

# Корреляция результатов высокопроизводительного и классического методов секвенирования при анализе лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека у пациентов на фоне неэффективной антиретровирусной терапии

А.А.Кириченко<sup>1</sup>, А.А.Свиридова<sup>1</sup>, А.Э.Лопатухин<sup>1</sup>, А.В.Мурзакова<sup>1</sup>,  
И.А.Лаповок<sup>1</sup>, И.А.Гоптарь<sup>1</sup>, А.С.Сперанская<sup>1</sup>, Г.А.Шипулин<sup>2</sup>, Д.Е.Киреев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

**Цель.** Сравнительная оценка сходимость результатов высокопроизводительного и классического методов секвенирования при анализе фрагментов гена *pol* ВИЧ-1, кодирующих протеазу и обратную транскриптазу, у пациентов на фоне неэффективной антиретровирусной терапии.

**Материалы и методы.** Проанализировали образцы плазмы крови от 45 ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективной терапией путем секвенирования «по Сэнгеру» (классический метод) и массового параллельного секвенирования. Из нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования, формировали консенсусные последовательности с различными порогами чувствительности к минорным вирусным популяциям (1, 5, 10 и 20%). Оценивали сходство нуклеотидных последовательностей, полученных с помощью различных методов секвенирования, и количество вариабельных позиций с помощью программ BioEdit 7.0.9.0 и MEGA6. Субтип последовательностей определяли с помощью ресурса REGA HIV-1 SubtypingTool 3.0. Нуклеотидные последовательности участков генома ВИЧ-1 анализировали на наличие мутаций резистентности и прогноза возникновения лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам с помощью базы данных Стэнфордского университета HIVdb (version 8.5).

**Результаты.** В среднем сходство между последовательностями, полученными с помощью классического и высокопроизводительного секвенирования с порогами 20, 10, 5 и 1%, составило 99,87; 99,91; 99,93 и 99,95% соответственно.

Вариабельность нуклеотидных последовательностей, полученных с помощью массового параллельного секвенирования, возрастала с понижением порога чувствительности к минорным вирусным популяциям – с 1,3% (порог чувствительности 20%) до 6,76% (порог чувствительности 1%). Лекарственная устойчивость хотя бы к одному антиретровирусному препарату была обнаружена у всех 45 пациентов с помощью высокопроизводительного секвенирования с 1%-м порогом чувствительности и у 43 ВИЧ-инфицированных – с порогами чувствительности 5, 10, 20% и классического популяционного секвенирования. Суммарно резистентность высокого, среднего и низкого уровней ко всем препаратам была обнаружена в 400 (69 к ИП, 221 к НИОТ, 110 к ННИОТ), 348 (56, 196 и 96 соответственно), 343 (54, 194 и 95 соответственно), 335 (52, 192 и 91 соответственно) и 327 (52, 188 и 87 соответственно) случаях с помощью высокопроизводительного секвенирования с порогами 1, 5, 10 и 20% и классического секвенирования соответственно.

**Заключение.** С помощью глубокого секвенирования с 1%-м порогом были обнаружены все мутации, выявленные с помощью классического секвенирования. Суммарно ко всем препаратам с помощью высокопроизводительного секвенирования с 1-, 5-, 10- и 20%-ми порогами чувствительности к минорным вирусным вариантам было выявлено 377, 288, 268 и 241 мутаций соответственно, и 229 – с помощью классического секвенирования. Выявленные с помощью массового параллельного секвенирования с разными порогами чувствительности дополнительные мутации в ряде случаев изменяли профиль лекарственной устойчивости пациентов. Так, 148 дополнительных мутаций, выявленных с помощью секвенирования с 1%-м порогом, изменили прогноз восприимчивости к антиретровирусным препаратам у 35 пациентов (122 случая); 59 мутаций, дополнительно обнаруженных с помощью секвенирования с порогом 5%, – у 13 пациентов (42 случая); 39 мутаций, выявленных с помощью секвенирования с порогом 10%, – у 10 пациентов (24 случая) и, наконец, с помощью высокопроизводительного секвенирования с 20%-м порогом было дополнительно обнаружено 12 мутаций, что привело к изменению прогноза у 5 пациентов (7 случаев).

**Ключевые слова:** ВИЧ-1, лекарственная устойчивость, мутации, антиретровирусная терапия, популяционное секвенирование, высокопроизводительное секвенирование, минорные вирусные варианты

**Для цитирования:** Кириченко А.А., Свиридова А.А., Лопатухин А.Э., Мурзакова А.В., Лаповок И.А., Гоптарь И.А., Сперанская А.С., Шипулин Г.А., Киреев Д.Е. Корреляция результатов высокопроизводительного и классического методов секвенирования при анализе лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека у пациентов на фоне неэффективной антиретровирусной терапии. *Инфекционные болезни*. 2019; 17(2): 12–19. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-2-12-19

## Для корреспонденции:

Кириченко Алина Алексеевна, младший научный сотрудник научной группы разработки новых методов диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646 доб. 1288  
E-mail: kotova-kirichenko@mail.ru

Статья поступила 03.12.2018 г., принята к печати 26.06.2019 г.

## For correspondence:

Alina A. Kirichenko, junior scientific researcher of HIV and viral hepatitis Research Group of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646 add. 1288  
E-mail: kotova-kirichenko@mail.ru

The article was received 03.12.2018, accepted for publication 26.06.2019

# Correlation of results analysis drug resistance of human immunodeficiency virus among patients with virological failure by next-generation sequencing and traditional population sequencing

A.A.Kirichenko<sup>1</sup>, A.A.Sviridova<sup>1</sup>, A.E.Lopatukhin<sup>1</sup>, A.V.Murzakova<sup>1</sup>,  
I.A.Lapovok<sup>1</sup>, I.A.Goptar<sup>1</sup>, A.S.Speranskaya<sup>1</sup>, G.A.Shipulin<sup>2</sup>, D.E.Kireev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**The objective.** To evaluate the correlation of the results analysis of pol gene fragments encoding protease and reverse transcriptase of HIV-1 among patients with virological failure by next-generation («deep») sequencing and traditional capillary («Sanger») sequencing.

