

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Федеральное бюджетное учреждение науки

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

На правах рукописи

Чуб Елена Владимировна

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С ТИПА 2k/1b
НА ЮГЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ**

03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
член-корр. РАН, профессор
Нетесов С.В.

Кольцово 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Строение генома ВГС, гены и их значение.....	12
1.1.1 Нетранслируемые области.....	14
1.1.2 Структурные белки.....	14
1.1.3 Неструктурные белки.....	17
1.2 Классификация ВГС: генотипы, субтипы.....	22
1.3 Клинические аспекты генотипов ВГС	24
1.4 Эпидемиологические аспекты ВГС, основные пути распространения.....	26
1.5 Географическое распределение генотипов ВГС.....	32
1.6 Понятие рекомбинации ВГС, данные об известных рекомбинантах всех типов.....	35
1.7 Заключение.....	44
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1 Сбор образцов	47
2.1.1 Группа пациентов с диагнозом острый гепатит	47
2.1.2 Группа пациентов с диагнозом хронический гепатит.....	48
2.2 Эпидемиологическое исследование	48
2.2.1 Анкетирование	48
2.2.2 Обработка эпидемиологических данных	48
2.3 Диагностические тест-системы	49
2.4 Химические реактивы, ферменты и наборы	50
2.5 Диагностика РНК ВГС	51
2.5.1 Выделение суммарной РНК	51
2.5.2 Обратная транскрипция (ОТ)	51
2.5.3 ПЦР-амплификация	52
2.6 Определение генотипа	54

2.6.1 Детекция и очистка продуктов амплификации	54
2.6.2 Определение нуклеотидных последовательностей	54
2.6.3 Анализ последовательностей	55
2.7 Определение точки рекомбинации	55
2.7.1 Дизайн праймеров для области NS2	55
2.7.2 Пошаговое сканирование (bootscan)	58
2.8 Дизайн праймеров для скринингового определения генотипа ВГС	58
2.9 Определение геномной последовательности изолята PSA424.....	61
2.10 Определение времени формирования рекомбинантных изолятов.....	61
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1. Характеристики обследуемой группы	63
3.1.1. Половозрастной состав группы	63
3.1.2. Эпидемиологические данные для инфицированных лиц	64
3.2. Встречаемость субтипов ВГС на территории Алтайского края	69
3.3. Характеристики обнаруженных изолятов 2k/1b, подтверждение точки рекомбинации	76
3.4 Данные о носителях изолятов 2k/1b, клиническая картина	77
3.5 Создание мультиплексной системы для скринингового генотипирования изолятов ВГС. Выявление новых рекомбинантных изолятов.....	79
3.6. Филогенетическое сравнение полученных изолятов 2k/1b с описанными ранее	83
3.7 Оценка доли изолятов 2k/1b в общей популяции ВГС на территории бывшего СССР	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	99
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	101
Приложение.....	118

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТ	антитела
АЛТ	аланинаминотрансфераза
ВГВ	вирус гепатита В
ВГС	вирус гепатита С
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ИФА	иммуноферментный анализ
ЛПНП	Липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	Липопротеины очень низкой плотности
ОТ-ПЦР	обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция
СВО	стойкий вирусологический ответ
5'-UTR	5'-untranslated region (5'-нетранслируемая область)
ARF	alternative reading frame (альтернативная рамка считывания)
CRF	циркулирующая рекомбинантная форма
HGV	hepatitis G virus (вирус гепатита G)
HVR	hypervariable region (гипервариабельный район)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Международный Комитет по Таксономии Вирусов)
IRES	internal ribosome entry site (внутренний сайт посадки рибосом)
ISDR	interferon sensitivity determining region (регион, определяющий чувствительность к интерферону)
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey (Национальное Исследование Здоровья и Питания)
NJ	neighbor joining (метод объединения ближайших соседей)
OR	odds ratio (отношение шансов)
ORF	open reading frame (открытая рамка считывания)
PePHD	PKR-eIF2a phosphorylation homology domain
RdRp	RNA-dependent RNA-polymerase (РНК-зависимая РНК-полимераза)
RT	reverse transcriptase (обратная транскриптаза)
SPP	signal peptide peptidase (сигнальная пептидная пептидаза)
UPGMA	unweighted pair group method using arithmetic averages (метод невзвешенных попарных средних)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Гепатит С является контагиозной болезнью печени, развивающейся в результате инфицирования вирусом гепатита С (ВГС). Гепатит С отличается часто бессимптомным вначале течением, и высокой степенью хронизации инфекции, которая может варьировать по степени тяжести от легкого заболевания, продолжающегося несколько недель, до серьезного состояния, приводящего к развитию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в настоящее время более 170 миллионов человек в мире инфицированы ВГС. Ежегодно 3-4 миллиона человек заражаются и более 350 тысяч человек умирают от связанных с гепатитом С болезней печени (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/ru/>). В России с начала регистрации инфекции в 1994 году наблюдался рост заболеваемости ВГС, достигший пика в 2000 году, (21,0 случай на 100 тыс. населения), с тех пор фиксируют постепенное снижение количества заболевших до 1,5 случая на 100 тыс. населения с 2013 году (http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/healthcare/).

Однако эти данные не отражают полной картины, поскольку лица с хронической инфекцией ВГС с отсутствием симптомов заболевания, количество которых достигает 90%, не попадают в поле зрения официальной статистики. Примерно у 75-85% инфицированных людей со временем развивается хроническое заболевание, у 5-20% развивается цирроз, а 1-5% умирают от цирроза или рака печени. В настоящее время более чем у 25% пациентов с раком печени основополагающей его причиной является гепатит С. Эти данные, отсутствие вакцины, а также тот факт, что в эпидемиологический процесс ВГС в основном вовлечено население репродуктивного возраста,

делают гепатит С одной из центральных проблем практического здравоохранения.

Изучению вопросов эпидемиологии вирусного гепатита С в России по-прежнему уделяется недостаточное внимание, в то время как анализ эпидемиологических данных в течение длительного времени может позволить сделать выводы об изменении основных факторов риска и эффективности применяемых превентивных программ. Мониторинг же за циркулирующими генотипами необходим для углубленной эпидемиологической оценки ситуации на данной территории.

В настоящее время для лиц, инфицированных гепатитом С, имеется немало новых способов лечения, которые в значительной степени замедляют развитие болезни, предупреждают возникновение цирроза и рака печени и в конечном итоге снижают смертность. Определение генотипа (субтипа) вируса имеет важное клиническое значение для определения тактики терапии при лечении ВГС-инфицированных пациентов и для прогноза эффективности лечения. Известно, что пациенты, инфицированные ВГС 2 или 3 генотипа, лучше поддаются лечению, быстрее и значительно чаще достигают стойкого вирусологического ответа по сравнению с пациентами, инфицированными ВГС 1 генотипа. До недавнего времени полагали, что генетическая вариабельность вируса гепатита С ограничивается несколькими генотипами, образовавшимися в результате эволюционной дивергенции, однако открытие рекомбинантных изолятов указало еще один путь формирования генетического разнообразия популяции ВГС. Межгенотипные рекомбинанты имеют нуклеотидные последовательности разных генотипов в структурной и неструктурной части их генома. И лечение пациентов, инфицированных рекомбинантными ВГС, представляет собой дополнительную проблему, поскольку остается неясной взаимосвязь рекомбинантного характера изолята и его восприимчивости к антивирусной терапии. Ответ на этот вопрос могло бы дать наблюдение за ходом лечения пациентов, инфицированных рекомбинантными изолятами ВГС, и анализ генетической вариабельности этих изолятов в течение антивирусной

