

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ НАНАЙСКОГО РАЙОНА ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

В.О. Котова¹, Л.А. Балахонцева¹, Е.А. Базыкина¹, О.Е. Троценко¹, В.Н. Бельды², С.Е. Кирдяшова²

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

² КГБУЗ Троицкая центральная районная больница МЗ Хабаровского края, с. Троицкое, Нанайский район, Хабаровский край, Россия

Резюме. 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. Цель исследования — провести анализ генетического разнообразия HCV, циркулирующего среди населения Нанайского района Хабаровского края. **Материалы и методы.** Проведен молекулярно-генетический анализ 124 образцов плазмы крови от пациентов с диагнозом хронический гепатит С (ХГС), проживающих на территории Нанайского района Хабаровского края. **Результаты.** РНК HCV была обнаружена в 84 (67,7±4,2%) образцах плазмы крови. Генотипирование HCV, проведенное с использованием набора «АмплиСенс-1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) показало, что на территории района наиболее распространен 3 генотип вируса — 47,6±5,4% (n = 40). Генотип 1 HCV обнаружен у 30 пациентов (35,7±5,2%). В 13 случаях (15,5±3,9%) выявлен 2 генотип и у 1 пациента (1,2±1,2%) генотип не определился. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b генома HCV, проведенный для 60 РНК HCV-положительных образцов, показал следующее соотношение субтипов: 1a — 2 (3,3±2,3%), 1в — 23 (38,3±6,3%), 2a — 6 (10±3,9%), 2с — 2 (3,3±2,3%), 3a — 27 (45±6,4%). В ходе исследования было выявлено 3 пробы, принадлежащие к рекомбинантной форме вируса RF2k/1b. С целью подтверждения рекомбинации были получены полные нуклеотидные последовательности гена NS2. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости проведения дополнительного комплексного обследования больных хроническими формами гепатита С с применением современных молекулярно-биологических методов для принятия решений об адекватной терапии, учитывая особенности выделенных изолятов. Данные о молекулярно-генетических характеристиках HCV, циркулирующих на отдельных территориях Дальнего Востока, весьма ограничены, и проведенное молекулярно-генетическое исследование дополнит в существующие представления о циркуляции геновариантов HCV на территориях Российской Федерации.

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип, субтип, рекомбинантные формы, хронический гепатит С, филогенетический анализ.

Адрес для переписки:

Котова Валерия Олеговна
680000, Россия, г. Хабаровск, ул. Шевченко, 2,
Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (4212) 46-18-54.
E-mail: kotova.valeriya@mail.ru

Contacts:

Valeriya O. Kotova
680000, Russian Federation, Khabarovsk, Shevchenko str., 2,
Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (4212) 46-18-54.
E-mail: kotova.valeriya@mail.ru

Для цитирования:

Котова В.О., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А., Троценко О.Е., Бельды В.Н., Кирдяшова С.Е. Генетическое разнообразие вируса гепатита С среди населения Нанайского района Хабаровского края // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 148–156. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1265

Citation:

Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Bazykina E.A., Trotsenko O.E., Beldy V.N., Kirdyashova S.E. Genetic diversity of hepatitis C virus in Nanaian region, Khabarovsk territory // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 148–156. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1265

GENETIC DIVERSITY OF HEPATITIS C VIRUS IN NANAIAN REGION, KHABAROVSK TERRITORYKotova V.O.^a, Balakhontseva L.A.^a, Bazykina E.A.^a, Trotsenko O.E.^a, Beldy V.N.^b, Kiryashova S.E.^b^a Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Khabarovsk, Russian Federation^b Troitsk central regional hospital of the Ministry of Healthcare of the Khabarovsk Krai, Troitskoe, Nanaisky region of the Khabarovsk krai, Russian Federation