**Materials and methods.** Blood plasma samples from 45 HIV-infected patients who experienced virological failure were analyzed by traditional sequencing and deep sequencing. For nucleotide sequences of HIV-1, obtained through next-generation sequencing, consensus sequences were created by setting the different sensitivity thresholds to minor viral populations (1, 5, 10, and 20%). The similarity of nucleotide sequences obtained through various sequencing methods and the number of variable positions using BioEdit 7.0.9.0 and MEGA6 programs were evaluated. Subtypes were determined using REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0. Nucleotide sequences of HIV-1 were analyzed for the presence of resistance mutations and drug resistance to antiretroviral drugs using the database of Stanford University HIVdb (version 8.5) (<https://hivdb.stanford.edu/>).

**Results.** On average, the similarities between the sequences obtained by traditional sequencing and deep sequencing with thresholds of 20, 10, 5 and 1% were 99,87, 99,91, 99,93 and 99,95% respectively. The variability of nucleotide sequences obtained by next-generation sequencing increased with decreasing sensitivity threshold to minor viral populations from 1,3% (threshold of 20%) to 6,76% (threshold of 1%). Drug resistance to at least one antiretroviral drug was detected in all 45 patients by deep sequencing with 1% sensitivity threshold and in 43 HIV-infected patients by deep sequencing with sensitivity thresholds of 5%, 10%, 20% and Sanger sequencing. All in all, high-level, intermediate-level and low-level drug resistance was detected in 400 (69 to PI, 221 to NRTI, 110 to NNRTIs), 348 (56 to PI, 196 to NRTI, 96 to NNRTI), 343 (54 to PI, 194 to NRTI, 95 to NNRTI), 335 (52 to PI, 192 to NRTI, 91 to NNRTI) and 327 (52 to PI, 188 to NRTI, 87 to NNRTI) cases with next-generation sequencing with thresholds of 1, 5, 10 and 20% and traditional sequencing respectively.

**Conclusion.** Using deep sequencing with the threshold of 1%, all mutations detected by Sanger sequencing were found. In total, 377, 288, 268 and 241 mutations were detected by deep sequencing with thresholds to minority populations of 1, 5, 10, and 20% respectively and 229 mutations were detected by traditional sequencing. Detected by next-generation sequencing with different sensitivity thresholds, additional mutations in some cases changed the drug resistance profile of patients. Thus, 148 additional mutations detected by sequencing with threshold of 1% changed the prediction of susceptibility to antiretroviral drugs in 35 patients (122 cases of drug resistance), 59 mutations additionally detected by sequencing with threshold of 5%, in 13 patients (42 cases), 39 mutations detected by sequencing with threshold of 10%, 10 patients (24 cases) and finally, with deep sequencing with threshold of 20%, 12 mutations were additionally detected, which led to a change in the prediction in 5 patients (7 cases).

**Key words:** HIV-1, drug resistance, mutations, antiretroviral therapy, population sequencing, next-generation sequencing, minor viral population.

**For citation:** Kirichenko A.A., Sviridova A.A., Lopatukhin A.E., Murzakova A.V., Lapovok I.A., Goptar I.A., Speranskaya A.S., Shipulin G.A., Kireev D.E. Correlation of results analysis drug resistance of human immunodeficiency virus among patients with virological failure by next-generation sequencing and traditional population sequencing. *Infekc. bolezni (Infectious diseases)*. 2019; 17(2): 12–19. (In Russian). DOI: 10.20953/1729-9225-2019-2-12-19

**И**нфекция, вызываемая вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция), – это заболевание, которое, несмотря на огромные усилия со стороны здравоохранения и науки, продолжает распространяться на планете. До настоящего времени отсутствуют эффективная вакцина и препараты, обеспечивающие полную элиминацию вируса. Применяемые антиретровирусные препараты (АРВП), не излечивая человека, тем не менее позволяют ему оставаться клинически здоровым. Терапия также является эффективным средством, снижающим заболеваемость, потому что человек с недетектируемой вирусной нагрузкой значительно реже передает вирус своим партнерам [1]. Возможности терапии дали надежду на снижение масштабов эпидемии, и в октябре 2014 г. ЮНЭЙДС представила стратегию «90-90-90» [2], подразумевающую значительное увеличение количества пациентов с ВИЧ, принимающих АРВП.

В том числе благодаря ей с 2010 по 2017 г. количество пациентов, получающих терапию, увеличилось значительно, с 7,7 до 20,9 млн человек [3]. Согласно принятой стратегии, данное количество к 2020 г. должно вырасти до 30 млн человек. Ожидается, что это позволит снизить количество новых случаев инфекции на 75%.

Однако, следствием широкомасштабного применения терапии является также лекарственная устойчивость (ЛУ) вируса к АРВП. Возможные негативные последствия резистентности довольно значительны. Согласно математическим моделям, увеличение ЛУ может привести к дополнительным 135 000 случаям смерти и 105 000 случаям новых инфекций [4]. Кроме того, резистентность вызовет значительное увеличение затрат на антиретровирусную терапию (АРВТ).

Лекарственная устойчивость может быть выявлена различными способами. До настоящего времени наиболее

часто как в диагностических, так и в научных лабораториях использовалось классическое капиллярное секвенирование по Сэнгеру (популяционное секвенирование). Однако за последние десять лет метод высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) получил широкое распространение в лабораториях и позволил совершить качественный скачок в ряде научных направлений.