терапии, особенно геномных областей, непосредственно определяющих чувствительность к интерферону. Другую проблему представляет собой диагностика рекомбинантных изолятов. Стандартным методом обнаружения рекомбинации между различными генотипами и субтипами ВГС является генотипирование, основанное на филогенетическом анализе, по крайней мере, двух геномных регионов, расположенных как можно дальше друг от друга. Обычно для этой цели используются регионы 5'UTR и NS5b. Однако, используемый в рутинной практике генотипический анализ, основанный только на одном фрагменте генома, преимущественно 5'UTR, как наиболее консервативного и диагностически ценного региона, не дает возможности выявлять рекомбинантные изоляты ВГС. Диагностическая ошибка в генотипировании ВГС и не определение рекомбинантного изолята может иметь серьезные последствия из-за выбора неверной схемы лечения и его неудовлетворительного результата. Выявление истинной встречаемости рекомбинантных изолятов на территории Западной Сибири, их происхождение, преимущественные пути передачи в сравнении с другими субтипами ВГС а также разработка удобного метода диагностики рекомбинантных изолятов типа 2k/1b и явились предметом изучения для настоящей работы.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлось изучение распространенности, путей передачи и генетического разнообразия рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b на территории Западной Сибири.

Для достижения указанной цели решались следующие **задачи**:

1. Проведение комплексного молекулярно-эпидемиологического исследования проб от больных Клиники инфекционных болезней городской больницы №5 г. Барнаул (Алтайский край), включающего анкетирование обследованных лиц, сбор образцов сывороток крови и исследование их на наличие серологических маркеров и РНК вирусного гепатита С с последующим статистико-эпидемиологическим анализом данных.

2. Разработка метода скринингового генотипирования изолятов ВГС, позволяющая определять субтипы циркулирующие на территории России, включая рекомбинантные изоляты типа 2k/1b.

3. Скрининг клинических образцов сывороток крови, полученных от пациентов инфицированных ВГС в период 2005-2014 с целью выявления рекомбинантных изолятов.

4. Определение полной нуклеотидной последовательности генома одного из обнаруженных рекомбинантных изолятов и фрагментов генов Core, E1, NS2 и NS5b для остальных.

5. Проведение филогенетического анализа последовательностей выявленных рекомбинантных изолятов.

Научная новизна и практическая ценность

1. В ходе комплексного молекулярно-эпидемиологического исследования ВГС у пациентов с симптомами острого гепатита в г. Барнаул впервые на территории Сибири выявлены 3 случая инфицирования рекомбинантной формой CRF01_1b2k ВГС. Подтверждена точка рекомбинации в последовательности гена NS2.

2. Разработана мультиплексная система для генотип-специфичной амплификации фрагмента области NS2 ВГС. Разработанный метод позволяет различать генотипы ВГС 1b, 2 (2a, 2c или 2k), 3a и рекомбинантные варианты типа 2k/1b при помощи ОТ-ПЦР с последующей электрофоретической детекцией. Чувствительность (85%) и специфичность (100%) системы подтверждена при тестировании образцов с предварительно установленным генотипом ВГС.

3. В период 2005-2014г. при генотипировании с использованием созданной системы 496 изолятов ВГС, выделенных в г.Новосибирске, было выявлено 5 новых случаев рекомбинантной формы. Таким образом, частота встречаемости CRF01_1b2k составила 1%.

4. Определены нуклеотидные последовательность фрагментов генома (Core, E1, NS2, NS5b) восьми выявленных рекомбинантных изолятов. Для изолята PSA-424 определена нуклеотидная последовательность полного генома.

5. Показано, что рекомбинантные формы ВГС типа 2k/1b, вне зависимости от географического района их обнаружения, имеют высокую степень гомологии генома и близкое филогенетическое родство, что говорит о единстве их происхождения. Наиболее вероятное время появления рекомбинантной формы CRF01_1b2k, рассчитанное методом молекулярных часов, находится в интервале 1959-1977гг.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработана мультиплексная система для генотип-специфичной амплификации фрагмента области NS2 ВГС, позволяющая различать генотипы ВГС 1b, 2 (2a, 2c или 2k), 3a и рекомбинантные варианты типа 2k/1b.

2. Рекомбинантные формы ВГС типа 2k/1b стабильно циркулируют в различных группах населения Западной Сибири с частотой встречаемости не менее 1%.

3. Рекомбинантные изоляты ВГС типа 2k/1b, вне зависимости от географического региона их обнаружения, имеют общего предка, образовавшегося на территории бывшего Советского Союза в период 1959-1977гг.

Вклад автора:

Результаты по теме диссертации за исключением работ, связанных с анкетированием пациентов и проведением серологических тестов были получены лично автором.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были представлены в форме докладов на Российской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» (Новосибирск, 25-27 июня 2005 г.); на заседании рабочей группы «Nosocomial and iatrogenic viral hepatitis in Russia and in the Baltic Network supported by the Swedish Institute» в рамках конгресса «7th Nordic-Baltic Congress on Infectious Diseases» (Riga, Latvia, September 17-20, 2006); на научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», (Новосибирск, 26-28 сентября 2013 г.) в форме постерных докладов на VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генодиагностика инфекционных болезней - 2007» (Москва, 28–30 ноября 2007 года), на Международном вирусологическом конгрессе «XIV International Congress of Virology» (Istanbul, 10-15 August, 2008). Материалы диссертации опубликованы в 5 статьях и представлены в 14 тезисах трудов конференций.

Настоящая работа выполнена в лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ Отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», в лаборатории клинической молекулярной информативной медицины Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, г. Нагоя, Япония, а также вирусологической лаборатории Swedish Institute for Infection Disease Control, г. Стокгольм, Швеция.

Благодарности:

Автор приносит благодарность своим коллегам по лаборатории и сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”, в тесном сотрудничестве с которыми была выполнена диссертационная работа, а именно: д.б.н., проф. В.Б. Локтеву, к.б.н. В.А. Терновому, к.б.н. Г.В. Кочневой, к.б.н. А.А. Гражданцевой, к.б.н. Г.Ф. Сиволобовой, к.ф.-м.н. А.Н. Швалову, С.А. Походне.

Также признательна врачам Клиники инфекционных болезней городской больницы №5 г. Барнаул (Алтайский край) – О.И. Матрос, И.Г. Клиновенко,

И.А. Хорошиловой, В.М. Гранитову за сбор образцов и проведение анкетирования пациентов.

Автор благодарит коллег из лаборатории клинической молекулярной информативной медицины Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, г. Нагоя, Япония – Fuat Kurbanov, Dr. Masashi Mizokami и вирусологической лаборатории Swedish Institute for Infection Disease Control, г. Стокгольм, Швеция – PhD, Ass Prof. Heléne Norder, Prof. Lars Magnus за помощь в проведении экспериментов и совместный анализ полученных данных.

Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю д.б.н., член-корр. РАН, профессору Сергею Викторовичу Нетесову за помощь в выборе темы и направления исследований и всестороннюю поддержку.

Настоящая работа выполнена за счет финансирования по грантам Международного научно-технического центра (МНТЦ) №1637р «Изучение частоты встречаемости, распределения генотипов и молекулярной вариабельности изолятов вируса гепатита С в Сибирских регионах России» и №3255р «Исследование иммунологических и структурных свойств рекомбинантных белков E1 и E2 ВГС, экспрессированных в клетках млекопитающих», по гранту Фонда МФТИ №00012/00049 «Создание региональной референс-лаборатории для ПЦР-диагностики вирусных гепатитов».

