Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей

и благополучия человека

ЕКАТЕРИНБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ

ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО   
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР   
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

(ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА)

|  |  |
| --- | --- |
| УДК 578.4 578 616-036.22  Рег. № НИОКТР 121041500042-8  Рег. № ИКБРС |  |
| СОГЛАСОВАНО  Руководитель ЕНИИВИ  ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  Роспотребнадзора, д-р. биол. наук  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ А.В. Семенов  «\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2022 г. | УТВЕРЖДАЮ  Генеральный директор  ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  Роспотребнадзора, д-р биол. наук  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Р.А. Максютов  «\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2022 г. |

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РИСК - ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ПРОФИЛАКТИКЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

В ОТДЕЛЬНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ

по теме:

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ВЫЯВЛЕНИЮ ГРУПП РИСКА ПЕРВИЧНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ

(промежуточный, 2 этап)

Отраслевая научно-исследовательская программа Роспотребнадзора

«Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней (2021-2025 гг.)»

(п.1.2.1)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Руководитель НИР,  руководитель ЕНИИВИ  ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  Роспотребнадзора,  д-р биол. наук | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | А.В. Семенов |
| Ученый секретарь,  канд. биол. наук | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | Т.С. Непомнящих |

Екатеринбург 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Руководитель НИР,  руководитель ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  д-р биол. наук | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | А.В. Семенов  (введение, раздел 3, заключение) |
| Отв. исполнитель,  науч. сотр. | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | М.В. Питерский  (введение, раздел 1,2,3, заключение) |
| Исполнители: |  |  |
| Зам. руководителя по научной работе,  д-р мед. наук, доцент | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Ю.А. Захарова  (введение, заключение) |
| Зав. арбитражной лабораторией диагностики ВИЧ и оппортунистических инфекций | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | У.А. Бажанова  (раздел 2, 3.3) |
| Врач-эпидемиолог | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | О.Я. Яранцева  (раздел 1.2, 3.2) |
| Врач-КЛД | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Н.В. Билалова  ( раздел 3.3) |
| Врач-КЛД | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Н.Е. Четверкина  (раздел 3.3) |
| Врач-КЛД | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | А.А. Климова  (раздел 3.4) |
| Врач-КЛД | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | М.А. Мартынов  (раздел 3.3) |
| Мл. науч. сотр.  Уральского окружного центра СПИД | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | О.А. Ходаков  (раздел 1.3, 3.4, 3.5, 3.6) |
| Мл. науч. сотр. научно-методического отдела | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | А.Г. Гусев  (раздел 1.3, 2, 3.4, 3.5, 3.6) |
| Стажер-исследователь  Уральского окружного центра СПИД | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | С.М. Кандышев  (раздел 3.7) |
| Нормоконтроль,  уч. секретарь | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Ю.А. Михайленко |

РЕФЕРАТ

Отчет 118 с., 10 рис., 16 табл., 98 источн., 4 прил.

СКРИНИНГ НА ВИЧ, ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ, АНТИРЕТРОВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ, ГРУППЫ РИСКА, ПЕРВИЧНАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ, БИОПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объектом исследования является эпидемический процесс ВИЧ-инфекции на территории Уральского федерального округа.

Предмет исследования – данные эпидемиологического, серологического и молекулярно-генетического мониторинга, результаты биоповеденческих исследований.

Цель работы – совершенствование системы профилактики ВИЧ-инфекции в группах высокого риска на основе современных молекулярно-генетических технологий для снижения заболеваемости.

В процессе работы проведен ретроспективный эпидемиологический анализ статистических данных, характеризующих эпидемический процесс ВИЧ-инфекции в УФО, проведены скрининговые и биоповеденческие исследования, определён генотипический пейзаж штаммов ВИЧ, выделенных от населения.

Показатель заболеваемости в 2021 году в УФО составил 75,9°/₀₀₀₀ и оказался на 46,9% ниже, чем аналогичный показатель в 2015 году, когда уровень заболеваемости был максимальным с 2003 года – 142,13°/₀₀₀₀. С 2015 года сформировался устойчивый тренд снижения заболеваемости ВИЧ со среднегодовым темпом убыли 9,9%. Установлено, что темп прироста показателя охвата населения освидетельствованием на ВИЧ должен превышать рост заболеваемости как минимум на 36,4%, чтобы обеспечивать снижение заболеваемости ВИЧ в краткосрочной перспективе.

Биоповеденческие исследования, проведённые среди лиц, освободившихся из мест лишения свободы, показали, что данная группа является уязвимой для заражения ВИЧ как до отбывания наказания, так и в период нахождения под стражей.

Установлено важное влияние информированности для последующей мотивации к терапии, даже среди лиц, употребляющих наркотики, установлено влияние материального положения пациента на его приверженности антиретровирусной терапии.

Разработаны программные продукты, оптимизирующие анализ биоинформационных данных, получаемых в результате секвенирования генома ВИЧ-1. Разработана внутренняя тест-система для секвенирования региона pol генома ВИЧ-1.

По материалам НИР подготовлено 9 печатных работ, в том числе 3 статьи (Scopus, РИНЦ). На научно-практических мероприятиях представлено 3 доклада. Получено свидетельство о регистрации 2-х программ для ЭВМ. Подготовлен проект методических рекомендаций «Профилактика ВИЧ-инфекции в учреждениях, осуществляющих наказание в виде лишения свободы».

Полученные данные могут быть использованы для совершенствования санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, при прогнозировании эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции, а также при обучении специалистов (инфекционистов, эпидемиологов).

НИР имеет прикладной характер.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 6

ВВЕДЕНИЕ 7

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ 10

1 Выбор направления исследований 10

1.1 Мониторинг эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в УФО и выявление новых групп риска заражения ВИЧ 10

1.2 Биоповеденческие исследования в уязвимых группах населения 11

1.3 Молекулярно-генетический мониторинг за первичной резистентностью ВИЧ 13

2 Материалы и методы 18

2.1 Эпидемиологические методы исследования 18

2.2 Лабораторные методы исследования 20

2.3 Статистические методы исследования 23

3 Процесс теоретических исследований 25

3.1 Мониторинг эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в УФО 25

3.1.1 Заболеваемость ВИЧ-инфекцией и охват медицинским освидетельствованием на ВИЧ в УФО 25

3.1.2 Заболеваемость СПИДом в УФО 27

3.1.3 Результаты работы по мониторингу эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в УФО за 1999-2021 год 30

3.2 Биоповеденческие исследований среди населения УФО 31

3.2.1 Биоповеденческие исследования среди лиц, освободившихся из учреждений уголовно-исполнительной системы УФО 31

3.2.2 Результаты исследования среди лиц, освободившихся из учреждений уголовно-исполнительной системы УФО 33

3.2.3 Социологическое исследование приверженности к АРТ среди пациентов в Свердловской области 38

3.2.4 Результаты биоповеденческих исследований 44

3.3 Разработка праймеров для секвенирования региона pol генома ВИЧ 46

3.4 Разработка программного обеспечения для анализа первичных данных секвенирования региона pol ВИЧ-1 54

3.5 Результаты исследования уровня распространённости вторичных МЛУ ВИЧ-1 среди ЛЖВС в УФО 55

3.6 Филогенетический анализ штаммов ВИЧ, циркулировавших на территории Российской Федерации 64

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 68

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 72

ПРИЛОЖЕНИЕ А Количественные показатели по подготовленной научной продукции 82

ПРИЛОЖЕНИЕ Б Протокол тестирования праймеров для секвенирования гена pol ВИЧ-1 на участке, кодирующем протеазу и обратную транскриптазу. 85

ПРИЛОЖЕНИЕ В Результаты определения чувствительности праймеров «in silico» 98

ПРИЛОЖЕНИЕ Г Результаты оценки вероятности димеризации праймеров 117

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчёте о НИР применяются следующие сокращения и обозначения:

АРВП – Антиретровирусные препараты

АРТ – Антиретровирусная терапия

ВИЧ – Вирус иммунодефицита человека

ВН – Вирусная нагрузка

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

ИБ – Иммунный блоттинг

ИУ – Исправительное учреждение

ИФА – Иммуноферментный анализ

КСР – Работницы коммерческого секса (секс-работницы)

ЛЖВС – Лица, живущие с ВИЧ/СПИД

МЛУ – мутации лекарственной устойчивости

НИР – Научно-исследовательская работа

ПИН – Потребители инъекционных наркотиков

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией

РНК – Рибонуклеиновая кислота

СПИД – Синдром приобретённого иммунодефицита

УОЦС – Уральский окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД

УФО – Уральский федеральный округ

ФСИН – Федеральная система исполнения наказаний

ВВЕДЕНИЕ

Распространение ВИЧ-инфекции является одной из наиболее острых проблем современности, вследствие которой растет смертность, снижается численность трудоспособного населения, замедляются темпы экономического роста государства.

Эпидемический процесс ВИЧ-инфекции в Уральском федеральном округе (УФО) характеризуется самой высокой интенсивностью в России. Максимальный уровень заболеваемости зафиксирован в 2015 году (142,1 случаев на 100 тыс. населения). В условиях высокой заболеваемости со значительной долей лиц, инфицированных половым путём (до 65%), растет значимость новых групп риска, таких как внутренние трудовые мигранты, серодискордантные пары, потребители психоактивных веществ не инъекционного введения, лица, освобождающиеся из мест лишения свободы.

Несмотря на то, что отдельные исследования демонстрируют в указанных когортах высокий уровень поражённости ВИЧ, до настоящего времени данные группы мало изучены и не включены в формы статистического наблюдения.

Согласно мировому опыту распространение резистентности ВИЧ в странах мира отмечается с 2000 года и связано с распространением масштабов лечения препаратами этого класса. Высокие уровни резистентности наблюдаются в Западной Европе, Северной Америке и Великобритании (14,0 %). С 2005 года регистрируется появление штаммов ВИЧ с множественной лекарственной устойчивостью.

Изучение уровня первичной резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам (АРВП) – важный и неотъемлемый компонент надзора за распространением лекарственно устойчивых штаммов. Полученные данные необходимы для анализа передаваемой устойчивости вируса с целью минимизации ее распространения, а также своевременного планирования и принятия мер, упреждающих циркуляцию резистентных штаммов ВИЧ. В России, в отличие от других стран мира, не проводятся массовые скрининговые тестирования на первичную резистентность ВИЧ к АРВП всех впервые выявленных и/или планирующих начать лечение ВИЧ-позитивных лиц вследствие высоких материальных затрат, что диктует необходимость формирования риск-ориентированного подхода к выполнению данной группы исследований.

Зависимость скорости прогрессирования заболевания от субтиповой принадлежности вируса и возможность возникновения рекомбинантных штаммов ВИЧ требует своевременного установления субтиповой структуры циркулирующих варинатов ВИЧ в различных регионах РФ, а также среди групп населения и территорий высокого риска распространения рекомбинантных штаммов ВИЧ.

Перечисленные выше проблемы диктуют необходимость дифференцированного подхода к разработке профилактических и противоэпидемических мероприятий среди представителей малоизученных групп риска, повышения эффективности программ по выявлению ВИЧ-инфицированных лиц, оптимизации расходов на мониторинг первичной резистентности ВИЧ, на основе современных инструментов эпидемиологической диагностики, формирования структурированной по годам, регионам и субтипам базы данных последовательностей ВИЧ-1 циркулировавших на всей территории РФ, содержащей информацию о МЛУ, что позволит добиться снижения заболеваемости ВИЧ-инфекцией.

Цель исследования: совершенствование системы профилактики ВИЧ-инфекции в группах высокого риска на основе современных молекулярно-генетических технологий для снижения заболеваемости.

Задачи исследования:

1. Изучить закономерности и тенденции развития эпидемического процесса распространения ВИЧ-инфекции в Уральском федеральном округе, в том числе среди групп риска (лица, освобожденные из мест лишения свободы, мигрирующие группы населения, серодискордантные пары, потребители психоактивных веществ). Определить критерии для отнесения отдельных категорий населения к новым группам риска заражения ВИЧ-инфекцией.
2. Применить риск-ориентированные подходы к организации молекулярно-генетического мониторинга за передаваемой/первичной резистентностью ВИЧ среди лиц с выявленными недавними случаями инфицирования.
3. Разработать научно-обоснованную систему профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией в выявленных группах риска и уменьшению риска распространения рекомбинантных штаммов ВИЧ.

Отчет за 2022 год содержит основные результаты выполнения работ, запланированных по теме НИР в указанный период.

Благодаря новому подходу в организации молекулярно-генетического мониторинга за передаваемой/первичной резистентностью будут определены территории и группы риска заражения резистентными и рекомбинантными штаммами ВИЧ.

Новые научные данные об эпидемическом процессе ВИЧ-инфекции в отдельных группах населения с использованием современных лабораторных методов, позволят разработать комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией и повышение качества жизни ВИЧ-позитивных лиц.

Планируется разработка новых методических рекомендаций по профилактике распространения резистентных форм ВИЧ, как инструмента организации эпидемиологического надзора для заинтересованных служб.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

**1 Выбор направления исследований**

**1.1 Мониторинг эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в УФО и выявление новых групп риска заражения ВИЧ**

В настоящий момент система противодействия СПИДу в мире показывает наилучшие результаты за последнее десятилетие. По состоянию на конец декабря 2020 года 27,5 млн [26,5 млн–27,7 млн] людей получили антиретровирусную терапию по сравнению с 7,8 млн [6,9 млн–7,9 млн] в 2010 году. В 2020 г. 73% [56–88%] всех людей, живущих с ВИЧ, имели доступ к лечению.

В 2021 году Уральский федеральный округ остаётся в числе самых неблагополучных по ВИЧ-инфекции территорий среди всех федеральных округов Российской Федерации. Согласно данным официальной статистики, заболеваемость ВИЧ в Уральском федеральном округе имела самый высокий уровень среди всех федеральных округов Российской Федерации до конца 2016 года. Ситуация изменилась в 2017 году – на первое место по уровню заболеваемости ВИЧ вышел Сибирский федеральный округ. Уровень заболеваемости ВИЧ в 2021 году в УФО составил 75,9 случаев на 100 тыс., что выше уровня заболеваемости в Российской Федерации (48,7 на 100 тыс.) на 55,9.

Объединенная программа ООН по ВИЧ / СПИДу (ЮНЭЙДС) определила амбициозные цели по борьбе с ВИЧ-инфекцией на ближайшее десятилетие, известные как «95-95-95» к 2025 году. Данная стратегия ЮНЭЙДС заключается в том, что к 2025 году 95% людей, живущих с ВИЧ должны знать о своем статусе, из них 95% должны находиться на АРТ, и у 95% пациентов, находящихся на АРТ, должна наблюдаться вирусная супрессия [1]. Считается, что реализация данной программы позволит ограничить распространение ВИЧ [2].

В рамках реализации данной программы контроль за циркуляцией ВИЧ в популяции имеет немаловажное значение. Практика показывает, что скрининг на антитела к ВИЧ является не только одной из основных составляющих системы эпидемиологического надзора за этой инфекцией, но и частью государственной стратегии противодействия ее распространению в Российской Федерации и в мире [3–5]. Активное выявление лиц с ВИЧ-инфекцией, особенно на ранних стадиях болезни и последующее назначение АРТ, позволит уменьшить опасность источников инфекции и снизить распространение ВИЧ в популяции.

В условиях нарастающей заболеваемости и пораженности населения УФО ВИЧ-инфекцией, система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией имеет важное значение для организации систематического сбора данных, оперативного анализа и прогноза эпидемиологической ситуации, для принятия управленческих решений при планировании распределения ресурсов в территориальных органах исполнительной власти на мероприятия первичной профилактики, обследования населения, лечения и реабилитации ВИЧ-инфицированных лиц.

Мониторинг и анализ показателей, характеризующих эпидемический процесс, не только на региональном уровне, но и на уровне УФО, несущего самое тяжёлое бремя ВИЧ-инфекции в Российской Федерации, представляет большой научный и практический интерес.

Анализ данных мониторинга эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в федеральном округе позволяет дать ответы на следующие актуальные вопросы:

– каковы закономерности и тенденции развития эпидемического процесса распространения ВИЧ-инфекции в Уральском федеральном округе, в том числе среди групп риска;

– какие группы населения имеют высокий риск распространения инфекции;

**1.2 Биоповеденческие исследования в уязвимых группах населения**

Согласно национальной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в Российской Федерации на период до 2030 года лица из мест лишения свободы относятся к особо уязвимой в отношении ВИЧ-инфекции группе населения [6]. В отношении этой группы рекомендуются добровольные скрининги на наличие антител к ВИЧ при поступлении в исправительные учреждения и при освобождении из мест лишения свободы.

Вместе с тем, лица, освобождающиеся из мест лишения свободы, уже не относятся к группе повышенного риска заражения ВИЧ-инфекцией. Указанная категория населения оказывается за пределами профилактических мероприятий, в том числе периодических скринингов на ВИЧ-инфекцию, сохраняя рискованное поведение и высокую вероятность заражения ВИЧ. Учитывая большое количество среди лиц, освободившихся из исправительных учреждений граждан, связанных с незаконным оборотом наркотиков, которые как распространяют, так и употребляют психоактивные вещества, их деятельность после освобождения делает эту группу не менее уязвимой, чем сами заключённые.

В пенитенциарных учреждениях Российской Федерации каждый год продолжает выявляться значительное число ВИЧ-позитивных лиц. Среди лиц, поступающих в следственные изоляторы от 3 до 6 процентов являются ВИЧ-инфицированными [7], свыше 70% случаев диагностики ВИЧ-инфекции среди лиц, совершивших правонарушение, осуществляется при поступлении в систему ФСИН [8]. За последние 7 лет в Российской Федерации было проведено крайне мало исследований среди лиц из мест лишения свободы в отношении их информированности о ВИЧ-инфекции, действующих факторов риска заражения. Анонимное анкетирование среди 60 ВИЧ-отрицательных мужчин из исправительных учреждений г. Тюмени в 2019-2020 гг. показало, что информацию о ВИЧ-инфекции анкетируемые чаще всего получают через СМИ (56,7%) или при общении с медицинскими работниками (33,3%), большинство, более 73%, не знают о настоящем уровне поражённости населения ВИЧ в Тюменской области [9]. Исследование в Санкт-Петербурге среди 77 осужденных за совершение преступлений в сфере незаконного оборота наркотиков, выявило ВИЧ у 31,2% лиц, только 20,8% стояли в семейно-брачных отношениях. Установлена серьёзная отягощенность социальными проблемами обследованных лиц [10]. Анонимное анкетирование 22 лиц из следственных изоляторов Хабаровского края с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией показало высокую распространённость среди них рискованного поведения: 50% респондентов признались в опиоидной наркотической зависимости, в беспорядочные половые связи вступали 68,2%. Наличие предыдущих судимостей отметили 81,8% респондентов [11].

По данным Федеральной службы исполнения наказаний, несмотря на регулярные сообщения о неудавшихся попытках доставить в места лишения свободы наркотические вещества, новые попытки доставки запрещенных веществ периодически фиксируются. Так, например, одним из наиболее распространенных преступлений среди лиц, содержащихся в исправительных колониях, в 2017 г. явилось приобретение и сбыт наркотических средств – 201 случай или 23% от общей массы всех совершенных преступлений в исправительных колониях [12]. Информацию от лиц из исправительных учреждений о таких факторах риска, действующих в условиях лишения свободы, как парентеральное введение наркотиков, незащищенные половые контакты значительно легче получить после их освобождения, однако таких исследований в Российской Федерации за последние 10 лет не проводилось.

Как лица, освободившиеся из мест лишения свободы, так и потребители неинъекционных наркотиков являются достаточно закрытыми группами населения.

Для исследования таких лиц привлекаются некоммерческие организации, имеющие в своём составе так называемых «равных консультантов». Основным методом являются биоповеденческие исследования, предусматривающие экспресс-тестирование на ВИЧ и анкетирование лиц из труднодоступных групп. Указанная деятельность, помимо получения новых научных данных, имеет ценный профилактический и социальный эффект, так как оказывает влияние на отказ интервьюентов от рискованного поведения субъектов, имеет информационно-просветительскую составляющую.

Ключевую роль в формировании резистентных штаммов ВИЧ играет приверженность пациентов к антиретровирусной терапии [13,14]. Исследование факторов, влияющих на приверженность пациентов с ВИЧ-инфекцией, является ключевым моментом для выбора групп риска пациентов, состоящих в серодискордантных парах. Партнёры таких пациентов рискуют быть инфицированными резистентными штаммами и, таким образом, относятся к группе риска первичной лекарственной устойчивости.

Результаты биоповеденческих исследований позволят:

* оценить распространенность рискованного поведения в новых группах риска;
* определить интенсивность действия факторов риска и их распространённость;
* сформулировать методические подходы к организации профилактических мероприятий в новых группах риска;
* определить факторы, влияющие на приверженность пациентов к антиретровирусной терапии.

**1.3 Молекулярно-генетический мониторинг за первичной резистентностью ВИЧ**

Молекулярно-генетический мониторинг необходимый для выявления вирусологической неудачи, оценки эффективности антиретровирусной терапии (АРТ), выявления приобретённой и первичной резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам в странах с низким и средним уровнем дохода является малодоступным. Стремительно снижается эффективность уже не только первой линии АРТ, но и второй линии [15–17]

В последние годы охват лечением ВИЧ-инфицированных пациентов серьезно увеличился. Так, в РФ доля пациентов с диагнозом «ВИЧ-инфекция», находящихся на терапии, возросла с 1% (2005 г.) до 39,5% (2020 г.)

Согласно новым рекомендациям по лечению пациентов с ВИЧ-инфекцией, АРТ следует назначать всем инфицированным пациентам, независимо от стадии болезни и наличия клинических проявлений [18]. Кроме того, в настоящее время анти- ретровирусные препараты (АРВП) применяются не только в схемах лечения, но и с целью предотвращения заражения вирусом в до- и постконтактной профилактике ВИЧ-инфекции, а также для предотвращения передачи ВИЧ от матери ребенку. Таким образом, количество пациентов, принимающих АРВП, постоянно растет, что влечет за собой и увеличение случаев возникновения к ним лекарственной устойчивости (ЛУ).

Потенциал распространения резистентных штаммов ВИЧ остаётся недооценённым. Проблема роста частоты приобретённой резистентности ВИЧ к АРТ приводит к увеличению рисков передачи резистентных штаммов ВИЧ [19]. В исследовании, посвящённом математическому моделированию эпидемического процесса распространения резистентных штаммов, было показано, что трансмиссионный потенциал резистентного штамма ВИЧ в основном зависит от времени начала АРТ, причем более раннее начало приводит к большему трансмиссионному потенциалу. При неполной лекарственной устойчивости, применении более эффективных в отношении резистентного штамма АРВП, вероятность его передачи снижается тем больше, чем раньше будет начата терапия. В связи с тем, что вирусная нагрузка, связанная с резистентным штаммом, нарастает медленнее чем вирусная нагрузка, связанная с «диким» (чувствительным к АРТ) штаммом, низкая приверженность АРТ снижает потенциал передачи резистентного штамма, но повышает трансмиссивный потенциал «дикого» штамма. В случае первичного заражения только резистентным штаммом низкая приверженность АРТ повышает его трансмиссивный потенциал. Разработанная Saenz R. и др. модель демонстрируют преобладание в популяции резистентных штаммов относительно восприимчивых к АРТ уже через 30 лет при охвате АРТ не менее 75% ЛЖВС. [20].

Ситуацию неконтролируемого распространения резистентных штаммов ВИЧ хорошо иллюстрирует эпидемиологическая ситуация в странах Африки.

В Замбии число людей, имеющих доступ к АРТ, экспоненциально возросло с 51 764 в 2005 году до 1 076 000 к концу 2019 года [21]. Вместе с этим росла распространённость лекарственной устойчивости ВИЧ. В 2007-2008 годах частота МЛУ ВИЧ составляла 5,7% среди 548 взрослых АРТ-наивных ЛЖВС, и 16% среди 25 взрослых, получающих АРТ (включая профилактику передачи от матери к ребёнку (ППМР)) [8]. Исследование в 2009-2012 годах показало, что 98% из 68 взрослых замбийцев, отказавшихся от АРТ первой линии, имели МЛУ ВИЧ [22]. Poppe и др. продемонстрировали рост распространенности МЛУ ВИЧ у младенцев в Замбии с 21,5% в 2007-2009 годах до 40,2% в 2014 году [23]. В исследовании 2017-2018 годов было установлено, что молодёжь в возрасте 15-24 года достигает самых низких показателей вирусной супрессии – 34% у девушек и 35,7% у юношей, по сравнению с 73,0% и 74,0% у мужчин и женщин в возрасте 45-59 лет. МЛУ ВИЧ были выявлены 75% пациентов с вирусологической неудачей (58 из 77 человек), из которых у 83% МЛУ ВИЧ соответствовали текущей схеме АРТ [21].

В Того обеспечение ЛЖВС АРТ активизировалось с 2003 г., а наращивание АРТ началось в 2007 г. В исследовании 2008 года у 46 (79,3%) из 58 пациентов с вирусологической неудачей выявлены МЛУ ВИЧ. Штаммы от всех пациентов были резистентны к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ), при этом 12 были резистентны только к ННИОТ, 25 (43%) к ННИОТ и ламивудину/эмтрицитабину, и 8 (13,8%) ко всем трём препаратам из их схемы АРТ [24]. В исследовании 2014 года из 283 ВИЧ-инфицированных детей и подростков вирусологическая неудача (более 1000 копий/мл) наблюдалась у 146 (51,6%) пациентов. Из 125 успешно генотипированных штаммов 110 (88%) имели резистентность как к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ) так и к ННИОТ. Резистентность хотя бы к одному из принимаемых АРВП была выявлена у 118 (94,4%) пациентов [25].

Резистентность ВИЧ к препаратам сразу нескольких групп имеет особое значение, так как это значительно сокращает возможности терапии. Из-за низкой приверженности терапии некоторых категорий пациентов, а также возможности передачи резистентных штаммов ВИЧ лечение может не давать положительных результатов у 16–27% пациентов, не получавших АРВТ, и у 50–70% ранее лечившихся больных [26].

Для оценки приобретенной ЛУ (ADR – acquired drug resistance) у пациентов с вирусологической неудачей АРТ, у пациентов, начинающих АРТ 1-й линии (PDR – pretreatment drug resistance), в частности у пациентов без опыта терапии или с опытом приема препаратов 1-й линии с перерывом менее 3 месяцев и для оценки ЛУ у детей до 18 месяцев Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендовала проводить оценку резистентности согласно алгоритму Стэндфордского университета и оценивать все мутации резистентности, ассоциированные с ЛУ [27–29].

Для оценки распространенности первичной ЛУ в РФ проводились различные исследования, однако в большинстве случаев выборка была менее 100 пациентов. Наиболее крупные исследования были проведены на выборке из 297 образцов крови от наивных пациентов из 6 субъектов РФ – дата постановки диагноза в 2005-2007 гг. (уровень ЛУ составил 1,9%) [30]; на выборке из 114 образцов от наивных пациентов из Приволжского федерального округа – дата постановки диагноза в 2008-2014 гг. (уровень ЛУ составил 1,5%) [31]; на выборке образцов от 660 наивных пациентов из 7 федеральных округов РФ – дата постановки диагноза в 2005–2015 гг. (уровень ЛУ составил 4,8%) [32]; на выборке образцов от 111 наивных пациентов из Санкт-Петербурга – дата постановки диагноза в 1998–2011 гг. (уровень ЛУ составил 0%) [33], а при исследовании в 2017-2018 гг. достигал уже 11% [19].

По данным масштабного исследования первичной резистентности, проведенного Кириченко А.А. и др. распространённость мутаций лекарственной устойчивости в основной популяции в Российской Федерации составляет 11,1%, при этом распространённость переданных мутаций лекарственной устойчивости в среднем составляет 5,3% [34].

Определение лекарственной устойчивости ВИЧ необходимо для организации максимально экономичной и эффективной терапии для ВИЧ-инфицированных. Метод генотипирования для исследования лекарственной устойчивости ВИЧ в клинической практике является самым распространенным. В РФ зарегистрированы и используются следующие диагностические системы: Viroseq HIV-1 («Abbott Laboratories») и АмплиСенс HIV-Resist-Seq (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) [35]. Однако коммерческие тест системы имеют высокую стоимость, ограничивающую возможность их использования в исследовательских целях. Каждая из тест-систем имеет собственное программное обеспечение, которое недоступно без приобретения тест-системы, имеет ключ активации и ограничение по количеству выравниваний, т.е не может использоваться длительно. Сборка тест-системы из специфичных праймеров и универсальных реакционных смесей выигрывает в стоимости. В литературных источниках приводятся последовательности без модифицированных позиций для амплификации участков генома ВИЧ-1 подтипа А [36], но их специфичность для других подтипов группы M и других групп является сомнительной, по причине варьируемости геномов и высокой частоты генетических изменений. В рамках исследования планируется разработка вырожденных праймеров гена pol, на участках, кодирующих обратную транскриптазу, протеазу и интегразу, которые будут максимально комплементарны местам отжига. Собственные праймеры позволят значительно увеличить масштаб исследования на генотипическую резистентность ВИЧ, обеспечат более полное покрытие целевого участка, кроме того, позволят применять методы молекулярной эпидемиологии для расследования случаев заражения ВИЧ-инфекцией [37].

Разработка, внедрение и проведение молекулярно-генетического мониторинга за первичной резистентностью ВИЧ обеспечат:

* создание новой тест-системы для секвенирования региона pol генома ВИЧ;
* создание нового программного обеспечения для анализа первичных данных секвенирования региона pol ВИЧ-1;
* исследование первичной резистентности ВИЧ-1 в различных группах АРТ-наивных пациентов;
* возможность сформировать научно-обоснованную систему профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на уменьшению риска распространения резистентных штаммов ВИЧ.

**2 Материалы и методы**

**2.1 Эпидемиологические методы исследования**

В ходе работы были использованы несколько подходов к сбору материала для мониторинга параметров, характеризующих эпидемический процесс распространения ВИЧ-инфекции:

* Ведение персонифицированного реестра ЛЖВС, содержащего данные эпидемиологического анамнеза, анамнеза болезни и пополняемого сведениями о результатах диспансерного и лабораторного наблюдения, схемах лечения. Данный метод нашел реализацию в виде базы данных, формируемой ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора и в Федеральном регистре ВИЧ, доступ к которому обеспечивается только для организаций подведомственных Министерству здравоохранения РФ, ФСИН РФ, ФМБА РФ. ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора публикует сведения из своей базы данных в виде ежегодного информационного бюллетеня, который использовался в качестве одного из основных источников информации о заболеваемости и распространённости ВИЧ-инфекции и СПИДа, а также о смертности среди ЛЖВС. Данная информация была использована для изучения основных показателей эпидемического процесса распространения ВИЧ-инфекции в УФО. Проанализированы данные из 15 информационных бюллетеней.

– Сбор и анализ форм федерального статистического наблюдения. В отношении ВИЧ инфекции в учреждения Роспотребнадзора предоставляется форма федерального государственного статистического наблюдения №4 «Сведения о результатах исследования крови на антитела к ВИЧ» (Форма №4). Форма федерального государственного статистического наблюдения №61 «Сведения о болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека» предоставляется региональными центрами по профилактике и борьбе со СПИД только в органы исполнительной власти, подведомственные Минздраву России. Таким образом, исследования проводились по результатам анализа Формы №4. Всего было обработано 3 формы из 3-х регионов.

– Проведение специализированных статистических наблюдений. В рамках выполняемого НИР были разработаны формы статистического наблюдения, в соответствие с которыми осуществлялся сбор информации за 2020 г. Сведения были предоставлены Управлениями Роспотребнадзора по Курганской области, Свердловской области и Ханты-Мансийскому автономному округу-Югра.

– Изучены и систематизированы статистические данные из государственных докладов Главных государственных санитарных врачей регионов УФО «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения». Всего проанализировано 6 государственных докладов.