При всех достоинствах традиционного секвенирования, оно имеет целый ряд недостатков: исследование является дорогостоящим, трудоемким и сложно масштабируемым. Кроме того, классическое секвенирование имеет ограниченную чувствительность (приблизительно 20%) в отношении минорных вирусных популяций. Напротив, при использовании NGS количество выявляемых минорных вариантов вируса напрямую зависит от установленного порога чувствительности к ним. Для определения оптимального порога было проведено большое количество исследований. Несмотря на то, что при понижении порога чувствительности возрастает количество выявляемых вариантов вируса, значительно увеличивается и количество артефактных позиций, возникающих в ходе nested-PCR или связанных с гипермутациями G-A, индуцированными белками APOBEC [5]. Таким образом, использование низких пороговых значений может привести к завышению количества пациентов с потенциальной вирусологической неэффективностью, что может стать причиной смены схемы терапии на более дорогостоящую. Так, в исследовании Inzaule et al. (2018) [6] использование 1%-го порога чувствительности к минорным вирусным популяциям привело к ложноположительным результатам у 8% пациентов в сравнении с 4% и 2% ВИЧ-инфицированных при 5%-м и 20%-м порогах соответственно.

В большинстве работ по выявлению мутаций ЛУ ВИЧ с различными порогами к минорным вариантам вируса наиболее надежным и информативным и, как следствие, наиболее подходящим для применения в клинической практике был принят порог 5% [7–9].

Обнаруженные с помощью метода высокопроизводительного секвенирования минорные варианты вируса, содержащие мутации ЛУ, могут иметь клиническую значимость и оказывать влияние на эффективность терапии как у наивных, так и у опытных пациентов [10–17]. Высокие риски развития вирусологической неудачи, ассоциированной с наличием резистентных минорных вариантов, были преимущественно описаны при приеме препаратов с низкими генетическими барьерами классов ННИОТ (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) [7, 16, 18, 19] и ингибиторов корцепторов (CCR5) [19–21]. Вопрос о клинической значимости минорных вариантов, резистентных к препаратам классов НИОТ (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) [22], ИП (ингибиторы протеазы) [23, 24] и ИИ (ингибиторы интегразы) [25], остается открытым, поскольку до настоящего времени неизвестно, при какой представленности определенные мутации становятся клинически значимыми.

В настоящее время секвенирование нового поколения активно внедряется в *in vitro*-диагностику, что требует проведения его валидации и сравнения с классическим методом секвенирования.

В связи с этим целью нашей работы явилась сравнительная оценка двух методов секвенирования при анализе регионов гена *pol*, кодирующих протеазу и обратную транскриптазу ВИЧ-1, у пациентов на фоне неэффективной антиретровирусной терапии.

## Материалы и методы

В исследовании были использованы образцы плазмы крови от 45 ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих АРВП. В исследуемой когорте было 15 женщин (33,3%) и 30 мужчин (66,7%). На момент забора крови для проведения исследования возраст пациентов варьировал от 26 до 57 лет, средний возраст составил 38 лет, медиана – 36 лет. По предполагаемым путям заражения выборка характеризовалась следующим образом: половой контакт – 23 человека (51,1%), парентеральное употребление психоактивных веществ – 12 (26,7%), для 10 человек (22,2%) путь был неизвестен.

Образцы плазмы крови были получены для проведения исследования лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к препаратам классов НИОТ, ННИОТ, ИП вследствие регистрации вирусологической неэффективности терапии. На момент забора крови продолжительность приема АРВП составляла от 5 месяцев до 10 лет (среднее – 3 года, медиана – 2 года). У 14 пациентов на момент исследования не было опыта смены терапии, у 31 пациента количество схем варьировало от 2 до 6. Концентрация РНК ВИЧ в образцах плазмы на момент исследования ЛУ ВИЧ составляла от 5397 до 370 000 коп/мл (среднее – 65 854 коп/мл, медиана – 27 000 коп/мл).

**Секвенирование ВИЧ-1.** Анализ образцов плазмы крови путем классического секвенирования по методу Сэнгера осуществлялся с помощью набора реагентов «АмплиСенс®HIV-Resist-Seq». Анализ тех же образцов плазмы путем массового параллельного секвенирования выполнялся с помощью набора «АмплиСенс®HIV-Resist-NGS». Оба исследования выполнялись согласно инструкции производителя (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). После окончания исследования, выполненного методом высокопроизводительного секвенирования, нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 использовались для генерации консенсусных последовательностей с различным порогом чувствительности к минорным вирусным популяциям с порогами 1, 5, 10 и 20% – NGS1%, NGS5%, NGS10% и NGS20% соответственно. Подробный протокол проведения анализа с помощью массового параллельного секвенирования, а также получение консенсусных последовательностей с различными порогами чувствительности описаны в работе Kireev, et al., 2018 [26].

**Анализ последовательностей ВИЧ-1.** Работа с нуклеотидными последовательностями (выравнивание, обрезание, расчет генетических дистанций, построение филогенетических деревьев) осуществлялась с помощью программ BioEdit 7.0.9.0 и MEGA6. Субтипирование последовательностей было выполнено с помощью ресурса REGA HIV-1 SubtypingTool 3.0. Среди 45 исследованных образцов 44 были классифицированы как субтип A1 (97,8%), согласно новой классификации известный как субтип A6 [27]. Один

образец был идентифицирован как рекомбинантная форма CRF 02\_AG. Выявление мутаций лекарственной устойчивости осуществлялось с помощью базы данных Стэнфордского университета HIVdb version 8.5, <https://hivdb.stanford.edu/>. Согласно алгоритму базы данных Стэнфордского университета каждой мутации и комбинации мутаций присваиваются баллы (drug penalty score), характеризующие вероятность возникновения резистентности ВИЧ к АРВП. Количество присваиваемых баллов зависит от ряда критериев, в частности от частоты встречаемости мутаций среди пациентов, имеющих и не имеющих опыт приема АРВП, данных о влиянии мутации на восприимчивость к АРВП *in vitro* и ассоциации мутации с вирусологическим ответом при приеме АРВП в составе новой схемы АРВТ. Для оценки чувствительности/устойчивости ВИЧ определены 5 уровней ЛУ в зависимости от суммарного количества баллов: чувствительный (0–9), потенциально-низкий (10–14), низкий (15–29), средний (30–59) и высокий (60–100) уровни ЛУ. Потенциально-низкий уровень учитывался как чувствительный согласно рекомендациям ВОЗ по оценке и интерпретации ЛУ ВИЧ [28].