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение генома ВГС, гены и их значение

Вирус гепатита С (ВГС), являющийся этиологическим агентом гепатита С, на сегодняшний день служит основной причиной хронического гепатита, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Отличительной его особенностью является способность вызывать латентное или малосимптомное течение заболевания, большей частью остающееся нераспознанным и высокая степень (до 80%) хронизации инфекции.

ВГС – это небольшой (с диаметром сферических вирусных частиц 55-65 нм) оболочечный вирус, содержащий одноцепочечную (+)РНК, являющийся единственным видом рода *Hepacivirus* в составе семейства *Flaviviridae*, согласно последней классификации вирусов, принятой Международным комитетом по таксономии вирусов в 2011 г. (King, 2011). В настоящее время еще 2 вируса претендуют на вхождение в род *Hepacivirus*, но еще не являются утвержденными как виды. Это GB virus B, способный инфицировать таминов (Bukh и др, 1999), и гепацивирус собак (CHV, canine hepacivirus) (Капоор и др, 2011). Так же недавно обнаружены гепацивирусы у лошадей (Burbelo и др, 2012) и мелких грызунов (Drexler и др, 2013).

Получены электронные микрофотографии ВГС (Ishida и др., 2001). Нуклеокапсид вируса содержит один белок (белок С, Core), а в состав липопротеиновой оболочки входят два гликопротеина (Е1 и Е2), которые, образуют шипы, выступающие над поверхностью липидной мембраны на 6 нм (Shimizu и др., 1996). Структура вирусной частицы ВГС приведена на Рис. 1.1.

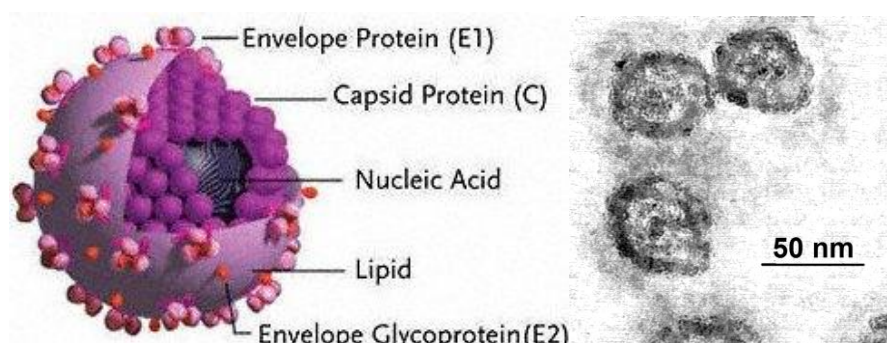


Рис. 1.1 Структура вирусной частицы ВГС

Геном ВГС несегментирован и представляет собой одноцепочечную (+)РНК длиной около 9600 н. (King, 2011). Схема генома представлена на Рис. 1.2. На 5'- и 3'-концах геномной РНК ВГС имеются нетранслируемые области, существенно различающиеся как по длине, так и по функциям. Расположенная между ними открытая рамка считывания (ORF) кодирует полипротеин длиной 3010-3033 а.к. в зависимости от субтипа вируса, который является предшественником 3 структурных и 7 неструктурных вирусных белков, образующихся в результате работы клеточных и вирусных протеаз. Структурными белками ВГС являются: Core – РНК-связывающий капсидный белок и поверхностные гликопротеины E1 и E2. К неструктурным белкам относят: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B. После структурных белков первым расположен небольшой белок p7, комплекс на основе которого выполняет функцию ионного канала (Dubuisson, 2007).

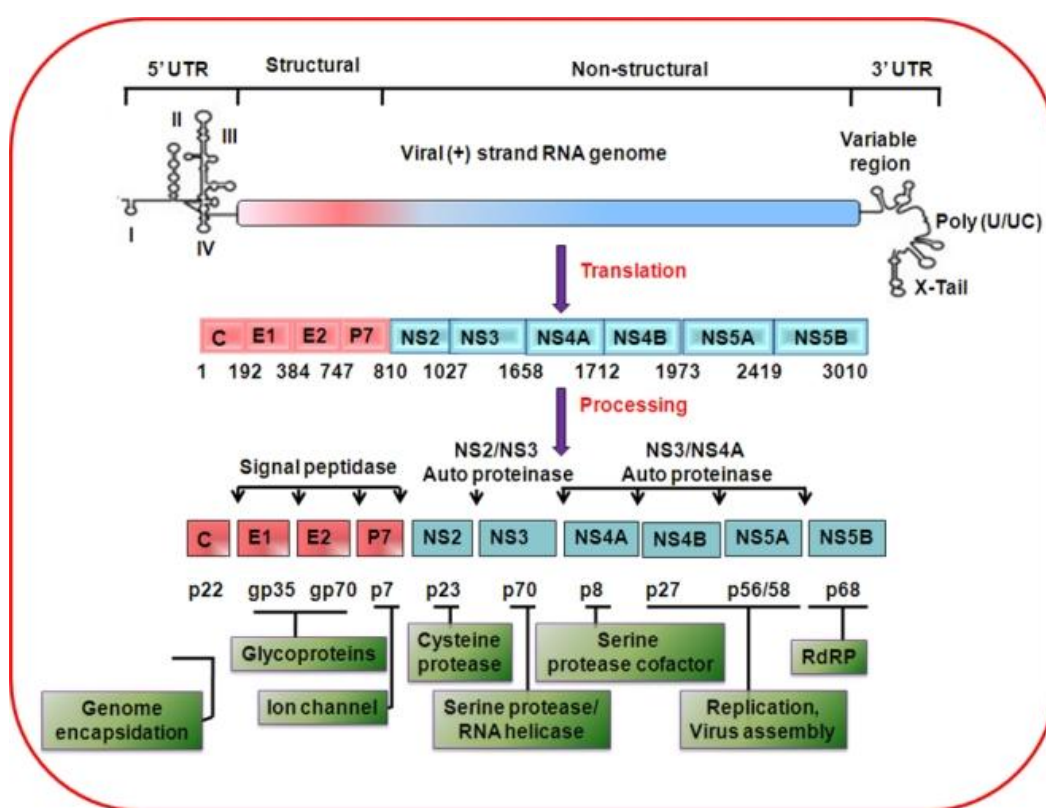


Рис. 1.2 Структура генома ВГС и вирусные белки (Banerjee и др., 2010).

Геном ВГС так же имеет альтернативную «+1» рамку считывания (ARF), которая перекрывает последовательность гена Core. ARF не имеет стартового кодона и трансляция обеспечивается рибосомальным сдвигом рамки считывания. Функции образующихся химерных белков до настоящего времени не выяснены (Dubuisson, 2007).

1.1.1 Нетранслируемые области

5'- нетранслируемая область (5'UTR) является наиболее эволюционно консервативной областью генома ВГС. Длина этого района составляет 341 н. для большинства изолятов ВГС. В последовательности 5'UTR выделяют 4 основных структурных домена, в пределах которых отмечают отдельные шпильки. Значительную часть 5'UTR занимает внутренний сайт посадки рибосом (IRES, internal ribosome entry site), обеспечивающий кэп-независимую трансляцию полипротеина ВГС. При этом показано, что для проявления функциональной активности IRES важными являются вторичная и третичная структуры этого района генома. Поэтому высокие требования к консерватизму 5'UTR определяются необходимостью сохранения шпильчатых структур и правильных расстояний между ними (Wang и др., 1994).

