyreva, L. Volova, L. Grezina, A. Kolomeets, I. Sergeeva, D. Neshumaeve, A. Boyko, V. Kotova, L. Balakhontseva, D. Kolpakov, A. Shemshura, S. Saukhat, E. Bukin, A. Polyakov, R. Kaiser, G. Shipulin, V. Pokrovsky // Cogent Medicine. – 2017. – № 4(1).

8. Киреев Д.Е. Оценка эффективности определения длительности ВИЧ-инфекции путем анализа генетической вариабельности вируса / Д.Е. Киреев, А.В. Мурзакова, А.Э. Лопатухин, А.В. Покровская, А.Б. Шемшура, В.В. Кулагин, Г.А. Шипулин, В.В. Покровский // Инфекционные болезни. – 2017. – Т. 15. – №2. – С. 61–66.*

9. Бобкова М.Р. Клинические рекомендации «Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ» / М.Р. Бобкова, Л.А. Грезина, Н.Е. Дементьева, Н.Н. Зайцева, Е.В. Казеннова, Д.Е. Киреев, А.Б. Шемшура // Лабораторная служба. – 2017. – №3. – С. 217-237.*

10. Лаповок И.А. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987—2015 гг. / И.А. Лаповок, А.Э. Лопатухин, Д.Е.

Киреев, Е.В. Казеннова, А.В. Лебедев, М.Р. Бобкова, А.Н. Коломеец, Г.И. Турбина, Г.А. Шипулин, Н.Н. Ладная, В.В. Покровский // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89. – № 11. – С. 44-49.

11. **Kireev D.E.** 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, E.V. Pimkina, A.S. Speranskaya, A.D. Neverov, G.G. Fedonin, Yu.S. Fantin, G.A. Shipulin // J Virol Methods. – 2018. – № 261. – P. 40–45.

12. Murzakova A. Molecular Epidemiology of HIV-1 Subtype G in the Russian Federation / A. Murzakova, **D. Kireev**, P. Baryshev, A. Lopatukhin, E. Serova, A. Shemshura, S. Saukhat, D. Kolpakov, A. Matuzkova, A. Suladze, M. Nosik, V. Eremin, G. Shipulin, V. Pokrovsky // Viruses. – 2019. – 11(4):348.

13. Кириченко А.А. 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.А. Лаповок, Н.Н. Ладная, В.В. Покровский // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2019. – Т. 11. – № 2. – С. 75-83.

14. Кириченко А.А. 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, А.В. Мурзакова, И.А. Лаповок, И.А. Гоптарь, А.С. Сперанская, Г.А. Шипулин, **Д.Е. Киреев** // Инфекционные болезни. – 2019. – Т. 17. – №2. – С. 12-19.*

15. Tarasova O. Computational Approach for the Prediction of Treatment History and the Effectiveness or Failure of Antiretroviral Therapy / O. Tarasova, N. Biziukova, **D. Kireev**, A. Lagunin, S. Ivanov, D. Filimonov, V. Poroikov // Int J Mol Sci. – 2020. – №21(3). – pii: E748.

16. Лаповок И.А. Молекулярно-генетические методы анализа в исследовании нозокомиальных вспышек ВИЧ-инфекции / И.А. Лаповок, А.Э. Лопатухин, **Д.Е. Киреев**. // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 18. – №1. – С. 53–59.*

17. Kirichenko A. Genetic Features of HIV-1 Integrase Sub-Subtype A6 Predominant in Russia and Predicted Susceptibility to INSTIs / A. Kirichenko, I. Lapovok, P. Baryshev, D. van de Vijver, J. van Kampen, C. Boucher, D. Paraskevis, **D. Kireev** // Viruses. – 2020. – №12(8):838.