Для обследования групп повышенного риска заражения ВИЧ-инфекцией проводились биоповеденческие исследования, включающие в себя анкетирование (интервьюирование) лиц из труднодоступных для обычного исследования социальных групп с привлечением «равных консультантов» – сотрудников некоммерческой организации «Региональный общественный фонд помощи различным категориям населения Свердловской области «Новая Жизнь»., оказывающим меры социальной поддержки за счёт различных грантов и нередко являющихся выходцами из данных социальных групп. Помимо анкетирования необходимым атрибутом биоповеденческого исследования в среде группы риска заражения ВИЧ является экспресс-тестирование на ВИЧ-инфекцию. В процессе исследования обработано 334 анкеты, каждому респонденту было проведено экспресс-тестирование на ВИЧ. Авторская анкета содержала 25 вопросов об использовании рискованных поведенческих практик, способствующих заражению ВИЧ и передаче вируса.

Методология анализа собранных данных включала ретроспективный эпидемиологический анализ, построение математических моделей для прогноза уровня заболеваемости и распространённости ВИЧ-инфекции.

Для определения генотипического пейзажа ВИЧ-1 в УФО и распространённости резистентности ВИЧ провели молекулярно-генетические исследования пациентов из регионов УФО. Для соответствия целям исследования в качестве критериев отбора пациентов в группу использовали следующие показатели: возраст от 18 лет и старше, стадия ВИЧ-инфекции не ниже 3 (в соответствии с клинической классификацией, предложенной В.В. Покровским [38]), неопределяемый уровень вирусной нагрузки в анамнезе с последующим вирусологическим прорывом, уровень вирусной нагрузки > 500 копий РНК ВИЧ в 1 мл, приём антиретровирусных препаратов не менее 24 недель. Указанным критериям соответствовали образцы от 223 лиц, состоящих на диспансерном учете по ВИЧ-инфекции в медицинских учреждениях УФО, в том числе: Свердловская область – 27 пациентов, Челябинская область – 76 пациентов, Тюменская область – 59 пациентов, Курганская область – 61 пациент.

Возраст пациентов, включенных в исследование, варьировал от 21 до 64 лет, медиана составила 36 лет, межквартильный интервал (МКИ) от 32 до 41 года. Среди обследованных пациентов лица мужского пола составили 55,6%.

Стадии ВИЧ-инфекции в исследуемой выборке распределились следующим образом: 3 стадия – 13,00%, 4 стадия – 87,00%, в том числе 4А – 44,84%, 4Б – 21,97%, 4В – 20,18%.

Для формирования базы данных последовательностей ВИЧ-1, циркулировавших на территории РФ, из международной базы данных было загружены все последовательности (17 729), найденные при поиске по ключевым словам «HIV-1» [AND] «Russia». Затем из загруженного набора данных были были отобраны последовательности, содержащие ген pol, информацию о регионе и годе получения. Далее проведено генотипирование и определение мутаций полиморфизма и МЛУ с помощью онлайн сервиса сервисы Стэндфордского университета «HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm» (алгоритм Sierra версия 3.1.3 от 08.06.2022, база данных HIVdb версия 9.1 от 02.06.2022). Для проведения филогенетического анализа последовательности из сформированной базы данных, в которых закодирован один и тот же участок генома были выровнены с помощью программы Unipro UGENE с использованием алгоритма ClustalO. После чего полученное выравнивание было кластеризировано с использованием алгоритма NJ при модели замен нуклеотидов LogDet. Уровень bootstrap поддержки оценивали в 1000 повторах.

**2.2 Лабораторные методы исследования**

Лабораторные исследования проводились на базе арбитражной лаборатории диагностики ВИЧ и оппортунистических инфекций Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД.

В ходе выполнения НИР были произведены серологические и молекулярно-генетические методы исследования (таблица 1).

Таблица 1 – Объем лабораторных исследований

| Виды исследования | Количество исследований |
| --- | --- |
| Определение антител классов М, G (IgM, IgG) к вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1/2 и антигена р24 (Human immunodeficiency virus HIV 1/2 + Ag p24) в крови (иммуноферментным методом) | 4104 |
| Определение антител классов М, G (IgM, IgG) к вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1/2 и антигена р24 (Human immunodeficiency virus HIV 1/2 + Ag p24) в крови (методом иммунного блоттинга) | 365 |
| Молекулярно-биологическое исследование плазмы крови на концентрацию РНК вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 методом ОТ-ПЦР | 300 |
| Определение мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к АРВП | 100 |
| Тестирование праймеров для секвенирования (ПЦР и электрофорез) | 450 |

С целью выявления антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1 методом ИФА, использовали тест-системы «МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГАТ» производства НПО «Диагностические системы». Для определения спектра антител к антигенам ВИЧ методом иммунного блоттинга использовали тест системы «МПБА БЛОТ-ВИЧ -1, ВИЧ-2» и «ИФА-БЛОТ-ВИЧ-1». Антиген р24 ВИЧ-1 выявляли с помощью тест-систем «ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ». Арбитражные исследования образцов проводили по алгоритму, регламентированному в СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции».

Для определения резистентности ВИЧ биологический материал (плазма крови) доставлялся на исследование в объеме не менее 2 пробирок по 2 мл в замороженном виде с соблюдениями холодовой цепи.

На первом этапе проводилось определение вирусной нагрузки ВИЧ-1.

Определение вирусной нагрузки ВИЧ-1 осуществляли с помощью наборов реагентов «РеалБест РНК ВИЧ количественный», согласно инструкции производителя (АО «Вектор-Бест», Россия) или с помощью наборов реагентов «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» согласно инструкции производителя («ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии» (г. Москва) методом количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией на амплификаторе Rotor-Gene Q («QUIAGEN», Германия).

Размах значений вирусной нагрузки в образцах составил от 2,72 до 6,65 lg копий РНК ВИЧ в 1 мл крови, медиана – 4,41; МКИ от 3,76 до 5,00.

Мутации устойчивости ВИЧ-1 к АРВП выявляли методом секвенирования амплифицированных фрагментов гена pol, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1, с использованием тест-системы «АмплиСенс® HIV-Resist-Seq» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Электрофорез высокого разрешения очищенных фрагментов с флюоресцирующими терминаторами проводили с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США).

В случае вирусной нагрузки менее 1000 копий/мл и/или отсутствия на элекрофореграмме специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК, проводили предварительное ультрацентрифугирование 1,0 мл плазмы в течение 1 ч при скорости центрифуги не менее 24000 g при температуре от 2 до 80°С.

Стандартная методика для выявления резистентности ВИЧ к АРВП на основе генотипирования включала следующие стадии:

1) экстракция (выделение) РНК из клинического материала ‒ плазмы крови,

2) обратная транскрипция,

3) амплификация участков генома ВИЧ-1, кодирующих обратную транскриптазу и протеазу,

4) подготовка и проведение секвенирования включает следующие стадии:

a) проведение и очистка продуктов амплификации от невключившихся нуклеотидов и праймеров;

б) детекция и оценка концентрации очищенных ПЦР- продуктов в агарозном геле.

в) проведение реакции циклического секвенирования;

г) очистка продуктов реакции секвенирования от не включившихся терминаторов;

д) подготовка продуктов реакции секвенирования для проведения автоматической детекции нуклеотидной последовательности;

е) автоматическая детекция нуклеотидной последовательности с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США);

5) Анализ и интерпретация результатов: обработку электрофореграмм и получение консенсусной последовательности осуществляли с использованием программного обеспечения «Деона 1.2.3» (ООО «МАГ»), для дальнейшего анализа использовали сервисы Стэндфордского университета «HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm».

Для поиска и парного выравнивания последовательностей использовался онлайн сервис NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/.

В целях автоматизации процесса обращения к сервису NCBI BLAST была написана процедура на языке программирования Python 3.7.5 с использованием модулей Bio.Blast.NCBIWWW и Bio.SeqIO пакета Biopython 1.75 (https://biopython.org).

Для 223 исследуемых последовательностей было выгружено по 1000 последовательностей с наименьшей генетической дистанцией. Для каждой из этих последовательностей была рассчитана относительная идентичность как доля количества совпадающих сайтов в обеих последовательностях (исходной и выгруженной) от количества сайтов, составляющих сумму длин непрерывных областей парного выравнивания последовательностей. Парное выравнивание исходной и выгруженной из GenBank нуклеотидных последовательностей производилось таким образом, чтобы количество совпадений на области непрерывного выравнивания было максимальным, количество разрывов (вставок) стремилось к нулю и ожидаемое количество точно таких же результатов выравнивания для других последовательностей из GenBank стремилось бы к нулю. Порог относительной идентичности установили на уровнях от 95% до 98%.

В целях совершенствования процесса определения мутаций лекарственной устойчивости при разработке программного обеспечения ConSeqAssembler основной алгоритм включал методику выравнивания коротких последовательностей на референсный геном.

Для выравнивания коротких последовательностей с результатами электрофореграмм использовался автоматический сервис обработки запросов Стэнфордского университета (https://hivdb.stanford.edu/page/webservice/). Выбор указанного ресурса обусловлен тем, что данный сервис основывается на научных данных в области изучения мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ, целенаправленно собираемых более двух десятков лет. Алгоритмы ресурса используют структурированные, аннотированные и проанализированные данные о генотипической лекарственной устойчивости вирусов, выделенных как от АРТ-наивных пациентов, так и от лиц, получающих АРТ. Данные систематически обновляют за счёт агрегирования сведений из многих опубликованных исследований для анализа временных глобальных тенденций в области мутаций лекарственной устойчивости, ответственных за приобретённую и переданную лекарственную устойчивость, создавая тем самым ресурс для клинических и молекулярных эпидемиологов.

Программный продукт ConSeqAssembler был реализован путем создания выполняемого модуля на языке Python 3.7.

**2.3 Статистические методы исследования**

Расчёт доверительных интервалов осуществляли по методу Уилсона для уровня ошибки 1-го типа 0,05 [39]. Для подтверждения статистически значимого различия использовали критерии непараметрической статистики (Хи-квадрат, точный критерий Фишера, критерий Манна-Уитни).

С целью количественной оценки влияния факторов на приверженность к АРТ рассчитывали шансы продолжения приёма препаратов на момент анкетирования и шансы наличия неопределяемой вирусной нагрузки ВИЧ-1. Шансы рассчитывались как отношение числа имеющих признак респондентов (*N1*) к числу не имеющих (*N0*).

Для оценки влияния предикторов использовася стандартный аппарат теории обобщенных линейных моделей (GLM) [40] – логит-регрессия.

Для кластерного анализа результатов анкетирования использовался метод k-средних и построение иерархической дендрограммы по методу полных связей.

Статистическая обработка результатов и их визуализация проведены с использованием пакета прикладных программ STATISTICA (data analysis software system), version 12 (StatSoft Inc), PAST 4.0 [41].

Формирование консенсусных последовательностей из данных, полученных в результате секвенирования исследуемых образцов с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США), использовалось программное обеспечение MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, Unipro UGENE (Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics 2012 28: 1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091) и специальное прикладное программное обеспечение собственной разработки (на языке программирования Python 3.7) для анализа результатов секвенирования.

Определение списка мутаций и их влияния на резистентность к АРТ препаратам производилось при помощи сервиса Стэндфордского университета «HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm» (алгоритм Sierra, база данных HIVdb).

**3 Процесс теоретических исследований**

**3.1 Мониторинг эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в УФО**

**3.1.1 Заболеваемость ВИЧ-инфекцией и охват медицинским освидетельствованием на ВИЧ в УФО**

В 2021 году Уральский федеральный округ остался в числе самых неблагополучных по ВИЧ-инфекции регионов среди всех федеральных округов Российской Федерации. В 2021 году Уровень заболеваемости в УФО оказался самым высоким в Российской Федерации и составил 75,9 случаев на 100 тыс., что выше среднероссийского показателя на 82,9%. (рисунок 1).

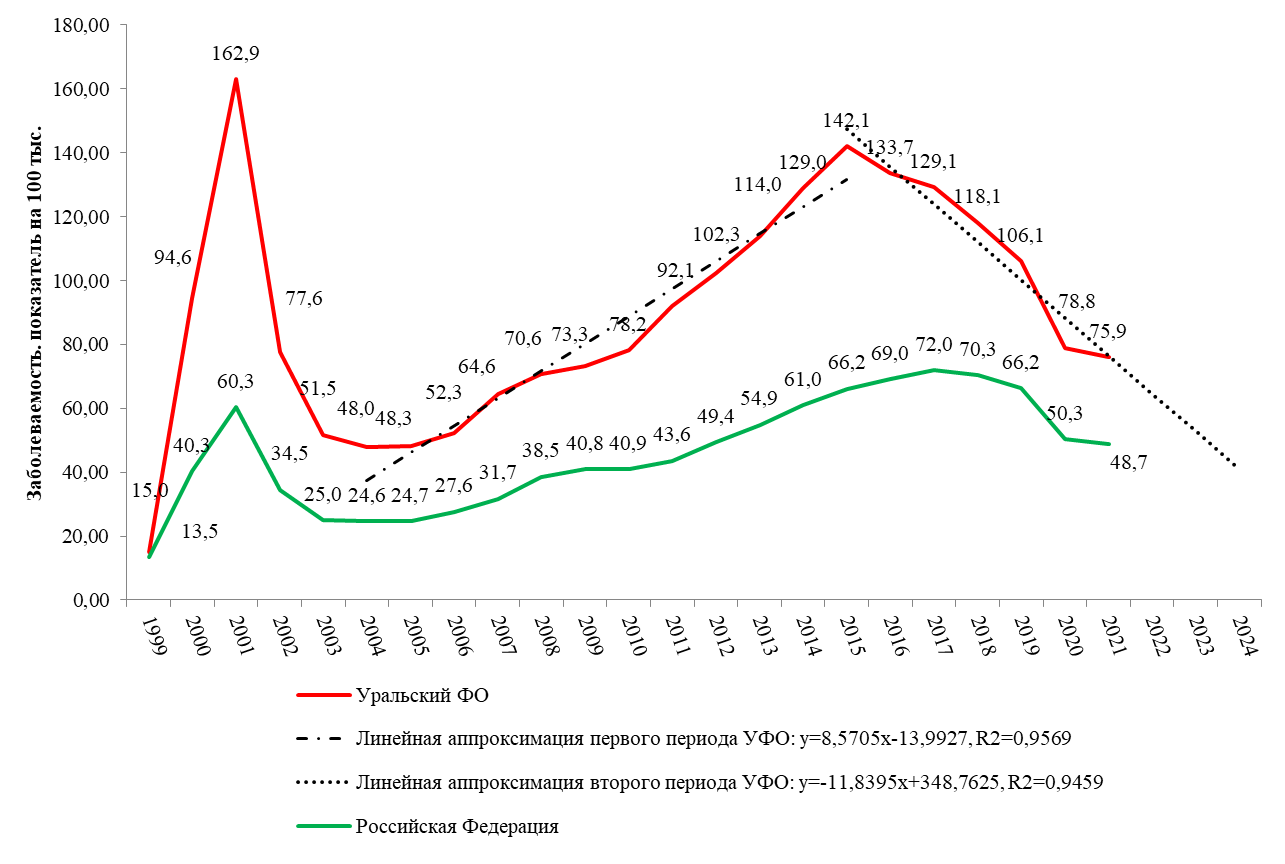


Рисунок 1 – Динамика заболеваемости ВИЧ и тренды в УФО и РФ за период 1999-2021 гг. (на 100 000 населения)

Следует отметить, что с 2015 года в УФО наблюдалась статистически значимая тенденция к снижению заболеваемости ВИЧ-инфекцией (тест Манна-Кендалла: S = –21, p = 0,0002). Среднегодовой темп снижения заболеваемости в период с 2015 по 2021 гг. составил 9,9%. Линейная аппроксимация достаточно точно описывает сформировавшийся тренд по формуле линейной регрессии (1)

(1)

где y – заболеваемость ВИЧ-инфекцией, x – год.

При сохранении тенденции к 2024 году в УФО уровень заболеваемости достигнет 40,9°/₀₀₀₀.

Средний многолетний уровень заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Уральском федеральном округе за период с1999 по 2021 год составил 89,5°/₀₀₀₀, что превышает среднероссийский показатель 45,8°/₀₀₀₀ населения в 1,9 раза. Среднемноголетний темп прироста заболеваемости ВИЧ-инфекцией в УФО составил 7,6%. В Российской Федерации среднемноголетний темп прироста составил 6,0%.

За весь период наблюдений в динамике заболеваемости ВИЧ-инфекцией в УФО было сформировано 2 локальных максимума – в 2001 году (162,94°/₀₀₀₀) и в 2015 году (142,13°/₀₀₀₀). Снижение уровней локальных максимумов свидетельствует о возникновении факторов, сдерживающего заболеваемость. Основными являются увеличение охвата населения скринингом на ВИЧ и лиц, живущих с ВИЧ антиретровирусной терапией.

Показатель охвата населения скрининговыми исследованиями входит в число целевых показателей, установленных ЮНЭЙДС. Стратегия ЮНЭЙДС предполагает, что к 2025 году 95% ВИЧ-инфицированных лиц должны знать о своем статусе. Как известно, на данный момент ВИЧ-инфекция является заболеванием, которое диагностируется исключительно на основании лабораторных исследований – для постановки диагноза необходимо обнаружить антитела к ВИЧ, антиген ВИЧ-1 и/или РНК ВИЧ, ДНК провируса ВИЧ.

Реальная заболеваемость и распространённость ВИЧ всегда превышает регистрируемую. Мониторинг индикаторов, которые позволяют рассчитывать реальную распространенность ВИЧ-инфекции в популяции, сопряжен с существенными затратами, соответственно его проведение представляется возможным только в рамках отдельных исследований. Постоянное увеличение числа ЛЖВ требует привлечения всё больших ресурсов здравоохранения, что не позволяет поддерживать качество лечебно-диагностических мероприятий на прежнем уровне и приводит к увеличению разницы между регистрируемой и реальной заболеваемостью. Как следствие, растёт число лиц, не знающих о своём статусе, что создаёт условия для ускорения передачи инфекции.

Проанализированы данные, полученные из формы федерального статистического наблюдения №4 «Сведения о результатах исследования крови на антитела к ВИЧ», ежегодных государственных докладов Главных государственных санитарных врачей, а также из информационных бюллетеней Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИД. С использованием метода пошаговой многофакторной линейной регрессии с включением переменных (предикторов).

Построена математическая модель, устанавливающая связь различных предикторов, включая регистрируемые за один, два, три и четыре года до наблюдаемых значений распространенность ВИЧ-инфекции, заболеваемость ВИЧ-инфекцией, заболеваемость СПИДом, охват населения медицинским освидетельствованием на ВИЧ, охват лиц, живущих с ВИЧ диспансерным наблюдением и антиретровирусной терапией (АРТ) с заболеваемостью ВИЧ-инфекцией за период с 2007 по 2021 год в Уральском федеральном округе (УФО). Для учёта существующего тренда, в математическую модель был включен год наблюдения. Установлена статистически значимая связь между заболеваемостью ВИЧ и двумя предикторами: R2 = 0,9484 (*p <* 0,0001), описываемая по формуле (2).

*y(t)* = 6152,933 + 1,267*I(t-1)* – 0,929S*C(t-1)* – 3,058*T(t)*, (2)

где *I(t-1)* – заболеваемость ВИЧ-инфекцией, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений, *SC(t-1)* – охват населения освидетельствованием на ВИЧ-инфекцию, регистрируемый за 1 год до наблюдаемых значений, *T(t)* – год наблюдения в обычном летоисчислении.

Нормальное распределение нестандартизованных остатков (критерий Шапиро-Уилка, W = 0,96, *p* = 0,7) подтверждает наличие линейной ассоциации между независимыми и зависимой переменными. Установлено, что заболеваемость ВИЧ-инфекцией, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений, является опережающим индикатором, связанным с ростом заболеваемости (коэффициент *b* = 1,267, *p* < 0,0001). Охват населения медицинским освидетельствованием на ВИЧ, регистрируемый за 1 год до наблюдаемых значений, оказывает влияние на снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией (*b* = – 0,929, *p* < 0,0001). Фактор времени отражает тренд снижения заболеваемости, начавшийся с 2016 года (*b* = – 3,058, *p* = 0,004). Рассматривая действие установленных предикторов в динамике, можно рассчитать взаимоотношение силы влияния предикторов. Влияние заболеваемости, регистрируемой за 1 год до наблюдаемых значений, на 36,4% превышает влияние охвата населения медицинским освидетельствованием на ВИЧ, регистрируемого за 1 год до наблюдаемых значений.

**3.1.2 Заболеваемость СПИДом в УФО**

Важным показателем, отражающим качество диагностических и профилактических мероприятий в отношении пациентов с ВИЧ/СПИД, свидетельствующем об их раннем активном выявлении, является показатель кумулятивного числа случаев впервые выявленных лиц с ВИЧ-инфекцией на 4 стадии по классификации В.И. Покровского.

На хороплете (рисунок 2) более интенсивно закрашены территории, имеющее наибольшее число новых случаев ВИЧ-инфекции на 4 стадии (СПИД). Срез кумулятивного итога произведён по состоянию на 31.12.2020 г.

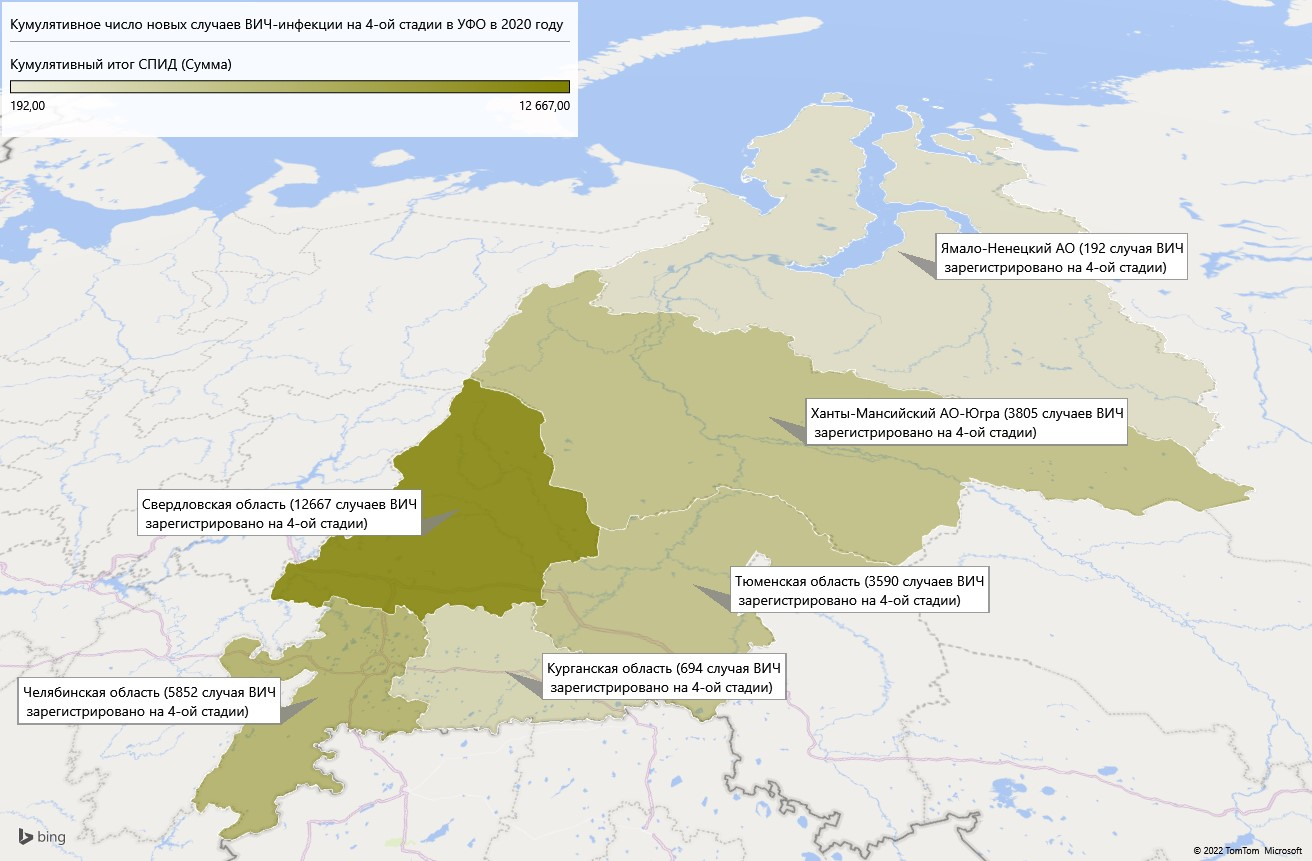


Рисунок 2 – Кумулятивное число новых случаев ВИЧ-инфекции на 4 стадии (СПИД) по состоянию на 31.12.2020 г.

Оценка абсолютных значений числа впервые зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции на 4-й стадии оправдана с точки зрения того, что каждый такой пациент на протяжении 6-8 лет являлся источником инфекции, не зная об этом и формируя неопределённый круг контактных лиц, подвергшихся угрозе заражения. На риск распространения ВИЧ-инфекции по причине существования каждого такого случая не влияют ни численность населения на рассматриваемой территории, ни уровень заболеваемости ВИЧ-инфекции.

За базовый уровень был принят минимальный шанс выявления случаев ВИЧ-инфекции на 4-ой стадии, относительно всех остальных новых случаев ВИЧ, зарегистрированный в Курганской области – 0,098. Относительно базового уровня были рассчитаны относительные шансы выявления ВИЧ-инфекции на стадии СПИД для всех регионов УФО (таблица 2).

Несмотря на то, что шанс выявления случаев ВИЧ-инфекции на 4-ой стадии, относительно всех остальных новых случаев ВИЧ в Свердловской области не самый высокий в УФО, относительный шанс выявления ВИЧ-инфекции на стадии СПИД в данном регионе в 18,3 раза выше базового.

Таблица 2 – Экстенсивные показатели распространения ВИЧ-инфекции, обусловленного поздним выявлением ВИЧ-инфицированных лиц

| Территория УФО | Кумулятивное число впервые выявленных случаев ВИЧ-инфекции, зарегистрированных на 4-ой стадии | Шанс выявления случаев ВИЧ-инфекции на 4-ой стадии, относительно всех остальных новых случаев ВИЧ | Относительный шанс выявления ВИЧ-инфекции на стадии СПИД |
| --- | --- | --- | --- |
| Курганская область | 694 | 0,098 | 1,0 |
| Свердловская область | 12667 | 0,451 | 18,3 |
| Тюменская область | 3590 | 0,497 | 5,2 |
| Ханты-Мансийский АО | 3805 | 0,509 | 5,5 |
| Челябинская область | 5852 | 0,24 | 8,4 |
| Ямало-Ненецкий АО | 192 | 0,146 | 0,3 |

Заболеваемость СПИД в Челябинской области в 2020 году составила 14,84 случая на 100 тыс. человек, что в 2,9 раза ниже показателя 2019 года (43,04 на 100 тыс.).

Заболеваемость СПИД в Свердловской области в 2020 году составила 28,95 случаев на 100 тыс. человек, что на 8,3% выше показателя 2019 года (26,53 на 100 тыс.).

В Ханты-Мансийском автономном округе заболеваемость СПИД в 2020 году составила 19,79 на 100 тыс. населения и была на 4,3% ниже по сравнению с показателем 2019 года (20,68 на 100 тыс.).

Заболеваемость СПИД в Тюменской области в 2020 году составила 28,11 на 100 тыс. населения, что на 3,6% превышает показатель 2019 года (27,12 случаев на 100 тыс. населения).

Выявлена статистически значимая связь (R2 = 0,8816, p < 0,0001) между заболеваемостью СПИД и единственным предиктором – распространенностью ВИЧ-инфекции, регистрируемой за 1 год до наблюдаемых значений (формула 3).

y(t) = – 15,164 + 0,0323*P(t-1)*, (3)

где *P(t-1)* – распространенность ВИЧ-инфекции, регистрируемой за 1 год до наблюдаемых значений.

Остатки (разница между наблюдаемыми и предсказанными моделью значениями) имели нормальное распределение (критерий Шапиро-Уилка, W = 0,91, p = 0,2), что подтверждает надёжность полученной математической модели. В соответствии с данной моделью, распространенность ВИЧ-инфекции, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений, является опережающим индикатором, влияющим на рост заболеваемости СПИД (коэффициент b = 0,0323, p < 0,0001)

Распространённость ВИЧ-инфекции, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений, является главным фактором, который в течение последних 14 лет непрерывно влияет на рост заболеваемости СПИД. Снижение заболеваемости СПИД требует комплексного подхода, направленного на снижение бремени вирусной нагрузки ВИЧ на популяцию за счёт расширения охвата медицинским освидетельствованием, а также своевременного и вирусологически эффективного лечения всех ЛЖВС.

**3.1.3 Результаты работы по мониторингу эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в УФО за 1999-2021 год**

Результаты статистического наблюдения также были использованы при подготовке научных статей, опубликованных в рецензируемых научных изданиях (Приложение А).

Анализ эпидемиологической ситуации в отношении ВИЧ-инфекции в УФО с учетом многолетней динамики показателей и данных за 1999-2021 гг., позволил выявить следующие особенности эпидемического процесса распространения ВИЧ-инфекции в УФО:

1. В УФО на протяжении последних 7 лет (с 2015 по 2021 год) отмечается снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией со 142,13°/₀₀₀₀ до 75,9°/₀₀₀₀ со среднегодовым темпом снижения 9,9%. Прогнозируется дальнейшее снижение уровня заболеваемости с достижением в краткосрочной перспективе уровня 40,9°/₀₀₀₀.

2. Влияние медицинского освидетельствования на снижение заболеваемости ВИЧ-инфекции нивелируется ростом заболеваемости. Темп прироста показателя охвата населения освидетельствованием на ВИЧ должен превышать рост заболеваемости как минимум на 36,4%, чтобы обеспечивать снижение заболеваемости ВИЧ в краткосрочной перспективе.

3. Заболеваемость ВИЧ-инфекцией, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений, и охват населения медицинским освидетельствованием на ВИЧ, регистрируемый за 1 год до наблюдаемых значений, являются опережающими показателями с разнонаправленным влиянием, при этом заболеваемость, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений является предиктором роста большей силы (коэффициент b = 1,267, p < 0,0001), чем охват освидетельствованием (*b* = – 0,929, *p* < 0,0001).

4. Растёт число лиц, впервые выявляемых на поздней 4-й стадии ВИЧ-инфекции (СПИД). С 2007 по 2020 год заболеваемость СПИДом выросла в 22 раз с 0,95°/₀₀₀₀ до 21,06°/₀₀₀₀. В Свердловской области относительный шанс выявления ВИЧ-инфекции на стадии СПИД в 18,3 раза выше базового (установленного в Курганской области), а кумулятивное число таких случаев достигло в 2020 году 12 667. Данные показатели характеризуют УФО и, особенно, Свердловскую область как территории с высоким риском распространения ВИЧ-инфекции лицами, не знающими о своём ВИЧ-статусе.

5. Распространённость ВИЧ-инфекции, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений заболеваемости СПИД, является опережающим индикатором и главным фактором, который в течение последних 14 лет непрерывно влияет на рост заболеваемости СПИД (коэффициент b = 0,0323, p < 0,0001).

Снижение заболеваемости СПИД требует комплексного подхода, направленного на снижение бремени вирусной нагрузки ВИЧ на популяцию за счёт расширения охвата медицинским освидетельствованием, а также своевременного и вирусологически эффективного лечения всех ЛЖВС.

**3.2 Биоповеденческие исследований среди населения УФО**

**3.2.1 Биоповеденческие исследования среди лиц, освободившихся из учреждений уголовно-исполнительной системы УФО**

Биоповеденческие исследования были проведены в период с февраля 2020 по март 2022 года Уральским окружным центром по профилактике и борьбе со СПИД совместно с сотрудниками Регионального общественного фонда помощи различным категориям населения Свердловской области «Новая жизнь» и включали анкетирование 334 лиц, освободившихся из мест лишения свободы в течение последнего года.