Abstract. Examining hepatitis C virus (HCV) genetic diversity is of great practical value in molecular-epidemiological research, development of specific prevention tools and outlining therapeutic strategy. Aim of study is to conduct analysis assessing HCV genetic diversity circulating in the Nanaisky Region population of the Khabarovsk Krai. *Materials and methods.* Molecular and genetic analysis of 124 blood plasma samples collected from patients with chronic hepatitis C and residing in the Nanaisky Region was conducted. *Results.* HCV RNA was detected in 84 (67.7±4.2%) plasma samples. HCV genotyping was performed by using AmpliSens — 1/2/3 kit (Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation) showing that genotype 3 dominated reaching up to 47.6±5.4% (n = 40). Genotype 1 was detected in 30 patients (35.7±5.2%). In thirteen cases (15.5±3.9%) genotype 2 was identified, whereas in one case (1.2±1.2%) virus genotype was unidentified. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences in HCV NS5B region was performed for 60 HCV RNA-positive samples showing subtype ratio as follows: 1a — 2 (3.3±2.3%), 1b — 23 (38.3±6.3%), 2a — 6 (10.0±3.9%), 2c — 2 (3.3±2.3%), 3a — 27 (45.0±6.4%). Three samples of RF2k/1b recombinant virus were found. A full NS2 gene nucleotide sequence was cloned in order to confirm the recombination event. The results of the study evidence about a need to conduct multi-layered examination of patients with chronic hepatitis C by using current molecular and biologic methods for assigning proper therapy coupled to characteristics of the isolated strains. The data regarding hepatitis C virus molecular and genetic parameters circulating in the Far Eastern Federal District, Russia, are rather limited. Hence, our study would contribute to current understanding of HCV genovariants circulating in territories of the Russian Federation.

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, от которых ежегодно в мире погибает более 400 000 человек. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), во всем мире вирусом гепатита С поражены 71 млн человек [25].

Вирус гепатита С (HCV) отличается высокой степенью генетической variability, что 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 89 подтвержденных субтипов [10, 13, 22]. Геномы среди генотипов HCV отличаются друг от друга примерно на 30–35%, а различия между субтипами составляют 15–20% [11, 24]. Субтипы включают в себя изоляты, состоящие из квазивидов — совокупности генетически близких вариантов вируса, структурно и антигенно отличающихся

между собой, в пределах одного индивидуума. Генетическая variability квазивидов достигает 1–3% [17].

Для каждого генотипа характерна определенная частота встречаемости и географическая зона распространения. Так, на долю генотипа 1, который имеет 13 субтипов (1a–1o), приходится больше всего случаев заболеваемости ГС в мире — 83,4 млн (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 млн (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% [20]. 2 генотип вируса 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 г. в Канаде у выходцев из штата Пенджаб (Индия) был выявлен 8 генотип вируса [10].

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) [1, 16, 21]. 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 интерфероновую терапию [3].

Изучение распространения генотипов HCV на территориях Российской Федерации проводится с середины 1990-х гг. [4]. По результатам молекулярно-генетических исследований установлено, что на территории Российской Федерации доминируют генотипы 1в и 3а [5, 6, 7, 8]. 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, в отличие от пациентов, инфицированных HCV генотипов 2 и 3 [2].

Проведение молекулярно-генетического мониторинга, включающего анализ территориальной специфики распространения различных генетических вариантов HCV, является важной составной частью системы эпидемиологического надзора за распространением вирусных гепатитов, а также имеет решающее значение для разработки средств специфической профилактики, диагностических тест-систем и совершенствования методов проводимой терапии.

Цель работы — провести анализ генетического разнообразия вируса гепатита С, циркулирующего у коренного населения Нанайского района Хабаровского края.

Материалы и методы

В работе была использована коллекция образцов плазмы/сыворотки крови от 124 пациентов с подозрением на хронический вирусный гепатит С (ХГС), которые в 2017–2018 гг. были направлены врачом-инфекционистом КГБУЗ Троицкая центральная районная больница в лабораторию эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора для проведения исследования. От всех пациентов были получены информированные согласия на участие в исследовании, которое было одобрено Комитетом по этике ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора. Сбор образцов крови был осуществлен на базе КГБУЗ Троицкая центральная районная больница.

Среди обследованных было 69 женщин (55,6±4,5%) и 55 мужчин (44,4±4,5%). Средний возраст пациентов составил 47,4±1,5 лет. Национальный состав исследуемой группы был следующим: 66,1% (n = 82) — русские, 30,6% (n = 38) — нанайцы, 1,6% (n = 2) — удэгейцы. Среди обследованных была 1 иранка (0,8%) и 1 ульчанка (0,8%).

Все образцы сывороток крови были 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 генотипа 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» и «АмплиСенс-1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) с использованием прибора Rotor Gene Q (Qiagen, Германия), согласно инструкциям производителя. Обратную транскрипцию для получения кДНК проводили с применением коммерческого набора Реверта-L (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Для 60 РНК HCV-положительных образцов с целью получения нуклеотидных последова-

Таблица. Праймеры, используемые для амплификации фрагмента NS5b генома ВГС

Table. Primers used during the amplification of the HCV NS5b fragment of the genome

№	Последовательность (5'→3') Sequence (5'→3')	Направление Direction	Положение в геноме Position in the genome
1	TATGAYACCCGCTGYTTTGGAC	Прямой	8256–8275
	GARTACCTRGTCATAGCCTC	Обратный	8622–8641
2	CTGYTTTGACTCMACRGTCAAC	Прямой	8267–8287
	ATAGCCTCCGTGAAGRCTC	Обратный	8611–8630

тельностью фрагмента области NS5b генома HCV была проведена двухступенчатая ПЦР со специфическими праймерами (Синтол, Россия) к данному участку генома, взятыми из литературных источников.

