

УДК 578.891:578.5:001.891(571.61)

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ

В.О. Котова¹, Л.А. Балахонцева¹, Е.А. Базыкина¹, О.Е. Троценко¹,
О.П. Курганова², О.М. Юргина³, Е.Н. Бурдинская³, Ю.А. Натыкан³,
И.М. Чурсина³

¹ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Российская Федерация;

²Управление Роспотребнадзора по Амурской области, г. Благовещенск, Российская Федерация

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Амурской области», г. Благовещенск, Российская Федерация

Изучение генетического разнообразия вируса гепатита С (HCV) имеет большое практическое значение при проведении молекулярно-эпидемиологических исследований, разработке средств специфической профилактики и для определения тактики терапии. Проведен серологический и молекулярно-генетический анализ 70 образцов сыворотки/плазмы крови от пациентов с диагнозом хронический гепатит С (ХГС), проживающих на территории Амурской области. РНК HCV была обнаружена в 48 (68,6±5,5%) образцах плазмы крови. Генотипирование HCV, проведенное с использованием набора «АмплиСенс -1/2/3» («Интерлабсервис»), показало, что на территории области среди обследованных пациентов незначительно преобладал 1 генотип вируса – 50,0±7,2% (n=24). Генотип 3 HCV обнаружен у 21 пациента (43,8±7,2%). В 3 случаях (6,2±3,5%) выявлен 2 генотип. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b генома HCV, проведенный для 40 РНК HCV-положительных образцов, выявил следующее соотношение субтипов: 1в - 22 (55,0±7,9%), 3а - 15 (37,5±7,7%), 2а - 1 (2,5±2,5%), 2к - 1 (2,5±2,5%), 2к/1в - 1 (2,5±2,5%).

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип, субтип, рекомбинантная форма, хронический гепатит С, филогенетический анализ

GENETIC DIVERSITY OF HEPATITIS C VIRUS AMONG THE POPULATION OF THE AMUR REGION

V.O. Kotova¹, L.A. Balakhontseva¹, E.A. Bazykina¹, O.E. Trotsenko¹, O.P. Kurganova²,
O.M. Yurgina³, E.N. Burdinskaya³, Yu.A. Nattykan³, I.M. Chursina³

¹Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Khabarovsk, Russian Federation

²Regional Office of Rospotrebnadzor in Amur region, Blagoveshchensk, Russian Federation

³FBUZ "Center of Hygiene and Epidemiology in the Amur region", Blagoveshchensk, Russian Federation

Evaluation of hepatitis C virus (HCV) genetic diversity is of great practical importance while conducting molecular epidemiologic studies, specific preventive measures and determining therapy tactics. Serological and molecular-genetic analysis of 70 serum/plasma samples obtained from patients diagnosed with chronic hepatitis C residing in the Amur Region was carried out. HCV RNA was detected in 48 (68,6±5,5%) plasma samples. HCV genotyping that was carried out utilizing AmpliSens - 1/2/3 kit (Interlab-service), showed that 1 genotype of the virus slightly prevailed – in 50,0±7,2% of the samples (n=24). HCV genotype 3 was found in 21 patients (43,8±7,2%). Genotype 2 was identified in 3 cases (6,2±3,5%). Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the NS5b region of the HCV genome that was carried out for 40 HCV-positive RNA samples, showed following ratio of subtypes: 1b - 22 (55,0±7,9%), 3a - 15 (37,5±7,7%), 2a - 1 (2,5±2,5%), 2k - 1 (2,5±2,5%), 2k/1b - 1 (2,5±2,5%).

Key words: hepatitis C virus, genotype, subtype, recombinant forms, chronic hepatitis C, phylogenetic analysis.

Введение

Гепатит С (ГС) продолжает оставаться одной из актуальных проблем здравоохранения всего мира и характеризуется широкой распространенностью, отсутствием вакцинопрофилактики, частым развитием хронических форм заболевания с возможностью формирования таких неблагоприятных исходов, как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома. По оценкам ВОЗ, во всем мире хроническим ГС страдает 58 миллионов человек. В 2019 г. от ГС умерло приблизительно 290 000 человек, главным образом в результате цирроза и первичного рака печени. Ежегодно в мире фиксируется до 1,5 миллионов новых случаев инфицирования [23].

Вирус гепатита С (ВГС, HCV) встречается во всех регионах мира. Наибольшее количество случаев приходится на Восточное Средиземноморье и Европейский регион. В странах Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана хроническим ГС страдает примерно по 10 миллионов человек, а в Африканском регионе и государствах Америки число больных хроническим ГС, по оценкам, составляет 9 и 5 миллионов человек, соответственно [23].

Большое влияние на течение инфекционного процесса ГС и на особенности эпидемиологии данной инфекции оказывает высокая генетическая гетерогенность вируса. ВГС является РНК-содержащим вирусом, который обладает высокой генетической вариабельностью, соответствующей быстрой замещаемости нуклеотидов. Это не только затрудняет разработку эффективных методов специфической профилактики, но и способствует быстрому формированию вариантов вируса, устойчивых к действию противовирусных препаратов. В настоящее время на основе филогенетического анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей изоляты HCV подразделяют на 8 генотипов и 93 подтвержденных субтипов [11, 13]. Геномы среди генотипов HCV отличаются друг от друга примерно на 30-35 %, а различия между субтипами составляют 15-20 % [12, 22]. Субтипы включают в себя изоляты, состоящие из квазивидов – совокупности генетически близких вариантов вируса, структурно и антигенно отличающихся между собой, в пределах одного индивидуума. Генетическая вариабельность квазивидов достигает 1–3% [17].

Для каждого генотипа характерна определенная частота встречаемости и географическая зона распространения. Так, на долю 1 генотипа, который имеет 14 субтипов (1a-1o), приходится больше всего случаев заболеваемости ГС в мире - 83,4 миллиона (46,2%). Наиболее распространенными субтипами являются субтипы 1a и 1b, которые встречаются повсеместно. Следующим наиболее распространенным геновариантом вируса является 3 генотип HCV, который по оценкам исследователей, составляет 54,3 миллиона (30,1%) случаев заболеваемости ГС в мире, и встречается в Центральной и Южной Азии, Латинской Америке и Восточной Европе. На долю генотипов 2, 4 и 6, которые имеют ограниченное географическое распределение, приходится большая часть оставшихся случаев инфицирования, с распространенностью, оцениваемой в 9,1%, 8,3% и 5,4%, соответственно. Частота распространения 5 генотипа составляет <1% [19]. Генотип 2 вируса ГС чаще встречается в странах Азии и Западной Африки, в то время как высокая частота инфицирования 4 генотипом происходит в Центральной, Восточной и Северной Африке, а также на Ближнем Востоке. Генотип 5 распространен в Южной Африке, генотип 6, имеющий наибольшее количество субтипов - в Восточной и Юго-Восточной Азии, 7 – в Центральной Африке. В 2018 году в Канаде у выходцев из штата Пенджаб (Индия) был обнаружен 8 генотип вируса [11].

