

МУТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ



Д.Э. Рейнгардт¹, Ю.В. Останкова¹, Е.В. Ануфриева¹, А.В. Семенов², Л.В. Лялина^{1,3},
А.А. Тотолян^{1,4}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора,
г. Екатеринбург, Россия

³ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью нашей работы была оценка распространенности мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С в генах *NS5A*, *NS5B*, *NS3* у ВИЧ-инфицированных лиц. Материалом исследования служили 157 образцов плазмы крови пациентов с ВИЧ, проживающих на территории Ленинградской области, с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии. Образцы обследовали на наличие анти-НСV-антител и РНК ВГС с помощью коммерческих тест-систем в соответствии с рекомендациями производителя. В случае выявления РНК ВГС осуществляли амплификацию с использованием комплекта праймеров, совместно фланкирующих гены *NS3*, *NS5A*, *NS5B*. После секвенирования нуклеотидных последовательностей указанных генов определяли субтип вируса. Для определения наличия мутаций лекарственной устойчивости ВГС к препаратам прямого противовирусного действия (ПППД) использовали программное обеспечение Geno2pheno HCV resistance (<https://hcv.geno2pheno.org>). Возраст пациентов варьировал от 18 до 65 и составил в среднем 34,3±7,27 лет. Количество мужчин в группе превосходило количество женщин — 71 и 28% соответственно. Антитела к ВГС были выявлены у 94,2% ВИЧ-инфицированных лиц. РНК ВГС выявили у 98 (61,7%) пациентов. Распределение генотипов ВГС в данной группе было следующим: 1a — 7% (n = 7), 1b — 53% (n = 52), 2 — 2% (n = 2), 3a — 38% (n = 37). Результаты определения вирусной нагрузки варьировали от 5,3 × 10³ до 2,3 × 10⁸ МЕ/мл. Нуклеотидная последовательность всех трех участков NS3, NS5A, NS5B определена в 73 образцах. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS3 проводили для 82 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 46), 3a (n = 31), 1a (n = 4), 2 (n = 1). В общей сложности доля штаммов, содержащих мутации в регионе NS3, составила 9,8%. Наличие значимых аминокислотных замен в регионе NS5A проверяли для 83 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 47), 3a (n = 30), 1a (n = 6). Процентное количество штаммов, содержащих мутации в регионе NS5A, составило 19,3%. Анализ мутаций резистентности в регионе NS5B проводили для 87 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 48), 3a (n = 32), 2 (n = 2), 1a (n = 5). Доля штаммов, содержащих мутаций в регионе NS5B, составила 11,5%. В исследуемой нами группе мутации, ассоциированные с устойчивостью вируса гепатита С к ПППД во всех регионах, были обнаружены в 16,6% (95% ДИ: 11,11–23,32%) случаев (n = 26). В регионе NS3 — 6 значимых аминокислотных замен, в регионах NS5A и NS5B — 15 и 10 значимых аминокислотных замен соответственно.

Ключевые слова: вирус гепатита С, коинфекция ВИЧ+ВГС, мутации лекарственной устойчивости, секвенирование, препараты прямого противовирусного действия, генотип.

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 353-81-73.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Contacts:

Yuliiia V. Ostankova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 353-81-73.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Для цитирования:

Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Ануфриева Е.В., Семенов А.В.,
Лялина Л.В., Тотолян А.А. Мутации лекарственной устойчивости вируса
гепатита С у ВИЧ-инфицированных лиц // Инфекция и иммунитет. 2024.
Т. 14, № 1. С. 86–94. doi: 10.15789/2220-7619-HDR-16597

Citation:

Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Anufrieva E.V., Semenov A.V., Lyalina L.V.,
Totolian A.A. HCV drug resistance mutations in HIV-infected patients //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024,
vol. 14, no. 1, pp. 86–94. doi: 10.15789/2220-7619-HDR-16597

HCV DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN HIV-INFECTED PATIENTS

Reingardt D.E.^a, Ostankova Yu.V.^a, Anufrieva E.V.^a, Semenov A.V.^b, Lyalina L.V.^{a,c}, Totolian A.A.^{a,d}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Federal Research Institute of Viral Infections "Virom", Ekaterinburg, Russian Federation