18. Лаповок И.А. Генетическая характеристика ВИЧ-1 у пациентов с опытом вирусологической неудачи терапии в Киргизской Республике в 2017-2018 гг. / И.А. Лаповок, Д.В. Салеева, А.Э. Лопатухин, А.А. Кириченко, А.В. Мурзакова, А.А. Бекболотов, Б.М. Исканова, Э.Б. Нарматова, Ж.К. Акматова, Н.А. Асыбалиева, **Д.Е. Киреев** // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2020. – Т. 10. – №3. – С. 105-111.*

- 19.Кириченко А.А. Оценка лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к элсультавирину и эффективность его применения среди Российских пациентов, ранее не получавших антиретровирусные препараты / А.А. Кириченко, Д.Е. Киреев, А.В. Кравченко, А.В. Покровская, У.А. Куимова, Н.В. Сизова, С.О. Майорова, Д.А. Гусев, В.В. Покровский // Журнал Инфектологии. – 2020. – Т. 12. – №5. – С. 29-39.*
- 20.Tarasova O. RHIVDB: A Freely Accessible Database of HIV Amino Acid Sequences and Clinical Data of Infected Patients / O. Tarasova, A. Rudik, **D. Kireev**, V. Poroikov // Front. Genet. – 2021. – №12:679029.
- 21.Lewis M. Highly prevalent Russian HIV-1 V3-loop sequence variants are susceptible to maraviroc / M. Lewis, B. Jubb, P. Simpson, A. Lopatukhin, **D. Kireev**, M. Bobkova, C. Craig, E. van der Ryst, M. Westby, S. Butler // Antivir Chem Chemother. – 2021. – №29:20402066211025156.
- 22.Кириченко А.А. Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в России (2013–2021 гг.) / А.А. Кириченко, Д.Е. Киреев, А.В. Шлыкова, А.Э. Лопатухин, И.А. Лаповок, Д.В. Салеева, А.В. Кравченко, В.В. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2021. – Т. 11. – №3. – С. 53-62.*
- 23.Осадчая О.А. Изучение передачи лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Республике Армения с помощью биоинформатических методов / О.А. Осадчая, П.В. Ерошкин, А.А. Кириченко, И.А. Лаповок, Д.В. Салеева, А.Э. Лопатухин, А.В. Шлыкова, Д.Е. Киреев, Т.Р. Григорян, А.Р. Петросян, Т.А. Сархатян В.В. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2021. – Т. 11. – №4. – С. 53–60.*
- 24.Kirichenko A. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries / A. Kirichenko, **D. Kireev**, A. Lopatukhin, A. Murzakova, I. Lapovok, D. Saleeva, N. Ladnaya, A. Gadirova, S. Ibrahimova, A. Safarova, T. Grigoryan, A. Petrosyan, T. Sarhatyan, E. Gasich, A. Bunas, I. Glinskaya, P. Yurovsky, R. Nurov, A. Soliev, L. Ismatova, E. Musabaev, E. Kazakova, V. Rakhimova, V. Pokrovsky // PLoS ONE. – 2022. – Vol. 17. – № 1. – P. e0257731.
- 25.Rhee S. Spectrum of Atazanavir-Selected Protease Inhibitor-Resistance Mutations / S. Rhee, M. Boehm, O. Tarasova, G. Di Teodoro, A. Abecasis, A. Sönnnerborg, A. Bailey, **D. Kireev**, M. Zazzi, The EuResist Network Study Group, R. Shafer // Pathogens. – 2022. – №11(5):546.
- 26.Safina K. Molecular epidemiology of HIV-1 in Oryol Oblast, Russia / K. Safina, Y. Sidorina, N. Efendieva, E. Belonosova, D. Saleeva, A. Kirichenko, **D. Kireev**, V. Pokrovsky, G. Bazykin // Virus Evolution. – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. veac044.
- 27.Kirichenko A. Prevalence of Pretreatment HIV-1 Drug Resistance in Armenia in 2017–2018

and 2020–2021 following WHO Survey / A. Kirichenko, **D. Kireev**, I. Lapovok, A. Shlykova, A. Lopatukhin, A. Pokrovskaya, N. Ladnaya, T. Grigoryan, A. Petrosyan, T. Sarhatyan, N. Sargsyants, T. Hovsepyan, H. Ghazaryan, H. Hovakimyan, S. Martoyan, V. Pokrovsky // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – P. 2320.