Условия для обоих раундов ПЦР были следующими: 95°C — 2 мин, затем 30 циклов: денатурация при 95°C — 30 с, отжиг при 60°C — 30 с 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 амплификации области гена NS2 были выбраны пары праймеров для первого раунда: 5'-CAAATGGGAATGGGTGGTCCTCCTGTTTCTRCTCCTYGCG и 5'-CCACCCCTGCCCTTCAAGGCTATCGGCYGGSCCCAG; второго раунда: 5'-ACTCCTTGCGGACGCCAGAGTCTGCGCGTGCTTGTGGATG и 5'-CCGGCCCAGAAATATCTCCCTCCCCCTTCGGGCGGAGAC [8]. Использовали следующие условия ПЦР для амплификации фрагмента гена NS2: 1-й раунд: 95°C — 30 с, 60°C — 30 с, 72°C — 45 с, 30 циклов; 2-й раунд: 95°C — 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 30 с, 30 циклов. Полученный в ходе ПЦР продукт величиной 760 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 (Applied Biosystems/Life Technologies, 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 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6.0, путем построения филогенетических деревьев методом «ближайших соседей» (neighbor-joining) [23]. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. Для оценки статистической достоверности филогенетических связей использовали бутстрэп (bootstrap) анализ для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева.

Для определения предполагаемой точки рекомбинации нуклеотидные последовательности исследовали методом Bootscan-анализа с применением программы SimPlot.

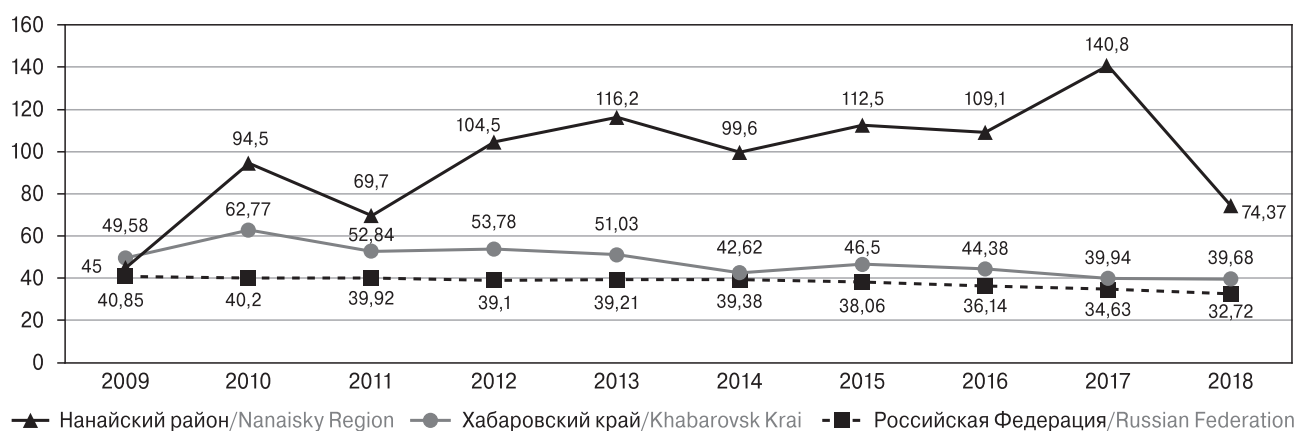
**Рисунок 1. Динамика заболеваемости хроническим вирусным гепатитом С в РФ, Хабаровском крае и Нанайском районе в 2009–2018 гг. (на 100 тыс. населения)**

Figure 1. Chronic viral hepatitis C incidence dynamics in the Russian Federation, Khabarovsk Krai and Nanaisky Region during 2009–2018 years (per 100 000 general population)

Результаты

Нанайский район является административно-территориальным районом Хабаровского края. Численность населения района по состоянию на 01.01.2018 составляла 15 962 человека, из них 4752 — представители коренных малочисленных народов Севера.

