

УДК:578.5:578.891:616.36-002:001.891(571.65)
DOI: 10.62963/2073-2899-2025-50-34-40

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С И АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА С СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ МАГАДАНСКОЙ ОБЛАСТИ

¹В.О. Котова, ¹Е.А. Базыкина, ¹Л.А. Балахонцева, ¹О.Е.Троценко,

²Е.В.Семенова, ²Л.Н. Вахнина, ²О.Л. Журавкова

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

²ГБУЗ «Магаданского областного диспансера фтизиатрии и инфекционных заболеваний», Российская Федерация, г. Магадан

Несмотря на проводимые исследования, данных о циркуляции различных геновариантов вирусов гепатитов на отдельных территориях Российской Федерации, особенно отдаленных, достаточно мало. В связи с этим весьма актуальным являются исследования по изучению генетического разнообразия и распространенности циркулирующих штаммов вирусов гепатитов, включая лекарственно-устойчивые, на разных географических территориях. Цель - провести анализ эпидемической ситуации по вирусному гепатиту С на территории Магаданской области, оценить генетическое разнообразие вируса гепатита С (HCV), циркулирующего среди населения Магаданской области. Ретроспективный анализ заболеваемости хронической формой гепатита С по Магаданской области проведен за период с 2014 по 2024 гг. (11 лет) по данным отчетов Управления Роспотребнадзора по Магаданской области. Выполнен серологический и молекулярно-генетический анализ 41 образца плазмы крови от пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит», проживающих на территории Магаданской области. Исследования показали, что заболеваемость хроническим гепатитом С (ХГС) в Магаданской области имела общую тенденцию с заболеваемостью в Дальневосточном федеральном округе, но меньшую интенсивность, особенно на протяжении 2014 - 2018 гг., а также 2022 - 2023 гг. Детское население Магаданской области практически не вовлечено в эпидемический процесс ХГС. РНК HCV была выявлена в 27 из 36 проб плазмы крови с положительным результатом ИФА на наличие антител (IgG+IgM) к вирусному гепатиту С. Установлено, что на территории Магаданской области циркулируют субтипы 3а, 1а, 1в, с преобладанием субтипа 3а. Зафиксирован 1 случай естественной рекомбинации HCV типа 2k/1b. Мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью, среди изолятов вируса гепатита С, полученных из Магаданской области и исследуемых в фрагменте NS5B, обнаружено не было. Несмотря на относительно благополучную ситуацию с ХГС в Магаданской области, чрезвычайно важным является наблюдение за структурой генотипов вируса гепатита С, позволяющее в дальнейшем отследить её стабильность либо нестабильность в изучаемом субъекте

Ключевые слова: Магаданская область, вирус гепатита С, вирус гепатита В, генотип, субтип, хронический гепатит, филогенетический анализ

HEPATITIS C VIRAL INFECTION INCIDENCE AND ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF VIRUS HEPATITIS C IN THE MAGADAN OBLAST

¹V.O. Kotova, ¹E.A. Bazykina, ¹L.A. Balakhontseva, ¹O.E. Trotsenko, ²E.V. Semenova,

²L.N. Vakhnina, ²O.L. Zhuravkova

¹FBIS Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human well-being (Rosptotebnadzor), Russian Federation, Khabarovsk

²Magadan Regional Phthisiology and Infectious Diseases Dispensary, Russian Federation, Magadan