3'-нетранслируемая область состоит как из высоко консервативных, так и весьма вариабельных районов. За вариабельным районом 3'UTR (н. 23-66) следует поли-(U)-тракт, переходящий в полипиримидиновый тракт, за которым расположена высоко консервативная последовательность 3'-X, длиной 98 н., которая требуется для инициации репликации (Kolykhalov и др., 1996).

1.1.2 Структурные белки

С-белок или Core является РНК-связывающим белком, который формирует вирусный нуклеокапсид. Он отщепляется сигнальной пептидазой хозяина от общего полипротеина с образованием белка-предшественника (p21), который подвергается дальнейшему процессингу, в ходе которого сигнальная пептидная пептидаза (SSP) отщепляет с С-конца сигнальную

последовательность из 20 гидрофобных аминокислот с образованием зрелой вирионной формы белка (p19) (McLauchlan и др., 2002). В ядрышках инфицированных гепатоцитов обнаруживается p16 форма Core, обладающая онкогенными свойствами (Irshad и др., 2006). В составе Core около 20% основных аминокислот (Lys и Arg), что позволяет связываться с РНК ВГС *in vitro* с образованием вирусоподобных частиц (Kunkel и др., 2001). В последовательности белка Core нет сайтов гликозилирования.

Выделяют два домена: гидрофильный домен (D1), составляющий две трети Core с N-конца и гидрофобный домен (D2), включающий C-концевую треть белка. D1 домен содержит значительное количество положительно заряженных аминокислот, что считается необходимым для связывания с РНК. Домен D2 обеспечивает правильную конформацию домена D1 и необходим для олигомеризации белка. Стоит отметить, что если домен D1 аналогичен капсидным белкам пести- и флавивирусов, то домен D2 отсутствует у представителей данных родов, но характерен для HGV (Boulant и др., 2006).

Поверхностные гликопротеины E1 и E2 вируса гепатита С играют важную роль на различных этапах жизненного цикла вируса. Они необходимы для проникновения вируса в клетку (Cocquerel и др., 2006) и участвуют в сборке инфекционных вирусных частиц (Dubuisson, 2007). Гетеродимер E1-E2, присутствующий на поверхности вирусных частиц является лигандом для клеточных рецепторов. Использование растворимой формы гликопротеина E2 привело к выявлению ряда предполагаемых рецепторов для вируса гепатита С: CD81 (Pileri и др., 1998), скэвенджер-рецептор класса В тип I (Scavenger Receptor class B type I, SR-BI) (Scarselli и др., 2002), гепарин сульфат (Barth и др., 2003), лектины DC-SIGN и L-SIGN (Pöhlmann и др., 2003). Еще одного кандидата в рецепторы для вируса гепатита С – асиалогликопротеиновый рецептор – позволило обнаружить использование вирусоподобных частиц (Saunier и др., 2003). Кроме того, из-за физической ассоциации HCV с ЛПНП и ЛПОНП в сыворотке крови, рецепторы для ЛПНП также рассматривались в качестве кандидата в рецепторы для вируса гепатита С (Monazahian и др.,

1999). Тем не менее, среди этих молекул только CD81 и SR-BI, как было показано, играют важную роль в проникновении HCV в клетку (Del Campo и др., 2012). Однако, коэкспрессия CD81 и SR-BI во внепеченочных клеточных линиях не приводит к проникновению вируса, что свидетельствует о том, что другие молекулы, экспрессирующиеся только в гепатоцитах, необходимые для успешного проникновения ВГС.

Гликопротеины E1 и E2 отщепляются от полипротеина клеточной сигнальной пептидазой, являются трансмембранными белками 1 типа с большим эктодоменом на N-конце и C-концевым трансмембранным доменом и собираются в виде нековалентных гетеродимеров (Deleersnyder и др., 1997). Для гликопротеинов E1 и E2 показано наличие 6 и 11 потенциальных сайтов N-гликозилирования, соответственно, по большому числу из которых идет присоединение углеводных остатков (Zhang и др., 2004).

Гликопротеин E2 ВГС характеризуется наличием, по крайней мере, 2 гипервариабельных районов: HVR1 и HVR2 (Weiner и др., 1991). Первые 27 аминокислот эктодомена E2 образуют HVR1. Анализ аминокислотной последовательности этого района выявляет только 50% гомологии между различными изолятами ВГС, так же эта последовательность может значительно изменяться в течение хронической инфекции (Sakamoto и др., 1994). Наблюдаемая изменчивость этого региона, похоже, обеспечивает образование вариантов, ускользающих от иммунного ответа. HCV с отсутствующим HVR1 показал себя инфекционным, но сильно ослабленным в экспериментах на шимпанзе (Forns и др., 2000). Несмотря на высокую вариабельность HVR1, физико-химические свойства аминокислот в каждой позиции и конформации HVR1 высококонсервативны для всех генотипов (Penin и др., 2001). Кроме того, HVR1 содержит значительное количество основных а.к., которые, как было показано, играют важную роль в регуляции вирусного проникновения (Callens и др., 2005).

Второй гипервариабельный регион - HVR2, существенно короче HVR1 и расположен в области а.к. 474-480. Домен HVR2 расположен в пределах

характерной для гликопротеина E2 ВГС повторяющейся последовательности аминокислот (а.к. 471-511) (Kato и др., 1992).

Небольшой полипептид из 63 аминокислот, считавшийся ранее С-концевой частью белка E2 (а.к. 747-809), обнаруживается в виде самостоятельного белка p7, отщепление которого осуществляется клеточной сигнальной пептидазой (Dubuisson, 2007). Медленное и частичное расщепление сигнальной пептидазой сайтов E2/p7 и p7/NS2 приводит к образованию E2p7NS2 предшественника (Carrère-Kremer и др, 2004) Считается, что этот предшественник может играть определенную роль в регуляции жизненного цикла ВГС. Белок p7 принадлежит к группе вирусных белков виropоринoв (Sharma, 2010), которые участвуют в нескольких вирусных функциях, включая содействие выходу вирусных частиц из клетки. Олигомеризация виropоринoв приводит к образованию гидрофильных пор в мембранах зараженных клеток (Gonzalez и др, 2003). P7 белок, высоко гидрофобный по своей природе, содержит два трансмембранных домена TM1 (а.к.19-32) и TM2 (а.к. 36-58). Пространственная структура p7 комплекса была определена с помощью электронной микроскопии как гексамер (42 кДа) (Carrère-Kremer и др, 2002). Ионные каналы, образованные p7, играют важную роль в воспроизводстве инфекционных вирусных частиц. Они не являются необходимыми для репликации вируса, но их присутствие повышает ее эффективность (Sharma, 2010).

1.1.3 Неструктурные белки

Большую часть полипротеина-предшественника составляют последовательности неструктурных белков NS2 (p23), NS3 (p70), NS4A (p8), NS4B (p27), NS5A (p58) и NS5B (p68).

NS2 представляет собой 23 кД трансмембранный гидрофобный белок, который не является необходимым для формирования комплекса репликации. Функция NS2 в своей зрелой форме неизвестна, однако, находясь в составе полипротеина-предшественника, NS2 проявляет активность

цистеиновой протеазы, ответственной за протеолиз на стыке NS2/NS3 (Yamaga и др, 2002). Для проявления протеазной активности NS2 требуются первые 180 аминокислот NS3. Однако, аминокислотные остатки активного центра (H952, E972 и C993), необходимые для каталитической активности цистеиновой протеазы NS2/3, находятся полностью в NS2. Эта потребность в N-концевой части NS3 до сих пор не очень ясна. Недавние открытия показывают, что цинк-связывающий домен в NS3 на самом деле может стимулировать активность протеазы NS2. Т.е. последовательность из 180 а.к. в NS3, по существу, выполняет функцию регуляторного кофактора (Schregel и др, 2009). Как было показано в экспериментах на шимпанзе, разрезание между NS2 и NS3 абсолютно необходимо для развития персистирующей вирусной инфекции (Welbourn и др, 2007).