## Результаты исследования и их обсуждение

**Сходство и вариабельность нуклеотидных последовательностей.** Сравнимые нуклеотидные последовательности, полученные с помощью различных методов секвенирования, представляли собой регион гена *pol* протяженностью 1262 нуклеотида (позиции 2083-3344, HXB2 штамм, #K03455), покрывающий все значимые мутации лекарственной устойчивости в протеазе и обратной транскриптазе. Сходство нуклеотидных последовательностей, исключая вариабельные позиции и инсерции/делеции, составляло от 98,95% до 100%. В среднем сходство между последовательностями, полученными с помощью традиционного метода секвенирования и метода NGS, варьировало от 99,87% до 99,95%, что составляло от 0,631 до 1,64 различий на протяженности исследуемого фрагмента региона *pol*. Однако для одного пациента минимальное сходство последовательностей (между классическим методом секвенирования и NGS20%) составило 98,95%, что явилось следствием различий нуклеотидов в 13 позициях.

Вариабельность нуклеотидных последовательностей, полученных с помощью массового параллельного секвенирования, возрастала с понижением порога чувствительности к минорным вирусным популяциям. Наиболее схожей с последовательностью, полученной с помощью классического метода секвенирования, по степени вариабельности являлась последовательность NGS20% (с порогом чувствительности к минорным вирусным популяциям в 20%). Последовательность NGS1% (с порогом чувствительности в 1%) имела приблизительно в 5,5 раз больше вариабельных позиций (6,76% против 1,23%) по сравнению с классическим методом секвенирования.

**Эффективность выявления лекарственной устойчивости.** ЛУ хотя бы к одному АРВП была обнаружена у всех 45 пациентов с помощью массового параллельного секвенирования с 1%-м порогом чувствительности к минорным вирусным вариантам и у 43 ВИЧ-инфицированных – с помо-

щью NGS с порогами чувствительности 5, 10, 20% и классического популяционного секвенирования.

Так, к препаратам класса ИП ЛУ была обнаружена у 15 пациентов с помощью NGS с порогом 1%, у 10 с помощью NGS 5, 10, 20% и только у 9 ВИЧ-инфицированных с помощью классического секвенирования. Резистентность к препаратам класса НИОТ была выявлена у 42 пациентов с помощью NGS 1% и у 40 пациентов с помощью NGS 5, 10, 20% и секвенирования по Сэнгеру. Наконец, ЛУ к препаратам класса ННИОТ с помощью NGS с 1%-м порогом была обнаружена у 35 пациентов, при анализе с помощью NGS 5% и 10% – у 31, с помощью NGS 20% – у 30 и у 29 ВИЧ-инфицированных с помощью классического секвенирования.

При использовании высокопроизводительного секвенирования ЛУ была выявлена не только у большего количества пациентов, но и к большему количеству препаратов у каждого пациента. Так, суммарно с помощью NGS с 1%-м порогом чувствительности к минорным вирусным вариантам было выявлено 400 случаев возникновения ЛУ низкого, среднего или высокого уровней к какому-либо АРВП (далее случаи). С помощью NGS с 5, 10 и 20%-ми порогами чувствительности было выявлено 400, 348, 343, 335 случаев возникновения ЛУ соответственно и 327 с помощью секвенирования по Сэнгеру.

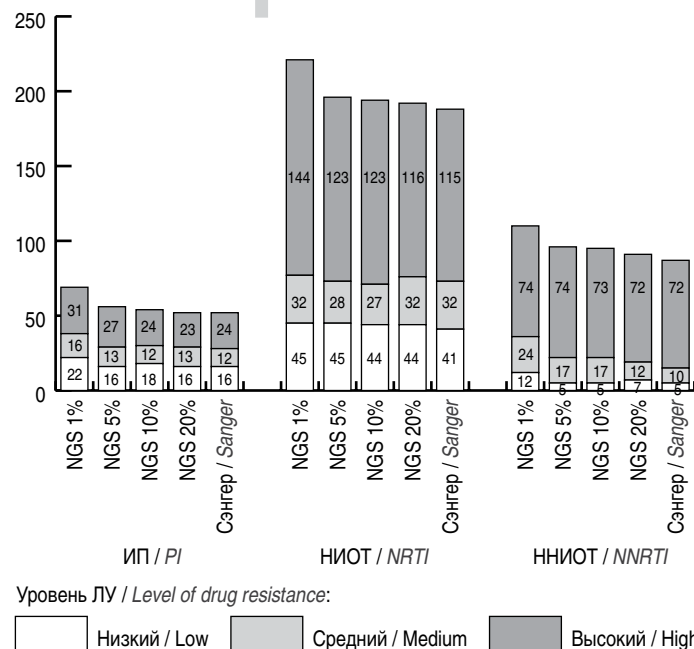


Рис. 1. Распределение по случаям возникновения ЛУ, выявленной различными методами секвенирования, к АРВП классов ИП, НИОТ и ННИОТ. Результаты, полученные с помощью высокопроизводительного метода секвенирования с порогом минорных вариантов 1, 5, 10 и 20% обозначены как NGS1%, NGS5%, NGS10% и NGS20% соответственно. Результаты классического секвенирования обозначены как «Сэнгер». Уровень лекарственной устойчивости был определен с помощью базы данных Стэнфордского университета.

Fig. 1. Distribution of strains resistant to PI, NRTI, and NNRTI. The results of next generation sequencing with sensitivity thresholds of 1, 5, 10, and 20% are referred to as NGS1%, NGS5%, NGS10%, and NGS20% respectively. The results of classical sequencing are referred to as «Sanger». The level of drug resistance was determined using the Stanford University database.