Despite the ongoing studies, information on circulation of various genovariants of hepatitis viruses in certain constituent entities of the Russian Federation is scarce, especially in remote territories. In this regard, research of the genetic diversity and prevalence of circulating strains of hepatitis viruses including drug-resistant ones in different geographic areas are relevant. Objective – to analyze viral

hepatitis C epidemic situation in the Magadan oblast, to evaluate genetic diversity of the hepatitis C virus (HCV) circulating among the population of the Magadan oblast. A retrospective analysis of the chronic hepatitis C incidence in the Magadan oblast was conducted during 2014-2024 (11 years) based on the official reports of the Magadan oblast Rospotrebnadzor regional office. Serological and molecular genetic analysis of 41 blood plasma samples obtained from patients diagnosed with chronic viral hepatitis and residing in the Magadan oblast was performed. The research showed that chronic hepatitis C (CHC) incidence rates in the Magadan oblast and in the Far Eastern Federal district had a common trend but was less intense in the Magadan region, especially during 2014-2018 and 2022-2023. The child population of the Magadan oblast was almost not involved in the CHC epidemic process. HCV RNA was detected in 27 out of 36 blood plasma samples that had a positive ELISA result for the presence of HCV-antibodies (IgG + IgM). It was established that subtypes 3a, 1a, 1b were circulating in the Magadan oblast and subtype 3a was predominant. One case of HCV 2k/1b natural recombination was detected. No drug resistance mutations in the HCV NS5B region were found in the obtained isolates. Despite relatively favorable CHC epidemic situation in the Magadan oblast, it is extremely important to monitor HCV genotypes structure that allows to perform ongoing surveillance over its stability or instability in the territory of concern.

Key words: Magadan oblast, hepatitis C virus, hepatitis B virus, genotype, subtype, chronic hepatitis, phylogenetic analysis

Социальная и экономическая значимость проблемы вирусных гепатитов в Российской Федерации (РФ) определяется высокой заболеваемостью преимущественно хроническими формами (ХВГ). По данным Роспотребнадзора, в 2024 г. заболеваемость ХВГ составила 44,32 на 100 тыс. населения, что на 4,3 % ниже СМП (46,31 на 100 тыс. населения). В этиологической структуре впервые зарегистрированных случаев ХВГ преобладает хронический гепатит С (ХГС), доля его составляет 78,7 % среди всех ХВГ. Показатели заболеваемости ХВГ резко отличаются по субъектам Российской Федерации (от 7,19 до 147,17 на 100 тыс. населения), что в определенной степени зависит от качества диагностики и полноты регистрации данной группы заболеваний [1]. Исследования по изучению генетического разнообразия и распространенности циркулирующих штаммов вирусов гепатитов, включая лекарственно-устойчивые, на разных географических территориях являются весьма актуальными и имеют важное значение для планирования и реализации программ по ликвидации ВГС.

Цель работы – провести анализ эпидемической ситуации по вирусному гепатиту С на территории Магаданской области, оценить генетическое разнообразие вируса гепатита С (HCV), циркулирующего среди населения Магаданской области.

Материалы и методы

В работе использованы образцы плазмы крови от 41 пациента с диагнозом хронический вирусный гепатит, собранные на базе отделения-центра по профилактике и борьбе со СПИД ГБУЗ «Магаданского областного диспансера фтизиатрии и инфекционных заболеваний». Для всех пациентов получены информированные согласия на участие в исследовании, а также одобрение комитета по этике ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора (протокол № 10 от 25.10.2023 г.) на проведение исследований. Исследования проводились согласно заключенному договору о сотрудничестве № 2/1 от 15.01.2024 г. с ГБУЗ «Магаданский областной центр по профилактике и борьбы со СПИД».

Среди обследованных преобладали лица мужского пола (63,4±4,7%). Средний возраст пациентов составил 43 года.

Выделение ДНК HBV и РНК HCV проводили из образцов плазмы крови объемом 100 мкл с помощью набора реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя. Выявление ДНК HBV, РНК HCV, определение вирусной нагрузки в положительных пробах и генотипа HCV проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на коммерческих диагностических наборах «АмплиСенс® HBV-FL», «АмплиСенс®HBV-Монитор-Fl», «АмплиСенс® HCV-FL», «АмплиСенс®HCV-Монитор-Fl», «АмплиСенс -1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкциям производителя. Обратную транскрипцию для получения кДНК на матрице РНК у РНК HCV положительных образцах проводили с применением коммерческого набора «Реверта-Л» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Для получения нуклеотидных последовательностей участков core и NS5b генома HCV была проведена двухступенчатая ПЦР со специфическими праймерами («Синтол», Россия) к данным участкам генома, взятыми из литературных источников [3,6].