^c I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^d Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of our work was to assess prevalence in the HCV drug resistance mutations in the *NS3*, *NS5A*, *NS5B* genes in HIV-infected patients. The material of the study was 157 blood plasma samples collected from HIV patients living in the Leningrad Region, with virological inefficiency of antiretroviral therapy. Samples were examined for the presence of anti-HCV antibodies and HCV RNA using commercial test systems in accordance with the manufacturer's recommendations. In the case of detecting HCV RNA, amplification reaction was carried out using a set of primers co-flanking the *NS3*, *NS5A*, and *NS5B* genes. After sequencing the nucleotide sequences of the above genes, the virus subtype was determined. To assess HCV drug resistance mutations to direct-acting antiviral agents (DAAs), the Geno2pheno HCV resistance software (<https://hcv.geno2pheno.org>) was used. The age of the patients varied from 18 to 65 and averaged 34.3 ± 7.27 years. The number of males vs females prevailed comprising 71% and 28%, respectively. Antibodies against HCV were detected in 94.2% cases, whereas HCV RNA — in 98 (61.7%) HIV-infected persons. The distribution of HCV genotypes in this group was as follows: 1a — 7% (n = 7), 1b — 53% (n = 52), 2 — 2% (n = 2), 3a — 38% (n = 37). The results of determining the viral load varied from 5.3×10^3 to 2.3×10^8 IU/ml. The nucleotide sequence of all three regions NS3, NS5A, NS5B was determined in 73 samples. Analysis of drug resistance mutations in the NS3 region was performed for 82 HCV isolates of genotypes 1b (n = 46), 3a (n = 31), 1a (n = 4), 2 (n = 1). In total, the proportion of strains containing mutations in the NS3 region was 9.8%. The presence of significant amino acid substitutions in the NS5A region was tested for 83 HCV isolates of genotypes 1b (n = 47), 3a (n = 30), 1a (n = 6). The percentage of strains containing mutations in the NS5A region was 19.3%. Resistance mutations in the NS5B region were analysed for 87 HCV isolates of genotypes 1b (n = 48), 3a (n = 32), 2 (n = 2), 1a (n = 5). The proportion of strains containing mutations in the NS5B region was 11.5%. In the study group, mutations associated with hepatitis C virus resistance to DAAs in all regions were found in 16.6% (95% CI: 11.11–23.32%) cases (n = 26). In the NS3, NS5A and NS5B, there have been identified 6, 15 and 10 significant amino acid substitutions, respectively.

Key words: hepatitis C virus, coinfection HIV+HCV, drug resistance mutations, sequencing, direct-acting antiviral agents, genotype.

Введение

Согласно данным ВОЗ, более 50 млн человек в мире заражены вирусом гепатита С (ВГС), при этом ежегодный прирост инфицированных лиц составляет около 1,5 млн человек. Таким образом, ВГС продолжает оставаться одной из глобальных проблем здравоохранения [17].

Заражение ВГС может приводить как к острой форме заболевания печени, так и к хронической, однако острая стадия заболевания, как правило, не манифестирует в виде характерных симптомов, либо последние отсутствуют вовсе [2]. У 15–45% пациентов наблюдается спонтанная элиминация вируса из организма в течение 6 месяцев. Вместе с тем у 55–85% пациентов может развиваться хронический гепатит С (ХГС) с дальнейшей прогрессией в цирроз печени, гепатоцеллюлярную карциному или печеночную недостаточность [7].

Различают восемь основных генотипов ВГС и более 60 субтипов. Относительно нуклеотидных последовательностей полных геномов, генетическое разнообразие между генотипами ВГС составляет около 30%, а различие между субтипами — 15% [4]. Глобальное распространение каждого генотипа ВГС географически детерминировано. Генотип 1 является наиболее часто встречаемым во всем мире и имеет широкое географическое

распространение, составляя 46% всех инфекций ВГС. Генотип 3 является вторым наиболее распространенным генотипом, на него приходится 30% инфекции, чаще встречается в Южной Азии, Австралии и в некоторых странах Европы [10]. Генотипы ВГС 2 и 4 составляют 9–13% инфекций с более ограниченным географическим распределением. Распространенность ВГС генотипа 2 выше в Азии и Западной Африке, в то время как высокая заболеваемость ВГС генотипа 4 наблюдается в центральной и восточной частях Африки к югу от Сахары, в Северной Африке и на Ближнем Востоке. Генотипы 5, 6 и 7 имеют наиболее ограниченное географическое распространение, при этом генотип 5 встречается в Южной Африке, а генотип 6 — в Восточной и Юго-Восточной Азии, в то время как инфицирование генотипом 7 и 8 было зарегистрировано у небольшого числа лиц из Демократической Республики Конго и из Индии соответственно [9, 10].