Неструктурный белок NS3 (67 кДа) обладает активностями химотрипсин-подобной сериновой протеазы, РНК геликазы и НТФазы (Hahn и др, 1995). Совместно с кофактором NS4A обеспечивает разрезание по границам NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A и NS5A/5B, что имеет важное значение для генерации компонентов вирусного репликативного комплекса. Поэтому не удивительно, что это протеаза была первой мишенью для разработки противовирусных препаратов (Lindenbach и др, 2005). NS3 не имеет трансмембранного домена, и при моноэкспрессии обнаруживается диффузно распределенным в ядре и цитоплазме клетки. Однако, при экспрессии совместно с NS4A он нековалентно связывается с центральной областью NS4A, который является мембранным белком и обеспечивает NS3 посадку на мембраны эндоплазматического ретикулума (Wölk и др, 2000).

В дополнение к своей роли в процессинге вирусного полипротеина, протеаза NS3-4A также принимает участие в блокировании развития неспецифического иммунного ответа. Ее целью является белок Cardif, функцией которого является передача сигнала от цитозольных РНК-геликаз, обнаруживших двуцепочечную РНК (продукт репликации многих вирусов), что приводит к активации регуляторного фактора транскрипции интерферона. NS3-

4А меняет конформацию белка Cardif, что приводит к его диссоциации от мембраны митохондрий и нарушению сигнального пути для развития противовирусного иммунного ответа (Morikawa и др, 2011).

С-конец NS3 представляет собой DexH/D-box РНК-геликазу (Haht и др, 1995). Ферменты этого надсемейства способны разделять РНК-РНК дуплексы АТФ-зависимым образом. Хотя мономер NS3 способен связывать РНК с высокой афинностью, для проявления геликазной активности требуется димер белка (Serebrov и др, 2004).

Функция NS3 геликазы в жизненном цикле ВГС до конца не известна. Она может участвовать в инициации/элонгации репликации РНК, разрушая вторичные шпильчатые структуры на концах (+) и / или (-) цепей РНК ВГС, а так же по всей длине матричной РНК. Кроме того, она может быть необходима для диссоциации репликативной формы.

Неструктурный белок NS4В является 27 кДа гидрофобным полипептидом и имеет четыре трансмембранных домена (Lundin и др, 2003). Было показано, что два С-концевых остатка цистеина пальмитированы, что способствует олигомеризации белка и является необходимым для вирусной репликации (Yu и др, 2006). HCV-репликативный комплекс был изучен в Huh7 клетках в 2003 году. Было показано, что мембранная сеть, состоящая из мелких везикул (80-180 нм), встроена в мембраны матрикса и находится в тесной связи с шероховатым эндоплазматическим ретикуломом. NS4В локализует эту сеть, совместно с другими структурными и неструктурными белками (El-Nage и др, 2003). Однако, он способен и самостоятельно индуцировать формирование мембранной сети (Egger и др, 2002). В составе белка NS4В присутствует мотив для связывания нуклеотидов. Этот структурный мотив связывает и гидролизует ГТР. Интересно, что мутации, затрагивающие эту последовательность, влияют на репликацию РНК ВГС (Kim и др, 2004).

Область NS5 у ВГС представлена в виде двух белков (NS5А и NS5В). Неструктурный белок NS5А обладает РНК-связывающей активностью (Huang и др, 2005) и может находиться в двух формах: базально фосфорилированной (56

кДа) и гиперфосфорилированной (58 кДа). Однако, степень и требования к фосфорилированию, по-видимому, различны для разных генотипов и изолятов ВГС. До сих пор функциональная значимость различных форм фосфорилирования неизвестна. Тем не менее, фосфорилирование NS5A является консервативной особенностью среди гепа- и пестивирусов, а также для некоторых флавивирусов. Утверждается, что фосфорилирование играет важную роль в жизненном цикле вируса гепатита С (Reed и др, 1998; Lemm и др, 2010). Кроме того, было обнаружено, что мутации, снижающие гиперфосфорилирование NS5A, могут привести к резкому усилению репликации вирусной РНК (Evans и др, 2004).

В NS5A выделяют три домена, которые разделяются лидерными последовательностями. Консервативный домен DI имеет цинк-связывающий мотив и представляет собой РНК-связывающий домен, который специфично взаимодействует с G/U богатыми последовательностями на 3' конце генома ВГС, предположительно для правильной ориентации репликативного комплекса. Домены DII и DIII являются более вариабельными среди генотипов ВГС. NS5A-DII содержит домены для связывания с ВГС-NS5B и протеинкиназой R (PKR, protein kinase R). Для NS5A-DIII было показано участие в сборке вирусных частиц (Tellinghuisen и др, 2008).

Полноразмерный NS5A имеет цитоплазматическую локализацию. Расщепление каспазами 3 и 6 приводит к образованию усеченных с N-конца фрагментов, которые получают ядерную локализацию. С-концевая область усеченных NS5A может связываться с прото-онкогенной серин/треонин-протеин киназой (c-Raf, proto-oncogene serine/threonine-protein kinase) (Bürckstümmer и др, 2006). Это взаимодействие оказывается существенным для ВГС, как показано на модели репликации ВГС в Huh7 клетках, накопление комплексов C-Raf с усеченным NS5A в ядре, негативно сказывается на репликации ВГС (Sauter и др, 2009). Была обнаружена значимая связь между вариациями в нуклеотидной последовательности (2209-2248) гена NS5A и ответом на лечение интерфероном. Этот участок NS5A (а.к. 237-276) получил

название «регион, определяющий чувствительность к интерферону» (ISDR, interferon sensitivity determining region). Сайт связывания с PKR так же находится в этом участке. У пациентов, имеющих ISDR мутантного типа, был более высокий уровень устойчивого вирусологического ответа, чем у больных с диким типом NS5A ISDR (Tan и др, 2001). Тем не менее, последние исследования ставят под сомнение существование ISDR в NS5A.

NS5B (p56) - является РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp, RNA dependent RNA polymerase). Это мембран-ассоциированный белок, содержащий С-концевой трансмембранный домен (Ivashkina и др, 2002). Как и большинство белков ВГС, NS5B обнаруживается связанным с мембранами эндоплазматического ретикулума (Schmidt-Mende и др, 2001), к которым прикрепляется за счет 21-го гидрофобного аминокислотного остатка на С-конце. Пространственная структура RdRp ВГС подобна структуре других белков этого семейства и позволяет выделить 3 главных домена: ладонь, пальцы и большой палец. (Bressanelli и др, 1999) Домен «ладонь» содержит активный центр фермента, в то время как «пальцы» и «большой палец» взаимодействуют с цепью РНК. Структурной особенностью фермента является активный центр, полностью окруженный в результате взаимодействия между субдоменами «большого пальца» и «пальцами» с образованием туннеля, через который одноцепочечная молекула РНК непосредственно направляется в активный центр (Appel и др, 2006).

Как RdRp, NS5B является ключевым компонентом репликативного комплекса, включающего также NS3, NS4A, NS4B и NS5A (Bartenschlager и др., 2004). Полимераза HCV способна инициировать синтез РНК *de novo*, то есть в отсутствии праймера, и предполагают, что этот механизм используется для инициации репликации *in vivo* (Zhong и др, 2000). Подобно другим изученным РНК-зависимым РНК-полимеразам, RdRp ВГС не имеет редактирующей активности и воспроизводит матрицу со значительным числом ошибок, что и обуславливает высокую вариабельность генома ВГС и наличие пула квазивидов у инфицированного индивида (Simmonds, 2004).