28.Лаповок И.А. Молекулярно-эпидемиологический анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в странах Восточной Европы и Центральной Азии в 2010-2019 гг. / И.А. Лаповок, А.А. Кириченко, А.В. Шлыкова, Д.В. Салеева, А.Э. Лопатухин, Д.Е. Киреев, Н.Н. Ладная, Э.И. Мусабаев, Е.И. Казакова, Н.С. Ибадуллаева, С.С. Ибрагимова, А.М. Сафарова, А. Кадилова, З. Нурляминова, Л. Исмамова, М. Зухурова, Р. Холназаров, А.А. Бекболотов, Э.Б. Нарматова, Б.М. Исканова, Т.Р. Григорян, А.Р. Петросян, Т.А. Саргатян, Е.Л. Гасич, А.С. Бунас, И.Н. Глинская, В.В. Покровский // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. – 2022. – № 12. – №3. – С. 31-40.*

29.Kirichenko A. HIV-1 Drug Resistance among Treatment-Naïve Patients in Russia: Analysis of the National Database, 2006–2022 / A. Kirichenko, **D. Kireev**, I. Lapovok, A. Shlykova, A. Lopatukhin, A. Pokrovskaya, M. Bobkova, A. Antonova, A. Kuznetsova, E. Ozhmegova, S. Shtrek, A. Sannikov, N. Zaytseva, O. Peksheva, M. Pitserskiy, A. Semenov, G. Turbina, N. Filoniuk, A. Shemshura, V. Kulagin, D. Kolpakov, A. Suladze, V. Kotova, L. Balakhontseva, V. Pokrovsky, V. Akimkin // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 4. – P. 991.

30.Киреев Д.Е. Российская база данных лекарственной устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам / Д.Е. Киреев, А.А. Кириченко, А.Э. Лопатухин, А.В. Шлыкова, Н.Ю. Галкин, Е.В. Савельер, М.Б. Глазов, В.В. Покровский, В.Г. Акимкин // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2023. — № 2. — С. 219-227.*

31.Киреев Д.Е. Связанность эпидемий ВИЧ-инфекции в Республике Армения и Российской Федерации / Д.Е. Киреев, А.А. Кириченко, О.А. Осадчая, Д.В. Салеева, И.А. Лаповок, А.Э. Лопатухин, А.В. Шлыкова, Н.Н. Ладная, Т.Р. Григорян, А.Р. Петросян, Т.А. Саргатян, Э.М. Овакимян, С.В. Мартоян, О.К. Казарян, Т.В. Овсепян, Н.К. Саркисянц, В.В. Покровский, В.Г. Акимкин // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. – 2023. – № 13 (3). – С. 27-34.*

32.Kireev D. Alarming Rise of Primary HIV Drug Resistance in Major Regions of Russia / **D. Kireev**, A. Kirichenko, M. Bobkova, A. Lebedev // *Current HIV Research*. – 2023. – Vol. 21 (6). – P. 347 – 353.

33.Осадчая О.А. Исследование устойчивости вируса иммунодефицита человека типа I к антиретровирусным препаратам у наивных пациентов в Армении в 2017–2021 годах / О.А. Осадчая, Д.Е. Киреев, Д.В. Салеева, А.А. Кириченко, И.А. Лаповок, А.Э. Лопатухин, А.В. Шлыкова, Л.Ф. Махмудова, Н.Н. Ладная, Э.М. Овакимян, С.В.

Мартоян, О.К. Казарян, Т.В. Овсепян, Н.К. Саргсянц, В.В. Покровский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2024. – Т. 101. – №2. – С. 184–192.*

34.Кириченко А.А. Пилотное исследование по изучению особенностей распространения резистентных вариантов ВИЧ-1 с помощью молекулярных кластеров / А.А. Кириченко, Д.Е. Киреев, Ю.Н. Сидорина, Н.Д. Абашина, Е.Е. Брусенцева, В.Г. Акимкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2024. - Т. 101. - №5. - С. 581-593.*

35.Лукьяненко Н.В. Анализ заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Алтайском крае в 2022 г / Н.В. Лукьяненко, Д.Е. Киреев, И.А. Лаповок, А.А. Кириченко, А.В. Шлыкова, Д.В. Фомина, М.А. Асманова, В.В. Шевченко // Якутский медицинский журнал. – 2024. – №4(88). – С. 80-84.

36.Киреев Д.Е. Геномный эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации / Д.Е. Киреев, А.А. Кириченко, В.Г. Акимкин // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2024. – №16(4). – С. 17-27.*

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