На протяжении почти всего анализируемого 10-летнего периода (2009–2018 гг.) заболеваемость ХГС в районе была выше, чем в целом по стране и в среднем по Хабаровскому краю (рис. 1). За последние два года наблюдения показатели заболеваемости ХГС превысили уровни Хабаровского края в 3,6 и 1,9 раза, среднефедеральные уровни — в 4,1 и 2,3 раза соответственно в 2017 и 2018 гг.

Во всех исследуемых пробах были выявлены антитела к вирусному гепатиту С: анти-ВГС (IgG+IgM). Анти-ВГС IgM были обнаружены у 51 пациента (41,1±4,4%).

РНК HCV была выявлена в 84 (67,7±4,2%) образцах плазмы крови. Во всех РНК-положительных пробах был определен уровень вирусной нагрузки. У 35 (41,7±5,4%) пациентов он был низкий (менее 8×10^5 МЕ/мл), у 49 (58,3±5,4%) — высокий (более 8×10^5 МЕ/мл). Генотипирование, проведенное с использованием набора «АмплиСенс-1/2/3», показало, что на территории района наиболее распространен HCV Гт3 — 47,6±5,4% (в 40 из 84 РНК-HCV-положительных проб). HCV Гт1 обнаружен у 30 пациентов (35,7±5,2%). В 13 случаях (15,5±3,9%) выявлен HCV Гт2 и у 1 пациента (1,2±1,2%) генотип определить не удалось по причине низкой вирусной нагрузки (рис. 2).

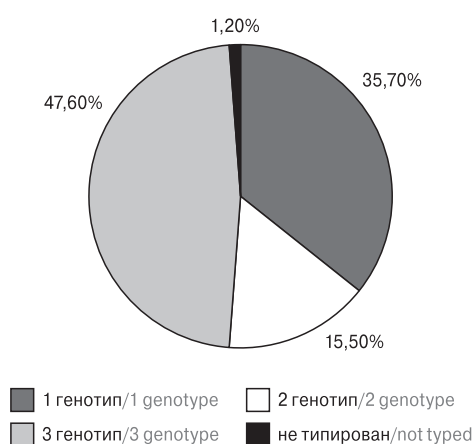


Рисунок 2. Распределение различных вариантов генотипов ВГС у больных хроническим гепатитом С в Нанайском районе Хабаровского края (n = 84)

Figure 2. HCV genotypes distribution among patients with chronic hepatitis C in the Nanaisky Region of the Khabarovsk Krai (n = 84)

В ходе проведенного исследования различий в структуре циркулирующих геновариантов и субтипов HCV среди этнических групп (коренных народностей Крайнего Севера и пришлое русскоязычного населения) обнаружить не удалось.

Для установления генетических взаимоотношений между отдельными образцами и возможного родства вариантов HCV, циркулирующих на исследуемой территории, с изолятами из других регионов Российской Федерации и стран ближнего и дальнего зарубежья, были получены и изучены нуклеотидные последовательности области NS5b генома (РНК зависящая РНК полимеразы) от 60 пациентов с диагнозом ХГС. Данный регион генома используется многими исследователями для уточнения взаимосвязи между отдельными изолятами ВГС. В качестве референс-штаммов для анализа использовали последовательности той же области генома HCV, полученные в России и других странах мира и представленные в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b генома HCV, проведенный для 60 исследованных образцов, показал следующее соотношение субтипов: 1a — 2 (3,3±2,3%), 1b — 23 (38,3±6,3%), 2a — 6 (10±3,9%), 2c — 2 (3,3±2,3%), 3a — 27 (45±6,4%). Филогенетические отношения между исследованными образцами и референсными последовательностями представлены на рис. 3.

На филогенетическом дереве 2 образца 1 генотипа (2031, 4794) оказались идентичными между собой и с высоким уровнем bootstrap-поддержки (99%) образовали единый кластер с изолятами, принадлежавшими 1a субтипу из США (EF407457, где данный геновариант является эндемичным) и Италии (KF667809), выделенными соответственно в 2007 и 2012 гг., а также с образцом из Санкт-Петербурга (AF388435.1).

Исследуемые нами штаммы геноварианта 1b на филогенетическом дереве не сформировали отдельных кластеров, а равномерно распределились между штаммами HCV данного субтипа, представленными в международной базе данных GenBank из России (Республика Саха — Якутия, Новосибирская область, Санкт-Петербург) и стран ближнего и дальнего зарубежья (Узбекистан, Таджикистан, Греция, США, Германия, Италия, Китай, Бразилия). Можно предположить, что варианты 1b субтипа распространялись на территории Нанайского района преимущественно независимыми путями, что подтверждается отсутствием крупных кластеров.