Таким образом, разница в динамике выявления лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ-1 наиболее ярко выражена при снижении порога до 1% (рис. 1), что, возможно, связано не только с высокой чувствительностью к обнаружению минорных вирусных популяций, но и с регистрацией артефактных ложновариантных позиций, появившихся на этапах экстракции, амплификации, подготовки библиотек и собственно секвенирования [12].

Следует отметить случаи, когда прогноз наличия ЛУ, сделанный на основании анализа нуклеотидных последовательностей, полученных с помощью классического секвенирования, не был сделан или уровень прогнозируемой резистентности был ниже по сравнению с анализом последовательностей, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования. При использовании NGS с 1%-м порогом уровень ЛУ к препарату класса НИОТ абакавиру (ABC) был определен ниже у одного пациента, и к зидовудину (AZT) и ставудину (D4T) – у другого, чем с помощью секвенирования по Сэнгеру. Это связано с обнаружением большого количества замен в гене обратной транскриптазы в позиции 74 в первом случае и в позиции 215 во втором, что было интерпретировано алгоритмом базы данных Стэнфорда как замена на X (L74X и T215X соответственно) и не было классифицировано в качестве мутаций, ассоциированных с ЛУ. Особый интерес представляет случай, когда у одного ВИЧ-инфицированного только с помощью NGS с 5%-м порогом чувствительности не была обнаружена ЛУ к тенофовиру (TDF) и занижена к ABC, AZT, D4T и диданозину (ddl). Это объясняется невыявлением одновременно двух мутаций

T215F, не обнаруженной также 1%-м NGS, из-за описанной ранее высокой вариабельности и K219E, выявленной только NGS с 1%-м порогом, из-за недостаточной чувствительности остальных методов.

**Частота и структура выявленных мутаций ЛУ.** Были проанализированы частота и структура мутаций ЛУ к препаратам класса ИП (основных и дополнительных), НИОТ и ННИОТ, выявленных с помощью классического секвенирования и высокопроизводительного секвенирования с разными порогами чувствительности к минорным вирусным популяциям.

С помощью глубокого секвенирования с 1%-м порогом были обнаружены все мутации, выявленные с помощью классического секвенирования. С помощью NGS с порогами 5% и 10% не была обнаружена 1 мутация V75I, которая самостоятельно не вызывает ЛУ, с помощью NGS с 20%-м порогом – 4 мутации: K43T, V75I (2), самостоятельно не изменяющие восприимчивость к АРВП, и G190S, ассоциированная с высоким уровнем ЛУ к невирапину (NVP) и эфавиренцу (EFV), выявленные Сэнгером.

Наибольшее количество мутаций (377) было выявлено с помощью массового параллельного секвенирования с порогом чувствительности 1% к минорным вирусным вариантам. При повышении порога чувствительности количество выявленных мутаций снижалось. Так, с помощью NGS с порогами чувствительности 5, 10 и 20% было выявлено 288, 268 и 241 мутаций соответственно ко всем классам АРВП. При анализе мутаций с использованием классического секвенирования было выявлено только 229 мутаций. Таким образом, с помощью секвенирования по Сэнгеру не удалось выявить почти 40% мутаций, обнаруженных с помощью самого чувствительного метода – NGS с порогом 1%. Подробно эффективность выявления мутаций с помощью классического секвенирования и высокопроизводительного секвенирования с разными порогами чувствительности к препаратам класса ИП, НИОТ и ННИОТ представлена на рис. 2.

В среднем у одного пациента с помощью NGS с 1%-м порогом было обнаружено 8,4 мутаций резистентности, 6,4 – с порогом 5%, 6 – с порогом 10%, 5,4 – с 20%-м порогом чувствительности и, наконец, 5,1 – с помощью классического секвенирования.

Дополнительно был проведен анализ наиболее важных мутаций устойчивости к разным классам препаратов, чья связь с лекарственной устойчивостью разного уровня была достоверно доказана. С этой целью мы провели анализ частоты выявления методом NGS и методом Сэнгера замен из списка основных мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1, последняя редакция 24 октября 2018 г. (<https://hivdb.stanford.edu/>). Поскольку, по данным литературы [7–9], в рутинной клинической практике оптимальным порогом NGS к минорным вариантам вируса может считаться порог в 5%, мы сравнивали результаты секвенирования по Сэнгеру с результатами NGS с порогом в 5% (табл. 1).

Как видно из табл. 2, методом NGS было выявлено больше пациентов, содержащих исследуемые ЛУ (выделено жирным шрифтом). Лишь в случае замены T215Y NGS не выявил мутацию у одного пациента по сравнению с Сэнгером. Это было связано с описанным выше феноменом ошибочно-

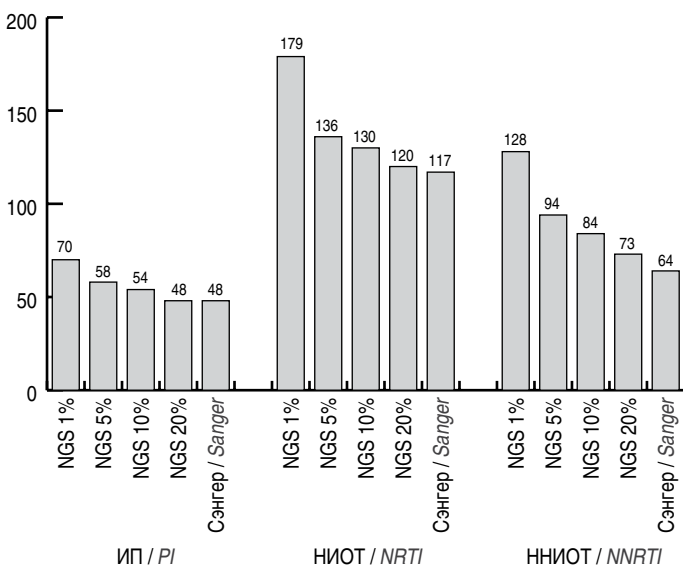


Рис. 2. Выявление различными методами секвенирования мутаций резистентности к препаратам классов ИП, НИОТ и ННИОТ. Результаты, полученные с помощью высокопроизводительного метода секвенирования с порогом минорных вариантов 1, 5, 10 и 20% обозначены как NGS1%, NGS5%, NGS10% и NGS20% соответственно. Результаты классического секвенирования обозначены как «Сэнгер».