Прямое секвенирование фрагментов вирусного генома проводили с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems/Life Technologies, США) на ДНК-анализаторе модели 3500 (Applied Biosystems/Life Technologies, США). Для идентификации близкородственных штаммов HCV полученные нуклеотидные последовательности анализировались в про-

грамме BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Построение филогенетических деревьев методом «ближайших соседей» проводилось в программе MEGA версии 7.0, [7].

Замены среди области генома NS5B, связанные с устойчивостью к препаратам прямого противовирусного действия, были исследованы с использованием программы интерпретации Geno2pheno[HCV] [4].

Результаты и обсуждение

Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости острыми вирусными гепатитами В и С на территории Магаданской области сохраняется благополучной. Благодаря массовой иммунизации населения против вирусного гепатита В заболеваемость острым вирусным гепатитом В (ОВГВ) на территории области не регистрируется с 2015 года.

Заболеваемость ХГС как в Магаданской области, так и в ДФО, за 10-летний период имела тенденцию к снижению ($T_{\text{ср}} = -5,8\%$ для Магаданской области и $T_{\text{ср}} = -4,1\%$ для ДФО). На протяжении 2014 - 2018 гг. заболеваемость ХГС в Магаданской области была ниже таковой по ДФО. В 2019 г. произошел резкий рост показателя, который вплоть до 2021 года практически не отличался от такового в ДФО. В 2022-2023 гг. заболеваемость ХГС вновь оказалась ниже средне-окружного значения, особенно в 2023 г. – ниже в 2,8 раза ($p < 0,001$). Причем в Магаданской области в 2022 и 2023 гг. после пандемии COVID-19 отмечен факт отсутствия компенсаторного роста заболеваемости ХГС, характерного в целом для ДФО. В 2024 году показатель заболеваемости ХГС составил 14,24 на 100 тыс. населения, был выше показателя 2023 г. на 27,5 %, но оставался ниже среднероссийского (34,71) и ниже аналогичного показателя по ДФО (31,68) на 59,0 % и 55,1 % соответственно (Рис. 1). Заболеваемость ХГС среди детей 17 лет и младше в Магаданской области носила спорадический характер (1 случай в 2014 г., 1 случай в 2016 г., 1 случай в 2017 г.), и начиная с 2018 г. случаев инфекции среди детского населения не регистрировалось вовсе.