Филогенетический анализ 27 образцов, отнесенных по результатам генотипирования к генотипу 3, показал, что все полученные нами нуклеотидные последовательности кластери-

зуются на одной ветви филогенетического дерева с ранее полученными последовательностями той же области генома вариантов субтипа 3a, выделенными в разные годы в различных регионах Российской Федерации и мира. Для популяции HCV субтипа 3a, циркулирующей на изучаемой нами территории, характерными оказались высокая генетическая гомогенность и отсутствие выраженной кластеризации по какому-либо признаку.

Филогенетический анализ 8 образцов, отнесенных по результатам предварительного генотипирования к генотипу 2, выявил формирование двух кластеров. Один из них был сформиро-

ван 6 полученными в настоящем исследовании нуклеотидными последовательностями (образцы № 2814, 1839, 3114, 2778, 4791, 2779) и генетически близкими последовательностями субтипа 2a HCV, зарегистрированными в GenBank, которые были выделены на территории Новосибирской области в 2002 г. (GQ389001.1), в Республике Саха (Якутия) (КТ 378626.1) в 2014 г., в Ленинградской области (AF388438.1) в 2014 г., а также во Франции (MG453401.1) в 2014 г. Два штамма (образцы № 4121, 4674) сгруппировались на филогенетическом дереве, образуя еще один общий кластер с изолятами HCV Гт 2с из Новосибирской области, Германии и Аргентины.