На момент анкетирования лица из мест лишения свободы для получения социальной поддержки и медицинской помощи самостоятельно обращались в некоммерческую организацию, где им предлагалось на анонимной основе пройти анкетирование. Дополнительно лицам, живущим с ВИЧ/СПИД, предоставляли подробную информацию об особенностях и порядке диагностики и лечения ВИЧ-инфекции, оказывали психологическую помощь, мотивировали к приверженности антиретровирусной терапии (АРТ) и отказу от рискованного поведения. Для анкетирования разработаны 2 анкеты: 1) для лиц, имевших опыт тюремного заключения (общая анкета) и 2) для лиц, имевших опыт тюремного заключения и живущих с ВИЧ (анкета для ЛЖВ). Анкета для ЛЖВ помимо социальных параметров (семейное положение, социальный статус и т.д.) и общей информации о предполагаемых факторах риска заражения ВИЧ до и в период отбывания наказания, а также сведениях об информированности по вопросам ВИЧ-инфекции, дополнительно включала информацию о месте и периоде заражения, приверженности к АРТ, фактическом приёме антиретровирусных препаратов в исправительных учреждениях и после освобождения.

В анонимном анкетировании приняли участие 302 мужчины.

Средний возраст респондентов, включенных в наблюдательное аналитическое поперечное исследование составил 38,85 ± 7,23 лет. Никогда не состояли в браке 45,7% респондентов (95 % ДИ [40,2 – 51,3]), находились в незарегистрированном браке – 20,2% (95 % ДИ [40,2 – 51,3]), в официальном браке – 18,9% (95 % ДИ [14,9 – 23,7]), были разведены или овдовели – 15,2% (95 % ДИ [11,6 – 19,7]). У 48,7% (95 % ДИ [43,1 – 54,3]) имелись дети. Основную долю анкетируемых лиц составляли люди лица со средним, средним специальным и незаконченным высшим образованием – 64,2% (95 % ДИ [58,7 – 69,4]), имели высшее образование 7,0% (95 % ДИ [4,6 – 10,4]). В коммерческой сфере деятельности до заключения под стражу работали 29,6% (95 % ДИ [24,7 – 35,1]), в бюджетной сфере – 11,8% (95 % ДИ [8,6 – 15,9]). На долю безработных пришлось 58,6% (95 % ДИ [52,9 – 64,0]). Число судимостей варьировало от 1 до 10 с медианой числа судимостей в общей группе равной трём.

Таким образом, социальный портрет анкетируемого в изучаемой группе выглядел следующим образом: мужчина в возрасте 39 лет, имеющий среднее, среднее специальное или незаконченное высшее образование, холостой, безработный, потребитель инъекционных наркотиков, рецидивист (трижды судимый).

Факторы риска заражения ВИЧ были сгруппированы по механизму передачи инфекции. При их анализе проведена сравнительная характеристика группы ВИЧ-инфицированных с группой лиц, имеющих отрицательный ВИЧ-статус.

Расчёт доверительных интервалов осуществляли по методу Уилсона для уровня ошибки 1-го типа 0,05 [42]. Для подтверждения статистически значимого различия использовали критерии непараметрической статистики (Хи-квадрат, критерий Манна-Уитни). Количественную оценку связи качественных признаков проводили с помощью расчёта отношения шансов (ОШ) и его 95%-ного доверительного интервала.

Полученные данные обрабатывали с помощью программного продукта STATISTICA (data analysis software system), version 12 (StatSoft Inc), и приложения PAST 4.0 [43].

**3.2.2 Результаты исследования среди лиц, освободившихся из учреждений уголовно-исполнительной системы УФО**

На долю безработных пришлось 58,6% (95 % ДИ [52,9 – 64,0]), в связи с этим, шанс встретить потребителя инъекционных наркотиков в данной категории был выше в 1,7 раза, отношение шансов (ОШ) составило 1,69 (95 % ДИ [1,02 – 2,82]).

Из 302 респондентов только 273 согласились ответить на вопрос об опыте употребления инъекционных наркотиков, из них 194 человека смогли указать стаж приёма. Доля ПИН составила 80,2% (95 % ДИ [71,7 – 82,0]), длительность наркопотребления находилась в диапазоне от 8 месяцев до 31 года с медианой 15 лет и межквартильным интервалом (МКИ) от 7 до 21 года. В группе ПИН, живущих с ВИЧ, медиана стажа приёма наркотиков составила 20 лет, в группе ПИН с отрицательным ВИЧ-статусом оказалась меньше на 13 лет (U=1702,5, Z=6,205, p = 0; n1=137 (ЛЖВ), n2=57).

Из 197 респондентов, имевших опыт потребления инъекционных наркотиков, продолжили их употреблять в исправительных учреждениях 57 человек (28,9%, 95 % ДИ [23 – 35,6]), 3 человека (1,5%, 95 % ДИ [0,5 – 4,4]) впервые начали употребление в период отбывания наказания. Таким образом, только 137 ПИН (69,5%, 95 % ДИ [62,8 – 75,5]) прекратили употребление в исправительных учреждениях.

На вопрос о том, видел ли респондент употребление инъекционных наркотиков в период отбывания наказания, согласились ответить 243 человека. При этом утвердительный ответ о данных фактах в исправительных колониях получен от 77 человек (31,7%, 95 % ДИ [26,2 – 37,8]), в СИЗО – от 30 человек (12,4%, 95 % ДИ [8,8 – 17,1]). Таким образом, 102 человека (42,0%, 95 % ДИ [35,9 – 48,3]) или каждый второй респондент, заключённый под стражу, были свидетелями употребления инъекционных наркотиков, из них 60 человек сами употребляли наркотические средства.

Опыт употребления инъекционных наркотиков является крайне серьёзным фактором риска заражения ВИЧ. Из 174 ЛЖВС, ответивших на вопрос об опыте приёма наркотиков, 164 человека (94,3%, 95 % ДИ [89,7 – 96,8]) признались, что употребляли их до заключения под стражу и/или в исправительных учреждениях, в группе лиц с отрицательным ВИЧ-статусом число ПИН составило 55 человек (55,6%, 95 % ДИ [45,7 – 65]). ПИН статистически значимо чаще были инфицированы ВИЧ, чем лица, не имевшие опыта употребления инъекционных наркотиков (χ2 = 59,55, d.f. = 1, p < 0,001). Шанс заражения ВИЧ среди ПИН был в 13 раз выше (ОШ=13,12, 95 % ДИ [6,19 – 27,82]).

Лица, сообщившие об употреблении наркотиков в исправительных учреждениях, имели на одну судимость больше (U=4369,5, Z=2,824, p = 0,0047; n1=60 (ПИН в ИУ), n2=191) и на 7 лет дольше принимали наркотические средства (U=3250,5, Z=2,136, p = 0,0327; n1=60 (ПИН в ИУ), n2=134). Из 179 ЛЖВ 139 человек (77,7%, 95 % ДИ [71 – 83,1]) считали, что заразились ВИЧ при внутривенном употреблении наркотиков.

Из 300 респондентов 183 человека (61,0%, 95 % ДИ [55,4 – 66,3]) наносили татуировки в исправительных учреждениях. В группе ВИЧ-инфицированных лиц данный факт в 1,6 раза встречался чаще (ОШ=1,61, 95 % ДИ [1,00 – 2,58]). Однако никто из них не связывал своё заражение ВИЧ с нанесением татуировок.

Средний возраст начала половой жизни в изучаемой группе анкетируемых лиц составил 15,18 ± 1,98 лет, при этом ПИН начинали половую жизнь на 1 год (в 14 лет по медиане) раньше (U=8381, Z= 3,034, *p* = 0,0024; n1=56, n2=192 (ПИН)). Большинство респондентов – 215 человек (71,2%, 95 % ДИ [65,8 – 76,0]) – имели на протяжении жизни более 10 половых партнёров. Сообщили о половых контактах с ВИЧ-инфицированными партнёрами 168 человек (55,6%, 95 % ДИ [50 – 61,1]), с ПИН – 229 человек (75,8%, 95 % ДИ [70,7 – 80,3]), с секс-работницами – 218 человек (72,2%, 95 % ДИ [66,9 – 76,9]). Признались, что имели гомосексуальные контакты 7 человек (2,3%, 95 % ДИ [1,1 – 4,7]). Каждый второй респондент – 161 человек (53,7%, 95 % ДИ [48,0 – 59,2]) – знал о половых контактах между заключёнными в местах лишения свободы.

При увеличении числа половых партнёров наблюдалась статистически значимая разница между группой ЛЖВ и лиц с отрицательным ВИЧ-статусом (χ2 = 8,06, d.f. = 1, p = 0,005). Из 181 ЛЖВ у 18 (9,9%, 95 % ДИ [6,4 – 15,2]) было более 20 партнёров, в то время как из 121 респондента без ВИЧ-инфекции только у двоих (1,7%, 95 % ДИ [0,5 – 5,8]).

В группе ЛЖВ 142 человека (79,3%, 95 % ДИ [72,8 – 84,6]) сообщили, что имели половые контакты с ВИЧ-инфицированными партнёрами. Шанс таких контактов среди ЛЖВ был в 15 раз выше (ОШ=15,73, 95 % ДИ [8,85 – 27,94]), чем среди лиц, освободившихся из исправительных учреждений с отрицательным ВИЧ-статусом.

Установлены высокие шансы наличия ВИЧ-инфекции среди лиц, имевших половые контакты с ПИН – ОШ=6,87 (95 % ДИ [3,79 – 12,46]) и с больными парентеральными вирусными гепатитами – ОШ=3,48 (95 % ДИ [2,15 – 5,65]). Зная, что ВИЧ передаётся половым путём, 89 респондентов (30,4%, 95 % ДИ [25,4 – 35,9]), в том числе 46 ЛЖВ, признались, что никогда не используют барьерные средства контрацепции, 167 человек (55,3%, 95 % ДИ [49,7 – 60,8]), в том числе 112 ЛЖВ, пользуются презервативом лишь иногда. Среди ЛЖВ 181 человек (87,9%, 95 % ДИ [82,3 – 91,8]) не пользуется презервативами на постоянной основе.

Большинство респондентов после последнего освобождения из мест лишения свободы имело половые контакты: 187 человек (61,9%, 95 % ДИ [56,3 – 67,2]) в течение последнего месяца, 56 человек (18,5%, 95 % ДИ [14,6 – 23,3]) в период от 1 до 6 месяцев до момента анкетирования. Из 181 ЛЖВ 150 (82,9%, 95 % ДИ [76,7 – 87,7]) имели половые контакты в течение 6 месяцев после освобождения, в том числе 41 (22,7%, 95 % ДИ [17,2 – 29,3]) не использовал барьерные средства контрацепции.

Из 179 ЛЖВ только 41 человек (22,9%, 95 % ДИ [17,4 – 29,6]) считает, что заразился ВИЧ-инфекцией половым путём, вместе с тем, из них 25 человек (61,0%, 95 % ДИ [45,7 – 74,3]) имели опыт употребления наркотиков.

Более четверти респондентов – 79 человек (26,3%, 95 % ДИ [21,6 – 31,5]) – имели в прошлом инфекции передающиеся половым путём, при этом статистически значимые различия между группами респондентов с ВИЧ-инфекцией и без ВИЧ-инфекции по данному признаку отсутствовали (χ2 = 2,37, d.f. = 1, p = 0,124).

Пенитенциарная система вносит неоценимый вклад в выявление ВИЧ-инфекции в труднодоступных группах населения. Все бывшие заключённые прошли скрининг на ВИЧ в условиях пенитенциарной системы: в следственном изоляторе (СИЗО), в лечебном исправительном учреждении (ЛИУ), а также в исправительных колониях при получении различных медицинских услуг в медицинских пунктах. До заключения под стражу 169 человек (56,0%, 95 % ДИ [50,3 – 61,4]) никогда не обследовались на ВИЧ, и не знали свой статус, из них у 96 человек (56,8%, 95 % ДИ [49,3 – 64,0]) в пенитенциарной системе был установлен диагноз ВИЧ-инфекции.

Повторные судимости обеспечили динамический скрининг, что ожидаемо увеличило вероятность выявления ВИЧ-инфекции. Лица, имеющие более одной судимости, в 1,8 раза чаще имели положительный ВИЧ-статус (ОШ=1,8, 95 % ДИ [1,01 – 3,21]).

Медиана числа судимостей в группе ЛЖВ составила 3, а в группе лиц с отрицательным ВИЧ-статусом – 2 (U=9398, Z=2,235, p = 0,0254; n1=178 (ЛЖВ), n2=124). Таким образом, ЛЖВ имели больше судимостей и чаще выходили в общую популяцию после отбывания наказания, чем не инфицированные ВИЧ лица.

Анкетирование показало, что респонденты хорошо информированы о путях передачи ВИЧ. Только 39 человек (13,0%, 95 % ДИ [9,6 – 17,2]) назвали пути передачи, через которые ВИЧ не передаётся. Знают о возможности заражения ВИЧ при употреблении инъекционных наркотиков 299 опрошенных (99,3%, 95 % ДИ [97,6 – 99,8]), половым путём – 293 человека (97,3%, 95 % ДИ [94,8 – 98,6]).

Средний стаж ВИЧ-инфекции у респондентов составлял 10 ± 5,5 лет, средний возраст 39±6 лет. Интервал времени между моментом вероятного заражения ВИЧ и моментом диагностики ВИЧ-инфекции в среднем составлял 1,5 года, но в отдельных случаях достигал 8-ми лет.

Важнейшим профилактическим мероприятием по предупреждению распространения ВИЧ является проведение АРТ всем ЛЖВ. Из 179 ЛЖВ на момент анкетирования 29 человек (16,2%, 95 % ДИ [11,5 – 22,3]) оставались АРТ-наивными пациентами. Из них у 5 человек (17,2%, 95 % ДИ [7,6 – 34,5]) диагноз ВИЧ-инфекции был установлен менее 1 года назад, остальные в среднем прожили с ВИЧ-инфекцией 5,5 ± 3,4 года.

Отношение заключённых, имеющих ВИЧ-инфекцию, к АРВП было, в целом, очень позитивное: 134 респондента (74,9%, 95 % ДИ [68,0 – 80,6]) уверены, что только АРВП и помогают в лечении ВИЧ-инфекции. Только 8 человек (4,5%, 95 % ДИ [2,3 – 8,6]) – все из числа АРТ-наивных пациентов – крайне низко оценивали эффективность АРВП или считали, что АРВП не помогают. Планировали пожизненный приём АРВП 163 пациента (93,1%, 95 % ДИ [88,4 – 96]).

Не всем ВИЧ-инфицированным заключённым предлагали приём АРВП в период отбывания наказания: только 143 респондента (81,7%, 95 % ДИ [75,3 – 86,7]) подтвердили, что у них была возможность начать или продолжить лечение по инициативе врача в исправительном учреждении. В общей сложности без АРТ оставались в пенитенциарной системе 66 ЛЖВ (36,9%, 95 % ДИ [30,1 – 44,1]). Из 145 ЛЖВ, оказавшихся в СИЗО, получали АРВП 80 респондентов (55,2%, 95 % ДИ [47 – 63]), из 146 ЛЖВ, отбывавших наказание в исправительных колониях, – 109 пациентов (74,7%, 95 % ДИ [67 – 81]), из 78 пациентов лечебно-исправительных колоний 62 (79,5%, 95 % ДИ [69,2 – 87,0]) сообщили, что получали АРВП. Среди 112 ЛЖВ, этапируемых более 1 дня, получали АРВП 64 человека (57,1%, 95 % ДИ [47,9 – 65,9]).

При нахождении в местах лишения свободы охват АРТ составлял 63,8% (113 респондентов, 95 % ДИ [56,5 – 70,6]). После освобождения, на момент проведения анкетирования, принимали АРВП 135 ЛЖВ (75,4%, 95 % ДИ [68,6 – 81,1]), в том числе 32 (23,7%, 95 % ДИ [17,3 – 31,5]), не получавшие АРВП в период отбывания наказания. Из 44 респондентов, не принимающих АРВП после освобождения, 10 человек (22,7%, 95 % ДИ [12,8 – 37]) получали АРТ в исправительных учреждениях. Шанс находиться на АРТ после освобождения оказался выше в 1,8 раза, чем в пенитенциарной системе (ОШ=1,79, 95 % ДИ [1,14 – 2,83]). Вместе с тем, об отсутствии перерывов в приёме АРВП сообщили только 50 респондентов (33,3%, 95 % ДИ [26,3 – 41,2]).

Благодаря тому, что анонимное анкетирование было проведено среди лиц, освободившихся из мест лишения свободы, нам удалось получить более достоверные ответы о парентеральном употреблении наркотиков в период нахождения в исправительных учреждениях. Результаты проведённого исследования подтвердили гипотезу о том, что в пенитенциарной системе реализуется парентеральный путь передачи ВИЧ инфекции, ассоциированный с употреблением наркотиков. В нашем исследовании 29% респондентов подтвердили, что продолжили принимать наркотики в исправительных учреждениях, а 42% были свидетелями фактов внутривенного введения наркотиков в период отбывания наказания. Считается, что это умеренный уровень распространённости инъекционного употребления наркотиков в тюрьмах [44]. Умеренные уровни использования инъекционных наркотиков в тюрьмах были зарегистрированы во Франции (24,2%) [45], Сербии (38,2%) [46], Иране (40,1%) [47] и Индонезии (56%) [48]. Самая высокая распространенность ПИН во время заключения была обнаружена в Мексике (61%) [49], Великобритании (64%) [50], Соединенных Штатах (62,5%) [51], Австралии (82%) [52] и Кыргызстане (82,6%) [53].

Основным и первичным путем заражения ВИЧ-инфицированных заключенных являлся парентеральный путь, связанный с внутривенным введением наркотиков. Половой и парентеральный путь, связанный с нанесением татуировок, имели второстепенное значение.

ВИЧ-положительные заключенные создают тяжелое бремя ВИЧ инфекции для основной популяции формируя потенциал распространения инфекции за счёт реализации полового пути передачи: 82,3% имели половые контакты в первые 6 месяцев после освобождения, при этом более 90% из них не использовали барьерные средства контрацепции. Частая смена половых партнёров (более 10 половых партнёров в течение жизни у 73,5% ЛЖВ), инфекции передающиеся половым путём (у 29,3% ЛЖВ), также свидетельствуют о высоком риске распространения ВИЧ-инфекции в основной популяции.

Охват ЛЖВ АРТ в исправительных учреждениях и после освобождения не соответствует уровню, способному остановить циркуляцию ВИЧ-инфекции, и составляет в исправительных учреждениях 63,8%, после освобождения 75,4%.

Высокая доля (16,2%) АРТ-наивных пациентов среди лиц, освобождающихся из мест лишения свободы, низкая приверженность бывших заключённых к АРТ, характеризующаяся перерывами в приёме у 3 из 4 пациентов, рискованное поведение, пренебрежение средствами барьерной контрацепции создают условия как для распространения ВИЧ-инфекции среди заключённых, так и для активной передачи ВИЧ в основную популяцию.

**3.2.3 Социологическое исследование приверженности к АРТ среди пациентов в Свердловской области**

В обследуемой группе задано 14 вопросов, касающихся внутренней стигмы и 9 вопросов о приверженности. Учитывая, что основной целью приверженности является достижение неопределяемого уровня вирусной нагрузки, то ответ о неопределяемой ВН может служить самостоятельным откликом на фактор воздействия стигмы.

Суммарная оценка внутренней стигмы производилась двумя способами:

– простое сложение положительных ответов для каждого респондента (К\_IS);

– бальная оценка по средневзвешанной величине и сложение баллов для каждого респондента (Баллы\_IS).

Суммарная оценка приверженности производилась аналогично.

Корреляционный анализ, проведённый по всей выборке не выявил ни положительной, ни отрицательной связи (таблица 3).

Для выявления возможных корреляционных связей между внутренней стигмой и приверженностью к АРВТ в отдельных группах респондентов был проведён кластерный анализ.

При разбивке выборки на 2 группы по гендерному признаку ситуация, корреляционных связей между внутренней стигмой и приверженностью также не установлено (таблица 4)

В общем случае кластер-анализ предназначен для объединения некоторых объектов в классы (кластеры) таким образом, чтобы в один класс попадали максимально схожие, а объекты различных классов максимально отличались друг от друга. Количественный показатель сходства рассчитывается заданным способом на основании данных, характеризующих объекты.

Таблица 3 – Матрица ранговых корреляций связи суммарной оценки внутренней стигмы (IS) и приверженности к АРВТ (Adh), с использованием коэффициента корреляции Спирмена

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Переменные | Баллы\_Adh | К\_ Adh |
| Баллы \_IS | R=-0,136111  p<0,05 | R=-0,137888  p<0,05 |
| К\_IS | R=-0,119479  p<0,05 | R-0,119686  p<0,05 |

Примечание: Баллы\_Adh – оценка приверженности в баллах, рассчитанных исходя из средневзвешанной доли положительных ответов на каждый из 9 вопросов о приверженности к АРВТ;

К\_Adh – оценка приверженности по количеству положительных ответов на 9 вопросов о приверженности к АРВТ

Баллы\_IS – оценка внутренней стигмы в баллах, рассчитанных исходя из средневзвешанной доли положительных ответов на каждый из 14 вопросов о внутренней стигме;

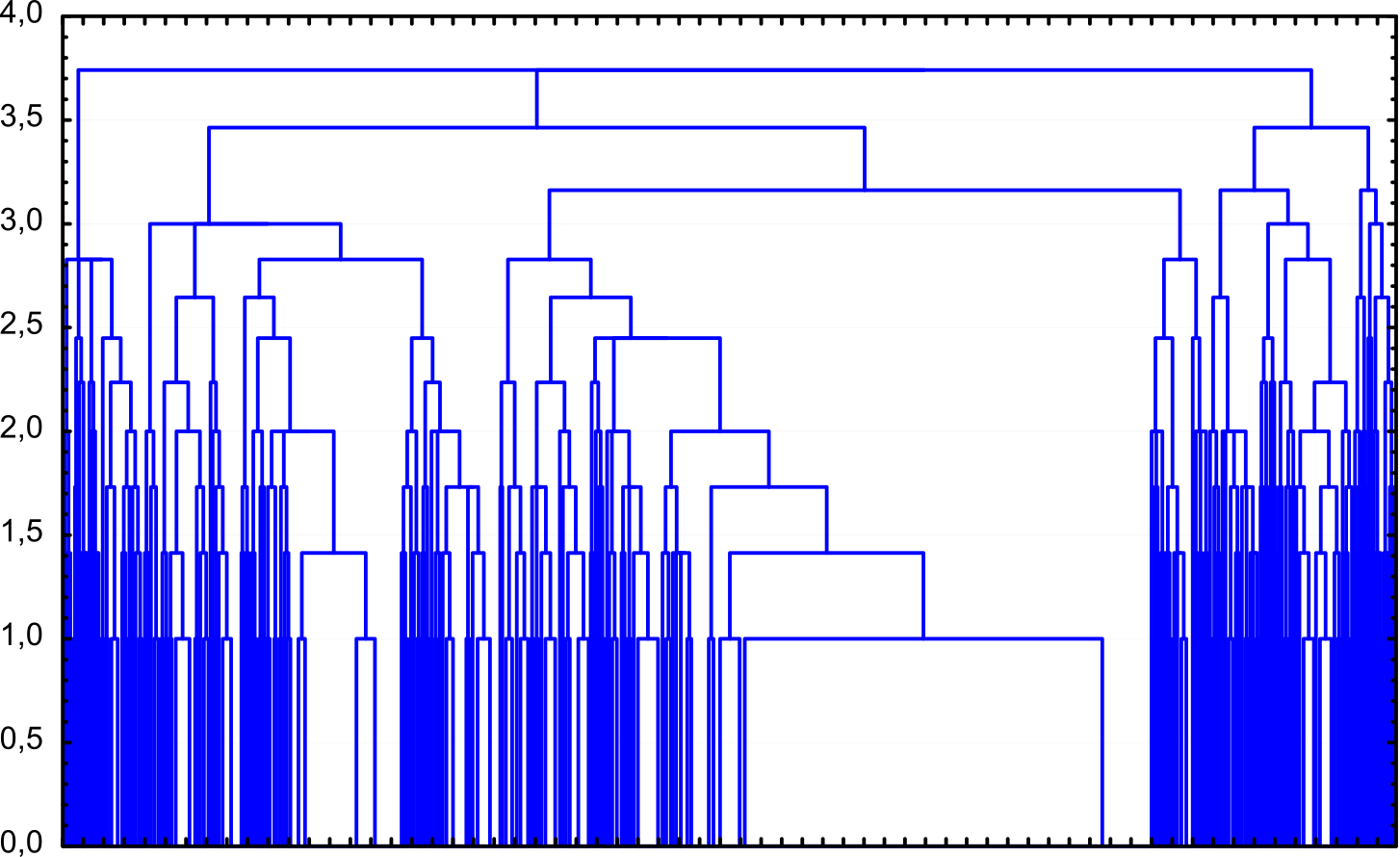
К\_IS – оценка внутренней стигмы по количеству положительных ответов на 14 вопросов о внутренней стигме

Таблица 4 – Матрица ранговых корреляций связи суммарной оценки внутренней стигмы (IS) и приверженности к АРВТ (Adh) с разбивкой по гендерному признаку, с использованием коэффициента корреляции Спирмена

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Переменные | Пол | Баллы\_Adh | К\_ Adh |
| Баллы \_IS | Ж | R=-0,115024 | R=-0,116522  p<0,05 |
| К\_IS | Ж | R=-0,068996 | R=-0,068151 |
| Баллы \_IS | М | R=-0,188683  p<0,05 | R=-0,187591  p<0,05 |
| К\_IS | М | R=-0,187529  p<0,05 | R=-0,186195  p<0,05 |

Все кластерные алгоритмы нуждаются в оценках расстояний между кластерами или объектами, и ясно, что при вычислении расстояния необходимо задать масштаб измерений.

На первом этапе определили, формируют ли респонденты кластеры, которые могут быть осмыслены путём построения иерархического дерева методом полной связи (рисунок 3). Метод полной связи определяет расстояние между кластерами как наибольшее расстояние между любыми двумя объектами в различных кластерах (т.е. "наиболее удаленными соседями"). Мера близости, определяемая евклидовым расстоянием, является геометрическим расстоянием в n- мерном пространстве.



**3**

**2**

**1**

Рисунок 3 – Дендрограмма ответов на вопросы по внутренней стигме, построенная методом полной связи

На дендрограмме видно, что респонденты в ответах по внутренней стигматизации разделились на 3 основных кластера. Ответы на 14 вопросов распределились между кластерами в большинстве случаев неравномерно, что наглядно было продемонстрировано на графике, построенном с использованием метода k-средних (рисунок 4).

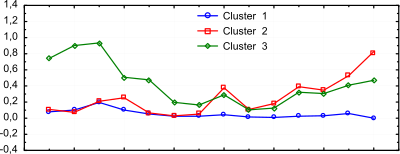


Рисунок 4 – Результаты кластеризации методом k-средних. Различия в частоте ответов на вопросы по внутренней стигме (по оси OY – вопросы)

К первому кластеру было отнесено 327 респондентов, ко второму 138 и к третьему 183

Результаты дисперсионного анализа подтвердили статистически значимые различия между группами, полученными в результате кластерного анализа (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты дисперсионного анализа для определения значимости различия между полученными кластерами (значение р<0,05, что говорит о значимом различии)

| Переменные | Между SS | df | Внутри SS | df | F | p |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Испытываете ли вы сейчас чувство стыда в связи с положительным ВИЧ-статусом? | 56,42153 | 2 | 72,2313 | 645 | 251,9124 | 0,000 |
| Испытываете ли вы сейчас чувство вины в связи с положительным ВИЧ-статусом? | 86,05997 | 2 | 55,1746 | 645 | 503,0276 | 0,000 |
| Обвиняете ли сейчас себя в связи с положительным ВИЧ-статусом? | 70,85152 | 2 | 85,5929 | 645 | 266,9568 | 0,000 |
| Обвиняете ли сейчас других в связи с положительным ВИЧ-статусом? | 19,46784 | 2 | 101,5306 | 645 | 61,8373 | 0,000 |
| Испытываете ли вы сейчас неуважение к себе в связи с положительным ВИЧ-статусом? | 23,12616 | 2 | 70,1686 | 645 | 106,2895 | 0,000 |
| Испытываете ли вы сейчас чувство, что должны быть наказаны в связи с положительным ВИЧ-статусом? | 3,83807 | 2 | 40,6064 | 645 | 30,4824 | 0,000 |
| Испытываете ли вы сейчас желание причинить себе вред, покончить с собой в связи с положительным ВИЧ-статусом? | 2,34382 | 2 | 39,5312 | 645 | 19,1212 | 0,000 |
| Изолировались ли Вы от своей семьи, друзей в связи с положительным ВИЧ-статусом | 13,68992 | 2 | 83,4567 | 645 | 52,9017 | 0,000 |
| Принимали ли Вы решение отказаться / прекратить работать в связи с положительным ВИЧ-статусом | 1,33234 | 2 | 35,3204 | 645 | 12,1652 | 0,000 |
| Отказались ли Вы от образования, обучения в связи с положительным ВИЧ-статусом | 3,43333 | 2 | 43,5528 | 645 | 25,4232 | 0,000 |
| Принимали ли Вы решение не вступать в брак в связи с положительным ВИЧ-статусом | 17,75388 | 2 | 80,6520 | 645 | 70,9917 | 0,000 |
| Принимали ли Вы решение не иметь сексуальных контактов в связи с положительным ВИЧ-статусом | 14,08252 | 2 | 79,8619 | 645 | 56,8683 | 0,000 |
| Принимали ли Вы решение (больше) не иметь детей в связи с положительным ВИЧ-статусом | 27,41904 | 2 | 96,5424 | 645 | 91,5934 | 0,000 |
| Избегали ли Вы обращения за помощью в связи с положительным ВИЧ-статусом | 72,86082 | 2 | 65,4108 | 645 | 359,2314 | 0,000 |

При корреляционном анализе внутри сформированных кластеров корреляционных связей между внутренней стигмой и приверженностью к АРВТ не выявлено (таблица 6).

Таблица 6 – Матрица ранговых корреляций связи суммарной оценки внутренней стигмы (IS) и приверженности к АРВТ (Adh) с разбивкой по кластерам, с использованием коэффициента корреляции Спирмена

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Переменная | Кластеры IS | Баллы\_P | К\_П |
| Баллы \_IS | 1 | R=-0,003739 | R=-0,001615 |
| К\_IS | 1 | R=0,017507 | R=0,017866 |
| Баллы \_IS | 2 | R=-0,004742 | R=-0,015232 |
| К\_IS | 2 | R=0,003808 | R=-0,004330 |
| Баллы \_IS | 3 | R=-0,183118,  p<0,05 | R=-0,189511,  p<0,05 |
| К\_IS | 3 | R=-0,154647,  p<0,05 | R=-0,157940,  p<0,05 |

Статистически значимые различия, связанные с внутренней стигмой, были найдены в группе мужчин. Установлено, что мужчины, сообщившие о неопределяемой вирусной нагрузке ВИЧ (n=172), отвечали положительно на 1 вопрос меньше о внутренней стигме, чем мужчины, имеющие определяемую вирусную нагрузку ВИЧ или не знающие своей вирусной нагрузки ВИЧ (n=182): критерий Манна-Уитни (U)= 13298,5, *p= 0,01448*.

Оценка влияния внутренней стигмы на приверженность также была проведена с использованием логистической регрессии на основе ответов респондентов на 14 вопросов (таблица 7).

Приверженность к АРТ оценивалась по ответу на вопрос о приёме в настоящее время АРВП.

Число респондентов, ответивших на все указанные выше вопросы, составило 573 человека.