Fig. 2. Detection of resistance to PI, NRTI, and NNRTI using various sequencing methods. The results of next generation sequencing with sensitivity thresholds of 1, 5, 10, and 20% are referred to as NGS1%, NGS5%, NGS10%, and NGS20% respectively. The results of classical sequencing are referred to as «Sanger».

го интерпретирования базой данных Стэнфорда множественных замен в 215-м положении, полученных с помощью NGS, когда алгоритм помечает данное положение как X и не учитывает как мутацию ЛУ.

Представляло интерес проанализировать дополнительные мутации, по данным Стэнфордской базы данных способные повлиять на профиль резистентности и выявленные с помощью массового параллельного секвенирования. В результате дополнительные мутации, выявленные с помощью NGS с порогом чувствительности 1%, приводили к изменению прогнозируемой восприимчивости к препаратам класса ИП (вероятное наличие ЛУ или повышение прогнозируемой резистентности) у 10 пациентов в 25 случаях, с порогом 5% – у 3 ВИЧ-инфицированных в 9 случаях и с порогом 10% – у 1 пациента в 2 случаях. В том числе у 8 (17 случаев), 2 (4 случая) и 1 (2 случая) пациента с помощью высокопроизводительного секвенирования с порогом 1, 5 и 10% соответственно была обнаружена ЛУ, однако, классическим секвенированием обнаружена не была.

Дополнительные мутации к препаратам класса НИОТ, выявленные с помощью NGS с порогом чувствительности 1%, приводили к изменениям в профиле ЛУ у 26 ВИЧ-инфицированных в 74 случаях, с порогом 5% – у 11 в 24 случаях, с порогом 10% – у 6 в 14 случаях и, наконец, у 3 пациентов в 6 случаях – с помощью NGS с 20%-м порогом чувствительности. В частности, у 15 (33 случая), 5 (9 случаев), 3 (6 случаев), 2 (4 случая) ВИЧ-инфицированных пациентов с помощью высокопроизводительного секвенирования с порогом 1, 5, 10 и 20% соответственно выявленная ЛУ не была обнаружена с помощью классического популяционного секвенирования.

Мутации, обнаруженные к препаратам класса НИОТ, дополнительно выявленные с помощью высокопроизводительного секвенирования, были связаны с изменением профиля ЛУ с чувствительного на резистентный у 11 пациентов в 23 случаях при использовании NGS1%, у 5 ВИЧ-инфицированных в 9 случаях – при использовании NGS 5%, у 4 в 8 случаях – NGS 10% и у 1 пациента – NGS 20%. Кроме того, дополнительная мутация, выявленная NGS 20%, повышала уровень прогнозируемой устойчивости у одного пациента.

### Заключение

Результаты сравнительного исследования высокопроизводительного и классического методов секвенирования показали, что секвенирование нового поколения обладает значительно большей чувствительностью, чем классическое, а при использовании порогов чувствительности NGS от 5% до 20% методы имеют хорошее сходство. Сходство между последовательностями, полученными с помощью различных методов секвенирования, было 99,87% и выше, т.е. последовательности отличались друг от друга менее чем в двух позициях на протяженности фрагмента в 1000 нуклеотидов. При понижении порога чувствительности к минорным вирусным вариантам повышалось количество переменных позиций. Так, нуклеотидная последовательность, полученная с помощью NGS с 1%-м порогом чувствительности, имела в 5,5 раза больше переменных позиций, чем после-

довательность, полученная классическим методом секвенирования. Именно увеличение количества выявляемых переменных позиций являлось основной причиной изменения прогнозируемого профиля ЛУ.

Классическое секвенирование, обладая чувствительностью около 20%, не всегда выявляет минорные варианты вируса, имеющие клиническую значимость и критически изменяющие профиль ЛУ у пациентов. Так, в нашем исследовании классическим методом секвенирования было обнаружено только 60% мутаций, выявленных с помощью NGS с 1%-м порогом чувствительности (229 из 377). И эти выяв-

Таблица 1. Характеристики нуклеотидных последовательностей, полученных с помощью различных методов секвенирования

Table 1. Characteristics of nucleotide sequences obtained by different sequencing methods

	Сходство нуклеотидных последовательностей между методом Сэнгера и NGS, Min-max среднее (%) / Similarity of nucleotide sequences obtained by Sanger sequencing and NGS, min-max mean (%)	Количество переменных позиций, Min-max среднее (%) / Number of variable positions, min-max mean (%)
Сэнгер / Sanger	–	0–3,01 (1,23)
NGS1%	99,01–100 (99,95)	1,27–17,99 (6,76)
NGS5%	99,03–100 (99,93)	0,16–6,81 (3,02)
NGS10%	99,03–100 (99,91)	0,08–4,75 (2,10)
NGS20%	98,95–100 (99,87)	0,08–3,41 (1,30)

Таблица 2. Частота выявления замен из списка основных мутаций ЛУ ВИЧ-1

Table 2. Frequency of detection of main HIV-1 mutations associated with drug resistance