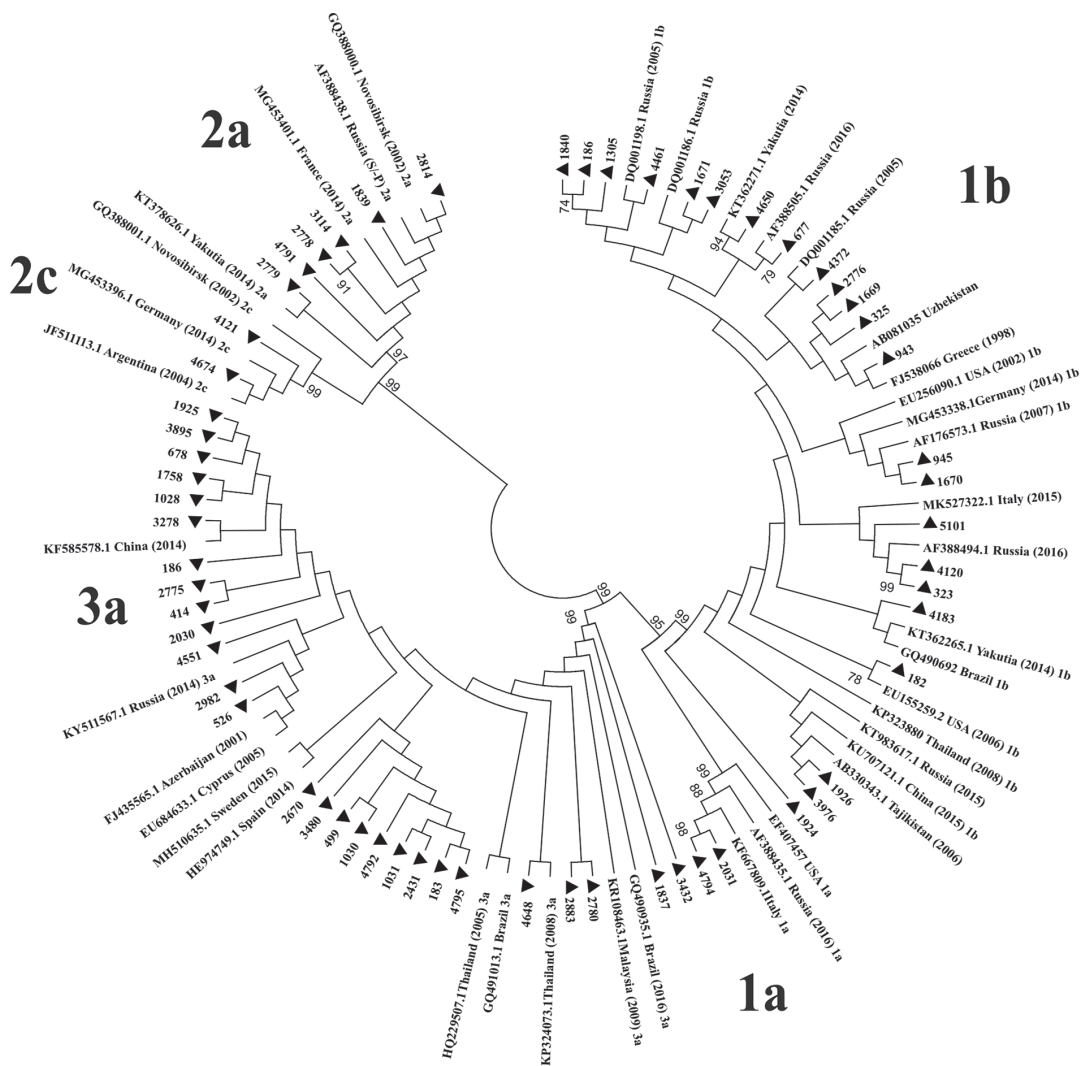


Рисунок 3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b HCV, циркулирующих среди населения Нанайского района Хабаровского края, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референтными последовательностями
 Figure 3. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the NS5B HCV region circulation among population of the Nanaisky Region of the Khabarovsk Krai compared to reference sequences presented in the international database GenBank

Примечание. Филогенетическое дерево построено по алгоритму neighbour-joining. Последовательности HCV, изученные в данной работе, выделены треугольниками. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70%.
 Note. The phylogenetic tree was constructed with the neighbour-joining algorithm. HCV sequences investigated in the current work are presented as triangles. The indicated bootstrap values are 70% of higher.

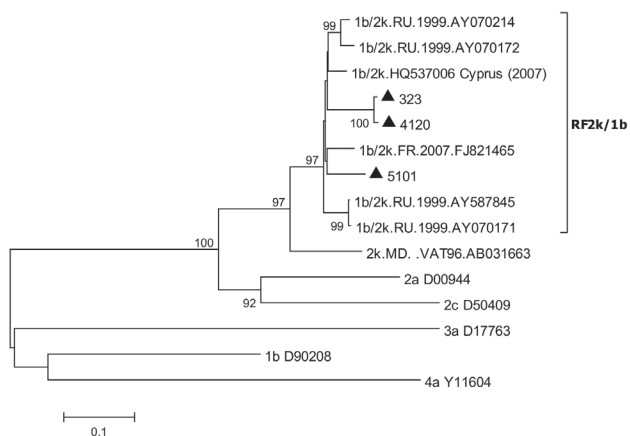


Рисунок 4. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей региона NS2 генома HCV рекомбинантных вариантов RF2k/1b, выделенных от пациентов с ХГС, проживающих на территории Нанайского района Хабаровского края, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями

Figure 4. Phylogenetic tree of the nucleotide sequences of the NS2 HCV region of the RF2k/1b recombinant variants isolated from patients with chronic viral hepatitis C and residing in the Nanaisky Region of the Khabarovsk Krai, compared to reference sequences presented in the international database GenBank

Примечание. Филогенетическое дерево построено по алгоритму neighbour-joining. Последовательности HCV, изученные в данной работе, выделены треугольниками. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70%. Note. The phylogenetic tree was constructed with the neighbour-joining algorithm. HCV sequences investigated in the current work are presented as triangles. The indicated bootstrap values are 70% of higher.

Анализ трех исследуемых нами образцов (4120, 323, 5101), проведенный с использованием тест-системы «АмплиСенс-1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), показал их принадлежность к субтипу 2, а при филогенетическом анализе фрагмента области NS5b генома HCV данные пробы группировались в кластер, сформированный изолятами 1b субтипа. Полученные результаты позволили предположить наличие рекомбинантного геноварианта CRF01_2k1b у обследованных пациентов Нанайского района.

С целью подтверждения рекомбинации субтипов 2k/1b для изолятов 323, 4120 и 5101 была определена полная нуклеотидная последовательность гена NS2, где по данным литературы могут располагаться точки рекомбинации [14]. Размер секвенированного фрагмента составил 760 н.о. Результаты проведенного нами анали-

за с использованием метода Bootscan-анализа подтвердили наличие точки перекреста для всех трех образцов.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей региона NS2 HCV показал высокую степень гомологии между рекомбинантными изолятами ВГС RF2k/1b, полученными в ходе настоящего исследования от русскоговорящих жителей Нанайского района, и ранее выявленными изолятами в Санкт-Петербурге, Франции и на Кипре [12, 15, 18] (рис. 4).