Таблица 7 – Вопросы о внутренней стигме с условными обозначениями

| Вопросы о внутренней стигме (IS) | Кодировка |
| --- | --- |
| Испытываете ли вы сейчас чувство стыда в связи с положительным ВИЧ-статусом? | Стыд |
| Испытываете ли вы сейчас чувство вины в связи с положительным ВИЧ-статусом? | Вина |
| Обвиняете ли сейчас себя в связи с положительным ВИЧ-статусом? | Самообвинение |
| Обвиняете ли сейчас других в связи с положительным ВИЧ-статусом? | Обвинение |
| Испытываете ли вы сейчас неуважение к себе в связи с положительным ВИЧ-статусом? | Неуважение |
| Испытываете ли вы сейчас чувство, что должны быть наказаны в связи с положительным ВИЧ-статусом? | Наказание |
| Испытываете ли вы сейчас желание причинить себе вред, покончить с собой в связи с положительным ВИЧ-статусом? | Аутоагрессия |

Продолжение таблицы 7

|  |  |
| --- | --- |
| Вопросы о внутренней стигме (IS) | Кодировка |
| Изолировались ли Вы от своей семьи, друзей в связи с положительным ВИЧ-статусом | Изоляция от семьи |
| Принимали ли Вы решение отказаться / прекратить работать в связи с положительным ВИЧ-статусом | Отказ от работы |
| Отказались ли Вы от образования, обучения в связи с положительным ВИЧ-статусом | Отказ от образования |
| Принимали ли Вы решение не вступать в брак в связи с положительным ВИЧ-статусом | Отказ от брака |
| Принимали ли Вы решение не иметь сексуальных контактов в связи с положительным ВИЧ-статусом | Отказ от секса |
| Принимали ли Вы решение (больше) не иметь детей в связи с положительным ВИЧ-статусом | Отказ от планирования детей |
| Избегали ли Вы обращения за помощью в связи с положительным ВИЧ-статусом | Отказ от обращения за помощью |

Для построения модели логистической регрессии был выбран квази-ньютоновский метод оценки с максимальным числом итераций 50. Полученная модель логит-регрессии не смогла статистически значимо связать влияние внутренней стигмы с приверженностью (χ2=13,95, d.f=14, p=0,4531517). Аналогичный результат получен при оценке приверженности по неопределяемой вирусной нагрузке (χ2=13,81, d.f=14, p=0, 4643874).

Выявлена статистически значимая разница по приверженности к приёму АРВП между лицами, употребляющими наркотики и лицами, никогда их не принимавших (χ2=15,03, d.f=1, p= 0,00012) и лицами, прекратившими их употреблять (χ2=22,14, d.f=1, p< 0,0001). При этом только 15% причин отказа от приёма АРВП были связаны непосредственной с употреблением наркотиков. Большинство лиц – 54% , употребляющих наркотики или употреблявших их ранее, отказывались от приёма АРВП из-за отсутствия мотивации.

Статистически значимой разницы по приверженности к приёму АРВП между лицами получившими и не получившими дотестовое консультирование не выявлено (χ2=0,25, d.f=1, p=0,6166), а также между лицами получившими и не получившими послетестовое консультирование (χ2=0,14, d.f=1, p=0,7097). Вместе с тем, выявлена статистически значимая разница по приверженности к приёму АРВП между лицами, получившими послетестовое консультирование от профильных специалистов по сравнению с лицами, не имевшими такой консультации (χ2=35,16, d.f=1, p<0,0001).

В нашем исследовании вопрос о финансовой стабильности имел 5 вариантов ответов, соответствующих уровням финансового положения (таблица 8**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Приверженность оценивалась по факту приёма АРВП.

Таблица 8 – Варианты ответов соответствующие уровням финансового положения

|  |  |
| --- | --- |
| Ответы на вопрос о финансовом положении (ФП) | Уровень |
| 1. Не хватает денег даже на еду | Очень плохое (ОП) |
| 2. Затруднительно покупать одежду и оплачивать жилищно-коммунальные услуги | Неудовлетво-рительное (Н) |
| 3. Не можем купить товары длительного потребления – бытовую технику, мебель и пр. | Удовлетвори-тельное (У) |
| 4. Не хватает денег на покупку автомобиля, квартиры | Хорошее (Х) |
| 5. Средств достаточно, чтобы купить всё, что считаем нужным | Отличное (О) |

Ответы на вопросы о финансовом положении и приёме АРВП дали 573 респондента, в том числе 80 (13,96%), не принимающих АРВП.

Для проверки гипотезы построена модель логит-регрессии, которую можно описать формулой (4).

|  |  |
| --- | --- |
| АРВП (приём) = exp(1,57308 – 0,6463184\*ОП – 0,2852261\*Н + 0,426897\*У + 1,429769\*Х+1,047958\*О) / (1+ exp(1,57308 – 0,6463184\*ОП – 0,2852261\*Н + 0,426897\*У + 1,429769\*Х+1,047958\*О), | (4) |

где АРВП – положительный ответ на вопрос о приёме антиретровирусных препаратов, ОП, Н, У, Х, О – уровни финансового положения в соответствии с таблицей 8.

C помощью данного уравнения установлено существенное повышение приверженности к приёму АРВП с ростом уровня финансового положения (χ2=32,88; d.f=5; p=0,000004).

Кроме того, видно, что влияние на приверженность к АРВП со стороны предикторов очень плохого ФП (ОП) и неудовлетворительного ФП (Н) – отрицательное, у остальных предикторов – положительное, но хорошее ФП (Х) имеет большее положительное влияние на приверженность, чем отличное ФП (О).

**3.2.4 Результаты биоповеденческих исследований**

Мужчины, сообщившие о неопределяемой вирусной нагрузке ВИЧ (n=172), отвечали о внутренней стигме положительно на 1 вопрос меньше, чем мужчины, имеющие определяемую вирусную нагрузку ВИЧ или не знающие своей вирусной нагрузки ВИЧ (n=182): критерий Манна-Уитни (U)= 13298,5; p= 0,01448

Модель логит-регрессии не позволила статистически значимо связать влияние внутренней стигмы с приверженностью (χ2=13,95, d.f=14, p=0,4531517). Аналогичный результат получен при оценке приверженности по неопределяемой вирусной нагрузке (χ2=13,81, d.f=14, p=0, 4643874)

Внешняя стигма также не оказывает значительного влияния на приверженность к АРВТ (χ2=17,63, d.f=11, p=0,090531) и на оценку АРТ по неопределяемой вирусной нагрузке (χ2=13,497, d.f=13, p=0,4102441)

Статистически значимой разницы по приверженности к приёму АРВП между лицами получившими и не получившими дотестовое консультирование не выявлено (χ2=0,25, d.f=1, p=0,6166), аналогично с послетестовым консультированием (χ2=0,14, d.f=1, p=0,7097)

Лица, получившие консультацию при выявлении у них ВИЧ-инфекции, без участия психолога и/или «равного» консультанта статистически значимо чаще прекращают прием АРВП, чем лица получившие консультацию при участии психолога и/или «равного» консультанта (χ2=7,87, d.f.=1, p= 0,005025)

Лица, употребляющие наркотики чаще лиц, никогда не употреблявших наркотики, прекращают прием АРВП (χ2=15,03, d.f.=1, p= 0,00012). При этом только 14,6% (ДИ 95%: 6,9% – 28,4%) причин отказа от приёма АРВП связаны непосредственно с употреблением наркотиков. 53,7% (ДИ 95%: 38,7% – 67,9%) отказывались от приёма АРВП из-за отсутствия мотивации или недостаточной информированности.

Установлено существенное повышение приверженности к приёму АРВП с ростом уровня финансового положения (χ2=32,88, d.f=5, p=0,000004).

Приверженность к приёму АРВП при очень плохом финансовом положении в 3 раза ниже, при неудовлетворительном финансовом положении в 2 раза ниже, чем среди лиц, имеющих удовлетворительное финансовое положение.

ВИЧ-положительные заключенные создают тяжелое бремя ВИЧ инфекции для основной популяции формируя потенциал распространения инфекции за счёт реализации полового пути передачи: 82,3% имели половые контакты в первые 6 месяцев после освобождения, при этом более 90% из них не использовали барьерные средства контрацепции.

Охват ЛЖВ АРТ в исправительных учреждениях и после освобождения не соответствует уровню, способному остановить циркуляцию ВИЧ-инфекции, и составляет в исправительных учреждениях 63,1%, после освобождения 75,4%.

Высокая доля (16,2%) АРТ-наивных пациентов среди лиц, освобождающихся из мест лишения свободы, низкая приверженность бывших заключённых к АРТ, характеризующаяся перерывами в приёме у 3 из 4 пациентов, рискованное поведение, пренебрежение средствами барьерной контрацепции создают условия как для распространения ВИЧ-инфекции среди заключённых, так и для активной передачи ВИЧ в основную популяцию.

**3.3 Разработка праймеров для секвенирования региона pol генома ВИЧ**

Все доступные в настоящее время тесты (коммерческие и внутренние) не могут успешно амплифицировать 100% тестируемых образцов пациентов [54].

Это связано в первую очередь с тем, что различные субтипы ВИЧ-1 имеют значительные генетические различия [55]. Субтип ВИЧ-1 может влиять на чувствительность вируса к антиретровирусным препаратам, а также характер мутаций резистентности, возникающих после воздействия лекарств. Субтип ВИЧ-1 может также влиять на скорость появления специфических мутаций резистентности после воздействия лекарств [56–58]. Специфические для субтипа различия последовательностей в местах связывания праймеров могут усложнить генотипирование ВИЧ-1, не относящегося к субтипу B [59]. Это означает, что праймеры, используемые для амплификации и секвенирования образцов, должны быть проверены на адекватную работу с необходимыми субтипами.[55]

Другое ограничение неразрывно связано с высокой генетической изменчивостью ВИЧ-1 даже в пределах одного субтипа. Несовпадение праймер-матрица, особенно вблизи 3'-конца праймера, может повлиять на выход продукта ПЦР.  В этом случае идеальный отжиг праймеров ПЦР, используемых в генотипических анализах, не гарантируется, что приводит либо к отсутствию амплификации определенного вирусного варианта, либо к последовательности, которая не является репрезентативной для большинства вирусных популяций в образце плазмы. Последнее может исказить важные терапевтические решения, о назначении терапии, и может привести к запоздалому выявлению неэффективности лечения и развитию лекарственной устойчивости. Поэтому праймеры, используемые в тестировании на лекарственную устойчивость, должны отжигаться в как можно более консервативных участках [60,61].

Осуществление поиска консервативных участков возможно на основании энтропии. Энтропия является мерой изменчивости нуклеотида в определенной позиции выравненной последовательности. Позиция с высокой оценкой энтропии сильно изменчива, в то время как позиция с низкой энтропией высоко консервативна. Значения энтропии для ВИЧ-1 варьируются от ~ 0,01 (высококонсервативный) до ~ 2,7 (гипервариабельный) [62].

Хотя внутренние наборы являются более гибкими, чем коммерческие, особенно потому, что изменения (например, альтернативные праймеры для изменения области исследования) могут быть более легко реализованы при необходимости, существуют некоторые требования. Минимальные области, для которых важен сбор информации о последовательности, должны охватывать следующие участки [55]:

– протеаза: кодоны 10–93;

– обратная транскриптаза: кодоны 41–238.

Внутренние анализы следует внедрять только после соответствующей проверки, включая оценку эффективности анализа с различными субтипами ВИЧ-1, сравнив с результатами, полученными с помощью коммерческого набора. Факторы, которые могут повлиять на качество генотипирования, включают тип используемого анализа/набора, обращение с образцами и их хранение, уровень опыта технических специалистов, выполняющих анализ, гетерозиготность последовательностей и субтипы вируса в клинических образцах [63].

Дизайн праймеров для высоковариабельных последовательностей ДНК сложен, и успех эксперимента требует внимания к разнообразию популяции и локализации праймеров в относительно консервативных регионах, в дополнение к общепризнанным ограничениям, обычно учитываемым при разработке праймеров. При разработке наших праймеров мы попытались учесть все описанные выше нюансы дизайна праймеров для определения генотипической лекарственной устойчивости ВИЧ.

Большинство программных инструментов для создания праймеров основываются на одной последовательности, что может привести к выборочной или предвзятой амплификации из разнообразной популяции.  Поэтому для точной амплификации и секвенирования таких высоко генетически изменчивых организмов как ВИЧ необходимо учитывать множественное выравнивание, представляющее разнообразие интересующей выборки в общем дизайне. Важно размещать праймеры в относительно консервативных областях, ограничивающих интересующую область, и разрабатывать праймеры, которые будут адекватно реагировать на уровень изменчивости, которого нельзя избежать.

Для генерации начального пула праймеров был использован онлайн-сервис для множественного выравнивания субипов ВИЧ и подбора праймеров PrimerDesign[[1]](#footnote-1). Общий рабочий процесс этого программного обеспечения проходит через взаимосвязанные этапы: 1) определяются целевые местоположения для праймеров, руководствуясь оценками энтропии последовательности, 2) оптимизируются температуры плавления праймеров, 3) добавляются адаптеры, 4) оцениваются риски димеризации.

С помощью онлайн-сервиса QuickAlign[[2]](#footnote-2) для выравнивания с последовательностями из базы данных последовательностей ВИЧ и онлайн-ресурса для визуализации карт генов референсной последовательности ВИЧ-1 HXB2 с энтропией и сайтами лекарственой устойчивости JBrowse[[3]](#footnote-3) производился поиск высоко консервативных последовательностей для потенциальных праймеров вручную.  Всего в пуле потенциальных праймеров было 55 кандидатов (из них 19 для первого раунда, 22 для второго раунда и 14 для секвенирования), длина которых варьировалась от 18 до 28 п.н. и GC-состав от 40 до 58%. Эти потенциальные праймеры разбивались на всевозможные пары и отбирались по T m и риску димеризации.

Тесты праймеров *in silico* проводились на веб-ресурсе Oligo Analyzer[[4]](#footnote-4) версии 3.1 от IDT, где производился расчет температур плавления и предсказание вторичных структур праймеров, а также тенденции само- и гетеродимеризации. Температура плавления праймера T m являлась исключающим параметром и оценивалась по эмпирической модели ближайшего соседа, принимая во внимание концентрацию магния 3 mM и концентрацию праймера 0,4 мкМ. Если разница в T m между потенциальными прямым и обратным праймерами находилась в диапозоне максимально допустимого предела (≤5°C), то эта пара праймеров добавлялась в список потенциальных пар и отправлялась на оценку риска димеризации. Потенциальный риск гомо- и гетеродимеризации оценивался между всеми конструкциями праймеров, которые будут участвовать в одной и той же реакции. При участии в формировании димера любого вида 3’-конца хотя бы одного из праймеров пара праймеров исключалась из списка.

Проверка на специфичность проводилась посредством онлайн-ресурса blastn[[5]](#footnote-5) из семейства NCBI BLAST, которая осуществляет поиск похожих последовательностей ДНК из базы данных ДНК.

Проверка на чувствительность проводилась с помощью специально для этой цели разработанного программного модуля, реализованного на языке Python 3.7. Модуль выполняет автоматизированную проверку чувствительности разрабатываемых праймеров на произвольном наборе аннотированных референсов генома ВИЧ. Программный модуль позволяет оценить с какой вероятностью и в какой области отдельный референс или группа референсов будет наилучшим образом гибридизироваться в процессе амплификации.

По результатам проверки праймеров на основе коллекции, включающей полные геномы ВИЧ, представляющие все известные субтипы и циркулирующие рекомбинантные формы, установлено что разработанные праймеры имеют высокий уровень комплементарности к подавляющему большинству геномов ВИЧ, особенно на участке, охватывающем 5 нуклеотидов на 3`-конце праймера (таблица 9). В нашей работы был использован праймер «GCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGG», подобранный по данным литературы [64] Полученные результаты анализа «in silica» по чувствительности праймеров находятся в приложении В.

Таблица 9 – Результаты тестирования чувствительности праймеров «in silicо»

| Праймер | Геномы в сравнении (n) | Среднее совпадение по позициям | Среднее квадратичное отклонение | Идеальное совпадение | Идеальное совпадение на 3`-конце | 95% ДИ НГ | 95% ДИ ВГ |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ПЦР-реакция | | | | | | | |
| a | 4661 | 4431,46 | 402,22 | 28,86% | 93,80% | 93,07% | 94,46% |
| b | 4662 | 4464,33 | 376,47 | 30,27% | 98,11% | 97,68% | 98,47% |
| l | 4662 | 4463,81 | 296,96 | 27,54% | 92,79% | 92,01% | 93,50% |
| m | 4662 | 4526,74 | 181,55 | 47,47% | 87,92% | 86,96% | 88,83% |

Продолжение таблицы 9

| Праймер | | Геномы в сравнении (n) | Среднее совпадение по позициям | | | Среднее квадратичное отклонение | | Идеальное совпадение | | Идеальное совпадение на 3`-конце | 95% ДИ НГ | | 95% ДИ ВГ |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ПЦР-реакция | | | | | | | | | | | | | |
| c | | 4662 | 4512,9 | | | 273,18 | | 50,09% | | 98,11% | 97,68% | | 98,47% |
| c | | 4662 | 4512,9 | | | 273,18 | | 50,09% | | 98,11% | 97,68% | | 98,47% |
| e | | 4662 | 4461,52 | | | 384,42 | | 30,42% | | 73,85% | 72,57% | | 75,09% |
| f | | 4662 | 4579,6 | | | 238,08 | | 70,08% | | 94,96% | 94,29% | | 95,55% |
| g | | 4662 | 4545,5 | | | 247,78 | | 56,09% | | 86,06% | 85,03% | | 87,02% |
| h | | 4662 | 4505,25 | | | 470,46 | | 44,49% | | 91,93% | 91,12% | | 92,68% |
| k | | 4662 | 4485,13 | | | 327,12 | | 35,44% | | 89,00% | 88,07% | | 89,86% |
| Секвенирующая реакция | | | | | | | | | | | | | |
| bb | 4662 | | | 4540,33 | 227,71 | | 58,26% | | 92,36% | | 91,57% | 93,09% | |
| gg | 4662 | | | 4609,65 | 123,97 | | 80,16% | | 89,45% | | 88,53% | 90,30% | |
| cc | 4662 | | | 4579,6 | 238,08 | | 70,08% | | 94,96% | | 94,29% | 95,55% | |
| jj | 4662 | | | 4515,63 | 257,48 | | 52,57% | | 91,93% | | 91,12% | 92,68% | |
| ii | 4662 | | | 4562,92 | 164,35 | | 63,64% | | 92,88% | | 92,10% | 93,58% | |
| nn | 4662 | | | 4614,88 | 118,93 | | 85,07% | | 88,37% | | 87,42% | 89,26% | |
| mm | 4662 | | | 4539,45 | 360,41 | | 55,75% | | 99,53% | | 99,29% | 99,69% | |
| rr | 4662 | | | 4593 | 115,8 | | 76,92% | | 91,93% | | 91,12% | 92,68% | |

Всего для двух раундов реакций амплификации разработано 9 праймеров и десятый праймер подобран по данным литературы, которые в одной области покрытия могут быть комбинированы между собой в рамках групп Раунд I (покрытие PR и RT) и Раунд II (покрытие RT) всеми возможными способами без явлений значимой димеризации (Приложение Г). Для подбора оптимальных пар праймеров с точки зрения отсутствия димеризации оценивали отношение самой низкой энергии Гиббса для возможного гетеродимера к минимальной энергии Гиббса для абсолютно комплементарной матрицы (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты анализа пар праймеров на образование гетеродимеров

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Комбинация | delta G max | delta G dimer | Процент dimer/max % |
| a+l | -51,67 | -6,24 | 12,07 |
| a+m | -52,01 | -9,15 | 17,59 |
| b+l | -52,98 | -6,24 | 11,78 |
| l+m | -52,98 | -9,15 | 17,27 |
| f+h | -39,52 | -7,71 | 19,51 |
| g+h | -46,18 | -7,71 | 16,70 |
| f+k | -41,95 | -9,21 | 21,96 |
| g+k | -46,18 | -9,21 | 19,94 |

Наиболее выгодные комбинации, с точки зрения минимизации образования гетеродимеров образуют праймеры b+l для первого раунда и g+h для второго раунда. Расчет энергии Гиббса проведен с использованием сервиса OligoAnalyzer™ Tool. Результаты расчета энергии Гиббса для каждой пары праймеров приведены в приложении Г.

Праймеры первого раунда вложенной ПЦР (прямые «a» и «b», обратные «l» и «m») используются для наработки длинного фрагмента матрицы, обеспечивающего полное покрытие участков гена *pol*, кодирующих PR и RT. Праймеры второго раунда фланкируют два более которких фрагмента, находящихся в пределах первого ампликона, один фрагмент для поркытия участка, кодирующего PR (прямой «c» и обратный «e» праймеры), и второй для покрытия участка, кодирующего RT ( прямые праймеры «f» и «g», обратные праймеры «h» и «k»). В аннотации использовались однобуквенные коды нуклеотидных оснований в соответствии со стандартной номенклатурой IUPAC (Таблица 11).

Праймеры были разработаны на основе Filtered Web Alignments всех доступных последовательностей ВИЧ-1 субтипа A от Los Alamos National Laboratory. Высоко консервативные основания были определены как идентичные на ≥99% во всех последовательностях субтипа A. Праймеры были размещены таким образом, что все последние пять нуклеотидов с 3’-конца были высоко консервативными. В двух случаях (праймеры «e» и «l») было допущено содержание вырожденных оснований на 3’-конце, добавленных максимально в одно положение для достижения 3’-консервативности ≥99% (таблица 11).

Таблица 11 – Последовательности праймеров для двух раундов вложенной ПЦР

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Область покрытия | Название | Последовательность (5'–3') | Тип | Длина |
| Раунд I (покрытие PR и RT) | a | GCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGG | Forward | 24 |
| b | TA\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GG | Forward | 27 |
| l | AC\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*TA | Reverse | 28 |
| m | CT\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GC | Reverse | 28 |
| Раунд II (покрытие PR) | c | AА\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GG | Forward | 20 |
| e | GG\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*CT | Reverse | 24 |
| Раунд II (покрытие RT) | f | AT\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GG | Forward | 20 |
| g | TA\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*CA | Forward | 24 |
| h | TC\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GT | Reverse | 20 |
| k | TT\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*AA | Reverse | 23 |

Прямые праймеры для первого раунда и прямой праймер для второго раунда покрытия PR расположены в области гена *gag*. Обратный праймер покрытия PR расположен на участке гена *pol*, кодирующем ревертазу, таким образом во втором раунде при генерации ампликона RT праймерами фланкируются все 99 кодонов протеазы. Прямые праймеры второго раунда покрытия RT расположены на участке гена *pol*, кодирующем протеазу, обратные – на участке, кодирующем ревертазу, что обеспечивает покрытие с 1 по 408 (или 439) кодон ревертазы (необходимая минимальная зона покрытия 41–238) (рисунок 5).

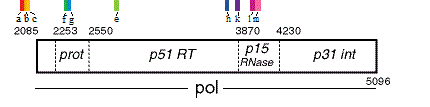


Рисунок 5 – Расположение праймеров относительно референса генома ВИЧ-1 HXB2

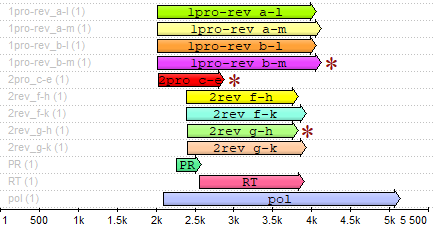
Результаты тестов *in silico* представлены в таблице, где отражен GC-состав и расчетные температуры плавления праймеров. При определении температур плавления с корректировкой по концентрации солей концентрация магния принималась 3мМ, олигонуклеотида 0,3мкМ (в соответствии со значениями состава готовой смеси для ПЦР ScreenMix-HS) (таблица 12).

ПЦР in silico проводилась с ограничениями для каждого праймера: максимальное несоответствие с матрицей 3 нуклеотида, 3’-концевое идеальное совпадение 5 нуклеотидов.

Таблица 12 – Параметры праймеров для вложенной ПЦР

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Область покрытия | Название | GC, % | Tm, °C | Tm, °C  (с корректировкой по концентрации солей) |
| Раунд I (покрытие PR и RT) | a | 58,3 | 62,3 | 68,5 |
| b | 44,4 | 59,5 | 68,1 |
| l | 42,9 | 59,4 | 66,1 |
| m | 44,6 | 59,3 | 67,7 |
| Раунд II (покрытие PR) | c | 50 | 55,9 | 64,3 |
| e | 41,6 | 54,5 | 63,6 |
| Раунд II (покрытие RT) | f | 50 | 53,8 | 63 |
| g | 41,7 | 55,7 | 62,7 |
| h | 55 | 58,8 | 65,6 |
| k | 46,5 | 58,3 | 64,1 |

Для исследования in vitro было синтезировано по одной паре праймеров на одно покрытие, остальные пары праймеров являются альтернативным (рисунок 6).



pol – участок генома ВИЧ, соответствующий гену pol, PR - участок гена pol, кодирующий протеазу, RT - участок гена pol, кодирующий ревертазу, 1pro-rev - ожидаемые продукты первого раунда, 2pro - ожидаемый продукт второго раунда для участка, кодирующего протеазу, 2rev – ожидаемые продукты второго раунда для участка, кодирующего ревертазу

Рисунок 6 – Схематическое изображение ожидаемых продуктов двух раундов вложенной ПЦР, полученное в результате тестирования *in silico* на программном продукте UGENE

Критерием удовлетворительной работы праймеров для вложенной ПЦР служило наличие ПЦР-продукта после двух раундов амплификации, детектируемое методом гель-электрофореза, для фрагмента PR ожидаемая длина бэнда 819 п.н., для RT – 1494 п.н.

Для определения оптимальной температуры отжига для пар праймеров была проведена амплификация трех образцов в градиенте температур. Первый раунд проводился в четырех градиентах от 52°C до 58°C с шагом в 2°C. Второй раунд проводился для каждого потенциально полученного в первом раунде продукта в градиенте температур отжига с 50,5°C до 56,5°C с шагом в 2°C.

Оптимальным значением температуры отжига для первого раунда амплификации было признано значение 56°C. Предварительная температура отжига второго раунда ≈ 50,5°C. Была произведена постановка девяти образцов (первый раунд проводился при 56°C) в градиенте температур отжига - 50,0°C, 50,5°C, 51,0°C, 51,5°C, 52,0°C. Оптимальная температура отжига второго раунда - 51,5°C, при данном значении детектируются специфические продукты для пары праймеров «c» и «e» длиной ≈800п.н.

Для изучения выявленных фрагментов и подтверждения их принадлежности к участку кодирующему протеазу ВИЧ-1 проводилось секвенирование с помощью пары праймеров «bb» и «gg». При терминирующей реакции секвенирования праймер задает отправную точку и направление для синтеза фрагментов ДНК разной длины, меченных флуоресцентными красителями. Праймеры для секвенирования подбирались из расчета эффективного чтения длиной в 500 п.н. (таблица 13).

Таблица 13 – Последовательности праймеров, разработанных для секвенирования

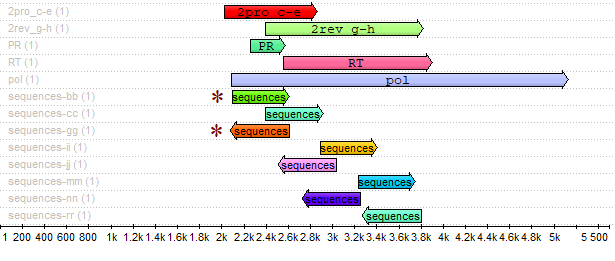
|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Секвенируемая область | Название | Последовательность (5'–3') | Тип | Длина |
| PR | bb | TA\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*TT | Forward | 18 |
| gg | CC\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*TT | Reverse | 17 |
| RT | cc | AT\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GG | Forward | 20 |
| jj | GG\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*CC | Reverse | 19 |
| ii | GG\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GT | Forward | 21 |
| nn | TC\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*AG | Reverse | 17 |
| mm | CC\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GG | Forward | 20 |
| rr | CC\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*GT | Reverse | 18 |

При определении температур плавления с корректировкой по концентрации солей концентрация магния принималась 3мМ, олигонуклеотида 0,3мкМ (в соответствии со значениями состава готовой смеси для ПЦР ScreenMix-HS) (таблица 14).

Таблица 14 – Параметры праймеров для секвенирования

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Секвенируемая область | Название | Старт (позиция HXB-2) | Стоп (позиция HXB-2) | GC, % | Tm, °C |
| PR | bb | 2090 | 2109 | 42,7 | 50,6 |
| gg | 2586 | 2602 | 52,9 | 52 |
| RT | cc | 2388 | 2407 | 50 | 53,8 |
| ij | 3012 | 3030 | 47,4 | 50,6 |
| ii | 2882 | 2902 | 39,7 | 51,6 |
| nn | 3231 | 3248 | 43,1 | 46,3 |
| mm | 3222 | 3241 | 52,5 | 54,5 |
| rr | 3774 | 3791 | 52,8 | 52,7 |

На каждые 500 п.н. приходится по два рида для обеспечения двойного перекрытия чтений (рисунок 7).



pol – участок генома ВИЧ, соответствующий гену pol, PR – участок гена pol, кодирующий протеазу, RT – участок гена pol, кодирующий ревертазу, 2pro – продукт второго раунда для участка, кодирующего протеазу, 2rev – ожидаемый продукт второго раунда для участка, кодирующего ревертазу. sequences – ожидаемые прочтения для праймеров секвенирования

Рисунок 7 – Схематическое изображение ожидаемых прочтений при использовании праймеров для секвенирования.

Перед терминирующей амплификацией производилась очистка продуктов ПЦР с последующим измерением концентрации ДНК в образцах. Образцы с концентрацией выше 4нг/мкл подвергались разведению до этого значения. В результате анализа полученных сиквенсов было обнаружено 8 образцов субтипа A6 и один образец рекомбинантного субтипа CRF03\_AB.

**3.4 Разработка программного обеспечения для анализа первичных данных секвенирования региона pol ВИЧ-1**

Для анализа и обработки результатов секвенирования были разработаны базы данных и прикладное программное обеспечение (программа для ЭВМ «Программа для анализа первичных данных секвенирования региона pol ВИЧ-1»).

На основе данных онлайн-сервиса «HIVdb Sequence Search Interface» с помощью языка Python 3.10 с использованием библиотек из Biopython версии 1.79 сформирована и размечена база данных, включающая в себя нуклеотидную последовательность региона Pol CDS для 142 субтипов ВИЧ-1 с перечислением accession number, начала первого нуклеотида ферментов протеазы и обратной транскриптазы относительного данного региона и их длины. Извлечение белковых последовательностей из последовательностей вирусной ДНК проводилось на базе сервиса «HIVdb Gene Cutter Sequence Alignment and Protein Extraction».

Опираясь на список мутаций и их влияния на резистентность к АРТ препаратам сформированы 4 информационных базы, содержащие: список из 15 мутаций, среди которых мутации лекарственной устойчивости, описанные мутации, в том числе делеции и инсерции случайно сгенерированные мутации. Подбор кодона для вставки на место измененной относительно эталонной последовательности аминокислоты производился случайно среди соответствующих кодонов.

Программа позволяет поэтапно осуществлять следующие действия:

– чтение исходных файлов ридов с результатами секвенирования формата ABI и конвертация массивов данных электрофореграмм в формат JSON;

– определение для дальнейшего использования рабочей области в каждом риде;

– поиск локальных максимумов интенсивности свечения в каждом из четырех каналов данных, соответствующих обнаружению нуклеотидов A, C, G, T;

– визуализация на графиках и интерпретация для каждого канала данных локальных максимумов интенсивности свечения;

– редактирование соответствия нуклеотида позиции локального максимума интенсивности свечения;

– выравнивание нуклеотидных последовательностей ридов по референсам из коллекции аннотированных полных геномов ВИЧ;

– построение консенсусной последовательности на основе наилучшего варианта выравнивания ридов;

– аннотирование консенсусной последовательности (начало гена протеазы, начало гена транскриптазы и начало гена интегразы);

– контроль консенсусной последовательности на наличие сдвигов рамки считывания и стоп-кодонов на участке генов протеазы, ревертазы и интегразы.

Программа разработана на языке Python 3.7, использованы библиотеки для работы с нуклеотдными последовательностями из Biopython версии 1.75 (<https://biopython.org/>). Для парного выравнивания нуклеотидных последовательностей на референсные геномы используется бесплатное, свободно распространяемое ПО «Clustal W» версии 2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2/>).

**3.5 Результаты исследования уровня распространённости вторичных МЛУ ВИЧ-1 среди ЛЖВС в УФО**

В исследуемой группе пациентов доминирующим геновариантом ВИЧ-1 являлся субтип A6, идентифицированный в 203 образцах из 223 (91,03%, 95% ДИ: 86,6 – 94,1), субтип B был выявлен в 2,69% случаев (95% ДИ: 1,2 – 5,7).