Коинфицирование ВГС и ВИЧ (ВГС/ВИЧ) весьма распространено как в России, так и во всем мире. ВГС встречается чаще у ВИЧ-инфицированных людей, чем среди населения в целом. Связано это со сходными путями распространения данных инфекций [12]. Имунные реакции хозяина влияют на генетическое разнообразие ВГС, особенно при коинфекции ВИЧ, и наблюдаются генетические

вариации в структурных генах ВГС, которые могут приводить к возникновению мутаций лекарственной устойчивости в том числе [3].

Во всем мире среди пациентов, инфицированных ВИЧ, распространенность ВГС составляет 72–92% среди потребителей инъекционных наркотических веществ (ПИН), 1–12% среди мужчин, практикующих секс с мужчинами (МСМ), и 9–27% среди гетеросексуалов [3]. В РФ распространенность ВГС-инфекции среди людей, живущих с ВИЧ, составляет около 40%. Основными группами риска являются ПИН (80–90%), пациенты, которым необходимо переливание крови (60–70%), МСМ (7–8%) [5].

До 2011 г. стандартом лечения ХГС являлась комбинация пегилированного интерферона альфа и противовирусного препарата рибавирина (ПЕГ-IFN α /РБВ) в течение 24 или 48 недель, в зависимости от генотипа ВГС. Данная терапия сопровождалась серьезными побочными явлениями, притом что устойчивый вирусологический ответ (УВО) достигался только у 55% больных, инфицированных генотипом 1, тогда как при генотипе 2 и 3 эффективность составляла 80% и более [8]. Революцией в терапии ХГС стала разработка препаратов прямого противовирусного действия (ПППД), направленных на ключевые белки вируса: протеазу NS3, полимеразу NS5B и белок NS5A.

Благодаря появлению безинтерфероновых схем терапии, значительно увеличилась частота достижения УВО (более 90%), сократилась продолжительность курса (до 12 недель), снизилось количество побочных явлений и режим приема препарата стал более удобен для пациентов (возможность приема лекарственных средств перорально 1 раз в сутки) [6].

Однако наличие точечных мутаций из-за отсутствия корректирующей способности у РНК-зависимой РНК-полимеразы является основным элементом, способствующим высокой генетической изменчивости ВГС и, как следствие, предрасполагающим к появлению устойчивых к лекарственным препаратам геновариантов [11]. Данный феномен приводит к отсутствию УВО в условиях лечения ПППД или же к возникновению вирусологического прорыва во время терапии.

Целью нашей работы была оценка распространенности мутаций лекарственной устойчивости ВГС в генах NS3, NS5A, NS5B у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы

В работе использована плазма крови 157 пациентов с ВИЧ-инфекцией, проживающих на территории Ленинградской области, с вирусологической неэффективностью антиретровирусной

терапии (АРВТ). Исследование одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург).

Исследование образцов на наличие серологических маркеров ВГС заключалось в качественном определении суммарных антител анти-НСV с использованием коммерческих наборов «Бест анти-ВГС» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и «ИФА-АНТИ-НСV» (НПО «Диагностические системы», Россия) в соответствии с рекомендациями производителей.

Для выявления наличия РНК ВГС использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с помощью коммерческого набора «АмплиСенс НCV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Вирусную нагрузку ВГС и ВИЧ определяли с использованием коммерческих наборов производства ФБУН ЦНИИЭ (Россия) «АмплиСенс НCV-Монитор-FL» и «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» соответственно согласно инструкциям производителя. Генотип ВГС определяли с использованием коммерческого набора производства ФБУН ЦНИИЭ (Россия) «АмплиСенс НCV-генотип-FL».

Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора реагентов «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя. Реакцию останавливали нагреванием в течение 5 мин при температуре 70°C. Далее осуществляли амплификацию с использованием комплекта праймеров, совместно фланкирующих гены NS3, NS5A, NS5B ВГС.