Нуклеотидные последовательности образцов 323 и 4120 достоверно сгруппировались на филогенетическом дереве, образуя общий кластер, что свидетельствует о высокой генетической близости исследуемых образцов, не исключающей эпидемиологической связи между ними. Анализ эпидемиологических данных показал, что пациент (323) являлся в прошлом потребителем инъекционных наркотиков, а предполагаемый путь инфицирования пациентки (4120) — половой от супруга, который также употреблял внутривенно наркотические препараты. Пациентка (5101), у которой была обнаружена рекомбинантная форма RF2k/1b, имела в анамнезе многочисленные оперативные вмешательства и ранее проживала в Грузии, где распространенность этого варианта достаточно высока [1].

Рутинные методы генотипирования, используемые в настоящее время в клинических лабораториях, не позволяют определять рекомбинантные варианты вируса, поскольку в коммерческих тест-системах для идентификации генотипов в качестве мишени используется только один фрагмент вируса 5'UTR/core. Этого недостаточно для определения рекомбинантных форм [1].

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения дополнительного обследования больных хроническими формами ГС с применением молекулярно-биологических методов для принятия решений об адекватной терапии, учитывая особенности выделенных изолятов.

Заключение

Впервые проведенное молекулярно-генетическое исследование вируса гепатита С, циркулирующего на территории Нанайского района Хабаровского края, показало, что среди обследованных пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» циркулируют субтипы: 1a, 1b, 2a, 2c 3a, с преобладанием 3a. Кроме того, на территории района зафиксировано 3 случая естественной рекомбинации HCV типа 2k/1b. Полученные нуклеотидные последовательности гена NS2 депонированы в базу данных GenBank под номерами MN366020-MN366022.

Проведение молекулярно-генетического мониторинга за циркулирующими на каждой отдельной территории генотипами/субтипами вируса имеет не только клиническое значение, но и играет важную роль в решении вопросов эпидемиологического надзора за вирусным гепатитом С.

Полученные результаты молекулярно-генетического исследования внесут значительное

дополнение в существующие представления о циркуляции геновариантов HCV на территориях Российской Федерации.

Для установления региональных особенностей и получения полной картины генетической структуры изолятов HCV, циркулирующих на территории Хабаровского края, необходимо проведение регулярного молекулярно-генетического мониторинга.

Список литературы/References

1. 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. [Demytyeva N.Ye., Kalinina O.V., Znoyko O.O., Belyakov N.A., Zhebrun A.B. The circulating recombinant form RF2k/1b of hepatitis C virus: problems in diagnostics and therapy. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 42–52. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2016-8-1-42-52
2. 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. [Kravchenko A.V., Kuimova U.A., Gankina N.Yu., Kanestri V.G., Chulanov V.P. Predictors of sustained virologic response in therapy of chronic hepatitis with pegylated interferon and ribavirin in patients with HIV infection. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2014, vol. 12, no. 2, pp. 30–34. (In Russ.)]
3. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов. М.: Икар, 2013. 336 с. [Kuregyan K.K., Mikhailov M.I. Molecular biological basis of viral hepatitis control. Moscow: Ikar, 2013. 336 p. (In Russ.)]
4. 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. [Lvov D.K., Samokhvalov E.I., Mishiro S., Tsuda F., Selivanov N.A., Okamoto H. Regularities in the spread of hepatitis C virus and its genotypes in Russian and countries within the former USSR. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1997, no. 4, pp. 157–161. (In Russ.)]
5. 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. [Mukomolov S.L., Levakova L.G., Sulyagina E.V., Sinayskaya E.V., Bolsun D.D., Ivanova N.V. Current epidemiology of hepatitis C in Russia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktualnie voprosi = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2012, no. 6, pp. 21–25. (In Russ.)]
6. 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. [Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Gerasimova V.V., Bichurina M.A., Kozlov A.V., Mukomolov S.L., Totolian A.A. Molecular epidemiology features of hepatitis C virus isolates from different regions of the republic Sakha (Yakutia). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 359–372. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-359-372
7. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клущкина 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. [Soboleva N.V., Karlsen A.A., Kozhanova T.V., Kichatova V.S., Klushkina V.B., Isaeva O.V., Ignatieva M.E., Romanenko V.V., Oorzhak N.D., Malinnikova E.Yu., Kuregyan K.K., Mikhailov M.I. The prevalence of the hepatitis C virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation. *Zhurnal infekologii = Journal of Infectology*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 56–64. (In Russ.)]
8. Чуб Е.В., Кочнева Г.В., Гранитов В.М., Нетесов С.В. Рекомбинанты вируса гепатита С типа 2k/1b у населения Алтайского края // Инфекционные болезни. 2007. Т. 5, № 4. С. 5–11. [Chub E.V., Kochneva G.V., Granitov V.M., Netesov S.V. Recombinants of hepatitis C virus type 2k/1b in the population of the Altai region. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2007, vol. 5, no. 4, pp. 5–11. (In Russ.)]
9. Чуланов В.П., Пименов Н.Н., Мамонова Н.А., Сагалова О.И., Шестакова И.В., Покровский В.И. Хронический гепатит С как проблема здравоохранения России сегодня и завтра // Терапевтический архив. 2015. № 11. С. 5–10. [Chulanov V.P., Pimenov N.N., Mamonova N.A., Sagalova O.I., Shestakova I.V., Pokrovsky V.I. Chronic hepatitis C in Russia: current challenges and prospects. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic archive*, 2015, no. 11, pp. 5–10. (In Russ.)]
10. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., Subramanian M.G., McHutchison J.G., Mo H., Svarovskaia E., Shafraan S.D. 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. 218, no. 11, pp. 1722–1729. doi: 10.1093/infdis/jiy401
11. 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. 65, no. 1, pp. S2–S21. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.035
12. Demetriou V.L., Kyriakou E., Kostrikis L.G. Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates. *Adv. Virol.*, 2011: 710438, 7 p. doi: 10.1155/2011/710438
13. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2019. URL: <https://talk.ictvonline.org> (30.05.2019)
14. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, no. 8, pp. 4034–4043. doi: 10.1128/jvi.76.8.4034-4043.2002