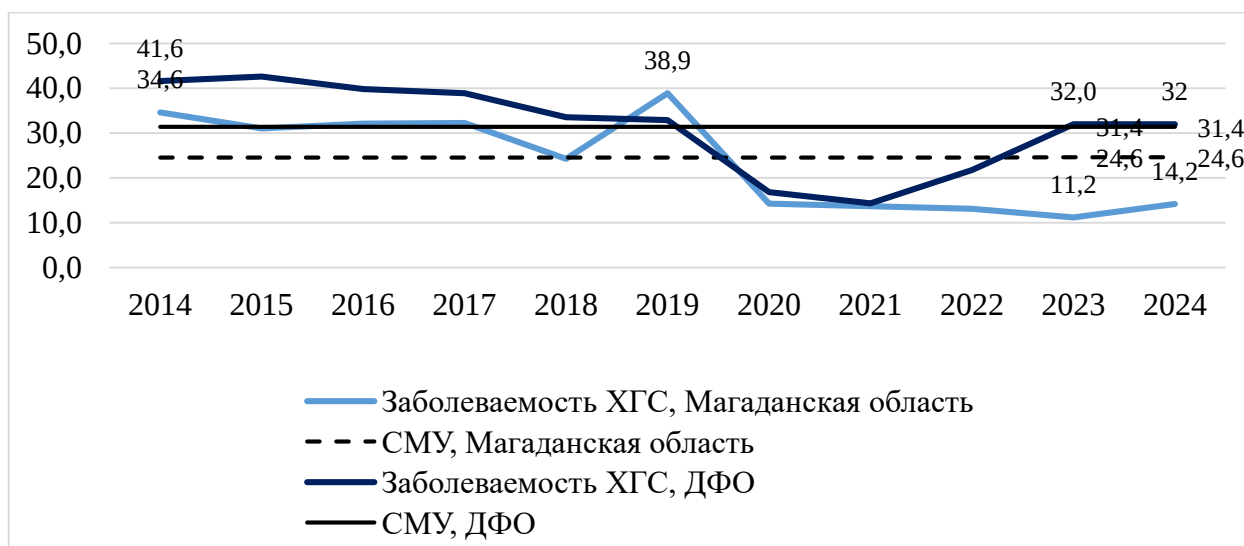


Рис. 1. Заболеваемость ХГС в Магаданской области и ДФО за 2014-2024 гг.
(на 100 тыс. населения)

В ходе проведенного исследования 41 образца плазмы крови от пациентов с диагнозом хронический вирусный гепатит, проживающих на территории Магаданской области, HBsAg был обнаружен в 3 образцах (7,3%; 95% ДИ 1,3-16,7), антитела к вирусному гепатиту С в 36 образцах (87,8%; 95% ДИ 76,4-96,0). Микст-инфекцию ХГВ+ХГС имели 2 (4,9%; 95% ДИ 0,5-13,7) пациента.

ДНК HBV выявлена в 2 из 5 HBsAg-положительных образцов плазмы крови. РНК HCV выявлена в 27 (71,1%; 95% ДИ 55,8-84,1) образцах плазмы крови.

Предварительное генотипирование HCV, проведенное с использованием набора «АмплиСенс -1/2/3» показало, что на территории Магаданской области среди обследованных пациентов наиболее распространен 3 генотип HCV – 55,6% (95% ДИ 37,3-73,9). Генотип 1 HCV обнаружен у 10 пациентов (37,0%; 95% ДИ 20,1-55,7-16,7). В 1 случае выявлен 2 генотип (3,7%) и у 1 пациента (3,7%) - микст-инфекция генотипами 1 и 3.

Низкая вирусная нагрузка в ДНК HBV-положительных образцах не позволила получить нуклеотидные последовательности участка генома HBV для проведения дальнейшего генотипирования. Для 15 РНК HCV-положительных образцов были получены нуклеотидные последовательности 2 участков генома HCV удовлетворительного качества: core и NS5B. Для 3 образцов удалось получить последовательности только области core, и для 5 образцов - области NS5B. Для определения субтипа и изучения генетической связи между исследуемыми штаммами и последовательностями, полу-

ченными из различных регионов и зарегистрированных в GenBank, был проведен филогенетический анализ.

Дерево, полученное в результате филогенетического анализа с использованием 20 проанализированных нуклеотидных последовательностей области NS5B, продемонстрировано на рис. 2. Анализ показал, что 13 образцов принадлежат субтипу 3а, что подтверждается кластеризацией (100% бутстрэп-поддержка) с другими штаммами данного субтипа из Англии, США, России, Австралии, Китая, Франции и Таиланда. При этом 3 полученные последовательности сформировали самостоятельный статистически значимый монофилетический кластер, указывающий на тесную генетическую и возможно эпидемиологическую связь между ними. Можно предположить, что в настоящее время на территории Магаданской области циркулируют как варианты вируса, занесенные в разный временной период из других регионов, так и распространенные только на территории области.