1.2 Классификация ВГС: генотипы, субтипы

В 2011 году Международный Комитет по Таксономии и Номенклатуре Вирусов определил, что вид «Вирус гепатита С» является единственным членом рода *Hepacivirus* в составе семейства *Flaviviridae*. Вид был разделен на 7 генетических групп, на основании геномной гетерогенности. К этим группам также применяется термин «генотип», который в общепринятом значении определяется как «совокупность всех генов организма или клетки», но в номенклатуре вирусов этот термин фактически обозначает таксономическую категорию рангом ниже вида. Процент гомологии нуклеотидной последовательности геномов всех изолятов, относящихся к одному генотипу составляет 65-70% (King, 2011). Внутри каждого генотипа, в свою очередь, выделяют отдельные субтипы, отличающиеся друг от друга на 15-25% по нуклеотидной последовательности полноразмерных геномов. Генотипы обозначаются цифрами от 1 до 7, для обозначения субтипа к номеру генотипа добавляется строчная буква английского алфавита. Названия генотипам и субтипам присваиваются в хронологическом порядке, по мере обнаружения.

Выделяют 2 стадии присвоения изоляту ВГС статуса нового генотипа и субтипа: предварительное присвоение и подтвержденное присвоение. Для предварительного отнесения группы изолятов к новому субтипу необходимо наличие не менее трех изолятов, полученных из эпидемиологически не связанных источников. Для всех изолятов должна быть определена нуклеотидная последовательность Core/E1 (более 90% района 869-1292 н. по последовательности изолята H77(AF009606)) и NS5B области (более 90% района 8276-8615 н. по последовательности изолята H77). Филогенетический анализ должен демонстрировать отдельное группирование изолятов нового субтипа от имеющихся в пределах данного генотипа. Для подтверждения статуса нового субтипа требуется наличие одной и более нуклеотидной последовательности всей кодирующей области генома ВГС и подтверждение об отсутствии рекомбинации.

В настоящее время существуют 3 основные базы данных по последовательностям ВГС: европейская база данных (<http://euhcvdb.ibcp.fr>), японская (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>) и база данных США (<http://hcv.lanl.gov>) Данные об имеющихся в базах данных генотипах и субтипах ВГС на апрель 2015 г. представлены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1 Генотипы и субтипы ВГС

Генотип	Субтип (Всего, n=91/55)
1	<i>a¹</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d²</i> , <i>e</i> , <i>f</i> , <i>g</i> , <i>h</i> , <i>i</i> , <i>j</i> , <i>k</i> , <i>l</i> , <i>m</i> , <i>n</i> (n=14/4)
2	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> , <i>f</i> , <i>g</i> , <i>h</i> , <i>i</i> , <i>j</i> , <i>k</i> , <i>l</i> , <i>m</i> , <i>n</i> , <i>o</i> , <i>p</i> , <i>q</i> , <i>r</i> , <i>s</i> (n=19/7)
3	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> , <i>f</i> , <i>g</i> , <i>h</i> , <i>i</i> , <i>k</i> , <i>l</i> (n=11/3)
4	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> , <i>f</i> , <i>g</i> , <i>h</i> , <i>i</i> , <i>j</i> , <i>k</i> , <i>l</i> , <i>m</i> , <i>n</i> , <i>o</i> , <i>p</i> , <i>q</i> , <i>r</i> , <i>s</i> , <i>t</i> , <i>u</i> , <i>v</i> (n=22/16)
5	<i>a</i> (n=1)
6	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> , <i>f</i> , <i>g</i> , <i>h</i> , <i>i</i> , <i>j</i> , <i>k</i> , <i>l</i> , <i>m</i> , <i>n</i> , <i>o</i> , <i>p</i> , <i>q</i> , <i>r</i> , <i>s</i> , <i>t</i> , <i>u</i> , <i>v</i> , <i>w</i> (n=23/23)
7	<i>a</i> (n=1/1)

¹ - субтипы ВГС со статусом подтвержденного присвоения

² - субтипы ВГС с предварительно присвоенным статусом

Высокая вариабельность ВГС обеспечивает существование «квазивидов» - множество незначительно различающихся геномов в пределах одного инфицированного организма. Выделяют мажорную или наиболее часто выявляемую последовательность, все другие варианты нуклеотидной последовательности носят название минорных. Различия в нуклеотидной последовательности квазивидов оценивают на уровне 1-14%. Существование квазивидов объясняют уклонением вируса от иммунного ответа, поскольку наблюдается эволюция наиболее иммунологически значимых районов генома.

Наиболее вариабельный район генома ВГС – HVRI (Curran и др., 2002). Высокая вариабельность присуща так же генам поверхностных гликопротеинов, гену NS2, районам антигенных детерминант NS4, гену NS5A и

части 3'-UTR (кроме 3'-X), в то время как область 5'-UTR, С-концевая часть NS4B, ген белка Core и 3'-концевая дополнительная последовательность представляют собой наиболее консервативные участки генома ВГС, обеспечивая функциональную целостность генома (Kato, 2000).

1.3 Клинические аспекты генотипов ВГС

Изучение генотипического разнообразия ВГС имеет значение, главным образом, для молекулярно-эпидемиологических исследований и определения тактики интерферонотерапии при лечении ВГС инфицированных пациентов.

В современных молекулярно-эпидемиологических исследованиях ВГС используются данные по молекулярной вариабельности генома ВГС для идентификации источника заражения, исследования путей передачи вируса. Генотип ВГС рассматривают как самостоятельный фактор в многомерном исследовании (например, при построении прогнозной модели эффективности лечения). Известно, что разные генотипы вируса могут иметь различную географическую встречаемость и их распространение может происходить из различных источников (популяций, регионов и т.д.).

Определение генотипа ВГС имеет немаловажное значение при проведении противовирусной терапии. Достижение стойкого вирусологического ответа (СВО) является главной целью терапии пациентов с ВГС инфекцией. Главными критериями СВО считают исчезновение вирусной РНК из сыворотки крови в конце терапии и её отсутствие в течение 6 месяцев после окончания лечения (Poordad и др., 2012). Успех применяемой терапии зависит от взаимодействия вирусных, хозяйских, клинических факторов, изучению которых отводится значительная роль. К известным факторам, влияющим на исход интерферонотерапии относятся: возраст (реакция на лечение лучше у пациентов моложе 40 лет в сравнении с пожилыми людьми) и пол (лечение эффективнее для женщин) пациента; высокая интенсивность виремии связана с плохим ответом; иммунодефицитные состояния, ко-инфекция ВИЧ или гепатитом В, чрезмерное употребление алкоголя осложняет

лечение ВГС-инфекции (Contreras и др., 2010). Установлено, что генотип является одним из важнейших прогностических факторов устойчивого вирусологического ответа (Munir и др., 2010). Стандартная схема лечения пациентов с хроническим гепатитом С – это использование пролонгированных форм интерферона- α (ИНФ- α 2a, ИНФ- α 2b) в сочетании с рибавирином. При лечении пациентов, имеющих генотип 1 ВГС, СВО достигается в 55% случаев, тогда как у лиц с генотипом 2 или 3 – более чем в 80%. Поэтому рекомендованы разные схемы лечения пациентов в зависимости от генотипа: 1) для пациентов с хроническим гепатитом С, инфицированных генотипом 2 или 3, оптимальным является продолжительность лечения 24 недели и ежедневная доза рибавирина 800 мг, 2) для лиц с генотипом 1 продолжительность терапии составляет 48 недель при стандартной дозе рибавирина 1000-1200 мг в день (Poynard и др., 1998). Однако, как показали недавние исследования, проведенные среди медленно реагирующих на терапию пациентов с генотипом 1 ВГС, вероятность достижения СВО была значительно выше ($OR=1,44$) у получивших 72-недельную терапию, по сравнению с теми, кто получал интерферон+рибавирин только рекомендованные 48 недель (Alavian и др., 2011). Терапевтический ответ на лечение носителей других генотипов (4, 5, 6) ВГС в настоящий момент изучается, пока рекомендовано лечение по схеме, существующей для генотипа 1.