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 3–30 пМ каждого олигопраймера для каждого генотипа, 0,8–1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 5,8 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США), буфер для Taq ДНК-полимеразы, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл. Амплификацию в общем виде проводили при данных условиях: после денатурации при температуре 95°C в течение 15 мин устанавливали 30–40 циклов в режиме: 95°C — 20 с, 52–58°C — 20–30 с, 72°C — 120 с; затем финальная элонгация при температуре 72°C — 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально методом электрофореза в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1 × TBE), окрашенном бромидом этидия.

Для последующего исследования использовали специфичные праймеры. Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов «ABI PRISM BigDye Terminator v3.1.» (Applied Biosystems, США) на прямых и обратных праймерах. Пробы исследовали с помощью генетического анализатора «ABI Prism 3500» (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ проводили с помощью программы NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе «MEGA11», используя алгоритм ClustalW [14]. Для определения наличия мутаций лекарственной устойчивости ВГС к ПППД использовали программное обеспечение Geno2pheno HCV resistance (<https://hcv.geno2pheno.org>).

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 9.5.1 (GraphPad Software Inc.). При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представлены с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Результаты

Возраст пациентов варьировал от 18 до 65 лет и составил в среднем $34,3 \pm 7,27$ лет. Количество мужчин в группе превышало количество женщин — 70,7 и 29,3%, соответственно.

В нашем исследовании антитела к ВГС были выявлены у 94,27% (95% ДИ: 89,40–97,35%) ВИЧ-инфицированных лиц. Из них женщин — 44 человека (29,73%) (95% ДИ: 22,50–37,79%) и мужчин — 104 человека (70,27%) (95% ДИ: 62,21–77,50%).

РНК ВГС выявили у 98 (62,4%) (95% ДИ: 54,35–70,01%) пациентов. Распределение генотипов ВГС в данной группе было следующим: 1a — 7,14% (95% ДИ: 2,92–14,16%) (n = 7), 1b — 53,06% (95% ДИ: 42,71–63,22%) (n = 52), 2 —

2,04% (95% ДИ: 0,25–7,18%) (n = 2), 3a — 37,76% (95% ДИ: 28,16–48,12%) (n = 37).

Результаты определения вирусной нагрузки варьировали от $5,3 \times 10^3$ до $2,3 \times 10^8$ МЕ/мл. Нуклеотидная последовательность всех трех участков NS3, NS5A, NS5B определена в 73 образцах, у 9 образцов удалось амплифицировать и получить нуклеотидные последовательности двух регионов и у 15 образцов — одного региона.

Частота выявления мутаций резистентности в регионе NS3. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS3 проводили для 82 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 46), 3a (n = 31), 1a (n = 4), 2 (n = 1). Процентное соотношение последовательностей региона NS3 ВГС генотипов 1b, 3a, 1a, 2 в обследованной выборке составило 56,10% (95% ДИ: 44,70–67,04%), 37,80% (95% ДИ: 27,32–49,19%), 4,88% (95% ДИ: 1,34–12,03%), 1,22% (95% ДИ: 0,03–6,61%) соответственно. Полученные показатели частоты встречаемости в зависимости от генотипа представлены в табл. 1.

В общей сложности доля штаммов, содержащих мутации в регионе NS3, составила 9,8% (95% ДИ: 4,31–18,32%) (8/82). Всего содержали мутации 50% (95% ДИ: 6,76–93,24%) (2/4) последовательностей генотипа 1a, 8,7% (95% ДИ: 2,42–20,79%) (4/46) генотипа 1b, 6,5% (95% ДИ: 0,79–21,42%) (2/31) генотипа 3a.

Частота выявления мутаций резистентности в регионе NS5A. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS5A проводили для 83 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 47), 3a (n = 30), 1a (n = 6).

Процентное соотношение последовательностей региона NS5A ВГС генотипов 1b, 3a, 1a среди обследованных составило 56,6% (95% ДИ: 45,29–67,47%), 36,2% (95% ДИ: 25,88–47,43%), 7,2% (95% ДИ: 2,70–15,07%) соответственно. Частота встре-

Таблица 1. Частота выявления клинически значимых мутаций в регионе NS3 в исследуемой группе

Table 1. Frequency of detected clinically relevant mutations in HCV NS3 region in the study group