Генетические варианты HCV 1 генотипа распределились на филограмме на 2 группы. В первую группу вошли 2 изолята, выделенные от пациентов, проживающих на территории Магаданской области (1-2, 2-17). Они оказались наиболее близки к последовательностям субтипа 1в, выделенным в разные годы в США, Японии и России.

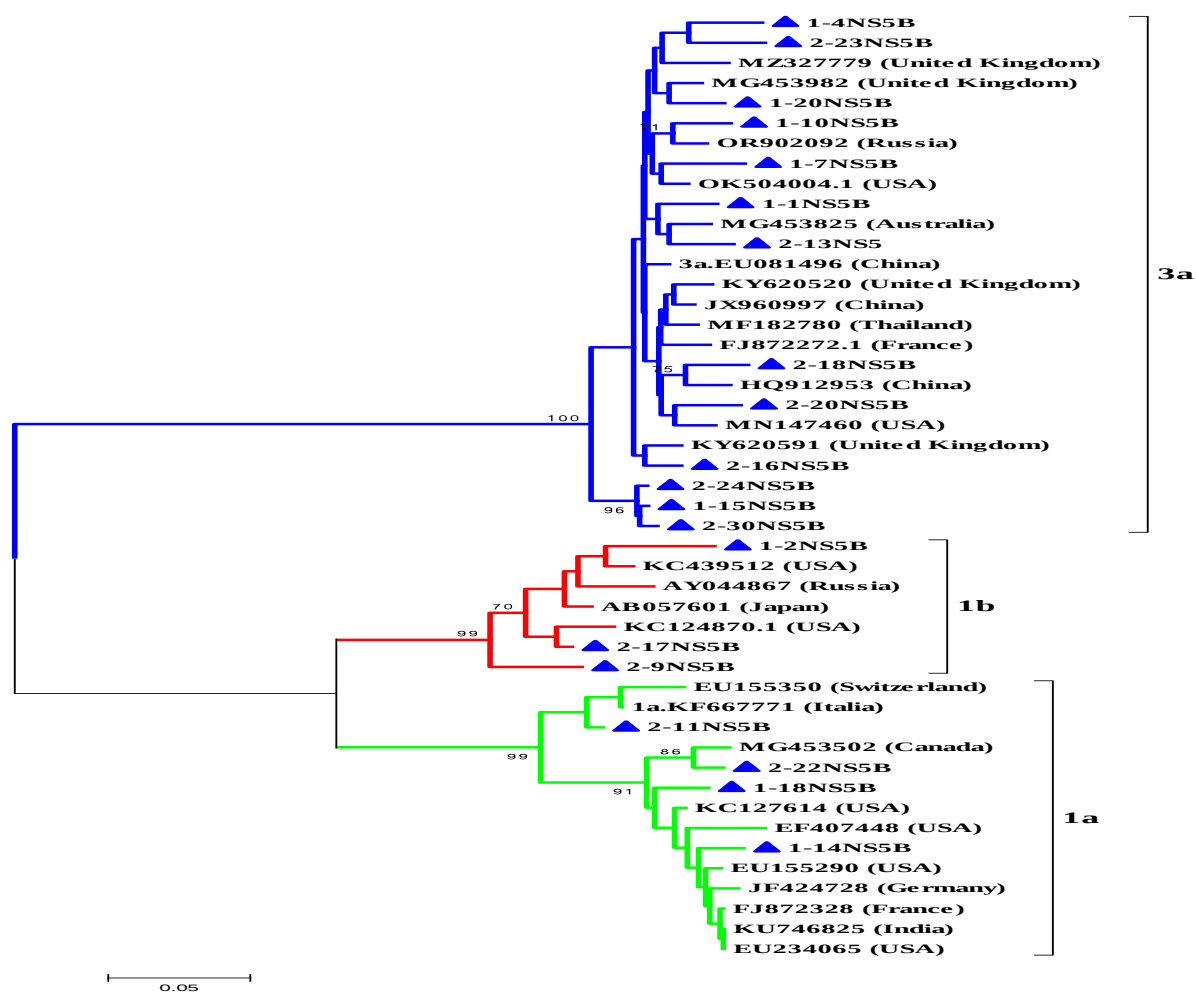


Рис.2. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области NS5B генома HCV, циркулирующего среди населения Магаданской области