На долю рекомбинантных форм ВИЧ-1 пришлось 6,28% (95% ДИ: 3,8 – 10,3). Среди рекомбинантных форм ВИЧ-1 чаще встречались AB-рекомбинанты (CRF03\_AB) – 7 образцов (3,14%, 95% ДИ: 1,5 – 6,3). Циркулирующие рекомбинантные формы CRF02\_AG выявлены в 4 образцах (1,79%, 95%: ДИ: 0,7 – 4,5), CRF63\_02A – в 3 (1,35%, 95% ДИ: 0,5 – 3,9).

Согласно ранее проведённым исследованиям [65–67] распространенность рекомбинантных форм ВИЧ в УФО составляла 7,2% (95% ДИ: 3,8 – 10,6), что говорит об отсутствии негативной динамики увеличения доли рекомбинантов.

Преобладание в структуре геновариантов ВИЧ субтипа А6, наиболее распространённого в странах, ранее входивших в состав СССР, является характерной чертой эпидемии ВИЧ в Российской Федерации.

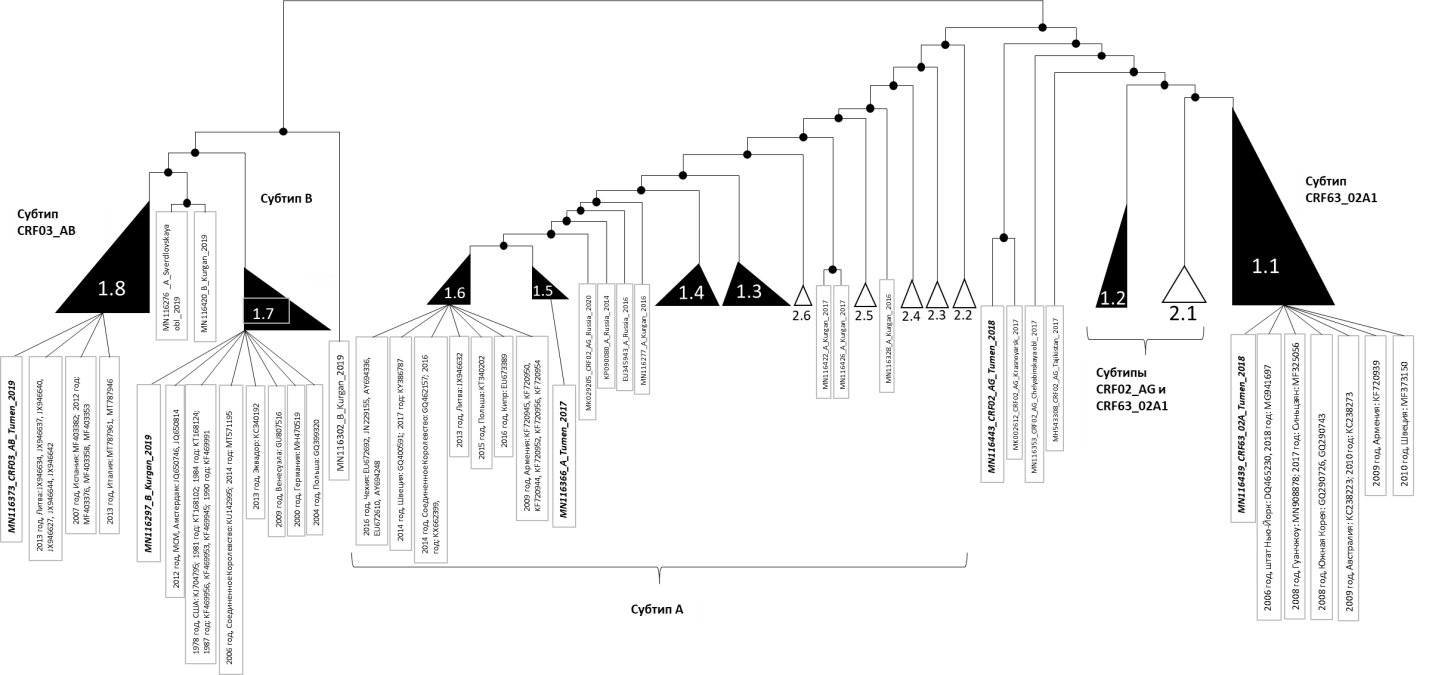
Для оценки влияния фактора межгосударственного заноса ВИЧ-инфекции была проведена оценка идентичности геномов штаммов ВИЧ, циркулирующих в УФО и выделенных от пациентов в других странах. С этой целью был проведен поиск родственных геномов ВИЧ среди нуклеотидных последовательностей, загруженных в базу данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) для нуклеотидной последовательности каждого штамма ВИЧ из исследуемой выборки.

Относительную идентичность не менее 97% имели 98 нуклеотидных последовательностей штаммов ВИЧ из исследуемой выборки (43,9%, 95% ДИ: 35,9 – 48,5) с геномами ВИЧ, выделенными от пациентов из стран ближнего зарубежья, входивших в состав СССР (Белоруссия, Казахстан, Киргизстан, Узбекистан, Литва и др.) и 80 нуклеотидных последовательностей (35,9%, 95% ДИ: 28,5 – 40,6) с геномами ВИЧ, выделенными от пациентов из стран дальнего зарубежья (США, Китай, Южная Корея, Австралия, Швеция, Германия и другие).

Филогенетический анализ проводили в 2 этапа. На первом этапе с помощью алгоритма кластеризации, представленного в разделе «Материалы и методы», построили филогенетическое дерево для исследуемых 223 штаммов. Выбрали наиболее типичных представителей для каждого субтипа, ориентируясь на максимальный уровень bootstrap-поддержки узла в кластере субтипа. Такими последовательностями явились: субтип A6 – MN116366 (уровень поддержки 100), субтип B – MN116297 (уровень поддержки 100), циркулирующий рекомбинантный штамм CRF03\_AB – MN116373 (уровень поддержки 77), циркулирующий рекомбинантный штамм CRF02\_AG – MN116439 (уровень поддержки 100), циркулирующий рекомбинантный штамм CRF63\_02A1 – MN116439 (уровень поддержки 50).

На втором этапе произведён филогенетический анализ, включающий 1574 нуклеотидные последовательности, в том числе 223 штамма ВИЧ из исследуемой выборки и 1351 родственных штаммов ВИЧ (с относительной идентичностью более 97%), найденных в GenBank. Новое выравнивание и кластеризация для построения филогенетического дерева были произведены с использованием методов, указанных в разделе «Материалы и методы» (наиболее типичные представители исследуемой выборки выделены курсивом и жирным шрифтом. большие кластеры (>20 последовательностей) – чёрные треугольники, малые кластеры (<20 последовательностей) – белые треугольники

рисунок 8).



Наиболее типичные представители исследуемой выборки выделены курсивом и жирным шрифтом. Большие кластеры (>20 последовательностей) – чёрные треугольники, малые кластеры (<20 последовательностей) – белые треугольники

Рисунок 8 – Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена pol ВИЧ-1, выделенных от инфицированных пациентов, проживающих на территории УФО в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена pol ВИЧ-1 выявил 8 больших кластеров (n1.1= 861; n1.2= 84; n1.3= 81; n1.4= 71; n1.5= 49; n1.6= 176; n1.7= 106, n1.8= 88) и 6 малых (n2.1= 16; n2.2= 4; n2.3= 9; n2.4= 5; n2.5= 7; n2.6= 5).

Наибольший кластер (n1.1=861) составили штаммы ВИЧ, выделенные на территориях Таджикистана, Киргизстана, Узбекистана и России в период с 2008 по 2020 годы. Также в него вошли 2 нуклеотидных последовательностей из США (2006 год, штат Нью-Йорк: DQ465230, 2018 год: MG941697) [68,69], две последовательности из Китая (2008 год, Гуанчжоу: MN908878; 2017 год: Синьцзян-Уйгурский автономный район: MF325056[70]), две последовательности из Южной Кореи (2009 год: GQ290726, GQ290743) [71], две последовательности из Австралии (2012 год: KC238223, KC238273) [72], одна последовательность из Армении (2013 год: KF720939), одна из Швеции (2010 год: MF373150) [73] и одна из Германии (2008 год: MH471090) [74].

Кластер n1.6 (176 последовательностей) помимо последовательностей из России, Украины, Казахстана, Киргизии, Беларуси и Узбекистана вошли последовательности из Чехии (2008 год: EU672692, EU672610, 2011 год: JN229155, AY694336, AY694248), Швеции (2004 год: GQ400591, 2012 год: KY386787) [75], Соединенного Королевства (2008 год: GQ462157, 2010 год: KX662399) [76], Литвы (2012 год: JX946632) [77], Польши (2015 год: KT340202), Кипра (2003-2006 гг.: EU673389) [78] и Армении (2009: KF720944, KF720945, KF720950, KF720952, KF720954, KF720956).

В состав другого большого кластера (n1.7=106) помимо последовательностей из России вошли последовательности из США, в том числе, полученные в период с 1978 по 1990 годы (1978 год «нулевой пациент»: KJ704795 [79]; 1984 год: KT168124 [80], 1981 год: KT168102 [80]; 1987 год: KF469945, KF469953, KF469956 [81]; 1990 год: KF469991 [81]). Кроме того, в состав этого кластера вошли последовательности из Соединенного Королевства (2006 год: KU142995 [82], 2014 год: MT571195 [83]), Эквадора (2004 год: KC340192), Нидерландов (2012 год, МСМ, Амстердам: JQ650746, JQ650814) [84], Венесуэлы (2009 год: GU807516) [85], и Польши (2004 год: GQ399320) [86].

Интерес представляет еще один кластер (n1.8=88), содержащий в составе, помимо последовательностей из России, Таджикистана, Казахстана и Беларуси, последовательности из Литвы (2012 год: JX946627, JX946634, JX946637, JX946640, JX946642, JX946644) [77] и Испании (2007 год, Валенсия: MF403382, 2012 год, Валенсия: MF403353, MF403358, MF403376) [87].

Генетическая близость штаммов ВИЧ, циркулировавших на территории УФО в 2016-2019 гг., со штаммами, выделенными от пациентов из других стран в более ранние годы, свидетельствует о многочисленных заносах инфекции в результате миграционных процессов (преимущественно международная трудовая и туристическая миграция). Гетерогенность генетической структуры штаммов ВИЧ на территории УФО создаёт предпосылки для снижения эффективности применяемых диагностических тест систем для молекулярно-генетических исследований.

В проведённом исследовании также была проанализирована распространённость комбинаций МЛУ и комбинаций генотипической резистентности. Такой подход потребовал раздельного анализа МЛУ и генотипической резистентности.

Наличие хотя бы одной мутации лекарственной устойчивости (МЛУ) было обнаружено в 140 из 223 образцов (62,8%, 95% ДИ: 56,3 – 68,9). Наиболее распространенными оказались мутации к ННИОТ и к НИОТ, которые встретились в 119 (53,4%, 95% ДИ: 46,8 – 59,8) и 105 образцах (47,1%, 95% ДИ: 40,6 – 53,6) соответственно. МЛУ к ингибиторам протеазы (ИП) регистрировали существенно реже – в 26 случаях (11,7%, 95% ДИ: 8,1 – 16,5). В 9 образцах (4,0%, 95% ДИ: 2,1 – 7,5) были обнаружены аминокислотные замены M184I, формирующие устойчивость как к НИОТ, так и к ННИОТ.

Одновременно к НИОТ и ННИОТ, были выявлены в 81 образце (36,3%, 95% ДИ: 30,3 – 42,8). Комбинации МЛУ к ИП и НИОТ, а также к ИП и ННИОТ встречались значительно реже в 9 (4,0%, 95% ДИ: 2,1 – 7,5) и 1 образце (0,45%, 95% ДИ: 0,1% –2,5) соответственно. Ко всем классам АРВП, ингибирующих протеазу и обратную транскриптазу, были выявлены МЛУ в 11 образцах (4,9%, 95% ДИ: 2,8 – 8,6). МЛУ только к одному из классов АРВП распределились следующим образом: в 26 образцах (11,7%, 95% ДИ: 8,1 – 16,5) – к ННИОТ, в 7 образцах (3,1%, 95% ДИ: 1,5 – 6,3) – к НИОТ, в 5 образцах (2,2%, 95% ДИ: 1,0 – 5,1) – к ИП.

Частота МЛУ только к ННИОТ показала статистически значимое превышение над частотой изолированных МЛУ только к ННИОТ (χ2=11,8, df=1, p=0,00059).

Число МЛУ одновременно выявленных в одном образце было в среднем в 2 раза больше среди мужчин, чем среди женщин (критерий Манна-Уитни U=3702, Z=5,09, p < 0,0001, n1=124, n2=99). Представленная выборка не позволяет доказать влияние гендерного фактора на развитие полирезистентности ВИЧ, однако полученные результаты целесообразно принять во внимание при более масштабных исследованиях.

Установлено, что пациенты, от которых выделен вирус, имеющий комбинации МЛУ к двум или трём видам АРВП, в среднем на 3 года 4 месяца (по медиане на 3 года) старше пациентов, от которых выделен вирус, не имеющий МЛУ (U=3157, Z=2,97, p=0,003, n1=102, n2=83) (рисунок 9).

Данный факт может быть обусловлен длительностью лечения, ростом шанса ко- или суперинфицирования резистентным штаммом при более длительном рискованном поведении. Вместе с тем, нельзя исключать обусловленное возрастом снижение функциональных возможностей иммунной системы подавлять отдельные субпопуляции ВИЧ-1, возникающее на горизонте 3-х лет.

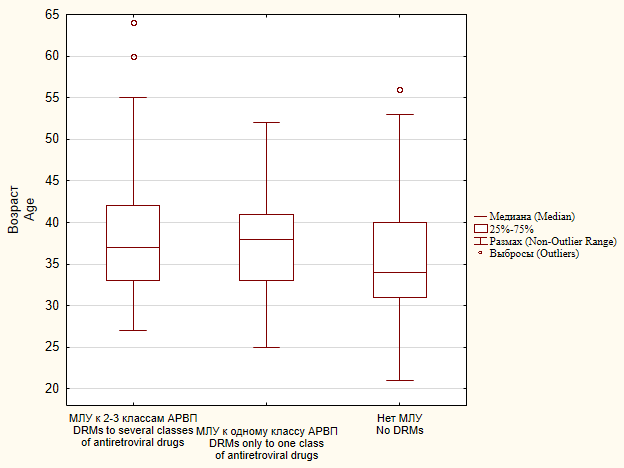


Рисунок 9 – Возраст пациентов, инфицированных штаммами ВИЧ: с мутациями лекарственной устойчивости к нескольким классам антиретровирусных препаратов, только к одному классу антиретровирусных препаратов, без мутаций лекарственной устойчивости

Среди 140 образцов, содержащих МЛУ, количество одновременно выявляемых МЛУ варьировало от 1 до 14, при этом медиана составила 3 МЛУ, а межквартильный интервал находился в диапазоне от 2 до 5. В общей сложности было выявлено 70 видов МЛУ, которые встретились 503 раза. Аминокислотные замены, приводящие к МЛУ, в гене протеазы возникали в 17-ти позициях, в гене обратной транскриптазы в 27 позициях.

Наиболее распространённой является аминокислотная замена M184V, формирующая резистентность ВИЧ к НИОТ, которая встречалась чаще любой другой МЛУ и была выявлена в 88 образцах (39,5%, 95% ДИ: 33,3 – 46,0). Среди МЛУ к ННИОТ наиболее распространённой была аминокислотная замена G190S, выявленная в 55 образцах (34,7%, 95% ДИ: 19,5 – 30,7).

Самой частой МЛУ ВИЧ-1 к ингибиторам протеазы (ИП) являлась минорная мутация L33F, выявленная в 13 образцах (5,8%, 95% ДИ: 3,4 – 9,7). Среди мажорных мутаций к ИП самыми частыми оказались замены M46I, наблюдавшиеся в 9 образцах (4,0%, 95% ДИ: 2,1 – 7,5), и I50L в 7 образцах (3,1%, 95% ДИ: 1,5 – 6,3).

МЛУ к ИП, несмотря на самую низкую частоту обнаружения, характеризовались широким видовым разнообразием – 23 вида (33,3% от всех видов МЛУ, 95% ДИ: 23,4 – 45,1), сопоставимым с количеством видов МЛУ к НИОТ – 26 видов (37,3%, 95% ДИ: 27,2 – 49,5) и ННИОТ – 19 видов (27,5%, 95% ДИ: 18,4 – 39,0).

С точки зрения преодоления генетического барьера резистентности наиболее интересны мутации, возникающие изолированно, вне комбинаций с другими МЛУ. Всего было выявлено 11 таких мутаций в 33 образцах. Наиболее распространённой изолированной МЛУ оказалась замена K103N, формирующая резистентность к ННИОТ, которая встречалась в изолированном виде в 11 образцах (4,9%, 95% ДИ: 2,8 – 8,6), в комбинациях – в 24 образцах (10,8%, 95% ДИ: 7,3 – 15,5). Распространённость МЛУ в изолированном виде свыше 1% (3 и более образцов) была выявлена для M184V, G190S, K103N, E138A, L33F. Только одна МЛУ G48A, формирующая устойчивость к ИП, была выявлена вне комбинаций и не встречалась совместно с другими МЛУ.

Таким образом, МЛУ ВИЧ, наиболее часто выявляемые в нашем исследовании (M184V, G190S, L33F), соответствуют МЛУ ВИЧ наиболее распространённым в Российской Федерации [26,65,88–93].

Известно, что МЛУ ВИЧ формируют различные уровни резистентности, влияющие на эффективность терапии тем или иным антиретровирусным препаратом [94]. Резистентность низкого, среднего и высокого уровня к АРВП была зарегистрирована нами в 134 образцах (60,1%, 95% ДИ: 53,5 – 66,3). Количество препаратов (по международным непатентованным наименованиям (МНН)), к которым имелась резистентность ВИЧ варьировало от 1 до 19, медиана 8 (МКИ от 4,25 до 11). При этом резистентность высокого уровня к АРВП выявлена в 126 образцах (56,5%, 95% ДИ: 49,9 – 62,8) с медианой по числу МНН 4,5 (МКИ от 3,25 до 7, размах от 1 до 13).

При оценке профиля резистентности ВИЧ к группам АРВП установлено, что в большинстве случаев – 82 образца (36,8%, 95% ДИ: 30,7 – 43,3) резистентность высокого уровня обнаруживается одновременно к ННИОТ и НИОТ. Резистентность высокого уровня только к ННИОТ выявлена в 19 образцах (5,5%, 95% ДИ: 5,5 – 12,9), только к НИОТ в 6 образцах (2,7%, 95% ДИ: 1,2 – 5,7). Резистентность высокого уровня к ингибиторам протеазы только в одном образце была представлена в отсутствии комбинаций с другими классами АРВП. В сочетании с резистентностью высокого уровня к НИОТ резистентность к ИП была выявлена в 9 образцах (2,1%, 95% ДИ: 2,1 – 7,5). Резистентность высокого уровня одновременно ко всем классам АРВП была выявлена также в 9 образцах (2,1%, 95% ДИ: 2,1 – 7,5).

В исследуемой выборке была обнаружена резистентность ко всем 20 АРВП, анализируемым «Алгоритмом интерпретации генотипической резистентности программы HIVdb» Стенфордского университета. При этом резистентность высокого уровня была выявлена к 18 АРВП.

Наиболее часто резистентность высокого уровня выявлялась к Невирапину (ННИОТ) – в 102 образцах (45,7%, 95% ДИ: 39,3 – 52,3). В равном количестве образцов наблюдалась резистентность высокого уровня к Эфавирензу (ННИОТ), Эмтрицитабину (НИОТ) и Ламивудину (НИОТ) – по 97 образцов (43,5%, 95% ДИ: 37,2 – 50,1). Резистентность высокого уровня с частотой выше 10% выявлена к Рилпивирину (ННИОТ) в 46 образцах (20,6%, 95% ДИ: 15,8 – 26,4), к Диданозину (НИОТ) в 40 образцах (17,9%, 95% ДИ: 13,5 – 23,5), к Абакавиру (НИОТ) в 39 образцах (17,5%, 95% ДИ: 13,1 – 23,0) и к Доравирину (ННИОТ) в 28 образцах (12,6%, 95% ДИ: 8,8 – 17,5).

Доля образцов, имеющих штаммы ВИЧ с генотипической резистентностью высокого уровня к ИП не превышала 4,5%, для Саквинавира была выявлена в минимальной доле – 1,8%, а для Дарунавира и Типранавира отсутствовала (таблица 15).

Таблица 15 – Спектр генотипической резистентности ВИЧ высокого уровня к антиретровирусным препаратам в исследуемой группе пациентов

| **Класс АРВП** | **АРВП** | **МНН АРВП** | **Количество образцов** | **Распространённость резистентности к АРВП**  **(n=223)** | | **Структура резистентности к АРВП**  **(n=641)** | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Распр.**  **Prev.** | **95% ДИ**  **CIα=0,05** | **Доля**  **Prop.** | **95% ДИ**  **CIα=0,05** |
| ИП  PI | ATV/r | Атазанавир | 10 | 4,5% | 2,5 – 8,1% | 1,6% | 0,8 – 2,8% |
| FPV/r | Фосампренавир | 9 | 4,0% | 2,1 – 7,5% | 1,4% | 0,7 – 2,6% |
| IDV/r | Индинавир | 6 | 2,7% | 1,2 – 5,7% | 0,9% | 0,4 – 2% |
| LPV/r | Лопинавир | 6 | 2,7% | 1,2 – 5,7% | 0,9% | 0,4 – 2% |
| NFV | Нелфинавир | 10 | 4,5% | 2,5 – 8,1% | 1,6% | 0,8 – 2,8% |
| SQV/r | Саквинавир | 4 | 1,8% | 0,7 – 4,5% | 0,6% | 0,2 – 1,6% |
| НИОТ  NRTI | ABC | Абакавир | 39 | 17,5% | 13,1 – 23% | 6,1% | 4,5 – 8,2% |
| AZT | Зидовудин | 10 | 4,5% | 2,5 – 8,1% | 1,6% | 0,8 – 2,8% |
| D4T | Ставудин | 16 | 7,2% | 4,5 – 11,3% | 2,5% | 1,5 – 4% |
| DDI | Диданозин | 40 | 17,9% | 13,5 – 23,5% | 6,2% | 4,6 – 8,4% |
| FTC | Эмтрицитабин | 97 | 43,5% | 37,2 – 50,1% | 15,1% | 12,6 – 18,1% |
| LMV | Ламивудин | 97 | 43,5% | 37,2 – 50,1% | 15,1% | 12,6 – 18,1% |
| TDF | Тенофовир | 9 | 4,0% | 2,1 – 7,5% | 1,4% | 0,7 – 2,6% |
| ННИОТ  NNRTI | DOR | Доравирин | 28 | 12,6% | 8,8 – 17,5% | 4,4% | 3 – 6,2% |
| EFV | Эфавиренз | 97 | 43,5% | 37,2 – 50,1% | 15,1% | 12,6 – 18,1% |
| ETR | Этравирин | 15 | 6,7% | 4,1 – 10,8% | 2,3% | 1,4 – 3,8% |
| NVP | Невирапин | 102 | 45,7% | 39,3 – 52,3% | 15,9% | 13,3 – 18,9% |
| RPV | Рилпивирин | 46 | 20,6% | 15,8 – 26,4% | 7,2% | 5,4 – 9,4% |

В 68 образцах повторялось 6 наиболее распространённых комбинаций резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам, в 6 образцах была выявлена моноустойчивость к Рилпивирину (таблица 16).

Таблица 16 – Наиболее распространённые комбинации генотипической резистентности ВИЧ к АРВП

| Комбинации генотипической резистентности к АРВП | Количество образцов | **Распространённость комбинаций**  **(n=223)** | |
| --- | --- | --- | --- |
| **Распр.** | **95% ДИ**  **CIα=0,05** |
| [ABC+DDI+FTC+LMV]НИОТ(NRTI) + +[DOR+EFV+ETR+NVP+RPV]ННИОТ(NNRTI) | 17 | 7,6% | 4,8 – 11,9% |
| [ABC+D4T+DDI+FTC+LMV+TDF]НИОТ(NRTI) + +[DOR+EFV+ETR+NVP+RPV]ННИОТ(NNRTI) | 15 | 6,7% | 4,1 – 10,8% |
| [EFV+NVP]ННИОТ(NNRTI) | 12 | 5,4% | 3,1 – 9,2% |
| [ABC+DDI+FTC+LMV]НИОТ(NRTI) + +[DOR+EFV+NVP+RPV]ННИОТ(NNRTI) | 8 | 3,6% | 1,8 – 6,9% |
| [ABC+AZT+D4T+DDI+FTC+LMV+TDF]НИОТ(NRTI)+ +[DOR+EFV+ETR+NVP+RPV]ННИОТ(NNRTI) | 8 | 3,6% | 1,8 – 6,9% |
| [ABC+FTC+LMV]НИОТ +[EFV+NVP]ННИОТ | 8 | 3,6% | 1,8 – 6,9% |
| Моноустойчивость к Рилпивирину (RPV) | 6 | 2,7% | 1,2 – 5,7% |

Распространённость монорезистентности высокого уровня к Рилпивирину среди женщин была существенно выше, чем среди мужчин по сравнению с комбинированной резистентностью к Рилпивирину в данных гендерных группах (точный критерий Фишера P = 0,0005).

Несмотря на высокий уровень выявляемости субтипа А6 (91,03%) в генетической структуре популяции выявленных штаммов ВИЧ, циркулирующих среди населения УФО, в анализируемых нуклеотидных последовательностях наблюдались различия. Гетерогенность штаммов ВИЧ сформировала распад филогенетического дерева на несколько удалённых кластеров, и позволила предположить занос штаммов ВИЧ в УФО из популяций находящихся за пределами Российской Федерации. Подтверждает данное предположение существенная доля штаммов, имеющих высокий уровень относительной идентичности консервативного участка генома (более 97%) с геномами штаммов ВИЧ из ближнего и дальнего зарубежья: 43,9% и 35,9% соответственно.

Установлена высокая частота встречаемости у штаммов ВИЧ МЛУ – 62,8%, при этом у 60,1% выявлена резистентность к какому-либо из АРВП. Выявлено статистически значимое превышение возраста пациентов, образцы которых содержали штаммы с МЛУ одновременно к 2 или 3 классам АРВП, по сравнению с пациентами, в образцах от которых отсутствовали штаммы с МЛУ (p=0,003). Возрастная разница медиан составила 3 года. Выявленная зависимость обуславливает потребность в более глубоком изучении связанных с возрастом функциональных возможностей иммунной системы подавлять отдельные субпопуляции ВИЧ-1 при поддержке АРТ.

Резистентность от низкого до высокого уровня была выявлена ко всем 20 АРВП, анализируемым в HIVdb, при этом резистентность высокого уровня отсутствовала только к двум ингибиторам протеазы: Дарунавиру и Типранавиру.

Резистентность высокого уровня выявлена в 56,5% образцов с медианой по числу МНН 4,5. Практически в каждом втором образце (доля от 43,5% до 45,7%) выявлялись штаммы ВИЧ с резистентностью высокого уровня к Невирапину (ННИОТ), Эфавирензу (ННИОТ), Эмтрицитабину (НИОТ) и Ламивудину (НИОТ). Устойчивость к препаратам из класса ИП встречалась значительно реже (4,5% образцов с резистентностью высокого уровня к ИП), что связано с высоким генетическим барьером возникновения МЛУ к АРВП из этого класса [95,96].

Широкая распространённость штаммов ВИЧ с резистентностью высокого уровня среди лиц с вирусологической неэффективностью лечения повышает риск передачи резистентных штаммов и распространения первичной резистентности в УФО. Следовательно, в УФО существует объективная необходимость определения резистентности ВИЧ до назначения АРТ первой линии АРТ-наивным пациентам прежде всего на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Таким образом, для ранней диагностики развития резистентности ВИЧ к АРВП, при существующих схемах АРТ, актуальна разработка ПЦР тест-систем, ориентированных на специфические участки гена pol, содержащих МЛУ к указанным АРВП. Данная тест-система позволит с низкими временными и финансовыми затратами установить показания для корректировки наиболее массовой схемы АРТ первого ряда.

**3.6 Филогенетический анализ штаммов ВИЧ, циркулировавших на территории Российской Федерации**

Критериям отбора соответствовали 6676 последовательностей из 73 субъектов РФ, выделенные в период с 1987-2021 гг..

Среди исследованных последовательностей были обнаружены следующие субтипы и рекомбинантные формы: A6, B, C, D, F, G, CRF01\_AE, CRF02\_AG, CRF03\_AB, CRF06\_cpx, CRF63\_02A1. Доминирующим являлся субтип A6, идентифицированный в 5405 последовательностях (80,96%). Вторым по распространённости оказался субтип B, выявленный в 516 случаях (7,73%). Далее следовал субтип G, на долю которого пришлось 1,56% (104 случая). Субтипы С (35 случаев, 0,52%), F (4 случая, 0,06%) и D (1 случай, 0,015%) представляли собой случайные находки.

Доля рекомбинантных форм в структуре составила 9,15% (611 последовательностей). Наиболее многочисленным рекомбинантным штаммом оказался CRF63\_02A1, выявленный в 511 случаях (7,65% от общей структуры и 83,63% от всех рекомбинантных форм). Второе и третье ранговое место среди рекомбинантных форм принадлежало CRF02\_AG (50 случаев, 0,75% от общей структуры и 8,18% от всех рекомбинантных форм) и CRF03\_AB (37 случаев, 0,55% от общей структуры и 6,06% от всех рекомбинантных форм).

Распределение субтипов по регионам выявило следующую картину: субтип A6 являлся доминирующим во всех регионах, за исключением пяти. В Новосибирской и Томской областях доминирующей являлась рекомбинантная форма CRF63\_02A1. Количество последовательностей из Новосибирской области с субтипом A6 составило 50 случаев, а с субтипом CRF63\_02A1 – 154 случая. В Томской области субтип A6 был представлен 35 последовательностями, а субтип CRF63\_02A1 – 90. В Кемеровской области распределение между субтипами A6 и CRF63\_02A1 составляло 37 и 36 случаев соответственно.

В Приморском регионе наиболее многочисленным оказался субтип B, выявленный в 32 случая против 22 для субтипа A6. В Ростовской области наиболее распространенным субтипом оказался G, составивший 32 случая, субтип A6 был представлен 17 последовательностями. В Новосибирской и Томской областях доминирующей являлась рекомбинантная форма CRF63\_02A1. Количество последовательностей из Новосибирской области с субтипом A6 составило 50 случаев, а с субтипом CRF63\_02A1 – 154 случая. В Томской области субтип A6 был представлен 35 последовательностями, а субтип CRF63\_02A1 – 90. В Кемеровской области распределение между субтипами A6 и CRF63\_02A1 было равное (37 и 36 случаев соответственно). В Приморском регионе наиболее многочисленным оказался субтип B, выявленный в 32 случаях против 22 для субтипа A6. В Ростовской области наиболее распространенным субтипом оказался G, составивший 32 случая, субтип A6 был представлен 17 последовательностями.

Распределение остальных рекомбинантных форм по регионам было следующим: CRF01\_AE был представлен единичными последовательностями в Волгоградской (1), Сахалинской (1), Хабаровской (2) областях, Москве (2), Санкт-Петербурге (1), Республике Башкортостан (1) и в ЯНАО (1). Субтип CRF02\_AG был наиболее представлен в Москве (13) и Московской области (12). CRF03\_AB чаще всего выявлялся в Свердловской области (13) и ЯНАО (10). CRF06\_cpx был представлен тремя последовательностями: две из Москвы, одна из Санкт-Петербурга. CRF11\_cpx был представлен всего одной последовательностью из Сахалинской области.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pol* ВИЧ-1 выявил 11 обособленных клад, некоторые из которых содержали в своем составе кластеры, представленные рекомбинантным субтипом, образованным от субтипа основной клады (рисунок 10).