Генотип ВГС/количество последовательностей HCV genotype/number of sequences	Мутация Mutation	n	%	Устойчивость к ингибитору Resistance to inhibitor
1a (4)	T54S	1	25	Телапревир, Воксилапревир, Гразопревир Telaprevir, Voxilaprevir, Grazoprevir
	Q80L	1	25	Воксилапревир Voxilaprevir
1b (46)	V36M	1	2,2	Гразопревир, Воксилапревир Grazoprevir, Voxilaprevir
	Y56F	2	4,4	Гразопревир, Воксилапревир Grazoprevir, Voxilaprevir
	Q80K	1	2,2	Асунапревир, Симепревир Asunaprevir, Simeprevir
3a (31)	Q80K	1	3,2	Воксилапревир Voxilaprevir
	Q168R	1	3,2	Глекапревир, Воксилапревир Glecaprevir, Voxilaprevir

чаемости мутаций лекарственной устойчивости ВГС в регионе NS5A представлена в табл. 2 в соответствии с генотипом вируса.

Доля фармакорезистентных по указанному региону штаммов составила 19,3% (95% ДИ: 11,44%–29,41%) (16/83). Всего содержали мутации устойчивости 14,9% (95% ДИ: 6,20–28,31%) (7/47) последовательностей генотипа 1b, 33,3% (95% ДИ: 14,73–49,40%) (9/30) генотипа 3a.

Частота выявления мутаций резистентности в регионе NS5B. Анализ мутаций лекарственной устойчивости в регионе NS5B проводили для 87 изолятов ВГС генотипов 1b (n = 48), 3a (n = 32), 2 (n = 2), 1a (n = 5).

Процентное соотношение последовательностей региона NS5B ВГС генотипов 1b, 3a, 2, 1a в обследованной выборке составило 55,2% (95% ДИ: 44,13–65,85%), 36,8% (95% ДИ: 26,69–47,80%), 2,3% (95% ДИ: 0,28–8,06%), 5,7% (95% ДИ: 1,89–12,90%) соответственно. В табл. 3 представлены данные о штаммах ВГС с мутациями в NS5B-регионе.

Клинически значимые аминокислотные замены были выявлены в 10 штаммах из 87, что составило 11,5% (95% ДИ: 5,65%–20,12%). Всего содержали мутации 60% (95% ДИ: 14,66–94,73%) (3/5) последовательностей генотипа 1a, 8,3% (95% ДИ: 2,32–19,98%) (4/48) генотипа 1b, 9,4% (95% ДИ: 1,98–25,02%) (3/32) генотипа 3a.

В обследованной нами группе мутации, ассоциированные с устойчивостью ВГС к ПППД во всех регионах, были обнаружены в 16,6% (95% ДИ: 11,11–23,32%) случаев (n = 26). В регионе NS3 — 6 значимых нуклеотидных замен, в регионах NS5A и NS5B 15 и 10 значимых нуклеотидных замен соответственно (табл. 4).

Обсуждение

По данным литературы, частота выявления серологических маркеров инфекции у мужчин значительно выше, чем у женщин, как среди ВИЧ-инфицированного контингента, так и среди больных ХГС [17]. В нашем исследовании среди пациентов с коинфекцией ВИЧ+ВГС серологические маркеры обеих инфекций преобладали у мужчин по сравнению с женщинами.

Распространение генотипов ВГС в РФ распределяется следующим образом: генотип 1 — 52,6% (1b — 48,9%, 1a — 3,7%); генотип 3 — 39,6%; генотип 2 — 7,8%. Генотипы 4–6 встречаются менее чем в 0,01% случаев [9]. Что касается генетического разнообразия ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц, оно аналогично таковому в общей популяции — преобладают генотипы 1b и 3a [3]. Распределение генотипов ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц, полученное в на-

Таблица 2. Частота выявления клинически значимых мутаций в регионе NS5A в исследуемой группе

Table 2. Frequency of detected clinically relevant mutations in HCV NS5A region in the study group

Генотип ВГС/количество последовательностей HCV genotype/number of sequences	Мутация Mutation	n	%	Устойчивость к ингибитору Resistance to inhibitor
1b (47)	Y93H	7	14,9	Даклатасвир, Омбитасвир, Пибрентасвир Daclatasvir, Ombitasvir, Pibrentasvir
3a (30)	A30K	2	6,7	Даклатасвир, Пибрентасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Pibrentasvir, Ledipasvir
	Y93H	7	42,6	Даклатасвир, Омбитасвир, Пибрентасвир Daclatasvir, Ombitasvir, Pibrentasvir

Таблица 3. Частота выявления клинически значимых мутаций в регионе NS5B в исследуемой группе