Примечание: Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей. Последовательности HBV, изученные в данной работе, выделены синими треугольниками. Референс-последовательности HBV обозначены номерами GenBank, с указанием региона. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70%. (Синие линии - субтип 3а, красные линии – субтип 1b, зеленые линии – субтип 1а)

Второй кластер был сформирован 4 полученными в ходе проводимого исследования нуклеотидными последовательностями и штаммами субтипа 1а из разных регионов, при этом образец № 2-11 был близок к европейским вариантам 1а, которые были выделены в разные годы в Швейцарии и Италии, а 3 образца (№ 2-22, 1-18, 1-14) объединились в кластер со штаммами из США, Канады, Индии, Германии, Франции, что подтверждается значением бутстрэппинга 91 %. Необходимо отметить,

что все 4 образца получены от пациентов, инфицированных в результате внутривенного употребления наркотических препаратов.

При секвенировании и филогенетическом анализе региона NS5B 19 исследуемых штаммов HCV, принадлежащих к 1 и 3 генотипам, практически не было выявлено различий между генотипами, определяемыми с помощью диагностической тест-системы «АмплиСенс -1/2/3», и геномными участками NS5B. Расхождение было обнаружено только в одном образце (№ 2-9), который при генотипировании был отнесен к 2 генотипу, а при филогенетическом анализе области NS5B сгруппировался с изолятами, принадлежавшими субтипу 1в. При филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей региона Core HCV данный образец сформировал монофилетический кластер со штаммами рекомбинантной формы CRF1_2k/1b из России, Франции, Бельгии (рис. 3). Рекомбинантная форма CRF1_2k/1b, впервые обнаруженная в Санкт-Петербурге в 2002 г., является наиболее распространенной в мире [5].

Следует отметить, что в настоящее время клиническими лабораториями для качественного и количественного определения РНК HCV, в т.ч. для рутинного генотипирования, чаще всего применяются диагностические наборы, в которых из-за высокого уровня консервативности и чувствительности в качестве мишени используется только один фрагмент вируса - 5-UTR/core, что является недостаточным для выявления рекомбинантных вариантов. Определение с помощью секвенирования и последующего филогенетического анализа рекомбинантной формы HCV CRF1_2k/1b у больного из Магаданской области подтверждает вышесказанное. Вместе с тем, ошибка при классификации 2 генотипа HCV может негативно повлиять на выбор противовирусных препаратов прямого действия и на результаты проводимого лечения. Установлено, что комбинации противовирусных препаратов, используемых для лечения пациентов, инфицированных данным геновариантом, не позволяют достичь устойчивого вирусологического ответа (УВО) у большинства пациентов, инфицированных рекомбинантным вариантом RF2k/1b [2].