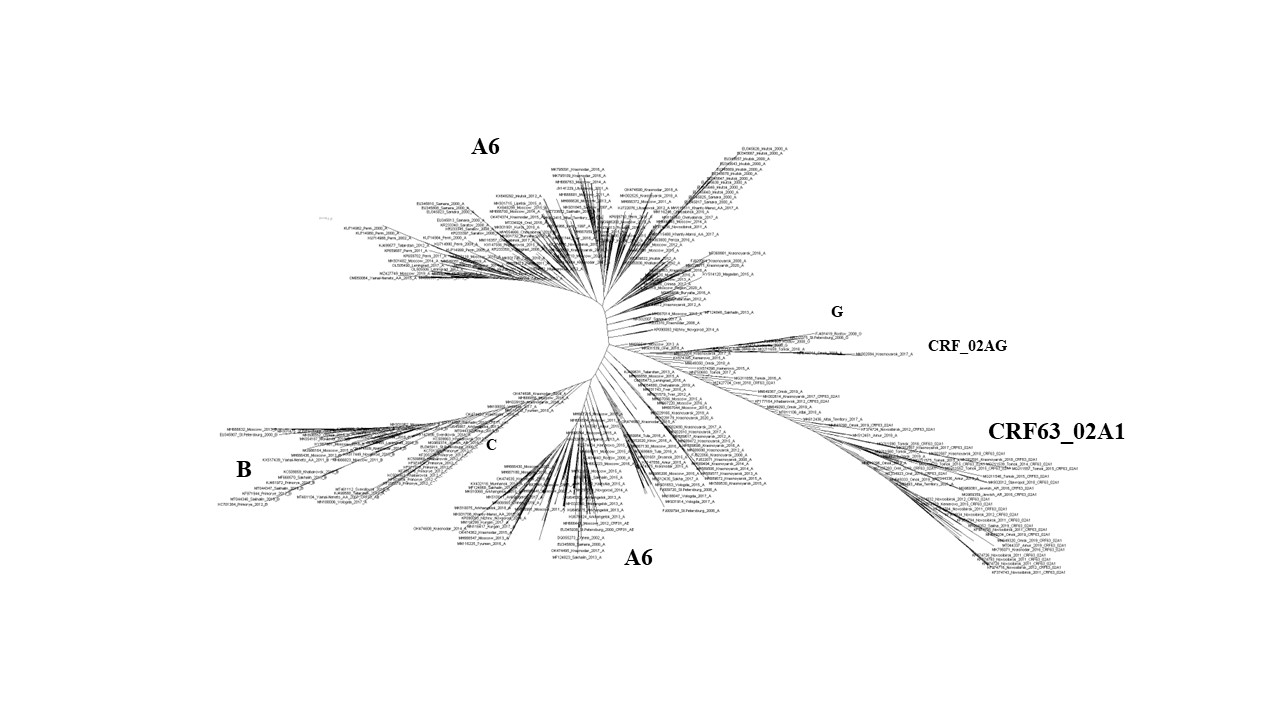


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево последовательностей гена *pol* ВИЧ-1, полученных на территории РФ в период с 1987 по 2022 год

Для поиска последовательностей ВИЧ, выделенных за рубежом, и имеющих наименьшую генетическую дистанцию, было отобрано 11 последовательностей из нашей коллекции, по 1 из каждой клады, из узла с наибольшей поддержкой бутстреп.

Поиск в международной базе данных GenBank с помощью инструмента BLAST по каждой из 11 последовательностей позволил сформировать базу датасет из 8609 геномов ВИЧ. Для 6821 генома была установлена страна происхождения. Число зарубежных последовательностей ВИЧ, совпадающих на 97% и более с геномами, относительно которых проводился поиск, составило 50. Среди них были обнаружены следующие субтипы: A6, CRF02\_AG, CRF03\_AB и CRF63\_02A1.

Большинство этих последовательностей пришлось на ближнее зарубежье. Наибольшее количество последовательностей было из Таджикистана (n=20, MH543310, MH543301, MH543299, MH543300, MH543308, MK245770, MH543303, MH543307, MH543306, MK245596, MH543311, MH543302, MK245771, MK245595, MK245769, MK245597, MH543194, MK245598, MH543216, MK245728), вторым по количеству близкородственных последовательностей был Узбекистан (n=9, MF431641, MF431642, MF401474, MW484680, AY829214, AY829207, KY235816, AY829204, KY235803), за ним с незначительным отставанием следовала Киргизия (n=8, MW303617, OL752907, MW303614, OL752906, MW303616, OL752908, OL752905, MG799098). В Азербайджане обнаружилось только 3 близкородственных последовательности (MW484339, MW484347, MW484383), в Армении – 2 (MW484304, MW484226), и одна в Белоруссии (AF414006).

На страны дальнего зарубежья пришлось всего 7 последовательностей (Китай - MN908878, 2008 год; Германия - MH471090, 2008 год; Испания - MF403353, 2012 год; MF403382, 2007 год; Швеция - MF373150, 2010 год; Великобритания - MF109476, 11 декабря 2013 года; США - DQ465230, 2001-2002 год).

После добавления этих последовательностей в исходное выравнивание и построения нового филогенетического дерева с теми же настройками все последовательности распределились по ранее сформированным кластерам в соответствии со своими субтипами. Последовательности, представленные субтипом A6 равномерно распределились между кладами под номерами 3 и 4.

Наименьшие генетические дистанции к штаммам ВИЧ, циркулирующим в России, выявлены среди штаммов, циркулирующих в основном в странах бывшего СССР. Также выявлена генетическая близость штаммов ВИЧ, циркулировавших на территории УФО в период с 2008 по 2018 со штаммами, выделенными от пациентов из других стран в более ранние годы, что может свидетельствовать о многочисленных заносах инфекции в результате миграционных процессов (преимущественно международная трудовая и туристическая миграция).

Формирование новой клады состоящей из субтипов А6 может говорить о новой эволюционной истории для данного субтипа. Планируется провести сравнительное исследование штаммов входящие в различные клады А6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Краткие выводы по результатам выполнения НИР в 2022 году:

В УФО на протяжении последних 5 лет отмечается снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией со 142,99°/₀₀₀₀ до 75,9°/₀₀₀₀.

На протяжении последних 7 лет (с 2015 по 2021 год) в УФО отмечается снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией со 142,13°/₀₀₀₀ до 75,9°/₀₀₀₀ со среднегодовым темпом снижения 9,9%. При сохранении тенденции к 2024 году уровень заболеваемости достигнет 40,9°/₀₀₀₀.

Установлено, что заболеваемость ВИЧ-инфекцией, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений, является опережающим индикатором, связанным с ростом заболеваемости (коэффициент b = 1,267, p < 0,0001). Охват населения медицинским освидетельствованием на ВИЧ, регистрируемый за 1 год до наблюдаемых значений, оказывает влияние на снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией (b = – 0,929, p < 0,0001).

На основе построенной математической модели рассчитано, что для сохранения эффективности выявления новых случаев ВИЧ темп прироста показателя охвата населения освидетельствованием на ВИЧ должен превышать рост заболеваемости как минимум на 36,4%.

За последние 13 лет заболеваемость СПИДом в УФО выросла в 22 раза с 0,95°/₀₀₀₀ до 21,06°/₀₀₀₀. В Свердловской области относительный шанс выявления ВИЧ-инфекции на стадии СПИД в 18,3 раза выше базового (установленного в Курганской области), а кумулятивное число таких случаев достигло в 2020 году 12 667. Данные показатели характеризуют УФО и, особенно, Свердловскую область как территории с высоким риском распространения ВИЧ-инфекции лицами, не знающими о своём ВИЧ-статусе.

В соответствии с построенной математической моделью распространённость ВИЧ-инфекции, регистрируемая за 1 год до наблюдаемых значений заболеваемости СПИД, является опережающим индикатором и главным фактором, который в течение последних 14 лет непрерывно влияет на рост заболеваемости СПИД (коэффициент b = 0,0323, p < 0,0001).

Дотестовое и послетестовое консультирование в процессе скрининга на ВИЧ, несёт значимую информационную функцию, повышая социальную настороженность в отношении ВИЧ-инфекции и пропагандируя неприятие рискованного поведения. В результате анкетирования пациентов с ВИЧ установлено, что лица, получившие консультацию при выявлении у них ВИЧ-инфекции, без участия психолога и/или «равного» консультанта, статистически значимо чаще прекращают прием АРВП, чем лица получившие консультацию при участии психолога и/или «равного» консультанта (χ2=7,87, d.f.=1, p= 0,005025).

Лица, употребляющие наркотики чаще лиц, никогда не употреблявших наркотики, прекращают прием АРВП (χ2=15,03, d.f.=1, p= 0,00012). При этом 53,7% (ДИ 95%: 38,7% – 67,9%) из них отказывались от приёма АРВП из-за отсутствия мотивации или недостаточной информированности.

Снижение охвата тестированием и смещение внимания общества и здравоохранения на пандемию COVID-19 на фоне выхода ВИЧ-инфекции за пределы групп риска способствуют ускорению распространения ВИЧ-инфекции в основной популяции. Биоповеденческие исследования в группах риска продемонстрировали низкую информированность о проблеме ВИЧ-инфекции в регионе с одновременно достаточно хорошей информированностью о путях и факторах передачи ВИЧ. Результаты исследования показали также низкую готовность представителей групп риска узнать свой ВИЧ-статус и начать лечение.

Разработка рекомендаций и исходных данных по конкретному использованию результатов НИР:

Необходима разработка профилактических программ в отношении заражения и передачи ВИЧ-инфекции для освобождающихся заключённых. Биоповеденческие исследования, проведённые среди лиц, освободившихся из мест лишения свободы, показали, что данная группа является уязвимой для заражения ВИЧ как до отбывания наказания, так и в период нахождения под стражей: 27,98 % ЛЖВ и 15,18 % лиц без ВИЧ продолжили употребление внутривенных наркотиков в период отбывания наказания 51,7% респондентов ответили, что у некоторых бывают половые контакты в местах заключения, при этом 28,43 % ЛЖВ и 38,52 % лиц без ВИЧ никогда не используют презервативы.

Анкетирование в отношении приверженности пациентов к антиретровирусной терапии не позволило статистически значимо связать влияние как внутренней стигмы с приверженностью (χ2=13,95, d.f=14, p=0,4531517) и снижением вирусной нагрузки ВИЧ до неопределяемой (χ2=13,81, d.f=14, p=0,4643874), так и внешней стигмы с приверженностью (χ2=17,63, d.f=11, p=0,090531) и на оценку АРТ по неопределяемой вирусной нагрузке (χ2=13,497, d.f=13, p=0,4102441). Однако установлено существенное повышение приверженности к приёму АРВП с ростом уровня финансового положения (χ2=32,88, d.f=5, p=0,000004). Так приверженность к приёму АРВП при очень плохом финансовом положении в 3 раза ниже, а при неудовлетворительном финансовом положении в 2 раза ниже, чем среди лиц, имеющих удовлетворительное финансовое положение.

Результаты биоповеденческих исследований продемонстрировали высокую распространённость приёма АРВП с перерывами у пациентов, имеющих опыт отбывания наказания в местах лишения свободы, что определяет их как группу риска возникновения вторичной резистентности, а их половых партнёров как группу риска с первичной резистентностью ВИЧ.

Анализ участков геномов ВИЧ, выделенных на территории УФО в 2016-2020 годах позволил установить высокий уровень выявляемости субтипа А6 (91,03%). Гетерогенность штаммов ВИЧ сформировала распад филогенетического дерева на несколько удалённых кластеров, кроме того, существенная доля штаммов, имела высокий уровень относительной идентичности консервативного участка генома (более 97%) с геномами штаммов ВИЧ из ближнего и дальнего зарубежья: 43,9% и 35,9% соответственно. Данные факты говорят об активном заносе штаммов ВИЧ в УФО из популяций находящихся за пределами Российской Федерации.

Исследования генотипической резистентности ВИЧ выявили резистентность от низкого до высокого уровня ко всем 20 АРВП, анализируемым в HIVdb, при этом резистентность высокого уровня отсутствовала только к двум ингибиторам протеазы: Дарунавиру и Типранавиру.

Установлена высокая частота встречаемости у штаммов ВИЧ МЛУ – 62,8%, при этом у 60,1% выявлена резистентность к какому-либо из АРВП. Выявлено статистически значимое превышение возраста пациентов, образцы которых содержали штаммы с МЛУ одновременно к 2 или 3 классам АРВП, по сравнению с пациентами, в образцах от которых отсутствовали штаммы с МЛУ (p=0,003).

Резистентность высокого уровня выявлена в 56,5% образцов с медианой по числу МНН 4,5. Практически в каждом втором образце (доля от 43,5% до 45,7%) выявлялись штаммы ВИЧ с резистентностью высокого уровня к Невирапину (ННИОТ), Эфавирензу (ННИОТ), Эмтрицитабину (НИОТ) и Ламивудину (НИОТ). Устойчивость к препаратам из класса ИП встречалась значительно реже (4,5% образцов с резистентностью высокого уровня к ИП).

В результате филогенетического анализа 6676 последовательностей из 73 субъектов РФ, выделенные в период с 1987-2021 гг. выявлено формирование новой клады состоящей из субтипов А6, что может говорить о новой эволюционной истории для данного субтипа и требует детального анализа групп, сформированных в результате проведённой кластеризации.

Оценка полноты решений поставленных задач:

Все задачи, предусмотренные календарным планом на втором этапе НИР, решены в полном объеме: проведен ретроспективный эпидемиологический анализ статистических данных, характеризующих эпидемический процесс ВИЧ-инфекции в УФО, проведены скрининговые и биоповеденческие исследования, определён генотипический пейзаж штаммов ВИЧ, выделенных от населения, разработаны программные продукты, оптимизирующие анализ биоинформационных данных, получаемых в результате секвенирования генома ВИЧ-1 и внутренняя тест-система для секвенирования региона pol генома ВИЧ-1.

Разработка рекомендаций и исходных данных по конкретному использованию результатов НИР:

Разработанная внутренняя тест-система для секвенирования гена pol ВИЧ позволит провести масштабное исследование первичной резистентности и определить группы риска лекарственной устойчивости ВИЧ-1. Комбинация молекулярно-генетических методов определения резистентности совместно с экспресс-методом определения наличия антиретровирусных препаратов в образце плазмы методом тонкослойной хроматографии позволит получать дополнительные сведения о доминирующем штамме ВИЧ у конкретного пациента.

Результаты оценки технико-экономической эффективности внедрения:

Разработана тест-система для секвенирования гена pol ВИЧ, внедрение которой позволит сократить расходы на проведение молекулярно-генетических исследовний. Внедрено в практику программное обеспечение в виде веб-сервиса, позволяющего выявить МЛУ, обычные и необычные (ранее не описанные) мутации, что позволяет избежать ошибок, которые могут приводить к неэффективности смены терапии.

Результаты оценки научно-технического уровня выполненной НИР в сравнении с лучшими достижениями в этой области:

Проведенные на втором этапе реализации НИР исследования являются современными высокотехнологичными исследованиями, соответствующими лучшим достижениям в данной области.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. World Health Organization. End inequalities. End AIDS. Global AIDS Strategy 2021 – 2026. – Geneva, 2021. – 164 p.

2. Амбициозная цель в области лечения, направленная на прекращение эпидемии СПИДа // Объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС). – 2014. – С. 38.

3. Государственная стратегия противодействия распространению ВИЧ-инфекции в Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу. – утв. Распоряжением Правительства РФ от 20.10.2016 г. №2230-р. – 2016. – 11 с.

4. Покровский В.В., Голиусов А.Т., Ладная Н.Н., и др. О проведении обследования на ВИЧ-инфекцию. Методические рекомендации (утв. Минздравсоцразвития РФ 6.08.07 г. №5950-РХ). – Москва, 2007. – 23 с.

5. Зайцева Н.Н. Комплексный подход к совершенствованию системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией на основе молекулярно-генетических методов и геоинформационных технологий : дисс. ... д-ра мед. наук : 14.02.02 // Н.Новгород. – Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, 2018. – 378 с.

6. Государственная стратегия противодействия распространению ВИЧ-инфекции в Российской Федерации на период до 2030 года. – утв. Распоряжением Правительства РФ от 21.12.2020 г. №3468-р. – 2020. – 14 с.

7. Федеральная целевая программа “Развитие уголовно-исполнительной системы (2018 - 2030 годы)”, утв. постановлением Правительства РФ от 06.04.2018 № 420. – 2018.

8. Магадеев Х.Д., Радзиховская М.В., Магадеев Р.Д. Преемственность диспансерного наблюдения за ВИЧ-инфицированными, освобождаемых из учреждений пенитенциарной системы // Сборник трудов ХIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского; IV Всероссийской научно-практической конференции; VI Всероссийского симпозиума. – Москва: ООО «Медицинское Маркетинговое Агентство» 2021. – С 100-101.

9. Кондратова С.Е., Марченко А.Н. Анализ факторов риска, определяющих проявление эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в пенитенциарной системе // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – № 1.– С. 20–27.

10. Тихомиров С.М. Социальное сопровождение реабилитации лиц с наркотической зависимостью // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2020. – Т. 60, № 4.– С. 78–84.

11. Базыкина Е.А., Троценко О.Е., Туркутюков В.Б., и др. Социально-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-позитивных заключенных, выявленных в следственных изоляторах федеральной системы исполнения наказания Хабаровского края // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2018. – Т. 34.– С. 29–31.

12. Красоткин П.Н., Красильникова М.С. Наркопреступность в России и в учреждениях уголовно-исполнительной системы: криминологический анализ // Вестник Сибирского юридического института МВД России. – 2018. – Т. 33, № 4.– С. 96–101.

13. Ющук Н.Д., Федяева О.Н., Сирота Н.А. Стратегии оценки приверженности антиретровирусной терапии у пациентов с ВИЧ-инфекцией // Клиническая медицина. – ОАО «Издательство «Медицина», 2016. – Т. 94, № 1.– С. 42–47.

14. Беляков Н.А., Левина О.С., Рыбников В.Ю. Формирование приверженности к лечению у больных с ВИЧ-инфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – Общество с ограниченной ответственностью Балтийский медицинский …, 2013. – Т. 5, № 1.– С. 7–33.

15. Boerma R.S., Bunupuradah T., Dow D., et al. Multicentre analysis of second-line antiretroviral treatment in HIV-infected children: adolescents at high risk of failure // Journal of the International AIDS Society. – 2017. – Vol. 20, № 1. – P. 21930.

16. Mulu A., Maier M., Liebert U.G. Upward trends of acquired drug resistances in Ethiopian HIV-1C isolates: A decade longitudinal study // PLOS ONE / ed. Paraskevis D. – 2017. – Vol. 12, № 10. – P. e0186619.

17. Ostankova Yu. V., Schemelev A.N., Zueva E. V., et al. HIV molecular epidemiology and pharmaco-resistance in patients with antiretroviral therapy failure in Arkhangelsk district // HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. – 2020. – Vol. 11, № 4. – P. 79–90.

18. ВИЧ-инфекция у взрослых. Клинические рекомендации. – Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2017. – 64 с.

19. Ingabire T., Semenov A. V., Esaulenko E. V., et al. Primary HIV drug resistance among newly HIV type-1 diagnosed patients in St. Petersburg // HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 70–79.

20. Saenz R.A., Bonhoeffer S. Nested model reveals potential amplification of an HIV epidemic due to drug resistance // Epidemics. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 34–43.

21. Miti S., Handema R., Mulenga L., et al. Prevalence and characteristics of HIV drug resistance among antiretroviral treatment (ART) experienced adolescents and young adults living with HIV in Ndola, Zambia // PLOS ONE / ed. Price M.A. – 2020. – Vol. 15, № 8. – P. e0236156.

22. Seu L., Mulenga L.B., Siwingwa M., et al. Characterization of HIV drug resistance mutations among patients failing first-line antiretroviral therapy from a tertiary referral center in Lusaka, Zambia. // Journal of medical virology. – 2015. – Vol. 87, № 7. – P. 1149–1157.

23. Poppe L.K., Chunda-Liyoka C., Kwon E.H., et al. HIV drug resistance in infants increases with changing prevention of mother-to-child transmission regimens. // AIDS (London, England). – 2017. – Vol. 31, № 13. – P. 1885–1889.

24. Dagnra A.Y., Vidal N., Mensah A., et al. High prevalence of HIV-1 drug resistance among patients on first-line antiretroviral treatment in Lomé, Togo. // Journal of the International AIDS Society. – 2011. – Vol. 14, № 1. – P. 30.

25. Salou M., Dagnra A.Y., Butel C., et al. High rates of virological failure and drug resistance in perinatally HIV-1-infected children and adolescents receiving lifelong antiretroviral therapy in routine clinics in Togo. // Journal of the International AIDS Society. – 2016. – Vol. 19, № 1. – P. 20683.

26. Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., и др. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 11, № 4.– С. 79–90.

27. World Health Organization. Guidelines on the public health response to pretreatment HIV drug resistance. – Geneva, 2017. – 84 p.

28. World Health Organization. WHO/HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework. – Geneva, 2017. – P. 73.

29. Fokam J., Takou D., Santoro M.M., et al. Short Communication: Population-Based Surveillance of HIV-1 Drug Resistance in Cameroonian Adults Initiating Antiretroviral Therapy According to the World Health Organization Guidelines. // AIDS research and human retroviruses. – 2016. – Vol. 32, № 4. – P. 329–333.

30. Ладная Н.Н., Богословская Е.В., Суханова А.Л. Распространенность штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам, передающихся от пациента к пациенту на территории шести субъектов России // Сб. трудов 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика — 2007». – 2017. – С. 121-123

31. Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Пекшева О.Ю. Анализ распространенности первичной резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам в Приволжском федеральном округе // Медицинский альманах. – 2016. – Т. 43, № 3.– С. 93–95.

32. Lapovok I., Murzakova A., Lopatukhin A., et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance mutations among ART-naive patients in Russia from 2005 to 2015 // Proceedings of 14th European Meeting on HIV & Hepatitis. Rev. Antivir. Ther. Infect. Dis. – 2016. – Vol. 4. – P. 83–84.

33. Дементьева Н.Е., Сизова Н.В., Лисицина З.Н., и др. Анализ субтипов и фармакорезистентных вариантов ВИЧ, циркулирующих среди ВИЧ-инфицированных пациентов Санкт-Петербурга // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2011. – Т. 3, № 4.– С. 34–43.

34. Кириченко А.А., Киреев Д.Е., Лопатухин А.Э., и др. Уровень и структура лекарственной устойчивости ВИЧ-1 среди пациентов без опыта приема антиретровирусных препаратов с момента начала применения антиретровирусной терапии в Российской Федерации // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2019. – Т. 11, № 2.– С. 75–83.

35. Грезина Л.А., Дементьева Н.Е., Зайцева Н.Н., и др. Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ // Лабораторная служба. – Издательство’Медиа Сфера’, 2017. – Т. 6, № 3.– С. 217–237.

36. Кретова О.В., Горбачева М.А., Федосеева Д.М., и др. Частоты мутаций в мишенях РНК-интерференции в геномах ВИЧ-1, выделенных из плазмы больных, получавших антиретровирусную терапию // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52, № 4.– С. 591–594.

37. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Чурина М.А., и др. Молекулярно-биологические методы диагностики при расследовании случая передачи ВИЧ-инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 4.– С. 59–66.

38. Покровский В.И., Покровский В.В., Юрин О.Г. Клиническая классификация ВИЧ-инфекции // Эпидемиология и инфекционные болезни. – Открытое акционерное общество Издательство Медицина, 2001. – № 1.– С. 7–10.

39. Wilson E.B. Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference // Journal of the American Statistical Association. – 1927. – Vol. 22, № 158. – P. 209–212.

40. Mcculloch C.E. Generalized Linear Models // Journal of the American Statistical Association. – 2000. – Vol. 95. – P. 1320.

41. Tebit D.M., Arts E.J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. // The Lancet. Infectious diseases. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 45–56.

42. Wilson E.B. Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference // Journal of the American Statistical Association. – 1927. – Vol. 22, № 158. – P. 209–212.

43. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // Palaeontologia Electronica. – College Station, 2001. – Vol. 4, № 1. – P. 1–9.

44. Moazen B., Saeedi Moghaddam S., Silbernagl M.A., et al. Prevalence of Drug Injection, Sexual Activity, Tattooing, and Piercing Among Prison Inmates // Epidemiologic Reviews. – 2018. – Vol. 40, № 1. – P. 58–69.

45. Michel L., Trouiller P., Chollet A., et al. Self-reported Injection Practices Among People Who Use Drugs in French Prisons: Public Health Implications (ANRS-Coquelicot Survey 2011-2013): Injection Practices in Prisons // Drug and Alcohol Review. – 2018. – Vol. 37. – P. S268–S276.

46. Krstić M., Ivanović I., Vasić M., et al. Risk Behaviour and Risk Factors for HIV and other STI Among Prisoners in Serbia // Sexually Transmitted Infections. – 2013. – Vol. 89. – P. A287–A287.

47. Kassaian N., Adibi P., Kafashaian A., et al. Hepatitis C Virus and Associated Risk Factors Among Prison Inmates with History of Drug Injection in Isfahan, Iran // International Journal of Preventive Medicine. – 2012. – № 3. – P. S156–S161.

48. Culbert G.J., Waluyo A., Iriyanti M., et al. Within-prison Drug Injection Among HIV-Infected Male Prisoners in Indonesia: A Highly Constrained Choice // Drug and alcohol dependence. – 2015. – Vol. 149. – P. 71–79.

49. Pollini R.A., Alvelais J., Gallardo M., et al. The Harm Inside: Injection During Incarceration Among Male Injection Drug Users in Tijuana, Mexico // Drug and Alcohol Dependence. – 2009. – Vol. 103, № 1–2. – P. 52–58.

50. Wright N.M.J., Tompkins C.N.E., Farragher T.M. Injecting Drug Use in Prison: Prevalence and Implications for Needle Exchange Policy // International Journal of Prisoner Health. – 2015. – Vol. 11, № 1. – P. 17–29.

51. Staton-Tindall M., Harp K.L., Minieri A., et al. An Exploratory Study of Mental Health and HIV Risk Behavior Among Drug-Using Rural Women in Jail // Psychiatric rehabilitation journal. – 2015. – Vol. 38, № 1. – P. 45–54.

52. Lloyd A.R., Clegg J., Lange J., et al. Safety and Effectiveness of a Nurse-Led Outreach Program for Assessment and Treatment of Chronic Hepatitis C in the Custodial Setting // Clinical Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 56, № 8. – P. 1078–1084.

53. Azbel L., Polonsky M., Wegman M., et al. Intersecting Epidemics of HIV, HCV, and Syphilis Among Soon-To-Be Released Prisoners in Kyrgyzstan: Implications for Prevention and Treatment // International Journal of Drug Policy. – 2016. – Vol. 37. – P. 9–20.

54. Wallis C.L., Papathanasopoulos M.A., Lakhi S., et al. Affordable in-house antiretroviral drug resistance assay with good performance in non-subtype B HIV-1 // Journal of Virological Methods. – Elsevier, 2010. – Vol. 163, № 2. – P. 505–508.

55. World Health Organization et. al. WHO HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework. – 2020. – 82 с.

56. Mo H., Parkin N., Stewart K.D., et al. Identification and structural characterization of I84C and I84A mutations that are associated with high-level resistance to human immunodeficiency virus protease inhibitors and impair viral replication // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2007. – Vol. 51, № 2. – P. 732–735.

57. Dumans A.T., Soares M.A., Machado E.S., et al. Synonymous genetic polymorphisms within Brazilian human immunodeficiency virus Type 1 subtypes may influence mutational routes to drug resistance // The Journal of infectious diseases. – J Infect Dis, 2004. – Vol. 189, № 7. – P. 1232–1238.

58. Caride E., Hertogs K., Larder B., et al. Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART // Virus genes. – Virus Genes, 2001. – Vol. 23, № 2. – P. 193–202.

59. Eshleman S.H., Hackett J., Swanson P., et al. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for Sequence-Based Analysis of Diverse Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains // Journal of Clinical Microbiology. – American Society for Microbiology (ASM), 2004. – Vol. 42, № 6. – P. 2711.

60. Martinez-Picado J., Morales-Lopetegi K., Villena C., et al. Evidence for preferential genotyping of a minority human immunodeficiency virus population due to primer-template mismatching during PCR-based amplification // Journal of Clinical Microbiology. – American Society for Microbiology, 2005. – Vol. 43, № 1. – P. 436–438.

61. Korn K., Weissbrich B., Henke-Gendo C., et al. Single-point mutations causing more than 100-fold underestimation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) load with the Cobas TaqMan HIV-1 real-time pcr assay∇ // Journal of Clinical Microbiology. – American Society for Microbiology, 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 1238–1240.

62. Wu J.W., Patterson-Lomba O., Novitsky V., et al. A Generalized Entropy Measure of Within-Host Viral Diversity for Identifying Recent HIV-1 Infections // Medicine. – Wolters Kluwer Health, 2015. – Vol. 94, № 42. – P. e1865.

63. Dudley D.M., Chin E.N., Bimber B.N., et al. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance // PLOS ONE. – Public Library of Science, 2012. – Vol. 7, № 5. – P. e36494.

64. Monie D., Simmons R.P., Nettles R.E., и др. A Novel Assay Allows Genotyping of the Latent Reservoir for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Resting CD4+ T Cells of Viremic Patients // Journal of Virology. – American Society for Microbiology, 2005. – Т. 79, № 8.– С. 5185–5202.

65. Пасечник О.А., Блох А.И. Распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 в регионах Российской Федерации и стран СНГ: систематический обзор и метаанализ // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, № 2.– С. 127–138.

66. Gashnikova N.M., Astakhova E.M., Gashnikova M.P., et al. HIV-1 Epidemiology, Genetic Diversity, and Primary Drug Resistance in the Tyumen Oblast, Russia // BioMed Research International. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–13.

67. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., и др. Генетические варианты ВИЧ-1 в азиатской части России (2005–2010) // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58, № 4.– С. 28–35.

68. Karchava M., Pulver W., Smith L., et al. Prevalence of drug-resistance mutations and non-subtype B strains among HIV-infected infants from New York State. // Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999). – 2006. – Vol. 42, № 5. – P. 614–619.

69. Rhee S.-Y., Clutter D., Fessel W.J., et al. Trends in the Molecular Epidemiology and Genetic Mechanisms of Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance in a Large US Clinic Population // Clinical Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 68, № 2. – P. 213–221.

70. Shu Z., Chen Y., Abudureyimu A., et al. Surveillance of HIV-1 drug resistance in Xinjiang: high prevalence of K103N in treatment-naïve individuals // Archives of Virology. – 2018. – Vol. 163, № 8. – P. 2111–2119.

71. Chin B.S., Choi J.Y., Han Y., et al. Comparison of Genotypic Resistance Mutations in Treatment-Naive HIV Type 1-Infected Patients in Korea and China // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2010. – Vol. 26, № 2. – P. 217–221.

72. Hawke K.G., Waddell R.G., Gordon D.L., et al. HIV Non-B Subtype Distribution: Emerging Trends and Risk Factors for Imported and Local Infections Newly Diagnosed in South Australia // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2013. – Vol. 29, № 2. – P. 311–317.

73. Neogi U., Siddik A.B., Kalaghatgi P., et al. Recent increased identification and transmission of HIV-1 unique recombinant forms in Sweden // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 6371.

74. Machnowska P., Meixenberger K., Schmidt D., et al. Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Seroconverter Study Cohort // PLOS ONE / ed. Mor O. – 2019. – Vol. 14, № 1. – P. e0209605.

75. Rhee S.-Y., Varghese V., Holmes S.P., et al. Mutational Correlates of Virological Failure in Individuals Receiving a WHO-Recommended Tenofovir-Containing First-Line Regimen: An International Collaboration // EBioMedicine. – 2017. – Vol. 18. – P. 225–235.

76. Hughes G.J., Fearnhill E., Dunn D., et al. Molecular Phylodynamics of the Heterosexual HIV Epidemic in the United Kingdom // PLoS Pathogens / ed. Emerman M. – 2009. – Vol. 5, № 9. – P. e1000590.