Table 3. Frequency of detected clinically relevant mutations in HCV NS5B region in the study group

Генотип ВГС/количество последовательностей HCV genotype/number of sequences	Мутация Mutation	n	%	Устойчивость к ингибитору Resistance to inhibitor
1a (5)	L159F	2	40	Софосбувир, Дасабувир Sofosbuvir, Dasabuvir
	C316Y	1	20	Дасабувир Dasabuvir
1b (48)	C316N	3	6,25	Софосбувир Sofosbuvir
	L159F	1	2,1	Дасабувир Dasabuvir
3a (32)	S282T	3	9,4	Дасабувир Dasabuvir

Таблица 4. Значимые нуклеотидные замены у ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективной АРВТ
 Table 4. Significant nucleotide substitutions in HIV-infected patients with ineffective ART

№ образца No. of sample	Регион Region	Генотип Genotype	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Устойчивость к ингибитору Resistance to Inhibitor
3	NS5A	3a	A30K+Y93H	Даклатасвир, Ледипасвир, Омбитасвир Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir
6	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
6	NS3	1b	V36M	Боцепревир, Глекапревир, Гразопревир Boceprevir, Glecaprevir, Grazoprevir
7	NS3	1b	Y56F	Гразопревир Grazoprevir
8	NS5A	3a	A30K	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
11	NS5B	1b	C316N	Софосбувир Sofosbuvir
15	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
15	NS3	3a	Q168R	Глекапревир, Воксилапревир Glecaprevir, Voxilaprevir
18	NS5B	1b	C316Y	Софосбувир Sofosbuvir
23	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
25	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
26	NS5B	1b	C316N	Софосбувир Sofosbuvir
29	NS3	3a	Q80K	Воксилапревир Voxilaprevir
29	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
29	NS5B	3a	S282T	Софосбувир Sofosbuvir
35	NS5B	1b	L159F	Софосбувир Sofosbuvir
36	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
39	NS5B	1a	L159F	Софосбувир Sofosbuvir
42	NS3	1b	Y56F+Q80K	Гразопревир Grazoprevir
44	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
46	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
57	NS5B	3a	S282T	Софосбувир Sofosbuvir
57	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
71	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
72	NS5B	3a	S282T	Софосбувир Sofosbuvir

Окончание таблицы 4. Значимые нуклеотидные замены у ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективной АРВТ

Table 4. Significant nucleotide substitutions in HIV-infected patients with ineffective ART (continued)

№ образца No. of sample	Регион Region	Генотип Genotype	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Устойчивость к ингибитору Resistance to Inhibitor
75	NS5B	1a	L159F	Софосбувир Sofosbuvir
75	NS3	1a	T54S+Q80L	Боцепревир, Телапревир Boceprevir, Telaprevir
81	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
86	NS3	3a	Q80K	Воксилапревир Voxilaprevir
89	NS5A	3a	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir
91	NS5B	1a	C316Y	Софосбувир Sofosbuvir
94	NS5A	1b	Y93H	Даклатасвир, Элбасвир, Ледипасвир Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir

стоящей работе, — превалирование генотипов 1b и 3a — не противоречило литературным данным.

Люди с коинфекцией ВГС+ВИЧ обладают высокой вероятностью передачи ВГС половым путем. С коинфицированием связаны повышенная восприимчивость слизистых оболочек к инфицированию ВГС. Прогрессирование заболеваний печени, фиброза и цирроза так же связаны с одновременным инфицированием ВГС и ВИЧ, что является одной из наиболее распространенных причин смерти у людей, живущих с ВИЧ-инфекцией (ЛЖВ), получающих АРВТ, и, в целом, смертность при коинфекции ВИЧ+ВГС выше, чем при моноинфекциях ВГС или ВИЧ [15].

В отсутствие специфической вакцинопрофилактики ХГС важным элементом стратегий элиминации вируса является своевременное назначение терапии пациентам с высоким риском передачи инфекции. Таким образом, к группам, в которых представляется возможной микроэлиминация ВГС, относятся ЛЖВ.