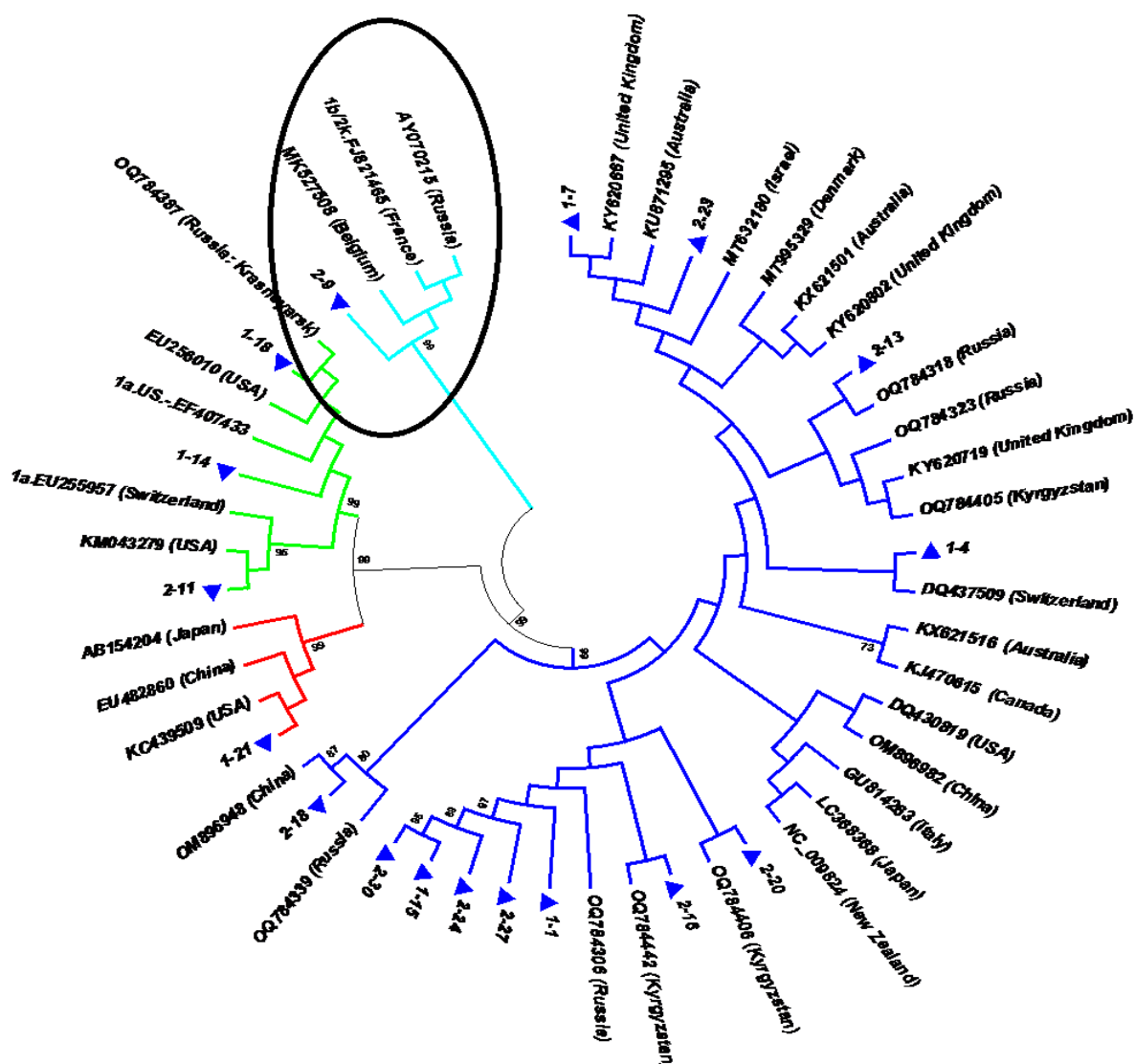


Рис.3. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области core генома HCV, циркулирующего среди населения Магаданской области

Примечание: Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей. Последовательности HBV, изученные в данной работе, выделены синими треугольниками. Референс-последовательности HBV обозначены номерами GenBank, с указанием региона. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70%. (Синие линии - субтип 3а, красные линии – субтип 1b, зеленые линии – субтип 1а, голубые линии – рекомбинантная форма 2k/1b)

Поскольку выбор и продолжительность лечения ВГС во многом зависят от генетического варианта вируса, генотипирование на основе как минимум двух областей генома HCV может помочь в выявлении предполагаемых рекомбинантов/множественных инфекций и улучшить терапевтическое лечение ВГС. Несмотря на то, что рекомбинация при инфицировании HCV встречается редко, необходимо проведение дальнейших исследований.