В 2002 г. в Санкт-Петербурге был обнаружен первый межгенотипный рекомбинантный вариант HCV - RF2k/1b, структурная часть генома которого образована субтипом 2k, а неструктурная – субтипом 1b вируса [14, 15]. В 2005 г. рекомбинантная форма RF2k/1b была включена в классификацию HCV как отдельная номенклатурная единица - RF 01_1b2k (рекомбинантная форма), а в 2009 – как CRF 01_1b2k (циркулирующая рекомбинантная форма) [2, 16, 20]. В настоящее время это единственный рекомбинантный вариант HCV, который широко распространен в мире и имеет эпидемиологическое значение. Современная классификация HCV включает 9 межгенотипных рекомбинантных форм [13]. Изучение рекомбинации HCV имеет большое значение в клинической практике, поскольку такие варианты вируса могут сочетать в себе разные свойства родительских генотипов, в том числе в плане ответа на терапию препаратами интерферонов [4].

Изучение распространения генотипов HCV на территориях Российской Федерации проводится с середины 1990-х гг. [5]. По результатам молекулярно-генетических исследований установлено, что на территории Российской Федерации доминируют генотипы 1b и 3a [7-10]. Необходимо отметить, что, несмотря на проводимые исследования, данные о распределении генотипов на отдельных территориях Российской Федерации весьма ограничены, особенно это касается отдаленных районов Дальнего Востока.

Определение генотипической принадлежности HCV играет важную роль при выборе тактики проводимой терапии. Известно, что пациенты, инфицированные HCV субтипа 1b, хуже отвечают, как на терапию пегелированным интерфероном и рибавирином, так и на терапию некоторыми препаратами прямого противовирусного действия, по сравнению с пациентами, инфицированными HCV генотипов 2 и 3 [3].

Изучение генетического разнообразия возбудителей вирусных гепатитов и проведение молекулярно-генетического мониторинга за циркулирующими на каждой отдельной территории геновариантами вирусов, осуществляемое с помощью молекулярно-генетических методов и приемов молекулярной эпидемиологии, имеют не только клиническое значение, но и играют важную роль в решении вопросов эпидемиологического надзора за вирусными гепатитами. Данные исследования позволяют выявлять завозные случаи заболевания, прогнозировать изменение эпидемиологической ситуации, разрабатывать новые стратегические подходы к усовершенствованию системы профилактики инфекций.

Цель работы: охарактеризовать современную эпидемиологическую ситуацию по вирусному гепатиту С в Амурской области и провести анализ генетического разнообразия вируса гепатита С (HCV), циркулирующего среди населения Амурской области.

Материалы и методы

При анализе заболеваемости использованы данные форм государственного статистического наблюдения №№ 1,2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», а также материал, представленный Управлением Роспотребнадзора по Амурской области по запросу ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора. Проведён ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости вирусным гепатитом С (ВГС) на территории Амурской области.

С целью проведения анализа генетического разнообразия вируса гепатита С, циркулирующего среди населения Амурской области, исследовано 70 образцов плазмы крови от жителей г. Благовещенска Амурской области, в том числе 65 образцов от пациентов с диагнозом хронического вирусного гепатита С (ХВГС) и 5 - от пациентов с острым вирусным гепатитом С (ОВГС). Среди обследованных было 44 женщины (62,9±5,8%) и 26 мужчин (37,1±5,8%). Средний возраст пациентов составил 47,6±1,6 лет.

Все поступившие образцы сывороток крови протестированы на наличие маркеров вирусного гепатита С: антитела к вирусу гепатита С – анти-ВГС (IgG+IgM) с проведением подтверждающего теста, анти-ВГС IgM. Сыворотки крови исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест», согласно инструкциям производителя.

Выделение нуклеиновых кислот из 100 мкл плазмы крови производили с использованием комплекта реагента «АмплиПрайм РИБО-преп» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя.

Первичный анализ на выявление РНК HCV, определение вирусной нагрузки и генотип вируса проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс® HCV-FL», «АмплиСенс®HCV-Монитор-FL», «АмплиСенс -1/2/3» (ООО, «Интерлабсервис», Москва, Россия), согласно инструкциям производителя, и прибора «Rotor Gene Q» (Qiagen, Германия). Обратную транскрипцию для получения кДНК проводили с использованием коммерческого набора «Реверта-Л».

Для 40 РНК HCV-положительных образцов с целью получения нуклеотидных последовательностей фрагмента области NS5b генома HCV была проведена двухступенчатая ПЦР со специфическими праймерами («Синтол», Россия) к данному участку генома, взятыми из литературных источников (табл. 1) [18].

Таблица 1

Праймеры, используемые для амплификации фрагмента NS5b генома ВГС

	Последовательность (5'→3')	Направление	Положение в геноме
1	TATGAYACCCGCTGYTTTGAC	Прямой	8256-8275
	GARTACCTRGTCATAGCCTC	Обратный	8622-8641
2	CTGYTTTGACTCMACRGTCAC	Прямой	8267-8287
	ATAGCCTCCGTGAAGRCTC	Обратный	8611-8630

Условия для обоих раундов ПЦР были следующими: 95°C –2 мин., затем 30 циклов: денатурация при 95°C – 30 сек., отжиг при 60°C – 30 сек. и удлинение цепи при 72°C – 1 мин. Полученный в ходе ПЦР продукт величиной 320 п.н. определяли в электрофорезе в 2% агарозном геле.

Для определения нуклеотидной последовательности анализируемых фрагментов вирусного генома проводили прямое секвенирование ампликонов на ДНК-анализаторе модели 3500 (Applied Biosystems/Life Technologies, США). Секвенирование осуществляли с помощью набора BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (AppliedBiosystems/LifeTechnologies, США), согласно протоколу производителя.