На данный момент существуют пангенотипные схемы терапии ХГС, однако, в связи с их высокой стоимостью, актуальными продолжают оставаться генотип-специфичные лекарственные средства. Таким образом ключевыми детерминантами выбора схем терапии ПППД остаются генотип ВГС, субтип и наличие ассоциированных с фармакорезистентностью мутаций, в связи с чем отсутствие определения генотипа и несвоевременное выявление мутаций лекарственной устойчивости могут привести к выбору неоптимальных схем лечения и, как следствие, неудачному исходу терапии [16]. В связи с этим особое значение приобретает определение генотипов, субтипов и мутаций ВГС в значимых для распространения

вируса внутри страны группах риска, в том числе и среди ВИЧ-инфицированных лиц.

В настоящее время терапевтические схемы на основе ПППД обеспечивают элиминацию вируса у большинства пациентов с ХГС. Тем не менее у 5% пациентов наблюдается вирусологический прорыв на терапии, что обычно связано с наличием мутаций лекарственной устойчивости. У пациентов с неэффективностью ПППД наличие таких мутаций ставит под угрозу эффективность терапии второй линии и, следовательно, является предиктором дальнейшего неуспешного лечения.

В данном исследовании мы проанализировали нуклеотидные последовательности регионов NS3, NS5A, NS5B на предмет наличия мутаций лекарственной устойчивости. Секвенирование всех трех регионов среди РНК-положительных образцов удалось в 75% случаев, двух и одного регионов — в 9,2 и 15,5% соответственно. Неудачи амплификации, по-видимому, были обусловлены более высоким уровнем полиморфизма последовательностей, кодирующих целевые белки, по сравнению с 5'-НТО областью, использовавшейся для детекции инфекции, и участком NS5B, использовавшимся для определения генотипа ВГС.

У 26 (16,6%) пациентов была обнаружена по крайней мере одна мутация в одном из трех регионов вируса, связанная с устойчивостью к терапии ПППД, у 4 пациентов были обнаружены мутации одновременно в двух регионах и у одного пациента — в трех регионах. У 3 пациентов была выявлена фармакорезистентность к препаратам, обусловленная наличием сразу двух мутаций в одном регионе: у двух пациентов в регионе NS3 и у одного — в регионе NS5A.

При определении наличия мутаций лекарственной устойчивости ВГС к ПППД в регионе NS5B среди впервые выявленных ВИЧ-инфицированных лиц значимые аминокислотные замены были обнаружены в 4,6% случаев [3]. В нашем исследовании это показатель составил 11,5%. Отсутствие эффективности АРВТ среди ЛЖВ может быть связано не только с низким уровнем комплаенса таких пациентов, но и продолжением практики рискованного поведения, в том числе употреблением наркотических средств. У таких пациентов велик риск передачи первично резистентных штаммов ВГС из-за использования нестерильных медицинских средств и отсутствия контрацепции.

Среди ЛЖВ с неэффективной АРВТ проблема резистентности ВГС имеет наиболее выраженный характер. Наряду с продолжением снижения уровня иммунной защиты в результате воздействия устойчивого штамма ВИЧ, состояние пациента усугубляется воздействием ВГС, в частности снижая функциональность печени. Такое коморбидное состояние без дальнейшего лечения неминуемо ведет к необратимым последствиям в виде декомпенсации печени и преждевременной гибели пациентов.

Стоит отметить, что штаммы ВГС с мутацией Y93H в регионе NS5A способны сохраняться длительное время в виде минорных даже после прекращения лечения ПППД [13]. Это важно в разрезе возможности передачи устойчивых штаммов ВГС среди групп пациентов с высоким риском передачи инфекции, в частности у ЛЖВ. Важный вопрос заключается в том, возможно ли эффективно лечить таких пациентов повторно препаратами более высокого класса при условии, что эти препараты доступны.

В настоящее время продолжается изучение влияния полиморфных вариантов, на данный момент не имеющих доказательств прямого

влияния на фитнес вируса в условиях терапии, однако оказывающих синергетическое действие при их комбинации.

Заключение

Несмотря на успехи терапии ХГС, лекарственная устойчивость практически неизбежна у пациентов, которые на терапии не достигают УВО. Еще более актуальной данная проблема становится при рассмотрении возможности передачи штаммов с уже сформированной лекарственной устойчивостью в уязвимых группах, а именно у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Данная ситуация усугубляет существующие проблемы с лечением и достижением полной эрадикации вируса наряду с возможной его устойчивостью к препаратам, что может привести к инвалидизации и преждевременной смерти таких пациентов.