Таким образом, филогенетический анализ, проведенный для 23 нуклеотидных последовательностей по областям NS5b и core генома HCV жителей Магаданской области, показал следующее итоговое соотношение субтипов: 3а – 15 (65,2%; 95% ДИ 44,8-82,7); 1в – 3 (13,0%; 95% ДИ 2,7-29,4); 1а – 4 (17,4%; 95% ДИ 4,8-34,6); 2k/1b – 1 (4,3%; 95% ДИ 0,04-16,1);

Мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью, среди изолятов вируса гепатита С, полученных из Магаданской области и исследуемых в фрагменте NS5B, обнаружено не было.

Заключение

Установлено, что заболеваемость ХГС в Магаданской области имела общую тенденцию с заболеваемостью ХГС в ДФО, но меньшую интенсивность, особенно на протяжении 2014 - 2018 гг., а также 2022 - 2023 гг. Детское население Магаданской области практически не вовлечено в эпидемический процесс ХГС.

Проведенное молекулярно-генетическое исследование вируса гепатита С среди пациентов Магаданской области показало, что на данной территории циркулируют субтипы 3а, 1а, 1в, с преобладанием субтипа 3а. На территории области зафиксирован 1 случай естественной рекомбинации HCV типа 2k/1b. Филогенетический анализ выявил сходство между исследуемыми изолятами HCV из Магаданской области и изолятами из других стран и регионов РФ, что подтверждает повсеместную международную циркуляцию указанных субтипов вируса.

Несмотря на относительно благополучную ситуацию с ХГС в Магаданской области, чрезвычайно важным является наблюдение за структурой генотипов вируса гепатита С, позволяющее в дальнейшем отследить её стабильность либо нестабильность в изучаемом субъекте. Кроме того, мониторинг циркулирующих в Магаданской области штаммов ВГС и определение генотипического/субтипического состава необходимы на этапе реализации в Российской Федерации программы элиминации гепатита С, осуществляемой с применением эффективной противовирусной терапии, действенность которой зависит от разных генотипов вируса.

Все полученные нуклеотидные последовательности участков генома ВГС-1 депонированы в международную базу GenBank (№ PQ874068-PQ874087).

Литература

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2024 году». https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/fbc/sd3prfszlc9c2r4xbmsb7o3us38nrvpk/Gosudarstvennyy-doklad_O-sostoyanii-sanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-Rossiyskoy-Federatsii-v-2024-godu_.pdf
2. Знойко О.О., Дудина К.Р., Козина А.Н. и др. Диагностическая тактика и рекомендации по лечению больных хроническим гепатитом С, инфицированных генотипом 2 ВГС // *Лечащий врач*. – 2016. – № 2. – С. 66. – EDN VOQYXB.
3. Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В. и др. Лекарственно-резистентные варианты ВГС субтипа 1в, циркулирующие на территории Российской Федерации: анализ аминокислотных мутаций в белках NS5A и Core // *Журнал инфектологии*. – 2018. – Т.10, №4. – С.30-36.
4. Kalaghatgi P., Sikorski A.M., Knops E., Rupp D., Sierra S., Heger E., Neumann-Fraune M., Beggel B., Walker A., Timm J., et al. Geno2pheno[HCV]-A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents // *PLoS ONE*. – 2016. - №11. – P. e0155869. DOI: 10.1371/journal.pone.0155869.
5. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnus L. O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg // *J Virol*. - 2002 Apr. – V. 76, N 8. – P. 4034–4043. DOI: 10.1128/jvi.76.8.4034–4043.2002.
6. 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. - V. 11, N 4. – P. e0153761. DOI:10.1371/journal.pone.0153761.
7. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. -N 30. - P. 2725-2729.DOI: 10.1093/molbev/mst197

Сведения об ответственном авторе:

Котова Валерия Олеговна – заведующая лабораторией эпидемиологии и профилактики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, dvaid@mail.ru