Для выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей использовалась программа BioEdit v.7.1.9.

Для идентификации близкородственных штаммов HCV полученные нуклеотидные последовательности анализировались в программе BLAST в сравнении с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6.0, путем построения филогенетических деревьев методом «ближайших соседей» (neighbor joining) [21]. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. Для оценки статистической достоверности филогенетических связей использовали бутстрэп (bootstrap) анализ для 1000 независимых построений каждого филогенетического древа.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием программы Excel 2013 и с расчетом средней арифметической ошибки. Использовался метод описательной и аналитической эпидемиологии.

Результаты исследования.

Амурская область является субъектом РФ, входящим в состав Дальневосточного федерального округа (ДФО). Численность населения субъекта по состоянию на 01.01.2022 г. составляет 772525 человек. Юго-западная часть Амурской области граничит с Китайской Народной Республикой.

В многолетней динамике эпидемическая ситуация по заболеваемости парентеральными вирусными гепатитами в Амурской области характеризуется как нестабильная, с волнообразным течением. По данным федеральной статистической отчетной формы «Сведения о мероприятиях по профилактике ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, выявлению и лечению больных ВИЧ», показатель суммарной заболеваемости всех форм парентеральных вирусных гепатитов в период с 2012 года по 2020 год снизился на 43,0%. При этом в 2019 году отмечен подъем заболеваемости, показатель составил 51,8 случай на 100 тыс. населения за счет увеличения числа больных хроническим вирусным гепатитом С. В 2020 году вновь отмечено снижение показателя в 2 раза (рис.1).

В многолетней динамике заболеваемости острым вирусным гепатитом С (ОВГС) отмечается тенденция к снижению. В 2020 году зарегистрировано 2 случая, показатель заболеваемости составил 0,25 на 100 тыс. населения, что ниже уровня 2019 года в 3 раза (6 случаев, показатель составил 0,76 на 100 тыс. населения). Уровень заболеваемости ОВГС в Амурской области оказался на 37,5% ниже показателя по Дальневосточному федеральному округу (0,40) и на 62,1% – среднероссийского уровня (0,66). Среди детей случаев заболеваний ОВГС в Амурской области в 2020 году не зарегистрировано [6].

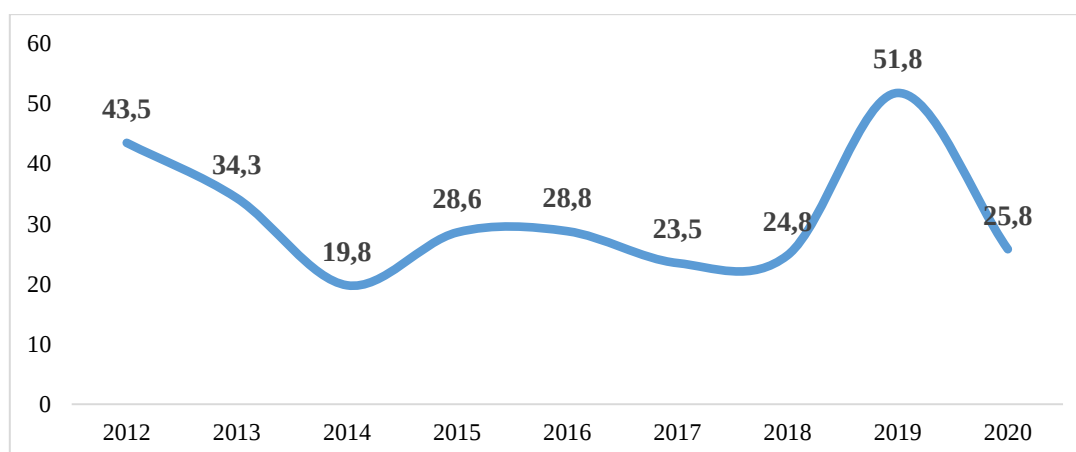


Рис.1. Многолетняя динамика суммарной заболеваемости вирусными гепатитами В и С (хроническими и острыми) в Амурской области (показатель на 100 тыс. нас.)

В структуре суммарной заболеваемости парентеральными вирусными гепатитами наибольший удельный вес ежегодно приходится на хронические вирусные гепатиты С (2020 г. – 77,9%, 2019 г. – 84,1%, 2018 г. – 81%, 2017 г. – 76%, 2016 г. – 79%). (Рис.2). Большинство больных хроническим вирусным гепатитом С проживает в г. Благовещенске, чем объясняется сходная с общим населением региона динамика заболеваемости в областном центре (рис. 3).

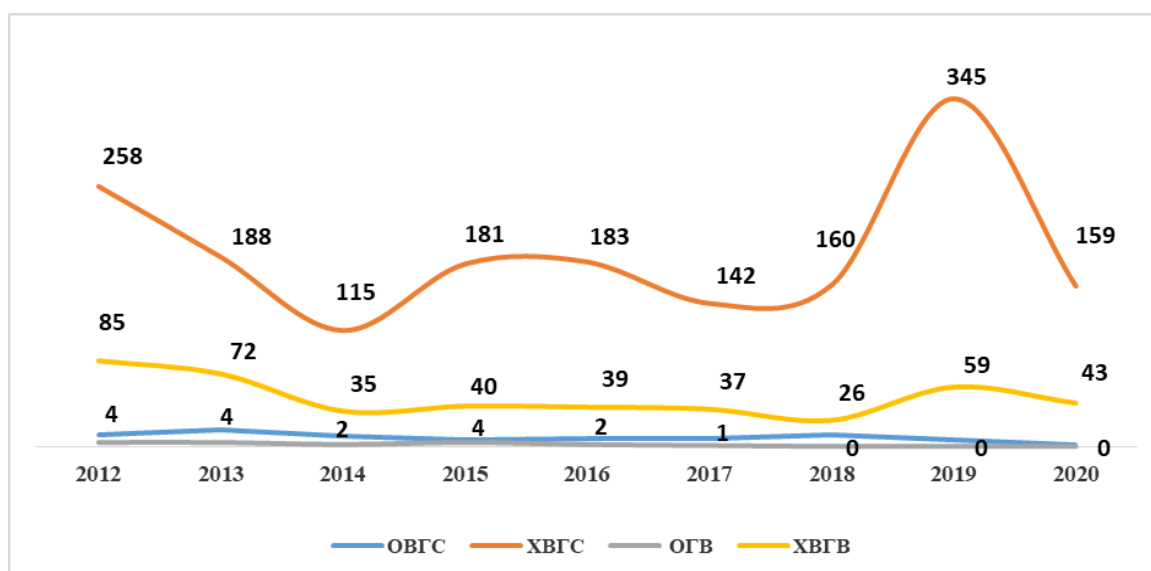


Рис.2. Многолетняя заболеваемость вирусными гепатитами В и С в Амурской области среди совокупного населения (абс. показатели)