Невыясненными остаются вопросы касающиеся влияния генотипа ВГС на тяжесть течения инфекции гепатита С, скорость развития заболевания, успех трансплантации печени. Представители всех генотипов и субтипов ВГС являются гепатотропными, могут вызывать развитие хронической инфекции, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы. Однако, в ряде исследований было показано, что субтип 1b может быть связан с более тяжёлым течением гепатита, быстрым развитием декомпенсированной стадии заболевания, требующей трансплантацию печени (Zein, 2000). Генотип 3 ассоциируют с более быстрым прогрессированием фиброза (Probst и др., 2011), а также с развитием стеатоза (жирового гепатоза) вне зависимости от индекса массы тела пациента (Ramalho,

2003). Кроме того, отмечают взаимосвязь между генотипом 4 и частотой развития рака печени (El-Serag, 2012). Неоднозначность в вопросах, касающихся взаимосвязи генотипа и прогрессирования гепатита С, может быть связана с невозможностью установить момент заражения, трудностями в организации длительного наблюдения за ВГС инфицированными пациентами из-за медленного и бессимптомного течения инфекции ВГС.

1.4 Эпидемиологические аспекты ВГС, основные пути распространения

Эпидемиологические данные о распространенности ВГС и факторы риска его передачи имеют важное значение для осуществления мер по предупреждению распространения инфекции. Сравнение эпидемиологических данных в течение длительного периода времени может позволить сделать выводы об изменении основных факторов риска и об успехе существующих превентивных программ.

Полноценной оценке эпидемиологической обстановки с ВГС в мире мешают некоторые ограничения, не позволяющие адекватно сравнить таковую в разных странах. В первую очередь это касается оценки общего количества инфицированных ВГС индивидуумов. В некоторых странах, например Австралии, большое внимание уделяется оценке размера групп высокого риска, в частности потребителей инъекционных наркотиков, данные о которых включаются в оценку общего уровня инфицирования. В других странах, таких как США, Франция, Германия определение уровня ВГС основано на исследованиях общей популяции, что, вероятно, исключает из оценки многих потребителей наркотиков, а также некоторые другие группы населения, и приводит к недооценке истинного уровня распространения. Так Chak в своем исследовании групп населения, не вошедших в категорию учета ВГС NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) таких, как заключенные, бездомные, проживающие в домах престарелых, госпитализированные и находящиеся на военной службе, показал, что включение этих групп увеличит

встречаемость ВГС на 27% (Chak и др, 2011). Такие страны, как Швейцария и Индия, оценивают уровень распространения ВГС по данным из банка крови и/или по исследованиям, включающим только беременных женщин, что также занижает истинную встречаемость ВГС. Поэтому, несмотря на невозможность прямого сравнения ситуации с ВГС в разных странах, стоит отметить, что истинная распространенность ВГС, вероятно, выше, чем это обычно сообщается.

Кроме того, практически всюду отсутствуют хорошие источники данных о числе новых случаев инфицирования. Там, где они представлены, часто невозможно отличить случаи острого и хронического гепатита. Те же страны, которые имеют хорошую систему учета, например, Швеция, показывают более высокий уровень числа новых инфекций, по сравнению с другими странами (Rantala и др, 2008).

С другой стороны, необходимо признать, что уровень ВГС-инфекции, описанный в большинстве случаев, основан на количестве анти-ВГС положительных образцов в скрининге, что не всегда верно отражает количество случаев хронического гепатита. По разным данным спонтанно излечиваются от 15 до 50% пациентов с острым гепатитом С (Thomas и др, 2005; Gerlach и др, 2003), поэтому, вполне вероятно, что количество пациентов с хроническим гепатитом С на 15-50% ниже, чем число первично инфицированных. В связи с этим, определить точное число ВГС инфицированных пациентов весьма затруднительно. Тем не менее предполагается, что в настоящее время в мире инфицировано более 170 миллионов человек, из них 11,3–14,7 млн. приходится на взрослое население Европы, включая Россию и Турцию (Cornberg и др, 2011); 42,3 – 57,0 млн. на Азию (Sievert и др, 2011), 6,8-8,9 млн. на страны Латинской Америки (Kershenovich и др, 2011). Китай (13 млн.), Индия (9,5 млн.) и Египет (6,5 млн.) – страны с наибольшим числом инфицированных ВГС. При этом один Китай имеет больше случаев ВГС-инфекции, чем вся Европа или обе Америки (Cornberg и др, 2011).

В процентном выражении уровень распространенности ВГС-инфекции в разных странах варьирует от 0,4% - 5,2% для европейских стран, с наиболее благополучной обстановкой (<1%) в Германии, Швеции, Норвегии, Франции. Россия занимает в этом списке промежуточное положение с встречаемостью ВГС – 2,5%. Аналогичная обстановка (2-3%) в странах Латинской Америки. Северная Америка, Австралия и большая часть Азии имеют от 1 до 2% инфицированных ВГС. Лидерами среди стран с наиболее неблагоприятной обстановкой являются Египет (15%), Италия (5,2%), Пакистан (4,7%), но даже эти цифры отражают лишь общую обстановку, тогда как в некоторых областях Египта, расположенных вдоль Нила, показатели распространенности достигают 22% (El-Zanaty и др., 2009), а в Пенджабе, самой густонаселенной провинции Пакистана – 30% (Ali и др., 2009).

Различия в уровне встречаемости, а также динамика распространения ВГС-инфекции внутри страны или между странами достаточно часто объясняются местными особенностями в путях передачи и различным уровнем общественного здравоохранения.

По-прежнему, основными факторами риска остаются употребление наркотиков и различные медицинские процедуры. При этом в странах с хорошо поставленными программами скрининга донорской крови употребление наркотиков является ведущим фактором риска. Например, в странах Северной Европы потребители инъекционных наркотиков составляют более половины инфицированных пациентов (65% для Швеции, 67% - Норвегии, 90% - Великобритании). В то время как для стран Азии, Африки и Латинской Америки на первое место выходят риски, связанные с различными медицинскими процедурами, такими как: переливание крови (38-75% - Индия, 64-72% - Мексика), повторное использование шприцов и игл (75%(суммарно вместе с переливанием крови) – Китай, 61% - Пакистан), гемодиализ (49% - Сирия, 44% - Перу). Для некоторых областей характерны специфические риски, связанные с культурными традициями или местными особенностями. Многократное инъекционное лечение шистосомоза в прилегающих к Нилу

областях Египта, где это заболевание очень распространено, является ведущим фактором риска в данном регионе (29,6%). Различные культурные традиции Индии и Пакистана, такие как, публичное бритье бород и других частей тела общими бритвами, вносит немалый вклад в распространение ВГС-инфекции в данном регионе (Jokhio и др, 2010). Татуировки, акупунктура, принятые в азиатских странах, являются значимым фактором риска в этом регионе (Nguyen и др, 2007). Некоторые риски в настоящее время являются историческими, вследствие изменений, внесенных в практику иммунизации и переливания крови, но они еще в прошлом обеспечили значительных процент инфицированных ВГС. Внутрибольничное инфицирование и переливание крови до начала скрининга – главные факторы, обеспечившие широкое распространение ВГС среди пожилого населения Японии, и на сегодняшний день они являются причиной 30% всех случаев ВГС-инфекции в этой стране. Среди молодого населения Японии важным фактором риска до сих пор является употребление наркотиков.