77. Caplinskas S., Loukachov V. V., Gasich E.L., et al. Distinct HIV Type 1 Strains in Different Risk Groups and the Absence of New Infections by Drug-Resistant Strains in Lithuania // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2013. – Vol. 29, № 4. – P. 732–737.

78. Kousiappa I., van de Vijver D.A.M.C., Demetriades I., et al. Genetic Analysis of HIV Type 1 Strains from Newly Infected Untreated Patients in Cyprus: High Genetic Diversity and Low Prevalence of Drug Resistance // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2009. – Vol. 25, № 1. – P. 23–35.

79. Worobey M., Watts T.D., McKay R.A., et al. 1970s and ‘Patient 0’ HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America // Nature. – 2016. – Vol. 539, № 7627. – P. 98–101.

80. Kinloch N.N., MacMillan D.R., Le A.Q., et al. Population-Level Immune-Mediated Adaptation in HIV-1 Polymerase during the North American Epidemic // Journal of Virology / ed. Kirchhoff F. – 2016. – Vol. 90, № 3. – P. 1244–1258.

81. Maldarelli F., Kearney M., Palmer S., et al. HIV Populations Are Large and Accumulate High Genetic Diversity in a Nonlinear Fashion // Journal of Virology. – 2013. – Vol. 87, № 18. – P. 10313–10323.

82. Roberts H.E., Hurst J., Robinson N., et al. Structured Observations Reveal Slow HIV-1 CTL Escape // PLOS Genetics / ed. Gojobori T. – 2015. – Vol. 11, № 2. – P. e1004914.

83. Mbisa J.L., Ledesma J., Kirwan P., et al. Surveillance of HIV-1 transmitted integrase strand transfer inhibitor resistance in the UK // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2020. – Vol. 75, № 11. – P. 3311–3318.

84. Lukashov V. V., Jurriaans S., Bakker M., et al. Transmission of Risk-Group Specific HIV-1 Strains Among Dutch Drug Users for More Than 20 Years and Their Replacement by Nonspecific Strains After Switching to Low-Harm Drug Practices // JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2013. – Vol. 62, № 2. – P. 234–238.

85. Rangel H.R., Garzaro D., Fabbro R., et al. Absence of Primary Integrase Resistance Mutations in HIV Type 1-Infected Patients in Venezuela // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2010. – Vol. 26, № 8. – P. 923–926.

86. Vercauteren J., Wensing A.M.J., van de Vijver D.A.M.C., et al. Transmission of Drug‐Resistant HIV‐1 Is Stabilizing in Europe // The Journal of Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 200, № 10. – P. 1503–1508.

87. Patiño-Galindo J.Á., Torres-Puente M., Bracho M.A., et al. The molecular epidemiology of HIV-1 in the Comunidad Valenciana (Spain): analysis of transmission clusters // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 11584.

88. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987—2015 гг. // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89, № 11.– С. 44–49.

89. Пономарева О.А., Ревизор А.О., Круглова Е.А., и др. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 на территории Иркутской области // Лабораторная служба. – 2016. – Т. 5, № 1.– С. 33–37.

90. Елисеева В.С., Кругляк С.П., Скляр Л.Ф., и др. Распространенность мутаций резистентности ВИЧ-1 к препаратам АРВТ в Приморском крае // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2015. – Т. 7, № 2.– С. 49–54.

91. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лебедев А.В., и др. Анализ резистентности ВИЧ в Приволжском федеральном округе Российской Федерации // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2015. – Т. 7, № 3.– С. 56–66.

92. Парфенова О.В., Пекшева О.Ю., Зайцева Н.Н. Распространение мутаций резистентности и субтипов ВИЧ-1 как показатель динамики эпидемии ВИЧ-инфекции в Приволжском федеральном округе в 2016-2018 гг. // Здоровье населения и среда обитания. – 2019. – № 8.– С. 50–56.

93. Новак К.Е., Никифорова А.О., Ингабире Т., и др. Оптимизация профилактики развития мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусных препаратов // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. – 2020. – Т. 119, № 3.– С. 47–51.

94. Liu T.F., Shafer R.W. Web Resources for HIV Type 1 Genotypic-Resistance Test Interpretation // Clinical Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 42, № 11. – P. 1608–1618.

95. Lee C.A., Kessler C.M., Varon D., et al. Resistance to HIV protease inhibitors // Haemophilia. – 1998. – Vol. 4, № 4. – P. 610–615.

96. Tenore S.B., Ferreira P.R.A. The Place of protease inhibitors in antiretroviral treatment // Brazilian Journal of Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 13, № 5. – P. 371–374.

97. Комаров Т.Н., Шохин И.Е., Мискив О.А., et al. Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС: 1 // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 99–108.

98. Илларионова Е., Гончикова Ю. Тонкослойная хроматография в определении антиретровирусных препаратов // Сборник научных трудов. Выпуск 6. – Иркутск, 2019.

ПРИЛОЖЕНИЕ А  
**Количественные показатели по подготовленной научной продукции**

| №  п/п | Наименование документа | Всего (утв/проект) |
| --- | --- | --- |
| 1. | Нормативные документы, в т.ч. | 0 |
| СП | 0 |
| СанПиН | 0 |
| Прочие (ГОСТы, Руководства) | 0 |
| 2. | Методические документы, в т.ч. | 0 |
| МУ | 0 |
| МУК | 0 |
| МР (методические рекомендации) | 0 |
| 3. | Информационно-методические документы, в т.ч. | 0 |
| информационно-методические письма | 0 |
| информационные письма | 0 |
| 4. | Патенты, положительные решения | 0 |
| Заявки на изобретения | 0 |
| 5. | МИБП, диагностические и профилактические препараты, в т.ч.: | 0 |
| ФСП | 0 |
| Промышленный регламент | 0 |
| регистрационные удостоверения | 0 |
| регистрационное досье | 0 |
| НТД | 0 |
| 6. | Программные продукты | **1/1** |
| базы данных | 0 |
| кадастр | 0 |
| другое (указать):  Программа для ЭВМ | **1/1** |
| 7. | Справки о депонировании штаммов/нуклеотидных последовательностей | 20/20 |
| 8. | Монографии, руководства, учебники и др. | 0 |
| 9. | Публикации, всего  в том числе:  **статьи** | **11/10**  **2/6** |
| Web of Science | 0 |
| Scopus | **3/2** |
| РИНЦ (ядро) | 0 |
| РИНЦ | **0/4** |
| **тезисы** | **6/4** |
| 10. | Защищено диссертаций сотрудниками учреждения: | 0 |
| кандидатские | 0 |
| докторские | 0 |

ПРОГРАММНЫЕ ПРОДУКТЫ:

1. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2021610375 от 13.01.2021 «ConSeqAssembler (Программное обеспечение для получения консенсусных последовательностей ВИЧ-1)». Авторы: Захарова Ю.А., Питерский М.В., Гусев М.В.
2. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2021668501 от 17.11.2021 «Программа для анализа первичных данных секвенирования региона pol ВИЧ-1». Авторы: Гусев А.Г., Захарова Ю.А., Питерский М.В., Семенов А.В.

СТАТЬИ:

1. Разнообразие субтипов, филогенетический анализ и изучение лекарственной устойчивости штаммов ВИЧ-1, циркулирующих в Уральском федеральном округе / Питерский М.В., Гусев А.Г., Ходаков О.А., Захарова Ю.А., Семенов А.В. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99. – №. 1. – С. 38-53. (doi: 10.36233/0372-9311-178)

2. Оценка серопревалентности к SARS-CoV-2 в различных группах населения с помощью моделей логит-регрессии в начальный период формирования коллективного иммунитета / Мищенко В.А., Питерский М.В., Смирнова С.С., Платонова Т.А., Вялых И.В., Быков И.П., Вяткина Л.Г., Махорина Т.В., Орлов А.М., Попкова Н.Г., Семенов А.В. // Проблемы особо-опасных инфекций. – 2022. – №. 1. – С. 113-121 (doi: 10.21055/0370-1069-2022-1-113-121)

***В редакции:***

3. Ключевые факторы риска передачи ВИЧ-инфекции лицами из мест лишения свободы / Питерский М.В., Семенов А.В., Захарова Ю.А., Яранцева О.Я., Ходаков О.А., Евсеева В. И., Грейсман М.О. // Анализ рисков здоровью

ТЕЗИСЫ:

1. Оптимизация филогенетического анализа на примере кластеризации нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 / М.В. Питерский, О. А. Ходаков // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология (тезисы IX Международной школы молодых учёных по молекулярной генетике «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям»). – 2021. – Т. 39, №S 1-2. – С. 41.

2. Распространенность и особенности течения COVID-19 у людей, живущих с ВИЧ, и доноров / Ю.А. Захарова, М.В. Питерский, О.А. Ходаков // Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной 120-летию со дня рождения А.А. Смородинцева (15 апреля 2021, Санкт-Петербург). – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2021. – С. 24-25.

3. Изучение информированности женщин секс-работниц Свердловской области в вопросах профилактики ВИЧ-инфекции / Питерский М.В., Захарова Ю.А., Сперанская Е.В., Евсеева В.И., Грейсман М.О., Савватеев Е.Ю. // Журнал инфектологии. – 2021. – Т. 13, № 3S. – С. 157-158.

4. Динамика серопревалентности к SARS-CoV-2 в различных группах населения в период пандемического распространения новой коронавирусной инфекции / Мищенко В.А., Питерский М.В., Смирнова С.С., Платонова Т.А., Попкова Н.Г., Семенов А.В. // Сборник тезисов ко II-й Международной научно-практической конференции по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям. – 2021.

5. Влияние охвата медицинским освидетельствованием на ВИЧ-инфекцию на заболеваемость ВИЧ-инфекцией на территории Уральского федерального округа / Питерский М.В., Яранцева О.Я., Захарова Ю.А., Семёнов А.В. // Сборник тезисов к международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Охрана здоровья матери и ребенка». – 2022.

6. Главный фактор заболеваемости СПИДом в Уральском федеральном округе / Питерский М.В., Яранцева О.Я., Захарова Ю.А., Семёнов А.В. // Сборник тезисов к международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Охрана здоровья матери и ребенка». – 2022.

Справки о депонировании штаммов/нуклеотидных последовательностей:

Справка о депонировании в международном банке генетической информации «GenBank» 20 последовательностей нуклеотидов гена pol РНК ВИЧ-1, выявленных среди больных ВИЧ-инфекцией, проживающих на территории Тюменской области в 2022 г. Submittion number GenBank: 2652643.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б  
**Протокол тестирования праймеров для секвенирования гена pol ВИЧ-1 на участке, кодирующем протеазу и обратную транскриптазу.**

1. Перечень оборудования, реактивов и расходных материалов.
2. Разведение праймеров
3. Выделение нуклеиновых кислот из ВИЧ - положительных сывороток
   1. получение кДНК - обратная транскрипция
   2. концентрирование проб
   3. аликвотирование
4. Проведение реакции амплификации с праймерами для I-го раунда
5. Электрофорез результатов амплификации с праймерами для I-го раунда.
6. Проведение реакции амплификации с праймерами для II-го раунда
   1. тестирование протеазы
   2. тестирование ревертазы
7. Электрофорез результатов ПЦР с праймерами для II-го раунда.
8. Проведение ПЦР-реакции с праймерами для секвенирующей реакции.
9. Электрофорез результатов ПЦР с праймерами для секвенирующей реакции.

**1. Перечень оборудования и реактивов.**

**1.1 Перечень оборудования**

* Стерильный ламинарный бокс
* Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс)
* Твердотельный термостат для пробирок 25-100°С
* Микроцентрифуга до 13 тыс g
* Вортекс
* Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой -ловушкой для удаления надосадочной жидкости
* Автоматические дозаторы переменного объема
* Амплификатор программируемый CFX96 BIO-RAD c градиентом температур
* Амплификатор программируемый Thermal Cycler Applied Biosystems 2720
* Центрифуга лабораторная Hettich LAB TECHNOLOGY 20 тыс g с охлаждением для планшетов
* Центрифуга лабораторная ROTINA 38 R Hettich LAB TECHNOLOGY 20 тыс g с охлаждением для пробирок
* Трансиллюминатор УФО с оптической системой для просмотра гелей и регистрации результатов
* Камера для горизонтального электрофореза
* Микроволновая печь для плавления агарозы
* Шейкер для 96-луночных планшетов Эппендорф
* Пробирки одноразовые полипропиленовые объемом 1,5 мл
* Пробирки одноразовые полипропиленовые объемом 0,2 мл
* Планшеты 96-луночные для проведения реакции секвенирования
* Держатели для планшетов
* Септы для планшетов
* Наконечники одноразовые с фильтром и без фильтра переменного объема
* Холодильник 2-8°С с морозильной камерой не выше минус 16°С
* Комплект защитной одежды для персонала
* Емкости для сбора отходов.

**1.2 Перечень реактивов**.

* Набор праймеров (приложение №1)
* Набор реактивов для ПЦР Tersus PCR kit
* Набор для выделения «МАГНО-сорб» АмплиСенс (ЦНИИЭ Роспотребнадзора).
* Набор для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора).
* Набор для обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» АмплиСенс ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

**2. Разведение праймеров**

**2.1 Разведение праймеров для первого раунда**.

Для тестирования были выбраны 3 группы праймеров. Параметры ПЦР-реакции определены с помощью сервиса «Tm calculator»[[6]](#footnote-6) (таблицы Б.1, Б.2, Б.3).

Таблица Б.1 – Праймеры для первого раунда

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ пары** | **Праймер** | **Старт** | **Стоп** | **Tm, °С** | **Направление** | **Длина ампликона** |
| 1 | a | 2008 | 2031 | 62,3 | прямой | 1878 |
| k | 3867 | 3886 | 55,3 | обратный |
| 2 | a | 2008 | 2031 | 62,3 | прямой | 2019 |
| l | 4000 | 4027 | 59,4 | 1 раунд обр |
| 3 | a | 2008 | 2031 | 62,3 | прямой | 2069 |
| m | 4050 | 4077 | 59,1 | 1 раунд обр |
| 4 | b | 2010 | 2039 | 59,5 | 1 раунд пр | 2017 |
| l | 4000 | 4027 | 59,4 | 1 раунд обр |
| 5 | b | 2010 | 2039 | 59,5 | 1 раунд пр | 2067 |
| m | 4050 | 4077 | 59,1 | 1 раунд обр |
| 6 | b | 2010 | 2039 | 59,5 | 1 раунд пр | 1876 |
| k | 3867 | 3886 | 55,3 | 1 раунд обр |

Таблица Б.2 – Праймеры для второго раунда

| **№ пары** | **Праймер** | **Старт** | **Стоп** | **Tm, °С** | **Направление** | **Длина ампликона** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Праймеры на протеазу** | | | | | | |
| 1 | b | 2010 | 2039 | 59,5 | прямой | 29 |
| c | 2020 | 2039 | 55,9 | обратный |
| 2 | b | 2010 | 2039 | 59,5 | прямой | 29 |
| e | 2813 | 2839 | 53,5 | обратный |
| **Праймеры на ревертазу** | | | | | | |
| 3 | f | 2388 | 2407 | 53,8 | прямой | 1402 |
| h | 3774 | 3790 | 57,8 | обратный |
| 4 | g | 2392 | 2415 | 55,7 | прямой | 1398 |
| h | 3774 | 3790 | 57,8 | обратный |
| 5 | g | 2392 | 2415 | 55,7 | прямой | 1494 |
| k | 3867 | 3886 | 55,3 | обратный |
| 6 | f | 2388 | 2407 | 53,8 | прямой | 1498 |
| k | 3867 | 3886 | 55,3 | обратный |

Таблица Б.3 – Секвенирующие праймеры

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название | Начало | Конец | Общая область | Температура отжига | Область | Направление |
| aa | 2074 | 2095 | 21 | 51,7 | протеаза | прямой |
| bb | 2090 | 2109 | 19 | 49,6 | протеаза | прямой |
| cc | 2388 | 2407 | 19 | 53,8 | ревертаза | прямой |
| gg | 2586 | 2602 | 16 | 52 | протеаза | обратный |
| ii | 2882 | 2902 | 20 | 51,6 | ревертаза | прямой |
| jj | 3012 | 3030 | 18 | 50,6 | ревертаза | обратный |
| ll | 3039 | 3060 | 21 | 50,1 | ревертаза | обратный |
| nn | 3231 | 3248 | 17 | 46,3 | ревертаза | обратный |
| oo | 3231 | 3247 | 16 | 46,3 | ревертаза | прямой |
| pp | 3303 | 3322 | 19 | 52,5 | ревертаза | обратный |
| mm | 3222 | 3241 | 19 | 54,5 | ревертаза | прямой |
| rr | 3774 | 3791 | 17 | 52,7 | ревертаза | обратный |
| tt | 3867 | 3886 | 19 | 55,3 | ревертаза | обратный |

Для тестирования выбраны следующие группы праймеров:

1. а, k, l, m, b;
2. bc, be, fh, fk,gh, gk;
3. ccrr, mmnn, ccjj, ccpp, bbgg, iijj, iipp, iirr, nnpp, aagg, ccll, ccnn, iill, iinn, oopp, oorr

**2.2 Разведение праймеров для второго раунда**.

Разведение праймеров проводилось в соответствии с паспортом на олигонуклеотиды (таблица Б.4).

Таблица Б.4 – Параметры разведения праймеров для получения стокового раствора

| Праймер | Количество вещества (нмоль) | Масса праймера, (Мкг) | Вода (мкл) | Концентрация мкМ/мл | Молекулярный вес, (г/моль) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **a** | 46.37 | 344,03 | 464 | 100 | 7420 |
| **b** | 61,6 | 521,48 | 616 | 100 | 8466 |
| **c** | 50,08 | 313,41 | 501 | 100 | 6258 |
| **e** | 49,74 | 367,23 | 497 | 100 | 7383 |
| **f** | 44,23 | 278,98 | 442 | 100 | 6307 |
| **g** | 37,89 | 283,45 | 379 | 100 | 7480 |
| **h** | 53,7 | 324,49 | 537 | 100 | 6043 |
| **k** | 45,7 | 317,45 | 457 | 100 | 6945 |
| **l** | 65,13 | 552,37 | 651 | 100 | 8481 |
| **m** | 44,21 | 378,67 | 442 | 100 | 8566 |
| **aa** | 38,2 | 259,45 | 382 | 100 | 6792 |
| **bb** | 47,81 | 264,37 | 478 | 100 | 5529 |
| **gg** | 53,06 | 268,29 | 531 | 100 | 5056 |

Были приготовлены растворы праймеров (а, b, c, e, f, g, h, k, l, m, k) -стоковая концентрация каждого праймера 100 мкМоль.

Основные растворы секвенирующих праймеров (cc, rr, mm, nn, jj, pp, bb, gg, ii, jj, rr, aa,ll, oo) были приготовлены аналогично.

Из основных растворов праймеров с концентрацией 100 мкМоль были приготовлены аликвоты объемом 100 мкл и рабочей концентрацией 10 мкМоль для тестирования.

**3. Выделение нуклеиновых кислот из ВИЧ - положительных сывороток.**

**3.1 Получение кДНК - обратная транскрипция**

В качестве матрицы для тестирования праймеров использовали биологический материал.

ВИЧ- позитивные сыворотки были отобраны для получения кДНК и определения вирусной нагрузки.

Выделение РНК и тотальной ДНК для тестирования праймеров первого раунда и второго раунда проводилось из проб 2020 года комплектом реагентов «МАГНО-сорб» АмплиСенс ЦНИИЭ Роспотребнадзора по инструкции к набору.

Постановка реакции обратной транскрипции проводилась комплектом реагентов «РЕВЕРТА-L» АмплиСенс ЦНИИЭ Роспотребназора по инструкции к набору.

Было получено 25 кДНК аликвот по 40 мкл.

**3.2 Концентрирование проб**

Определение вирусной нагрузки проводилось набором «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT».

В соответствии с протоколом амплификации от 2022.07.13 AmpliSens HIV Soft Monitor из партии полученных кДНК продуктов для тестирования праймеров были отобраны 4 аликвоты, соответствующие пробам с максимальной вирусной нагрузкой ВИЧ-1 (таблица Б.5).

Таблица Б.5 – Аликвоты с максимальной вирусной нагрузкой ВИЧ-1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № п/п | ID образца | Вирусная нагрузка в сыворотке, копии/мл | Объем кДНК, мкл |
| 1 | 236 | 613 118 | 40 |
| 2 | 355 | 651 300 | 40 |
| 3 | 372 | 684 950 | 40 |
| 4 | 423 | 755 536 | 40 |

**3.3 Аликвотирование**

Данные аликвоты были собраны в отдельную общую пробирку. Объем доведен стерильной деионизированной Н2О до 480 мкл.

Общую аликвоту разделили на несколько пробирок

Данное разведение ошибочное, так как следовало развести буфером ДНК.

При этом способе разведения-концентрация копий – 225 406 кп/мл.

**4. Проведение реакции амплификации первого раунда**.

Для получения ПЦР - продукта использовался амплификатор CFX-96 (BioRaD),

Для тестирования праймеров использовалась коммерческая тест-система Tersus Plus PCR kit (Евроген).

Рабочее разведение праймеров:

Основной 100 мкМ раствор праймеров был разведен стерильной деионизированной водой в соотношении 1:1000. Концентрация рабочего раствора составила 0.1 мкМ (таблица Б.6).

Таблица Б.6 ‒ Расчет объема праймеров для постановки ПЦР-реакции

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Концентрация основного раствора, мкМ | Разведение | Концентрация рабочего раствора, мкМ | на одну реакцию, мкл |
| a | 100 | 1:1000 | 0,1 | 1 |
| b | 100 | 1:1000 | 0,1 | 1 |
| l | 100 | 1:1000 | 0,1 | 1 |
| m | 100 | 1:1000 | 0,1 | 1 |
| к | 100 | 1:1000 | 0,1 | 1 |

Приготовление реакционной смеси для ПЦР проводилось по таблице из инструкции ПЦР набора Tersus Plus PCR kit (таблица Б.7). Составлен шаблон планшета (таблица Б.8) и программа циклирования (таблица Б.9).

Таблица Б.7 – Состав реакционной смеси

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент | Объем на одну реакцию, мкл |
| 5X Tersus Red буфер | 5 мкл |
| dNTP | 0,5 мкл |
| Полимераза | 0,5 мкл |
| Вода | 5 мкл |
| Праймер 1 | 1 мкл |
| Праймер 2 | 1 мкл |
| Матрица | 10 мкл |

Таблица Б.8 – Шаблон планшета

|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |  | **T0C** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **A** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **A** | 59,5 |
| **B** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **B** | 58 |
| **C** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **C** | 56,5 |
| **D** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **D** | 55 |
| **E** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **E** | 53,5 |
| **F** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **F** | 52 |
| **G** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **G** | 50,5 |
| **H** | al | am | ak | bl | bm | bk |  |  |  |  |  |  | **H** | 49 |

Таблица Б.9 – Программа циклирования

| № | Количество циклов | Температура, °С | Время, сек |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1 | 95 | 60 |
| 2 | 45 | 95 | 20 |
| 49-59,5 | 30 |
| 72 | 180 |
| 3 | 1 | 72 | 180 |
| 4 |  | 4 | длительно |

**5.** **Электрофорез результатов амплификации с праймерами для первого раунда**

Эффективность амплификации оценивалась по детекции целевых продуктов реакции в 1% агарозном геле с бромистым этидием и маркером молекулярных масс.

Электрофорез был проведен в 1% агарозном геле. Для приготовления 1% ТВЕ буфера использовался 10Х концентрат.

Для получения 1000 мл 1% раствора ТВЕ к 100 мл 10 Х ТВЕ- концентрата буфера добавили 900 мл деионизированной воды.

В мерную колбу внесли 100 мл 1% раствора ТВЕ буфера и 1,0 г агарозы. Прогрели в микроволновой печи до полного растворения агарозы.

В мерную колбу добавили 1 каплю бромистого этидия. Прогрели смесь до кипения.

Остудили колбу до температуры 40°С.

Над платформой для полимеризации геля установили гребенки, чтобы сформировать лунки для нанесения образцов.

Жидкий агарозный гель осторожно залили в камеру для полимеризации. Оставили на 40 минут для затвердевания гелевой пластины.

Через 40 минут вынули гребенки из гелевой пластины так, чтобы не повредить лунки.

Поместили готовую гелевую пластину в камеру для электрофореза. Добавили 1% буфер ТБЕ в количестве, достаточном для покрытия гелевой пластины на 4 мм

В лунки для образцов осторожно, чтобы не повредить лунки, внесли по 5 мкл продуктов реакции I раунда и маркеры молекулярных масс.

Напряжение в электрофоретической камере установили из расчета 5 вольт на 1 см длины геля, что составило 80В

Через 80 минут электрофорез был остановлен.

Визуализация результатов проведена с помщью трансиллюминометра BioRad.

Ампликоны ДНК светятся при ультрафиолетовом облучении (λ400 нм) присутствии бромистого этидия. Установлена слабая детекция бенда, соответствующая продукту **al** на уровне молекулярного маркера 600-700 пн., температура отжига 59,5°С (рисунок Б.1, Б.2).

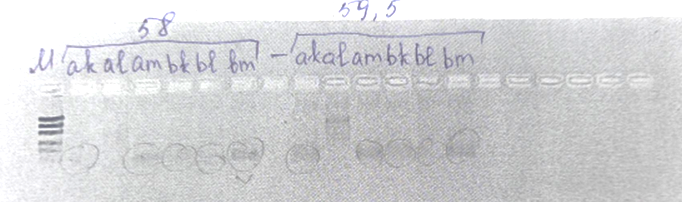


Рисунок Б.1 – Электрофорез продуктов амплификации первого раунда

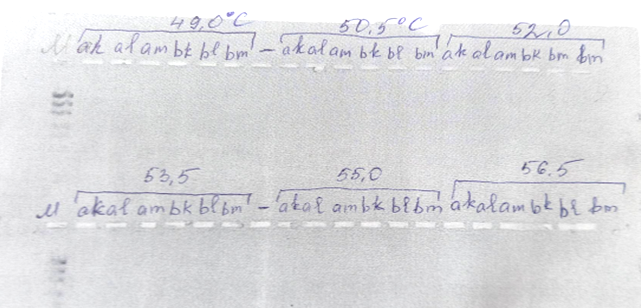


Рисунок Б.2 – Электрофорез продуктов амплификации первого раунда (продолжение)

**6. Проведение реакции амплификации с праймерами для II-го раунда**

Для получения ПЦР - продукта использовался амплификатор CFX-96 (BioRaD).

Для тестирования праймеров использовалась коммерческая тест-система Tersus Plus PCR kit (Евроген)

Рабочее разведение праймеров:

1. Основной 100 мкМ раствор праймеров был разведен стерильной деионизированной водой в соотношении 1:10. Концентрация рабочего раствора составила 10 мкМ.
2. Составлены две пары праймеров для тестирования протеазы: bc, be.
3. Составлены пары праймеров для тестирования ревертазы: gh, gk, fh, fk

Для тестирования праймеров для участка генома ВИЧ, кодирующего протеазу, ВИЧ был составлены планшет с парами праймеров «be» и «ce» (таблица Б.10), подготовлена программа для амплификации (таблица Б.11).

Таблица Б.10 – Макет планшета с градиентом температур. Цветом выделены температуры, выбранные для амплификации

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **be** | **ce** | **T гр С** |
|  | 1 | 2 | градиент |
| A |  |  | 59,5 |
| B | ● | ● | 59 |
| C |  |  | 57,9 |
| D | ● | ● | 56 |
| E | ● | ● | 53,7 |
| F |  |  | 51,9 |
| G |  |  | 50,6 |
| H | ● | ● | 50 |

Таблица Б.11 – Программа амплификации

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Количество циклов | Т°С | Время, сек |
| 1 | 1 | 95 | 60 |
| 2 | 45 | 95 | 20 |
| 49-59,5 | 30 |
| 72 | 180 |
| 3 | 1 | 72 | 180 |
| 4 |  | 4 | длительно |

Для тестирования праймеров для участка генома ВИЧ, кодирующего ревертазу, отобраны 5 праймеров, скомбинированные в 4 пары (таблица Б.12), составлены два планшета: первый с парами праймеров «gh», «gk» (таблица Б.13), второй с парами праймеров «fh», «fk» (таблица Б.14), подготовлена программы для амплификации с градиентами температур отжига праймеров.

Таблица Б.12 – Пары праймеров для тестирования ревертазы

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № пары | Праймер | Направления |
| 1 | g | прямой |
| h | обратный |
| 2 | g | прямой |
| k | обратный |
| 3 | f | прямой |
| h | обратный |
| 4 | f | прямой |
| k | обратный |

Таблица Б.13 – Макет планшетов для праймеров gh, gk с градиентом температур. Цветом выделены температуры, выбранные для амплификации

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | gh | gk |  |  | T гр С |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | градиент |
| A | ● | ● |  |  | 59 |
| B |  |  |  |  | 58,4 |
| C | ● | ● |  |  | 57,3 |
| D |  |  |  |  | 55,3 |
| E | ● | ● |  |  | 52,3 |
| F |  |  |  |  | 51 |
| G |  |  |  |  | 49,7 |
| H |  |  |  |  | 49 |

Таблица Б.14 – Макет планшетов для праймеров fh, fk с градиентом температур. Цветом выделены температуры, выбранные для амплификации

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | fh | fk | T гр С |
|  | 1 | 2 | градиент |
| A | ● | ● | 61 |
| B |  |  | 60,5 |
| C |  |  | 59,5 |
| D | ● | ● | 57,7 |
| E |  |  | 55,6 |
| F |  |  | 53,8 |
| G |  |  | 52,6 |
| H | ● | ● | 52 |

Таблица Б.15 – Состав реакционной смеси

|  |  |
| --- | --- |
| Компонент | Объем на одну реакцию, мкл |
| 5X Tersus Red буфер | 5 мкл |
| dNTP | 0,5 мкл |
| Полимераза | 0,5 мкл |
| Вода | 5 мкл |
| Праймер 1 | 1 мкл |
| Праймер 2 | 1 мкл |
| Матрица | 10 мкл |

При приготовлении реакционной смеси были учтены ошибки разведения рабочего раствора праймеров. Рабочий раствор праймеров 10 мкМ. Концентрация праймеров в готовой реакционной смеси при объеме рабочего раствора 1 мкл- 0,4 мкМ. Программа амплификации для второго раунда предусматривала градиент температур отжига от 49,0 до 59,5°С (таблица Б.16).

Таблица Б.16 – Программа амплификации

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Количество циклов | Температура, °С | Время, сек |
| 1 | 1 | 95 | 60 |
| 2 | 45 | 95 | 20 |
| 49-59,5 | 30 |
| 72 | 180 |
| 3 | 1 | 72 | 180 |
| 4 |  | 4 | длительно |

**7. Электрофорез результатов амплификации с праймерами для II-го раунда**.

Электрофорез проводили по вышеописанной методике. Целевой продукт be слабо детектируется при Т- 50°С °;Т- С 53.7°С; Т- С 56°С; Т- С 59°С на уровне маркера молекулярных масс 550-600 пн (рисунки Б.3, Б.4, Б.5).