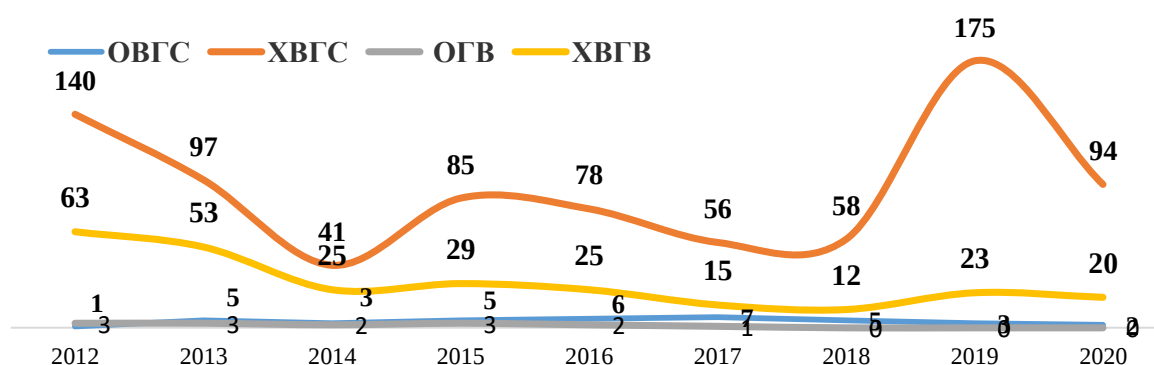


Рис.3. Многолетняя заболеваемость вирусными гепатитами В и С в г. Благовещенске (абс. показатели)

В 2020 году показатель заболеваемости ХВГС в целом по Амурской области по сравнению с 2019 снизился на 53,9% (или в 2 раза) и составил 20,1 на 100 тыс. населения (в 2019 году – 43,6 на 100 тыс. населения).

Основной удельный вес заболеваемости ХВГС приходится на взрослое население (94,3%). При этом с 2016 по 2019 гг. отмечен рост заболеваемости среди детей с 6 случаев в 2016 году до 34 случаев в 2019 году. В 2020 году ХВГС выявлен у 9 детей. Особенность эпидемического процесса вирусного гепатита С у детей в возрасте до 17 лет проявилась в виде практического отсутствия регистрации острого гепатита С (всего 1 случай в 2018 году) на фоне довольно высоких показателей заболеваемости хроническими гепатитами С у них в период с 2017 по 2019 гг., что могло свидетельствовать о недостаточной диагностике и неправильной постановке диагнозов медицинскими организациями (Рис.4).

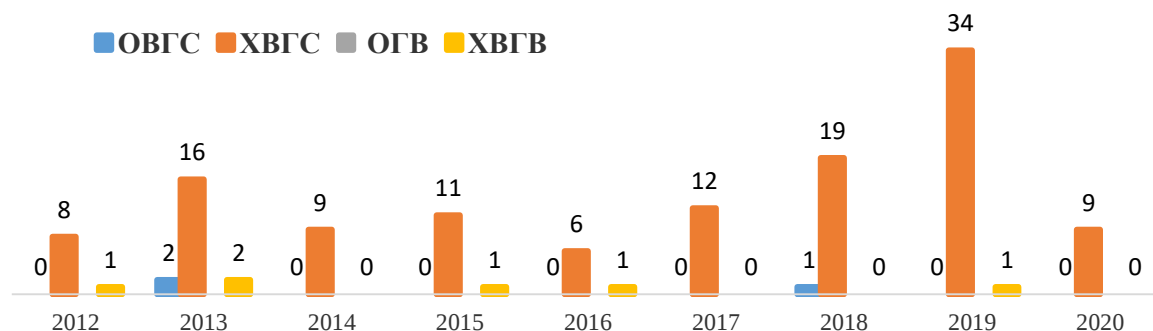


Рис.4. Многолетняя заболеваемость ВГВ и ВГС в Амурской области (дети до 17 лет, абс. показатель)

Наибольший уровень заболеваемости ХВГС детского населения отмечен в Амурской области в 2019 году: из 34 заболевших ХВГС детей 4 случая зарегистрированы у детей до 1 года, 1 случай – в возрасте 1-2 года, 8 случаев – в возрасте 3-6 лет и 12 случаев – среди детей школьного возраста. В 2020 году диагноз ХВГС впервые установлен у 9 детей, из них по одному ребенку в школьном возрасте и до года, у 3-х детей – в возрасте 3-6 лет.

Из числа всех зарегистрированных в 2012-2020 гг. случаев ХВГС среди детей 38,5% приходится на г. Благовещенск (Рис.5).

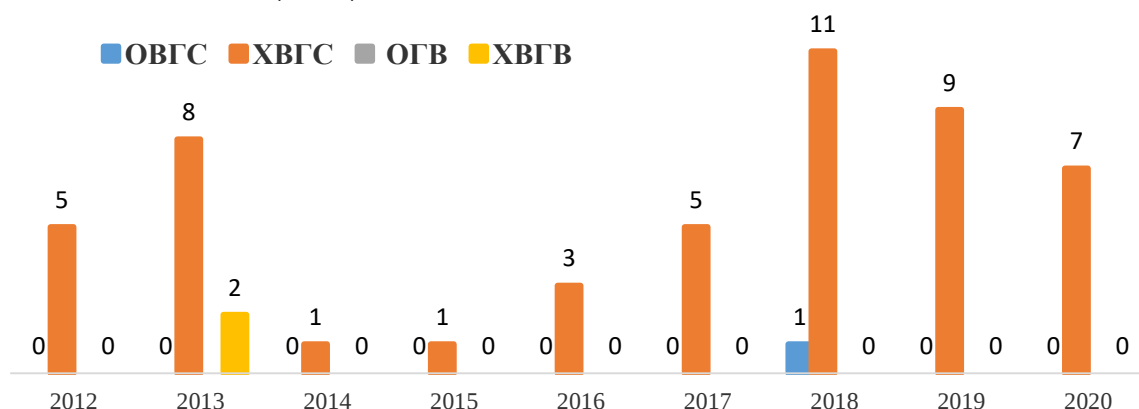


Рис.5. Многолетняя заболеваемость ВГВ и ВГС в г. Благовещенске (дети до 17 лет, абс. показатель)

Следует отметить, что число обследованных на вирусные гепатиты В и С в Амурской области в 2019 году по сравнению с 2018 г. возросло незначительно – на 4,5 % (с 307 524 до 321 280 человек), практически не изменившись в 2020 г. (318 687 человек).