15. Kalinina O., Norder H., Magnius 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. 85, no. 7, pp. 1853–1857. doi: 10.1099/vir.0.79984-0
16. Kuiken C., Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol. Biol.*, 2009, no. 510, pp. 33–53. doi: 10.1007/978-1-59745-394-3_4
17. Messina J., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 77–87. doi: 10.1002/hep.27259
18. Morel V., Descamps V., François C., Fournier C., Brochet E., Capron D., Duverlie G., Castelain S. Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed hepatitis C infection: a case report. *J. Clin. Virol.*, 2010, vol. 47, no. 4, pp. 382–386. doi: 10.1016/j.jcv.2010.01.011
19. Rajhi M., Ghedira K., Chouikha A., Djebbi A., Cheikh I., Ben Yahia A., Sadraoui A., Hammami W., Azouz M., Ben Mami N., Triki H. Phylogenetic analysis and epidemic history of hepatitis C virus genotype 2 in Tunisia, North Africa. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 4: e0153761. doi: 10.1371/journal.pone.0153761
20. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J. Gen. Virol.*, 2004, vol. 85, no. 11, pp. 3173–3188. doi: 10.1099/vir.0.80401-0
21. Simmonds P., Bukh J., Combet C., Deléage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon P., Inchauspé G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D.G., Okamoto H., Pawlowsky J.M., Penin F., Sablon E., Shin-I T., Stuyver L.J., Thiel H.J., Viazov S., Weiner A.J., Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2005, vol. 42, no. 4, pp. 962–973. doi: 10.1002/hep.20819
22. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T., Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 318–327. doi: 10.1002/hep.26744
23. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
24. Thong V.D., Akkarathamrongsin S., Poovorawan K. Hepatitis C virus genotype 6: virology, epidemiology, genetic variation and clinical implication. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 2927–2940. doi: 10.3748/wjg.v20.i11.2927
25. WHO. Global hepatitis report, 2017. Geneva: WHO, 2017. 83 p. URL: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en> (15.05.2019)

Авторы:

Котова В.О., старший научный сотрудник, зав. лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа, Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Балахонцева Л.А., руководитель Дальневосточного окружного центра по профилактике и борьбе со СПИДом, Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Базыкина Е.А., младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа, Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Троценко О.Е., д.м.н., директор Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Бельды В.Н., врач-инфекционист, КГБУЗ «Троицкая центральная районная больница», г. Хабаровск, Россия;

Кирдяшова С.Е., главный врач КГБУЗ «Троицкая центральная районная больница», г. Хабаровск, Россия.

Authors:

Kotova V.O., Senior Researcher, Head of the Laboratory of Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Balakhontseva L.A., Head of the Far Eastern Regional Center on Prevention and Combat Against AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Bazykina E.A., Junior Researcher, Laboratory of Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Trotsenko O.E., PhD, MD (Medicine), Head of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Beldy V.N., Infectologist, Troitsk Central Regional Hospital, Khabarovsk, Russian Federation;

Kirdyashova S.E., Head Physician of the Troitsk Central Regional Hospital, Khabarovsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.09.2019
Отправлена на доработку 09.05.2020
Принята к печати 03.06.2020

Received 02.09.2019
Revision received 09.05.2020
Accepted 03.06.2020