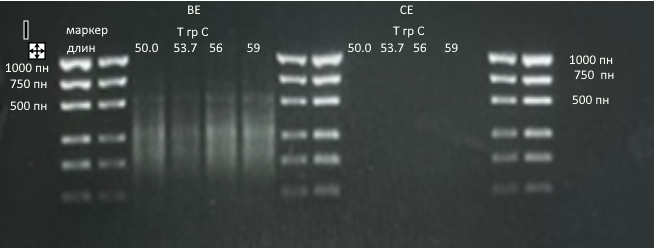


Рисунок Б.3 – Электрофорез продуктов амплификации с праймерами «be» и «ce»

Целевой продукт праймеров «gh» детектирован при температуре отжига 57,3-59°С (рисунок Б.4), продукты амплификации праймеров «fh» обнаружены при температуре отжига 57,7-61,0°С (рисунок Б.5)

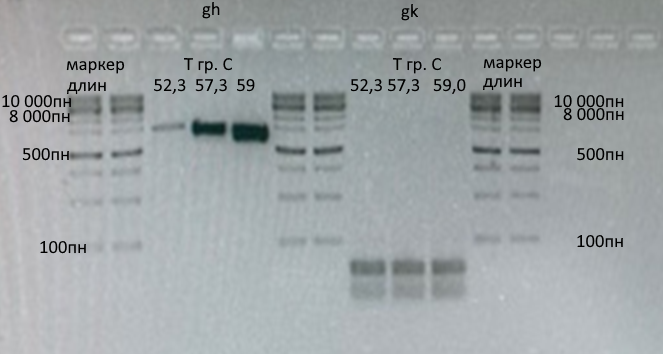
****

Рисунок Б.4 – Электрофорез продуктов реакции в агарозном геле с праймерами «gh» и «gk»

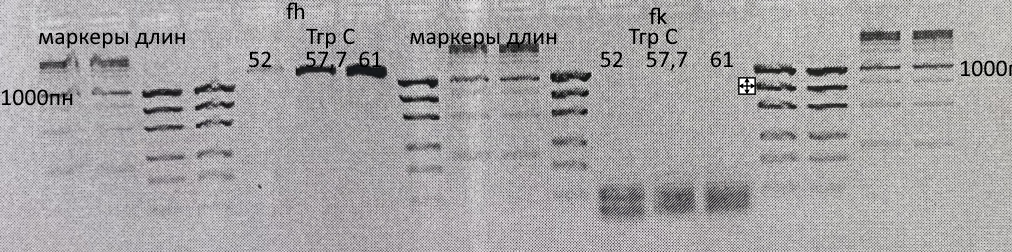


Рисунок Б.5 – Электрофорез продуктов реакции в агарозном геле с праймерами «fh» и «fk»

**8. Проведение реакции амплификации с секвенирующими праймерами.**

Были составлены пары из прямого и обратного праймеров на участок генома ВИЧ, кодирующий протеазу и ревертазу, близкие по значению температуры отжига. Для ПЦР реакции были предусмотрен два варианта градиентов температуры отжига (таблицы Б.17, Б.18).

Таблица Б.17 – Макет планшетов для амплификации секвенирующих праймеров с градиентом температур от 44 до 54 °С

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | T гр С |
| A |  |  |  |  |  |  | 54 |
| B |  |  |  |  |  |  | 53,4 |
| C |  |  |  |  |  |  | 52,3 |
| D | cc-rr | mm-nn |  |  |  |  | 50,3 |
| E | cc-jj | cc-pp | ii-jj | ii-pp | ii-rr | nn-pp | 47,9 |
| F | bb-gg |  |  |  |  |  | 46 |
| G |  |  |  |  |  |  | 44,6 |
| H |  |  |  |  |  |  | 44 |

Таблица Б.18 – Макет планшетов для амплификации секвенирующих праймеров с градиентом температур от 40 до 51°С

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | T гр С |
| A |  |  |  |  |  |  | 51 |
| B |  |  |  |  |  |  | 50,4 |
| C | **aa-gg** |  |  |  |  |  | **49,1** |
| D | cc-ll | ii-ll |  |  |  |  | **47** |
| E |  |  |  |  |  |  | **44,3** |
| F | cc-nn | ii-nn | oo-pp | oo-rr |  |  | **42,2** |
| G |  |  |  |  |  |  | **40,7** |
| H |  |  |  |  |  |  | **40** |

Реакционную смесь готовили на основе инструкции производителя для набора реагентов «Tersus Plus PCR kit» (таблица Б.18)

Таблица Б.18 – Состав реакционной смеси для секвенирующих праймеров

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Реагент ПЦР-смеси | Объем, мкл |
| 1 | 5х Tersus буфер |  |
| 2 | 50х смесь d NTP |  |
| 3 | PCR-праймер прямой | 1 |
| PCR-праймер обратный | 1 |
| 4 | 50х Tersus полимераза | 0,5 |
| 5 | ДНК -матрица | 5 |
| 6 | Вода | 12 |
| Конечный объем | | 25 |

Программы амплификации для двух вариантов градиентов температур отжига были идентичны (таблица Б.19)

Таблица Б.19 – Программа амплификации

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Количество циклов | **Температура,** °С | Время, сек |
| 1 |  | прогрев | пауза |
| 2 | 1 | 95 | 1 мин |
| 3 | 35 | 95 | 20 сек |
| градиент | 30 сек |
| 72 | 1 мин |
| 4 | 1 | 72 | 5 мин |
| 5 |  | 4 | удержание |

**9. Электрофорез результатов ПЦР с праймерами для секвенирующей реакции.**

Методика электрофоретического разделения продуктов амплификации описана выше. Целевой продукт пар праймеров «aa-gg», «cc-ll», «ii-ll», «ii-nn», «oo-pp», «oo-rr» детектировался на уровне маркеров длин 500-700 пн. Определена детекция целевого продукта ccjj, bbgg, mmnn, iipp, nnpp. (рисунок Б.6, Б7).

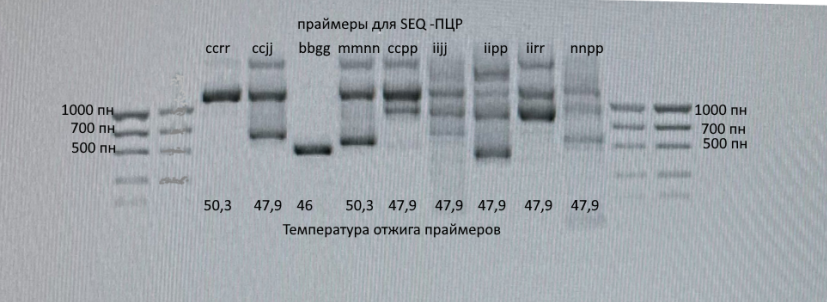


Рисунок Б.6 – Электрофорез продуктов амплификации секвенирующих праймеров (первый прогон)

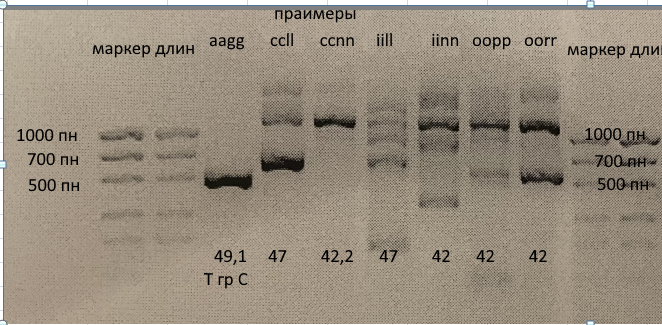


Рисунок Б.7 – Электрофорез продуктов амплификации секвенирующих праймеров (второй прогон)

Таким образом, пары праймеров «**а-l», «b-e», «g-h», «mm-nn», «cc-jj», «bb-«gg», «ii-jj», «ii-pp», «nn-pp», «aa-gg», «cc-ll», , «ii-ll», «ii-nn», «oo-rr»** позволяют получитьспецифический продукт в виде ампликонов генома ВИЧ, на участках кодирующих протеазу и ревертазу.

ПРИЛОЖЕНИЕ В  
**Результаты определения чувствительности праймеров «in silico»**

В приложении «В» приведены результаты анализа чувствительности праймеров. На рисунках графически изображено по оси ОХ число нуклеотидов несовпадающих с геномом из банка. По оси ОУ процент геномов в банке. Полученный результат характеризует то насколько праймер комплементарен матрице. Чем больше геномов не имеют не совпадающих нуклеотидов, тем выше чувствительность праймера.

**1. Результаты тестирования праймера «а»**

Длина праймера «а‎» 24 нуклеотида. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[7]](#footnote-7) рассчитано, что праймер «а‎» для 96,94% последовательностей имеет не менее 21 комплементарного основания, при этом 67,33% последовательностей имеет не более 1 не комплементарного основания (рисунок В.1). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 82,3%, для субтипа В 36,6%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 23,75±0,61 (n=79), для субтипа В – 23,03±0,95 (n=1388). Все последовательности субтипа CRF63 (n=3) комплементарны праймеру «а». Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «а» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа А6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 3,8%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «а» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0.1%. Не комплементарных праймеру «а» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

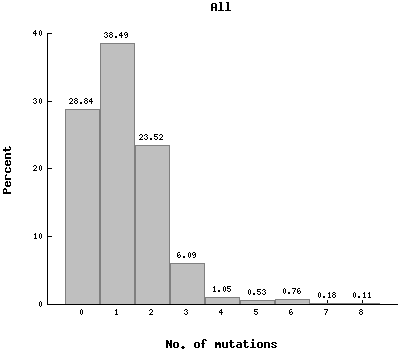


Рисунок В.1 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «a» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**2. Результаты тестирования праймера «b»**

Длина праймера «b» 27 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[8]](#footnote-8) рассчитано, что праймер «b» для 97,19% последовательностей имеет не менее 24 комплементарых оснований, при этом 68,55% последовательностей имеет не более 1 не комплементарного основания (рисунок В.2). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 81%, для субтипа В 38,9%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 26,73±0,61 (n=79), для субтипа В – 26,06±1,08 (n=1389). Все последовательности субтипа CRF63 (n=3) комплементарны праймеру «b». Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Не комплементарных праймеру «а» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа А6 не было. Максимальное количество не комплементарных праймеру «а» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 2%. Не комплементарных праймеру «а» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

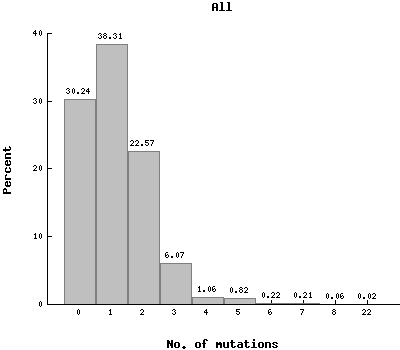


Рисунок В.2 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «b» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**3. Результаты тестирования праймера «l»**

Длина праймера «l» 31 нуклеотид. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[9]](#footnote-9) рассчитано, что праймер «l» для 94,88% последовательностей имеет не менее 26 комплементарых оснований, при этом 67,91% последовательностей имеет не более 3 не комплементарных оснований (рисунок В.3). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 65,8%, для субтипа В 23,7%, для субтипа CFR63 33,3%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 30,61±0,61 (n=79), для субтипа В – 29,7±1,06 (n=1389). для субтипа СRF63 – 30±1 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «l» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 1,3%.. Максимальное количество не комплементарных праймеру «l» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,2%. Не комплементарных праймеру «l» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

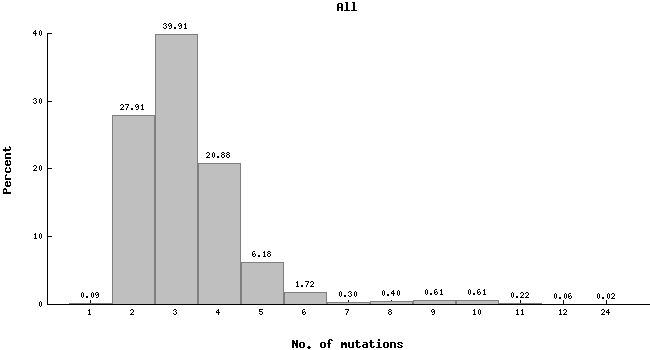


Рисунок В.3 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «l» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов).

**4. Результаты тестирования праймера «m»**

Длина праймера «m» 31 нуклеотид. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[10]](#footnote-10) рассчитано, что праймер «m» для 94,15% последовательностей имеет не менее 29 комплементарых оснований, при этом 83,32% последовательностей имеет не более 2 не комплементарных оснований (рисунок В.4). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 2,5%, для субтипа В 49,8%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 29,86±0,45 (n=79), для субтипа В – 30,27±0,88 (n=1389). для субтипа СRF63 – 29,67±0,58 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «m» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 1,3%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «m» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,2%. Не комплементарных праймеру «m» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

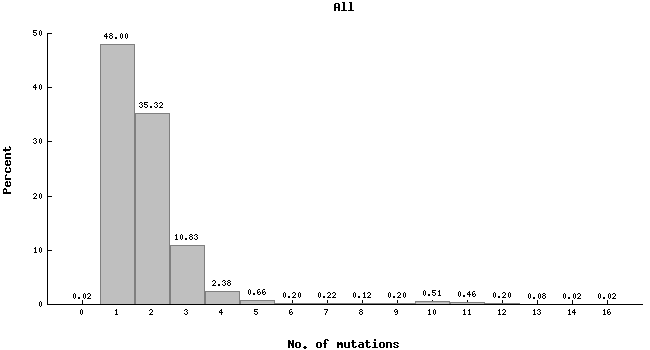


Рисунок В.4 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «m» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**5. Результаты тестирования праймера «c»**

Длина праймера «c» 20 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[11]](#footnote-11) рассчитано, что праймер «с» для 97,69% последовательностей имеет не менее 18 комплементарых оснований, при этом 88,63% последовательностей имеет не более 1 не комплементарного основания (рисунок В.5). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 89,9%, для субтипа В 63,4%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 19,9±0,3 (n=79), для субтипа В – 19,52±0,79 (n=1389). Все последовательности субтипа CRF63 (n=3) комплементарны праймеру «с». Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Не комплементарных праймеру «с» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа А6 не было. Максимальное количество не комплементарных праймеру «с» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 2%. Не комплементарных праймеру «с» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

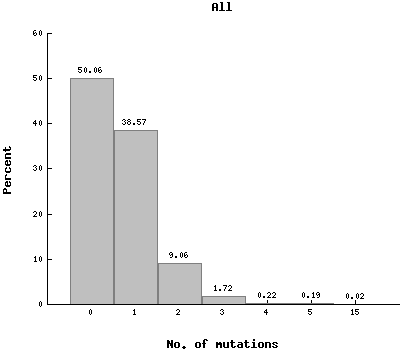


Рисунок В.5 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «c» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**6. Результаты тестирования праймера «e»**

Длина праймера «e» 27 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[12]](#footnote-12) рассчитано, что праймер «e» для 90,07% последовательностей имеет не менее 24 комплементарых оснований, при этом 70,02% последовательностей имеет не более 2 не комплементарных оснований (рисунок В.6). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 2,5%, для субтипа В 62,9%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 25,77±0,51 (n=79), для субтипа В – 26,53±0,76 (n=1389). для субтипа CFR63 – 25 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «e» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 100%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «e» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 8,9%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «e» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа CRF63 не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,4%.

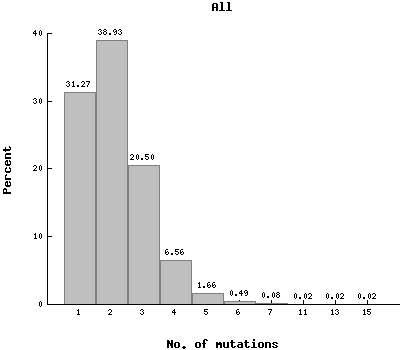


Рисунок В.6 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «e» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**7. Результаты тестирования праймера «f»**

Длина праймера «f» 20 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[13]](#footnote-13) рассчитано, что праймер «f» для 95,53% последовательностей имеет не менее 19 комплементарых оснований, при этом 70,06% последовательностей не имеет не комплементарных оснований (рисунок В.7). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 91,1%, для субтипа В 86,3%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 19,91±0,29 (n=79), для субтипа В – 19,84±0,43 (n=1389). для субтипа CFR63 – 20 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «f» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 3,8%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «f» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 2,4%. Не комплементарных праймеру «f» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

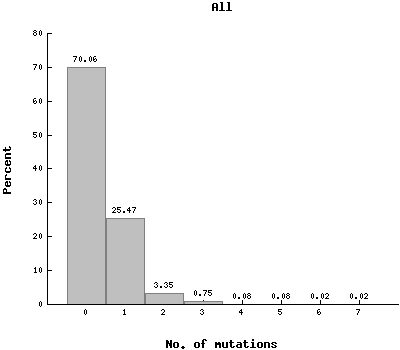


Рисунок В.7 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «f» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**8. Результаты тестирования праймера «g»**

Длина праймера «g» 24 нуклеотида. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[14]](#footnote-14) рассчитано, что праймер «g» для 96,71% последовательностей имеет не менее 22 комплементарых оснований, при этом 56,07% последовательностей не имеет не комплементарных оснований (рисунок В.8). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 83,5%, для субтипа В 76,7%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 23,81±0,46 (n=79), для субтипа В – 23,73±0,54 (n=1389). для субтипа CFR63 – 23 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «g» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 3,8%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «g» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 8,1%. Не комплементарных праймеру «g» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

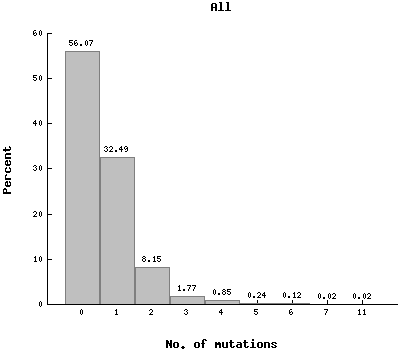


Рисунок В.8 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «g» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**9. Результаты тестирования праймера «h»**

Длина праймера «h» 20 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[15]](#footnote-15) рассчитано, что праймер «h» для 98,66% последовательностей имеет не менее 18 комплементарых оснований, при этом 89,83% последовательностей имеет не более 1 комплементарного основания (рисунок В.9). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 0%, для субтипа В 66,6%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 18,94±0,25 (n=79), для субтипа В – 19,61±0,6 (n=1389). для субтипа CFR63 – 19 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «h» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 1,3%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «h» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,1%. Не комплементарных праймеру «h» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

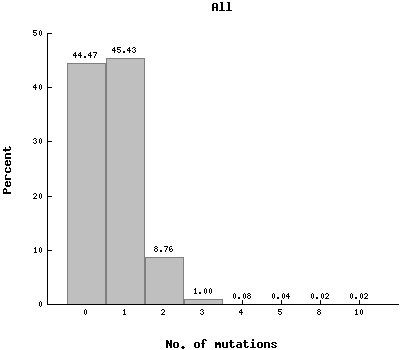


Рисунок В.9 Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «h» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**10. Результаты тестирования праймера «k»**

Длина праймера «k» 23 нуклеотида. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[16]](#footnote-16) рассчитано, что праймер «k» для 96,31% последовательностей имеет не менее 21 комплементарного основания, при этом 81,8% последовательностей имеет не более 1 комплементарного основания (рисунок В.10). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 86,1%, для субтипа В 62,3%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 22,86±0,35 (n=79), для субтипа В – 22,51±0,87 (n=1389). для субтипа CFR63 – 23 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «k» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 5,1%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «k» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 3, доля таких последовательностей в наборе составила 0,1%. Не комплементарных праймеру «k» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

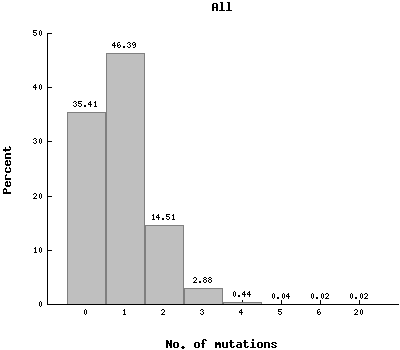


Рисунок В.10 –Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «k» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**11. Результаты тестирования праймера «bb»**

Длина праймера «bb» 24 нуклеотида. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[17]](#footnote-17) рассчитано, что праймер «bb» для 95,57% последовательностей имеет не менее 21 комплементарного основания, при этом 58,81% последовательностей имеет не более 1 комплементарного основания (рисунок В.11). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 22,8%, для субтипа В 51,4%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 23,06±0,63 (n=79), для субтипа В – 23,42±0,69 (n=1389). для субтипа CFR63 – 22 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «bb» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 8,9%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «bb» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,1%. Не комплементарных праймеру «bb» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

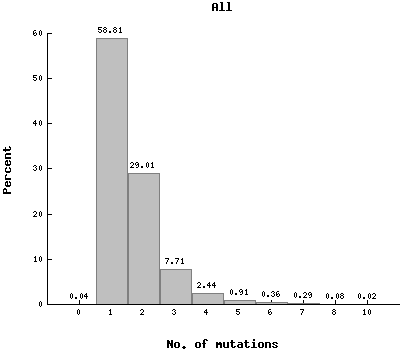


Рисунок В.11 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «bb» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**12. Результаты тестирования праймера «gg»**

Длина праймера «gg» 20 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[18]](#footnote-18) рассчитано, что праймер «gg» для 95,53% последовательностей имеет не менее 19 комплементарных оснований, при этом 80,14% последовательностей не имеют не комплементарных оснований (рисунок В.12). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 94,9%, для субтипа В 83,4%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 19,95±0,22 (n=79), для субтипа В – 19,82±0,43 (n=1389). для субтипа CFR63 – 20 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «gg» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 3,8%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «gg» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,1%. Не комплементарных праймеру «gg» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

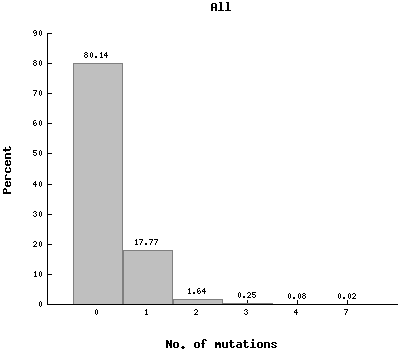


Рисунок В.12 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «gg» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**13. Результаты тестирования праймера «cc»**

Длина праймера «сс» 20 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[19]](#footnote-19) рассчитано, что праймер «сс» для 95,53% последовательностей имеет не менее 19 комплементарных оснований, при этом 70,06% последовательностей не имеют не комплементарных оснований (рисунок В.13). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 91,1%, для субтипа В 86,3%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 19,91±0,29 (n=79), для субтипа В – 19,84±0,43 (n=1389). для субтипа CFR63 – 20 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «сс» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 3,8%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «сс» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 2,4%. Не комплементарных праймеру «сс» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

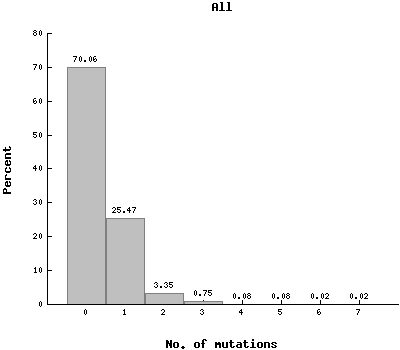


Рисунок В.13 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «cc» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**14. Результаты тестирования праймера «jj»**

Длина праймера «jj» 19 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[20]](#footnote-20) рассчитано, что праймер «jj» для 97,99% последовательностей имеет не менее 17 комплементарных оснований, при этом 52,55% последовательностей не имеют не комплементарных оснований (рисунок В.14). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 32,9%, для субтипа В 67,7%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 18,24±0,6 (n=79), для субтипа В – 18,64±0,57 (n=1389). для субтипа CFR63 – 17 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Не комплементарных праймеру «jj» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не было. Максимальное количество не комплементарных праймеру «jj» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 5,2%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «jj» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа CRF63 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 100%.

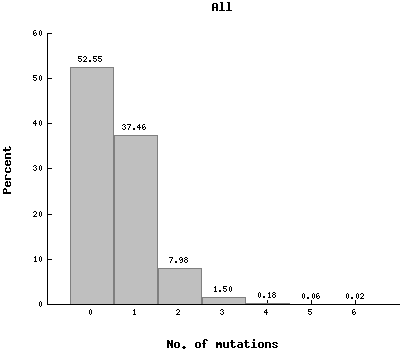


Рисунок В.14 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «jj» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**15. Результаты тестирования праймера «ii»**

Длина праймера «ii» 24 нуклеотида. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[21]](#footnote-21) рассчитано, что праймер «ii» для 91,79% последовательностей имеет не менее 22 комплементарных оснований, при этом 64,09% последовательностей имеет не более 1 не комплементарного основания (рисунок В.15). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 79,7%, для субтипа В 64,1%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 23,8±0,4 (n=79), для субтипа В – 23,57±0,64 (n=1389). для субтипа CFR63 – 22,67±0,58 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «ii» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 2,5%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «ii» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,2%. Не комплементарных праймеру «ii» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

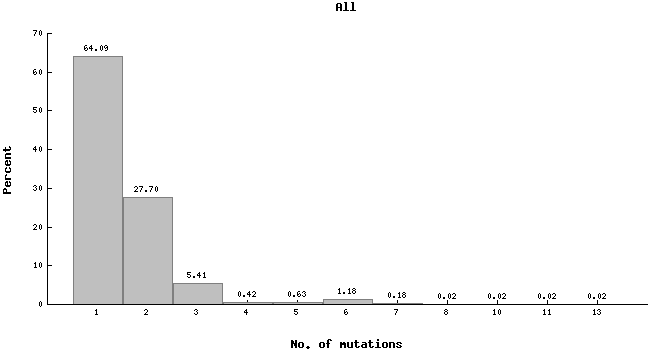


Рисунок В.15 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «ii» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**16. Результаты тестирования праймера «nn»**

Длина праймера «nn» 17 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[22]](#footnote-22) рассчитано, что праймер «nn» для 98,17% последовательностей имеет не менее 15 комплементарных оснований, при этом 86,72% последовательностей имеет не более 1 не комплементарного основания (рисунок В.16). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 88,6%, для субтипа В 85,4%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 16,87±0,37 (n=79), для субтипа В – 16,84±0,4 (n=1389). для субтипа CFR63 – 16±0 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «nn» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 6,3%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «nn» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 3, доля таких последовательностей в наборе составила 0,1%. Максимальное количество не комплементарных праймеру «nn» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа CFR63 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 100%.

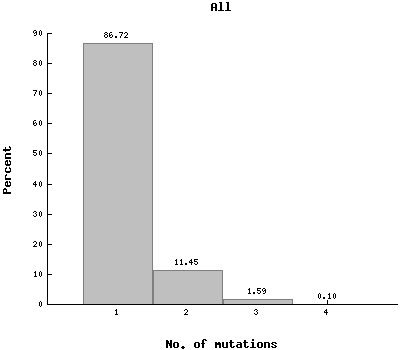


Рисунок В.16 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «nn» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**17. Результаты тестирования праймера «mm»**

Длина праймера «mm» 20 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[23]](#footnote-23) рассчитано, что праймер «mm» для 92,79% последовательностей имеет не менее 18 комплементарных оснований, при этом 55,8% последовательностей имеет не более 1 не комплементарного основания (рисунок В.17). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 89,9%, для субтипа В 71,7%, для субтипа CFR63 0%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 19,89±0,36 (n=79), для субтипа В – 19,67±0,57 (n=1389). для субтипа CFR63 – 19 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Не комплементарных праймеру «mm» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не было.Максимальное количество не комплементарных праймеру «mm» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 0,2%. Не комплементарных праймеру «mm» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

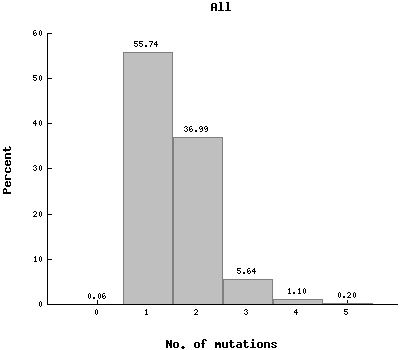


Рисунок В.17 – Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «mm» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

**18. Результаты тестирования праймера «rr»**

Длина праймера «rr» 18 нуклеотидов. Анализ проводился на контрольном наборе последовательностей из 4662 геномов ВИЧ. При помощи анализа с использованием сервиса QuickAlign[[24]](#footnote-24) рассчитано, что праймер «rr» для 97,92% последовательностей имеет не менее 16 комплементарных оснований, при этом 80,54% последовательностей имеет не более 1 не комплементарного основания (рисунок В.18). Доля полностью комплементарных совпадений для субтипа А6 составила 93,7%, для субтипа В 78,8%, для субтипа CFR63 100%. Для субтипа А6 среднее число комплементарных нуклеотидных оснований праймера к контрольному набору последовательностей геномов ВИЧ составило 17,94±0,25 (n=79), для субтипа В – 17,77±0,48 (n=1389). для субтипа CFR63 – 18 (n=3). Оценка комплементарности на 3’-конце праймера проводилась для 5 нуклеотидов. Максимальное количество не комплементарных праймеру «rr» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа A6 не превышало 1, доля таких последовательностей в наборе составила 1,3%.Максимальное количество не комплементарных праймеру «rr» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа В не превышало 2, доля таких последовательностей в наборе составила 0,1%. Не комплементарных праймеру «rr» нуклеотидов на 3`-конце из контрольного набора последовательностей геномов ВИЧ субтипа СRF63 не было.

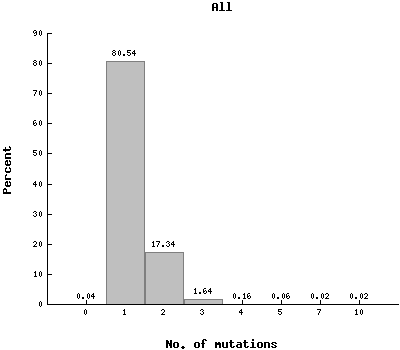


Рисунок В.18 Доля последовательностей в контрольном наборе отличающихся от праймера «rr» (по оси OX число отличающихся нуклеотидов)

ПРИЛОЖЕНИЕ Г  
**Результаты оценки вероятности димеризации праймеров**

В приложении Г приведены результаты анализа праймеров на склонность к образованию гетеродимеров. Maximum Delta G означает минимальную энергию Гиббса, т.е. энергию характерную для реакции с абсолютно комплементарной матрицей (верх рисунка). Minimum Delta G характеризует минимальную энергию Гиббса реакции образования гетеродимера, а также водородными связями показаны места, где может происходить отжиг с образованием гетеродимера. Реакцию отжига праймера на целевую матрицу и реакцию отжига с образованием гетеродимера следует рассматривать как одновременно протекающие, и то какая реакция и во сколько раз будет преобладать характеризует энергия Гиббса. Чем ниже энергия Гиббса, тем лучше реакция протекает.

По результатам анализа гетеродимеризации праймеры показали хорошие результаты: высокую энергию образования гетеродимера, отсутствие комплементарности к димеру на 3’ конце. Число комплементарных связей гетеродимеров было не более 6 для всех пар праймеров. В таблице Г.1 приведены результаты анализа, полученные при помощи сервиса OligoAnalyzer™ Tool.

Таблица Г.1 – Гетеродимеризация пар праймеров

| Пара праймеров | Максимальная энергия Гиббса, ккал/моль | Минимальная энергия Гиббса гетеродимера, ккал/моль | Число комплементарных связей | Возможная димеризация |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| a+l | -51,67 | -6,24 | 4 |  |
| a+m | -52,01 | -9,15 | 6 |  |

Продолжение таблицы Г.1

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Пара праймеров | Максимальная энергия Гиббса, ккал/моль | Минимальная энергия Гиббса гетеродимера, ккал/моль | Число комплементарных связей | Возможная димеризация |
| b+l | -52,98 | -6,24 | 4 |  |
| b+m | -52,98 | -9,15 | 6 |  |
| f+h | -39,52 | -7,71 | 4 |  |
| f+k | -41,95 | -9,21 | 4 |  |
| g+h | -46,18 | -7,71 | 4 |  |
| g+k | -46,18 | -9,21 | 4 |  |

1. URL: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PRIMER\_DESIGN/primer\_design.html [↑](#footnote-ref-1)
2. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-2)
3. URL: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/genome\_browser/help.html [↑](#footnote-ref-3)
4. URL: https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer [↑](#footnote-ref-4)
5. URL:https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\_TYPE=BlastSearch&LINK\_LOC= blasthome [↑](#footnote-ref-5)
6. https://tmcalculator.neb.com/#!/main [↑](#footnote-ref-6)
7. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-7)
8. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-8)
9. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-9)
10. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-10)
11. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-11)
12. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-12)
13. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-13)
14. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-14)
15. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-15)
16. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-16)
17. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-17)
18. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-18)
19. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-19)
20. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-20)
21. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-21)
22. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-22)
23. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-23)
24. URL:https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK\_ALIGNv2/QuickAlign.html [↑](#footnote-ref-24)