На диспансерном наблюдении с вирусными гепатитами В и С в 2020 году состояло 4 743 человека. При этом, выявлена динамика нарастания ежегодного числа лиц с указанными диагнозами, охваченных диспансерным наблюдением – с 3199 в 2014 г. до 4904 в 2019 г.

Неблагоприятные тенденции, связанные с ростом заболеваемости впервые выявленным хроническим гепатитом С среди населения Амурской области, привели к необходимости молекулярно-генетического изучения циркуляции возбудителя в данном субъекте РФ. В связи с этим, с целью изучения генетического разнообразия HCV, циркулирующего среди населения Амурской области, исследовано 70 образцов плазмы крови от жителей региона.

Все образцы сывороток крови перед проведением молекулярно-генетического исследования были протестированы на наличие маркеров вирусного гепатита С. Во всех пробах были выявлены антитела к вирусному гепатиту С (анти-ВГС (IgG+IgM)). Анти ВГС IgM обнаружены у 41 пациента (58,6±5,9%). Все анти-ВГС позитивные образцы подтверждены методом ИФА на наличие антител к структурным и неструктурным белкам ВГС.

РНК HCV выявлена в 48 (68,6±5,5%) образцах плазмы крови. Во всех РНК-положительных пробах определен уровень вирусной нагрузки. У 39 (81,2±5,6%) пациентов он был низкий (менее 8×10^5 МЕ/мл), у 9 (18,8±5,6%) – высокий (более 8×10^5 МЕ/мл). Генотипирование HCV, проведенное с использованием набора «АмплиСенс -1/2/3» («Интерлабсервис»), показало, что среди обследованных пациентов Амурской области незначительно преобладал 1 генотип вируса – 50,0±7,2% (у 24 из 48

пациентов). Генотип 3 HCV обнаружен у 21 пациента ($43,8 \pm 7,2\%$). В 3 случаях ($6,2 \pm 3,5\%$) выявлен 2 генотип (рис.6).

Для установления генетических взаимоотношений между отдельными образцами и возможного родства вариантов HCV, циркулирующих на территории Амурской области, с изолятами из других регионов Российской Федерации и стран ближнего и дальнего зарубежья, получены 40 нуклеотидных последовательностей области NS5b генома (РНК зависима РНК полимеразы) удовлетворительного качества, пригодных для проведения дальнейшего анализа. Прямое секвенирование NS5B области генома используется многими исследователями для идентификации различных генотипов HCV и уточнения взаимосвязи между отдельными изолятами. В качестве референс-штаммов для анализа использовали последовательности той же области генома HCV из России и других стран мира, представленные в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

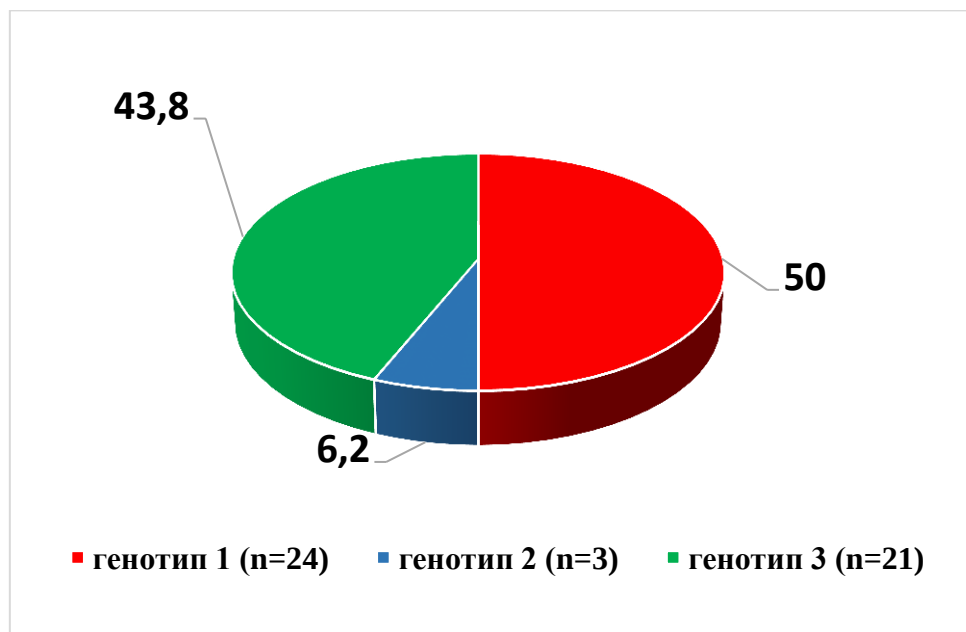


Рис. 6. Распределение генотипов HCV среди обследованных жителей Амурской области (по результатам исследования в тест-системе «АмплиСенс -1/2/3» («Интерлабсервис»))

Филогенетические отношения между исследованными образцами и референсными последовательностями представлены на рисунке 7. На филогенетическом дереве 23 исследуемых штамма равномерно распределились между штаммами HCV субтипа 1в, представленными в международной базе данных GenBank из стран ближнего и дальнего зарубежья (Узбекистан, Греция, США, Германия, Италия, Китай, Бразилия). При этом 4 нуклеотидные последовательности сгруппировались вместе и сформировали единый кластер, отличный от других образцов субтипа 1в. Можно предположить, что на территории Амурской области существует, по крайней мере, две независимые эпидемиологические цепи связанных между собой случаев инфицирования HCV геновариантом 1в. Низкое сходство изученных нами штаммов со штаммами из России обусловлено, скорее всего, невысокой долей штаммов, выделенных на территориях РФ и зарегистрированных в международной базе данных Genbank.