Молекулярно-генетическая характеристика последовательностей ВГС будет способствовать последующей идентификации путей передачи патогена с целью контроля и/или предотвращения распространения инфекции. Полученные данные рационально использовать для оценки динамики распространенности фармакорезистентности ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы подтверждают, что от всех участников исследования было получено информированное согласие.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы/References

1. Загдын З.М., Кобесов Н.В., Вербицкая Е.В., Денюшенков В.Л. Глобальное бремя ВИЧ/СПИД в России в аспекте общественного здоровья. Часть 1 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2023. Т. 15, № 2. С. 69–80. [Zagdyn Z.M., Kobesov N.V., Verbitskaya E.V., Denuyshenkov V.L. The global burden of HIV/AIDS in Russia in terms of public health. Part 1. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2023, vol. 15, no. 2, pp. 69–80. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2023-15-2-69-80
2. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999–2009 гг. // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 3. С. 255–262. [Mukomolov S.L., Levakova I.A. Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999–2009. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 3, pp. 255–262. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262
3. Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Voumbaly S., Balde T.A., Семенов А.В. Первичные мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 3. С. 97–105. [Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Voumbaly S., Balde T.A., Semenov A.V. Primary HCV drug resistance mutations in patients with newly diagnosed HIV infection. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 3, pp. 97–105. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105
4. 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.V., Isaeva O.V., Ignatieva M.E., Romanenko V.V., Oorzhak N.D., Malinnikova E.Yu., Kyuregyan K.K., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации // *Журнал инфектологии*. 2017. Т. 9, № 2. С. 56–64.]

- 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 infektologii = Journal Infectology*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 56–64. (In Russ.) doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64
5. Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 1104 с. [Infectious diseases: national guidelines. Eds. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 1104 p. (In Russ.)]
 6. Aghemo A., De Francesco R. New horizons in hepatitis C antiviral therapy with direct-acting antivirals. *Hepatology*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 428–438. doi: 10.1002/hep.26371
 7. 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
 8. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Gonçalves F.L. Jr., Häussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 2002, vol. 347, no. 13, pp. 975–982. doi: 10.1056/NEJMoa020047
 9. Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 2014, vol. 1, suppl. 1, pp. S45–S57. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027
 10. Guntipalli P., Pakala R., Kumari Gara S., Ahmed F., Bhatnagar A., Endaya Coronel M.K., Razzack A.A., Solimando A.G., Thompson A., Andrews K., Enebong Nya G., Ahmad S., Rinaldo R., Cozzolongo R., Shahini E. Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 2021, vol. 84, no. 4, pp. 637–656. doi: 10.51821/84.4.015
 11. Messina J.P., 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
 12. Ngwaga T., Kong L., Lin D., Schoborg C., Taylor L.E., Mayer K.H., Klein R.S., Celentano D.D., Sobel J.D., Jamieson D.J., King C.C., Tavis J.E., Blackard J.T. Diversity of the hepatitis C virus NS5B gene during HIV co-infection. *PLoS One*, 2020, vol. 15: e0237162. doi: 10.1371/journal.pone.0237162
 13. Nitta S., Asahina Y., Matsuda M., Yamada N., Sugiyama R., Masaki T., Suzuki R., Kato N., Watanabe M., Wakita T., Kato T. Effects of resistance-associated NS5A mutations in hepatitis C virus on viral production and susceptibility to antiviral reagents. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 34652. doi: 10.1038/srep34652
 14. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 2021, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
 15. Thompson A.J., McHutchison J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J. Viral. Hepat.*, 2009, vol. 16, pp. 377–387. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01124
 16. Welzel T.M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., Jacobson I., Zeuzem S., Agarwal K. Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *J. Hepatol.*, 2017, vol. 67, no. 2, pp. 224–236. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.014
 17. WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016–2021: towards ending viral hepatitis. Geneva: WHO Document Production Services, 2016. 53 p. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf> (15.07.2023)

Авторы:

Рейнгардт Д.Э., врач клинической лабораторной диагностики отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Ануфриева Е.В., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Семенов А.В., д.б.н., директор ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;
Лялина Л.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии Первого Санкт-Петербургского медицинского университета имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Reingardt D.E., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostic, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-related Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Virology HIV-Infection; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Anufrieva E.V., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology HIV-Infection; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Semenov A.V., DSc (Biology), Director of the Federal Research Institute of Viral Infections "ViroM", Ekaterinburg, Russian Federation;
Lyalina L.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Epidemiology of Infectious and Non-Infectious Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.