Класс препаратов / Class of drugs	Мутация / Mutation	Количество пациентов с мутацией / Number of patients with mutation		Препарат, к которому вызвана устойчивость / Drug, to which resistance has evolved
		NGS5%	Сэнгер / Sanger	
ИП / PI	M46I/L	5	4	ATV, LPV
	I47V	1	1	ATV
	I50L	5	5	ATV
	I50V	1	1	DRV, LPV
	I54L	1	1	ATV, DRV, LPV
	I54V	1	1	ATV, LPV
	L76V	1	1	DRV, LPV
	V82A	2	1	ATV, LPV
	I84V	1	1	ATV, DRV, LPV
	N88S	2	2	ATV
НИОТ / NRTI	M41L	8	6	ABC, TDF, ZDV
	K65R	3	2	3TC, FTC, ABC, TDF
	D67N	10	9	ZDV
	K70R	9	9	TDF, ZDV
	K70E	2	0	ABC, TDF
	L74V/I	12	10	ABC
	Y115F	3	2	ABC, TDF
	M184V/I	37	36	3TC, FTC, ABC
	L210W	5	4	ABC, TDF, ZDV
	T215Y	11	12	ABC, TDF, ZDV
ННИОТ / NNRTI	K219Q/E	6	4	ZDV
	K101E	9	8	DOR, EFV, ETR, RPV, NVP
	K103N	16	14	EFV, NVP
	Y181C/I	6	5	DOR, EFV, ETR, RPV, NVP
	Y188L	1	0	DOR, EFV, ETR, RPV, NVP
Y188H	1	0	DOR, EFV, NVP	

ленные мутации позволили определить только 82% случаев ЛУ ВИЧ к АРВП (327 из 400).

Целый ряд исследований говорит о важности выявления минорных резистентных вариантов ВИЧ-1, способных вызвать вирусологическую неудачу в ходе терапии [7, 16, 18–21, 26]. При этом большое значение имеет выбор уровня порога выявления минорных вирусных популяций. Так, в работах Fisher et al. и Mohamed et al. рекомендуемый уровень, имеющий клиническую значимость, находился в диапазоне от 0,1% до 10% [13, 15]. В то же время наши предыдущие исследования [26] демонстрируют, что при снижении порога чувствительности до 1% и менее снижается точность секвенирования и повышается риск получения ложноварибельных позиций. Настоящее исследование показало, что возрастание степени вариабельности в позициях иногда приводило к тому, что алгоритм оценки ЛУ Стэнфордской базой данных исключал позиции из анализа, что не позволяло выявить мутацию в образце. Наиболее вероятно, что порог клинической значимости индивидуален для каждой мутации, а также может зависеть от дополнительных параметров, таких как выбранная схема антиретровирусной терапии и вирусная нагрузка на момент начала приема препаратов.

Тем не менее, согласно результатам нашего исследования, которые соответствуют данным литературы [7–9], в качестве инструмента для анализа мутаций ЛУ в рамках эпидемиологического надзора и для рутинных клинических исследований можно рекомендовать использование NGS с 5%-м порогом чувствительности к минорным вирусным вариантам. Данный порог обеспечивает, с одной стороны, высокую чувствительность анализа, а с другой – минимизирует возможность выявления артефактных ложноварибельных позиций. В этом случае метод NGS предоставляет дополнительную клинически значимую информацию по профилю резистентности ВИЧ-инфицированного и помогает снизить риск назначения пациенту неэффективной терапии.

Следует отметить, что данное исследование имело определенные ограничения, поскольку оно являлось ретроспективным и для выявления мутаций резистентности были использованы только генотипические методы. Клиническая значимость мутаций, выявленных с помощью NGS с разными порогами чувствительности к минорным вариантам вируса, представляет большой интерес и требует проведения дополнительных продольных исследований на выборке пациентов с хорошо охарактеризованными историями лечения в динамике.

#### **Информация о финансировании**

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-10096).

#### **Financial support**

The study was funded by the grant from Russian Science Foundation (project No. 18-75-10096).

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### **Conflict of interests**

The authors declare that there is not conflict of interests.

## **Литература/References**

1. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 2011 Aug 11;365(6):493-505. DOI: 10.1056/NEJMoa1105243
2. 90-90-90, an ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. UNAIDS / JC2684 (English original, October 2014).
3. Factsheet – World AIDS day, 2017. UNAIDS.
4. HIV drug resistance report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. Clutter DS, Zhou S, Varghese V, Rhee SY, Pinsky BA, Jeffrey Fessel W, et al. Prevalence of Drug-Resistant Minority Variants in Untreated HIV-1-Infected Individuals With and Those Without Transmitted Drug Resistance Detected by Sanger Sequencing. *J Infect Dis*. 2017 Aug 1;216(3):387-391. DOI: 10.1093/infdis/jix338
6. Inzaule SC, Hamers RL, Noguera-Julian M, Casadellà M, Parera M, Kityo C, et al. Clinically relevant thresholds for ultrasensitive HIV drug resistance testing: a multi-country nested case-control study. *Lancet HIV*. 2018 Nov;5(11):e638-e646. DOI: 10.1016/S2352-3018(18)30177-2
7. Huber M, Metzner KJ, Geissberger FD, Shah C, Leemann C, Klimkait T, et al. MinVar: A rapid and versatile tool for HIV-1 drug resistance genotyping by deep sequencing. *J Virol Methods*. 2017 Feb;240:7-13. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.11.008
8. Trabaud M-A, Icard V, Ramière C, Tardy JC, Scholtes C, André P. Comparison of HIV-1 drug-resistance genotyping by ultra-deep sequencing and sanger sequencing using clinical samples. *J Med Virol*. 2017 Nov;89(11):1912-1919. DOI: 10.1002/jmv.24872
9. Ávila-Ríos S, García-Morales C, Matías-Florentino M, Romero-Mora KA, Tapia-Trejo D, Quiroz-Morales VS, et al. Pretreatment HIV-drug resistance in Mexico and its impact on the effectiveness of first-line antiretroviral therapy: a nationally representative 2015 WHO survey. *Lancet HIV*. 2016 Dec;3(12):e579-e591. DOI: 10.1016/S2352-3018(16)30119-9
10. Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, Rauch P, Burgisser P, Yerly S, et al. Minority quasispecies of drug resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naive and-adherence patients. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan 15;48(2):239-47. DOI: 10.1086/595703
11. Geretti AM, Fox ZV, Booth CL, Smith CJ, Phillips AJ, Johnson M, et al. Low-frequency K103N strengthens the impact of transmitted drug resistance on virologic responses to first-line efavirenz or nevirapine-based highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Dec;52(5):569-73. DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181ba11e8
12. Li JZ, Paredes R, Ribaldo HJ, Svaroskaia ES, Metzner KJ, Kozal MJ, et al. Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA*. 2011 Apr 6;305(13):1327-35. DOI: 10.1001/jama.2011.375
13. Fisher R, van Zyl GU, Travers SA, Kosakovsky Pond SL, Engelbrech S, Murrell B, et al. Deep sequencing reveals minor protease resistance mutations in patients failing a protease inhibitor regimen. *J Virol*, 2012, 86(11): 6231-7. DOI: 10.1128/JVI.06541-11
14. Knapp D, McGovern R, Dong W, Poon AF, Swenson LC, Zhong X, et al. Factors Influencing the Sensitivity and Specificity of Conventional Sequencing in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tropism Testing. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb;51(2):444-51. DOI: 10.1128/JCM.00739-12
15. Mohamed S, Penaranda G, Gonzalez D. Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. *AIDS*. 2014 Jun 1;28(9):1315-24. DOI: 10.1097/QAD.0000000000000267

16. Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F, et al. Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Mar;70(3):930-40. DOI: 10.1093/jac/dku426
17. Paredes R, Lalama CM, Ribaudo HJ, Schuurman R, Däumer M, Aitken S, et al. Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis.* 2010; 201: 662–71.
18. Boltz VF, Bao Y, Lockman S, Halvas EK, Kearney MF, McIntyre JA, et al. Low-frequency nevirapine (NVP)-resistant HIV-1 variants are not associated with failure of antiretroviral therapy in women without prior exposure to single-dose NVP. *J Infect Dis.* 2014 Mar 1;209(5):703-10. DOI: 10.1093/infdis/jit635
19. Li JZ, Kuritzkes DR. Clinical Implications of HIV-1 Minority Variants. *Clin Infect Dis.* 2013 Jun;56(11):1667-74. DOI: 10.1093/cid/cit125
20. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, et al. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol.* 2006 May; 80(10):4909-20. DOI: 10.1128/JVI.80.10.4909-4920.2006
21. Kagan RM, Johnson EP, Siaw M, Biswas P, Chapman DS, Su Z, et al. A genotypic test for HIV-1 tropism combining Sanger sequencing with ultradeep sequencing predicts virologic response in treatment-experienced patients. *PLoS One.* 2012;7(9):e46334. DOI: 10.1371/journal.pone.0046334
22. Casadellà M, Noguera-Julian M, Sunpath H, Gordon M, Rodriguez C, Parera M, et al. Treatment options after virological failure of first-line tenofovir-based regimens in South Africa: an analysis by deep sequencing. *AIDS.* 2016 Apr 24;30(7):1137-40. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001033
23. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, DeGrosky M, Uy J, Seekins D, Simen B, et al. Virologic failures on initial boosted-PI regimen infrequently possess low-level variants with major PI resistance mutations by ultra-deep sequencing. *PLoS One.* 2012;7(2):e30118. DOI: 10.1371/journal.pone.0030118
24. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, Schnittman S, Wirtz V, Uy J, et al. Prevalence and clinical significance of HIV drug resistance mutations by ultra-deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in the CASTLE study. *PLoS One.* 2010 Jun 3;5(6):e10952. DOI: 10.1371/journal.pone.0010952
25. Fonager J, Larsson JT, Hussing C, Neess Engsig F, Nielsen C, Fischer TK. Identification of minority resistance mutations in the HIV-1 integrase coding region using next generation sequencing. *J Clin Virol.* 2015 Dec;73:95-100. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.11.009
26. Kireev DE, Lopatukhin AE, Murzakova AV, Pimkina EV, Speranskaya AS, Neverov AD, et al. Evaluating the accuracy and sensitivity of detecting minority HIV-1 populations by Illumina next-generation sequencing. *J Virol Methods.* 2018 Nov; 261:40-45. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.08.001
27. Foley BT, Leitner T, Paraskevis D, Peeters M. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review. *Infect Genet Evol.* 2016 Dec;46:150-158. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.10.018
28. WHO/HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Мурзакова Анастасия Вениаминовна, младший научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646  
E-mail: murzakova\_a.v@mail.ru
- Лаповок Илья Андреевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646  
E-mail: i\_lapovok@mail.ru
- Гоптарь Ирина Александровна, научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646  
E-mail: probirka@list.ru
- Сперанская Анна Сергеевна, научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646  
E-mail: hanna.s.939@gmail.com
- Шипулин Герман Александрович, кандидат медицинских наук, заместитель директора Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.1  
Телефон: (495) 540 6171  
E-mail: shipgerman@gmail.com
- Киреев Дмитрий Евгеньевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646  
E-mail: dmitkireev@yandex.ru

#### Information about co-authors:

Alesya A. Sviridova, junior scientific researcher of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646  
E-mail: sviridova-alesya@mail.ru

Aleksey E. Lopatukhin, scientific researcher of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646  
E-mail: a.lopatukhin@gmail.com

Anastasiya V. Murzakova, junior scientific researcher of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646  
E-mail: murzakova\_a.v@mail.ru

Ilya A. Lapovok, PhD (Biology), scientific researcher of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646  
E-mail: i\_lapovok@mail.ru

Irina A. Goptar, scientific researcher of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646  
E-mail: probirka@list.ru

Anna S. Speranskaya, scientific researcher of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646  
E-mail: hanna.s.939@gmail.com

German A. Shipulin, MD, PhD, Deputy Director of the Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russian Federation  
Address: 10/1 Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russian Federation  
Phone: (495) 540 6171  
E-mail: shipgerman@gmail.com

Dmitry E. Kireev, PhD (Biology), scientific researcher of the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation  
Phone: (495) 947-9646  
E-mail: dmitkireev@yandex.ru

#### Информация о соавторах:

Свиридова Аlesia Андреевна, младший научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646  
E-mail: sviridova-alesya@mail.ru

Лопатухин Алексей Эдуардович, научный сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
Телефон: (495) 947-9646  
E-mail: a.lopatukhin@gmail.com