Примечателен тот факт, что анализ одного исследуемого образца (1622/8), проведенный с использованием тест-системы «АмплиСенс -1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), показал его предварительную принадлежность к субтипу 2, в то время как при филогенетическом анализе фрагмента области NS5b генома HCV данная проба группировалась в кластер, сформированный изолятами 1в субтипа. Полученные результаты позволили предположить наличие рекомбинантного геноварианта CRF01_2k1b у обследованного пациента. Данная циркулирующая рекомбинантная форма появилась в результате объединения области 5'UTR генотипа 2к и области 3'UTR генома генотипа 1в, наиболее тесно связанного с глобальной эпидемией ВГС в мире [1, 16]. Для данного образца была получена нуклеотидная последовательность фрагмента гена Core HCV и проведен дополнительный филогенетический анализ в сравнении с последовательностями геноварианта CRF01_2k1b из разных регионов мира.

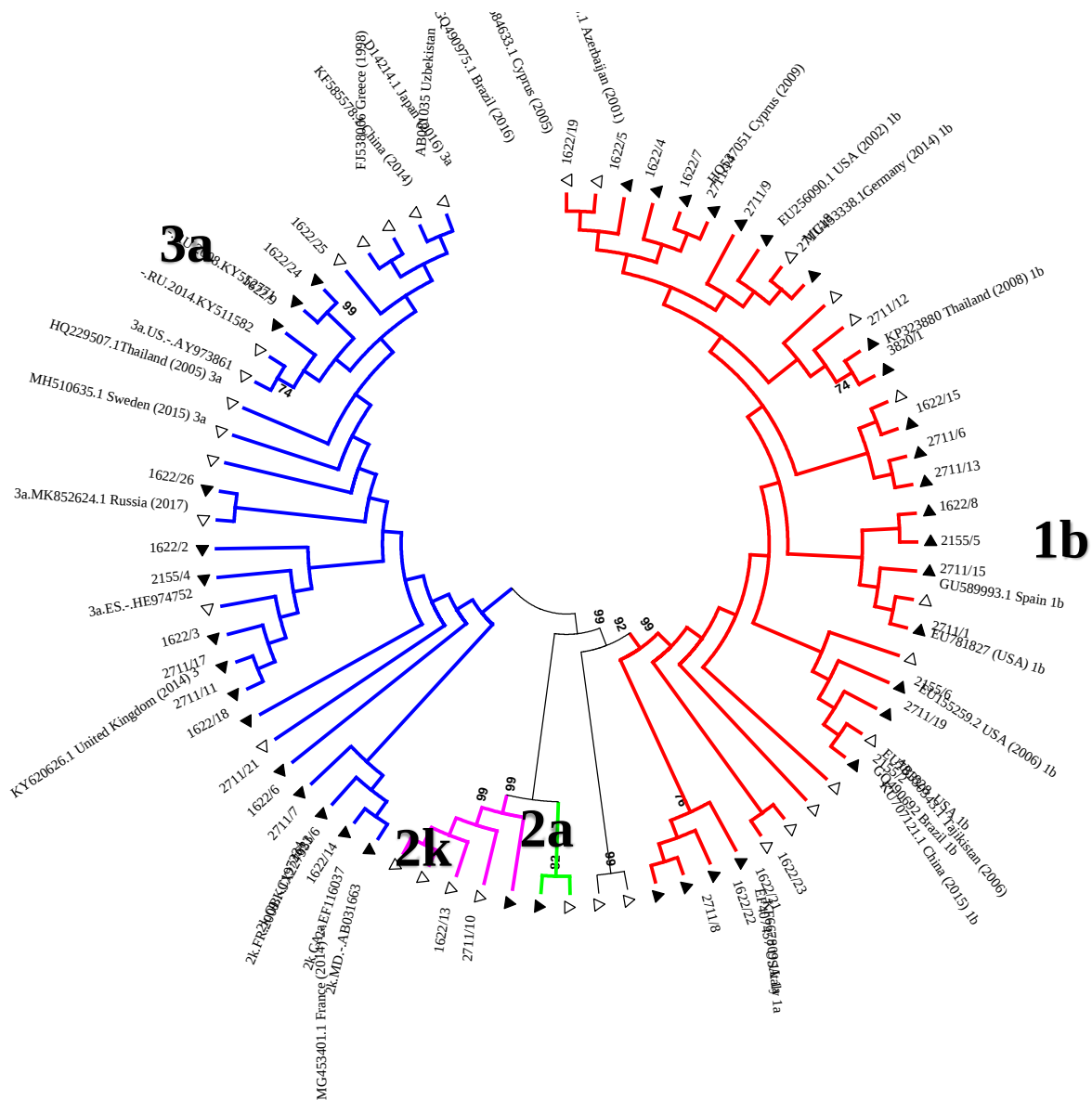


Рис 7. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b HCV, циркулирующих среди населения Амурской области в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями

Примечание: Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей. Последовательности HCV, изученные в данной работе, выделены черными треугольниками. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70%.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей региона Core HCV показал высокую степень гомологии между рекомбинантным изолятом ВГС RF2k/1b, полученным в ходе проведенного исследования, и ранее описанными изолятами из России, странами ближнего и дальнего зарубежья (рис. 8).

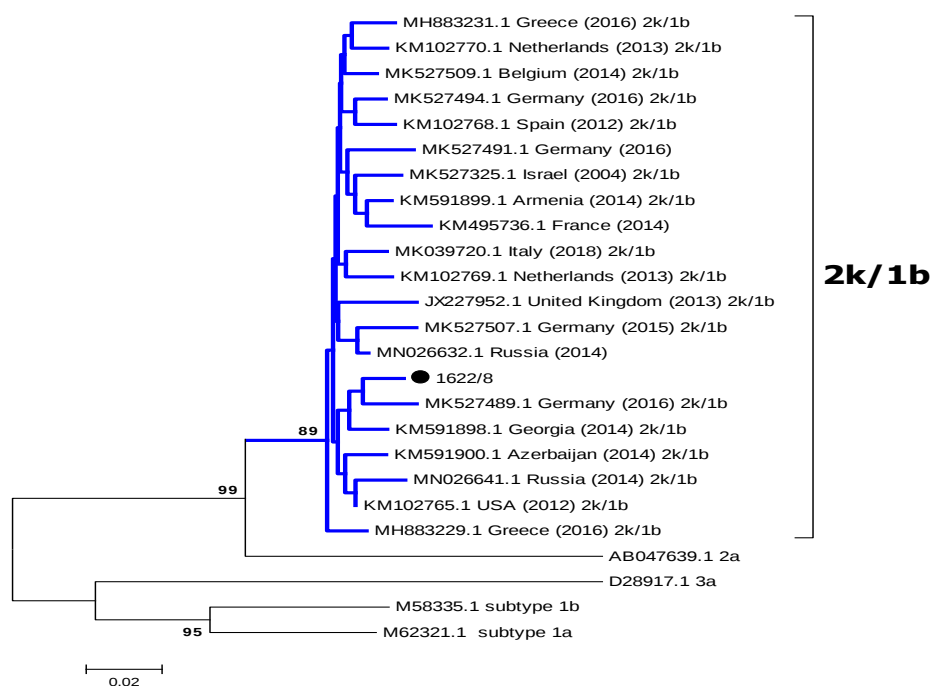


Рис.8 Филогенетическое дерево нуклеотидной последовательности региона Core генома HCV, полученной от пациента с ХГС, проживающего на территории Амурской области, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями

В настоящее время в работе клинических лабораторий используются методы генотипирования, которые не позволяют дифференцировать CRF01_2k1b от 2 генотипа вируса. В коммерческих диагностических тест-системах для идентификации генотипов в качестве мишени используется только один фрагмент вируса 5'UTR/core, что является недостаточным для выявления рекомбинантных форм вируса.

Филогенетический анализ 15 образцов, отнесенных по результатам генотипирования к генотипу 3, показал, что все полученные нуклеотидные последовательности кластеризуются на одной ветви филогенетического древа с ранее полученными последовательностями той же области генома вариантов субтипа 3a, выделенных в разные годы в разных регионах Российской Федерации и мира (рис.9). Для популяции HCV субтипа 3a, циркулирующей на изучаемой территории Амурской области, оказались характерными высокая степень генетической гомогенности и отсутствие выраженной кластеризации по каким-либо признакам. Следует обратить внимание на то, что нуклеотидные последовательности образцов 1622/24 и 1622/25, достоверно сгруппировались на филогенетическом древе, образуя общий кластер, что свидетельствует о наиболее высокой степени гомологии исследуемых образцов, не исключающей эпидемиологической связи между ними. Данный факт может быть использован при проведении эпидемиологического расследования.

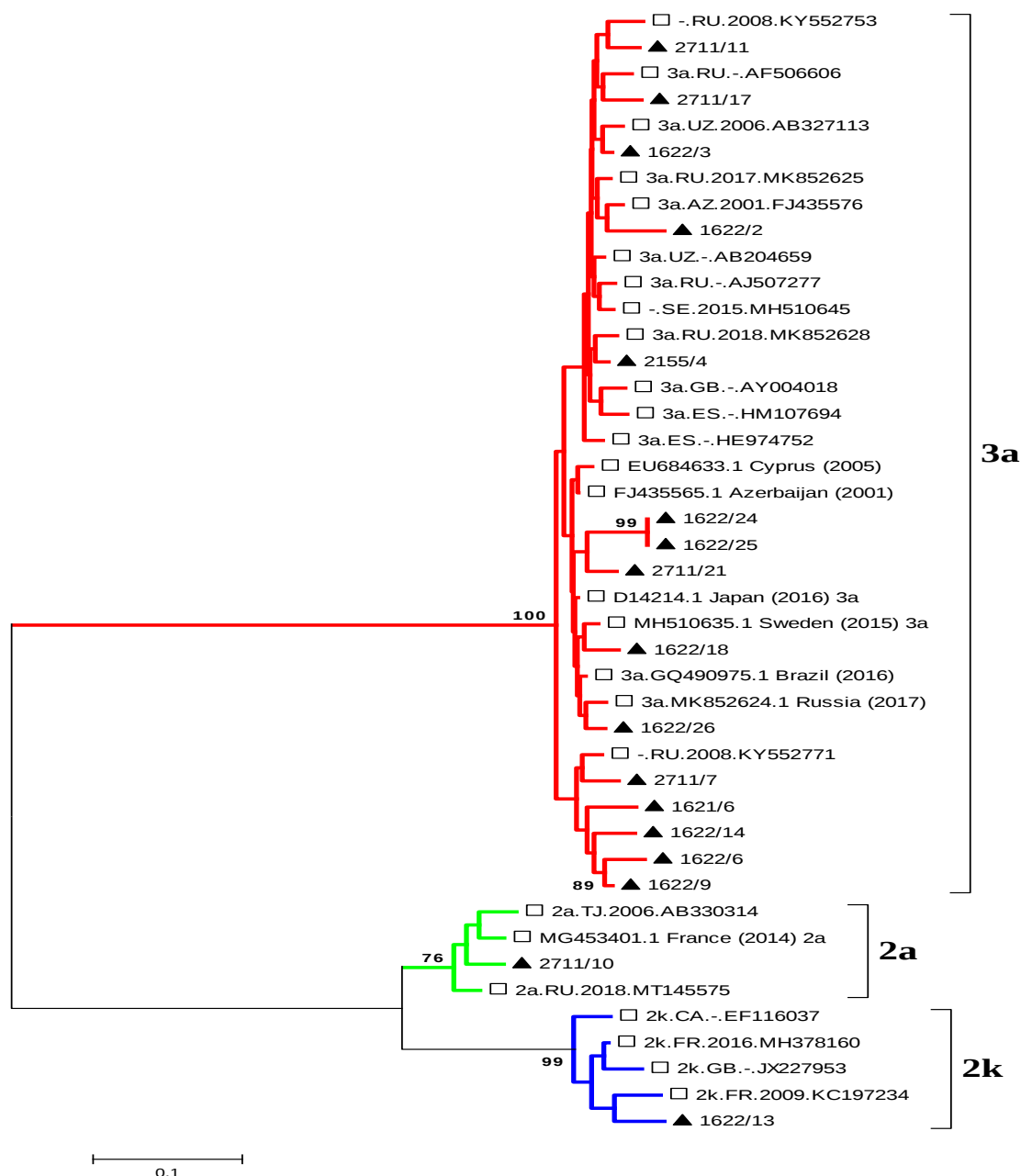


Рис 9. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b HCV генотипов 2 и 3, циркулирующих среди населения Амурской области, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями

Филогенетический анализ 2 из 3 образцов, отнесенных по результатам генотипирования с использованием набора «АмплиСенс -1/2/3» («Интерлабсервис») к генотипу 2, выявил формирование двух кластеров. Один из них был сформирован образцом № 2711/10 и генетически близкими последовательностями субтипа 2а HCV, выделенными в разные годы на территориях Франции (MG453401.1), Таджикистане (AB330314) и Хабаровском крае (MT145575). Образец № 1622/13 сгруппировался на филогенетическом дереве, образуя еще один общий кластер с изолятами HCV субтипа 2к из Канады, Англии и Франции.

Таким образом, филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b генома HCV, проведенный для 40 исследованных образцов Амурской области показал иное, более уточненное соотношение субтипов, включавшее и рекомбинантную форму вируса. Так, доля генотипа 1в составила 22 изолята (55,0±7,9%), 3а – 15 (37,5±7,7%), 2а – 1 (2,5±2,5%), 2к – 1 (2,5±2,5%), 2к/1б – 1 (2,5±2,5%).

Заключение

Проведенное молекулярно-генетическое исследование вируса гепатита С, распространенного на территории Амурской области, показало, что среди обследованных пациентов с диагнозом хронический гепатит С циркулируют субтипы: 1б, 3а, 2а, 2к с небольшим преобладанием 1б. Кроме того, в

Амурской области среди обследованных лиц зафиксирован 1 случай естественной рекомбинации HCV типа 2k/1b. Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента области NS5b генома HCV депонированы в базу данных GenBank под номерами OP503641-OP503680.

Благодаря определению высокой степени генетической гомологии нуклеотидных последовательностей, достоверно сгруппированных на древе, показано возможное использование результатов филогенетического анализа изолятов вируса гепатита С в эпидемиологическом расследовании случаев инфицирования.

Таким образом, полученные данные позволяют не только расширить информационную базу GenBank изученными нуклеотидными последовательностями вируса гепатита С, циркулирующего среди населения Амурской области, но и использовать результаты молекулярно-генетического анализа для совершенствования эпидемиологического надзора за вирусными гепатитами, в том числе при проведении эпидемиологического расследования.

Литература

1. Гасич Е.Л., Еремин В.Ф. Рекомбинантная форма 2k/1b ВГС, выявленная в Беларуси: происхождение, распространение и пути передачи // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. - 2017. - Т.6, № 1. - С.9-14.
2. Дементьева Н.Е., Калинина О.В., Знойко О.О., Беляков Н.А., Жебрун А.Б. Циркулирующая рекомбинантная форма вируса гепатита С RF2k/1b: проблемы диагностики и терапии // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2016. - Т.8, №1. - С.42-52.
3. Кравченко А.В., Куимова У.А., Ганкина Н.Ю., Канестри В.Г., Чуланов В.П. Предикторы устойчивого вирусологического ответа при терапии хронического гепатита пегилированным интерфероном и рибавирином у больных ВИЧ-инфекцией // Инфекционные болезни. - 2014. - Т. 12, № 2. - С. 30–34.
4. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов. – М.: «Икар», 2013. - 336 с.
5. Львов, Д. К., Самохвалов Е.И., Миширо С., Тсуда Ф., Селиванов Н.А., Окамото Х., Стаханова В.М. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ // Вопросы вирусологии. - 1997. - № 4. - С. 157-161.
6. Материалы для Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Амурской области в 2020 году».
7. Мукомолов С.Л., Левакова Л.Г., Сулягина Е.В., Синайская Е.В., Болсун Д.Д., Иванова Н.В. Современная эпидемиология гепатита С в России // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2012. - № 6. - С. 21–25.
8. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Герасимова В.В., Бичурина М.А., Козлов А.В., Мукомолов С.Л., Тотолян А.А. Молекулярно-эпидемиологические особенности изолятов вируса гепатита С из разных регионов Республики Саха (Якутия) // Инфекция и иммунитет. – 2015. -Т.5, №4. - С.359-372.
9. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клушкина В.В., Исаева О.В., Игнатьева М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации // Журнал инфектологии. - 2017. - Т.9, №2. - С.56-64.
10. Чуб Е.В., Кочнева Г.В., Гранитов В.М. и др. Рекомбинанты вируса гепатита С типа 2k/1by населения Алтайского края // Инфекционные болезни. - 2007. - Т.5, № 4. - С.5-11.
11. Borgia S. M., Hedskog C., Parhy B. et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes // J Infect Dis. – 2018. – Vol.11, № 288. – P.1722-1729.
12. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control // J Hepatol. – 2016. – Vol.1, № 65. P.2-21.
13. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2022 URL: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification. (Accessed: 13.04.2022).
14. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnus L.O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg // J. Virol. – 2002. –Vol.8, № 76. – P.4034–4043.
15. Kalinina O., Norder H., Magnus L.O. Full-Length Open Reading Frame of a Recombinant hepatitis C Virus Strain from St. Petersburg: Proposed mechanism for its formation // J. Gen. Virol. – 2004. – Vol.7, №85. - P.1853–1857.
16. Kuiken C., Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus // Methods mol biol. – 2009. - №510. - P.33–53.
17. Messina J., Humphreys I., Flaxman A. et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes // Hepatology. – 2015. Vol.1, №61. - P.77–87.
18. Rajhi M., Ghedira K., Chouikha A. et al. Phylogenetic Analysis and Epidemic History of Hepatitis C Virus Genotype 2 in Tunisia, North Africa // PLoS One. – 2016. - Vol4, № 11. - e0153761.

19. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on // J. Gen. Virol. – 2004. - №85. - P.3173–3188.
20. Simmonds P., Bukh J., Combet C. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes // Hepatology. – 2005. - Vol.4, № 42. - P.962–973.
21. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2013. - №30. - P.2725-2729.
22. Thong VD, Akkarathamrongsin S., Poovorawan K. Hepatitis C virus genotype 6: Virology, epidemiology, genetic variation and clinical implication // World J Gastroenterol. – 2014. – Vol.11, № 20. - P.2927-2940.
23. World Health Organization. Global hepatitis report, 2019 [Электронный ресурс]. – Geneva: World Health Organization, 2019. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.

Сведения об ответственном авторе:

Котова Валерия Олеговна – старший научный сотрудник, заведующая лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, e-mail: dvaids@mail.ru