Употребление инъекционных наркотиков как основной фактор риска передачи ВГС практически везде связано с молодым возрастом и обеспечивает пик заболеваемости ВГС, приходящийся на возраст 25-30 лет, с более высоким соотношением количества мужчин к количеству женщин (70% инфицированных ВГС в Швеции - мужчины) (Duberg и др, 2011). Это может быть объяснено различиями в рискованном поведении мужчин и женщин и тем, что употребление наркотиков чаще встречается среди мужчин. Косвенно это подтверждается тем, что в странах с низким уровнем употребления наркотиков ВГС более распространен у женщин, как у лиц чаще обращающихся за медицинской помощью (Chlabicz и др, 2006).

Распределение генотипов также связано с различными путями передачи инфекции. Субтипы 1a и 3a связывают с употреблением наркотиков, в то время как субтип 1b чаще передается с продуктами крови (Esteban и др, 2008). В соответствии с этим, субтипы 1a и 3a встречаются с большей частотой в странах, где употребление наркотиков является основным фактором риска

ВГС-инфекции. В странах Восточной Европы: России, Польше, Чешской Республике уровень ВГС-инфицированности увеличился вслед за сильным ростом употребления внутривенных наркотиков. Следствием этого стало возрастание доли субтипов 1a и 3a в Чешской Республике с 23 и 3% соответственно в 2001 году, до 40,5 и 23,5% в 2009 (Krekulova и др, 2001; 2009). Несмотря на то, что некоторые исследования показывали незначительную роль употребления наркотиков в распространении ВГС в Польше (Chlabicz и др, 2006), эпидемиологические данные, такие как соотношение мужчин/женщин, увеличение доли субтипа 3a, и то, что встречаемость ВГС выше среди городского населения по-сравнению с сельским все-таки свидетельствуют о ведущей роли этого фактора риска.

Между тем в западных странах идет спад в выявлении новых случаев ВГС. В Канаде было зарегистрировано 12039 случаев в 2008 году, по сравнению с 17781 в 2000г. В Германии отмечают ежегодное уменьшение заболеваемости на 10% в год, что связывают с метадоновой программой. Аналогично во Франции снижается заболеваемость ВГС в группе 20-59 лет, предполагается, что это – следствие эффективно действующей программы по замене игл. Параллельно снижается значение употребления наркотиков как фактора риска, если в 1997 г. 51% новых случаев ВГС-инфекции были связаны с употреблением наркотиков, то в 2003 – 31% (Defosseze и др., 2008).

Употребление наркотиков не является на сегодняшний день ведущим фактором риска заражения ВГС для сельской местности и территорий с ограниченными возможностями медицинской помощи. Основным генотипом, связанным с передачей ВГС посредством медицинских процедур, является 1b. Отмечено, что среди турок, проживающих за рубежом, где употребление наркотиков может быть основным фактором риска, часто выявляют генотип 1a (60%), в то время как у пациентов, проживающих в Турции, в подавляющем большинстве случаев обнаруживают генотип 1b и с употреблением наркотиков связывают только 4% случаев ВГС (Turhan и др, 2005).

Высокую распространенность ВГС в отдельных частях южной Италии связывают с использованием многоразовых стеклянных шприцев (Fusco и др., 2008). Ретроспективное исследование, проведенное в Испании, связало значительную часть случаев инфицирования ВГС с госпитализацией (67%). При этом из 73 пациентов, у которых госпитализация была единственным фактором риска, 33 были прооперированы, 24 оказывалась экстренная помощь, остальные 16 пациентов подвергались действию инвазивных диагностических или терапевтических процедур (Martínez-Bauer и др., 2008). Возрастающая с возрастом распространенность и отсутствие гендерных различий также свидетельствуют о том, что нозокомиальные факторы риска определяют распространение ВГС в этих районах.

Для регионов с частыми случаями внутрибольничных инфекций (особенно это касается ряда стран Азии и Африки) важное значение имеет поддержание санитарии на высоком уровне и соблюдение протоколов о стерилизации оборудования и применение других гигиенических мер по предотвращению дальнейшего распространения ВГС.

Несомненный вклад в распространение ВГС инфекции вносит иммиграция. Вследствие глобализации, а также исторических и политических взаимоотношений со странами с высокой эндемичностью, иммиграция приводит к увеличению распространенности инфекционных заболеваний. Иммиграция – основной источник увеличения населения в Израиле, а 70% в настоящий момент инфицированного HCV населения родились в бывшем Советском Союзе (Kerzman и др., 2007). В Швейцарии одна треть инфицированных родились за пределами страны (Negro, 2010). В Германии 35% больных гепатитом С имеют не немецкое происхождение, 20% из них – немецкие переселенцы, возвращающиеся из стран бывшего СССР (Nürpe и др., 2008). В Великобритании иммиграция из исторически связанных с ней стран с высоким уровнем гепатита С (Индия, Пакистан) имеет существенное влияние на распространение ВГС. Иммиграция также приводит к изменению в распределении генотипов ВГС. Примером является высокая

распространенность гепатита С генотипа 4 в Греции из-за иммиграции из Африки (Savvas и др., 2005).

1.5 Географическое распределение генотипов ВГС

Генотипы ВГС в мире имеют различную встречаемость, в зависимости от страны, географического региона или континента. На Рис. 1.3 приведено распределение изолятов ВГС по субтипам и генотипам в разных странах.

На этом рисунке видно, что генотипы 1, 2 и 3 широко распространены и встречаются практически повсеместно. С наибольшей частотой обнаруживаются субтипы 1a, 1b и 3a что является следствием их попадания в группу с высоким фактором риска передачи ВГС. При этом субтип 1a превалирует в Северной Америке (США и Канада), Южной Америке (Бразилия) и некоторых европейских странах (Норвегия, Великобритания), а субтипы 1b и 3a встречаются на данных территориях с меньшей частотой. Субтип 1b характерен для стран Южной и Восточной Европы, Северной Африки, Мексики, Аргентины, Австралии, Японии, где так же, иногда в значительном количестве, выявляют субтипы 1a и 3a. Минорными субтипами в странах со значительным преобладанием 1 генотипа обычно являются 2a, 2b, 2c, 4.

Другой характер распространения характерен для субтипов генотипа 2. В то время как субтипы 2a, 2b и 2c распространены достаточно широко, значительная часть субтипов этого генотипа выявляется в Западной Африке, что объясняется эндемичностью генотипа 2 на данной территории, приведшей к появлению множества субтипов в результате эволюции в течение значительного периода времени (Candotti и др, 2003).

Генотип 3 является эндемичным для района Юго-Восточной Азии, где в настоящее время обнаружены субтипы 3a-3k. Наибольшее разнообразие субтипов обнаружено в Индии, где, кроме доминантных субтипов 3a и 3b, циркулируют 3c, 3f, 3g, 3i и 3k (Sievert и др, 2011; Lole и др, 2003). Подобное генетическое разнообразие указывает на исходное появление общего предка

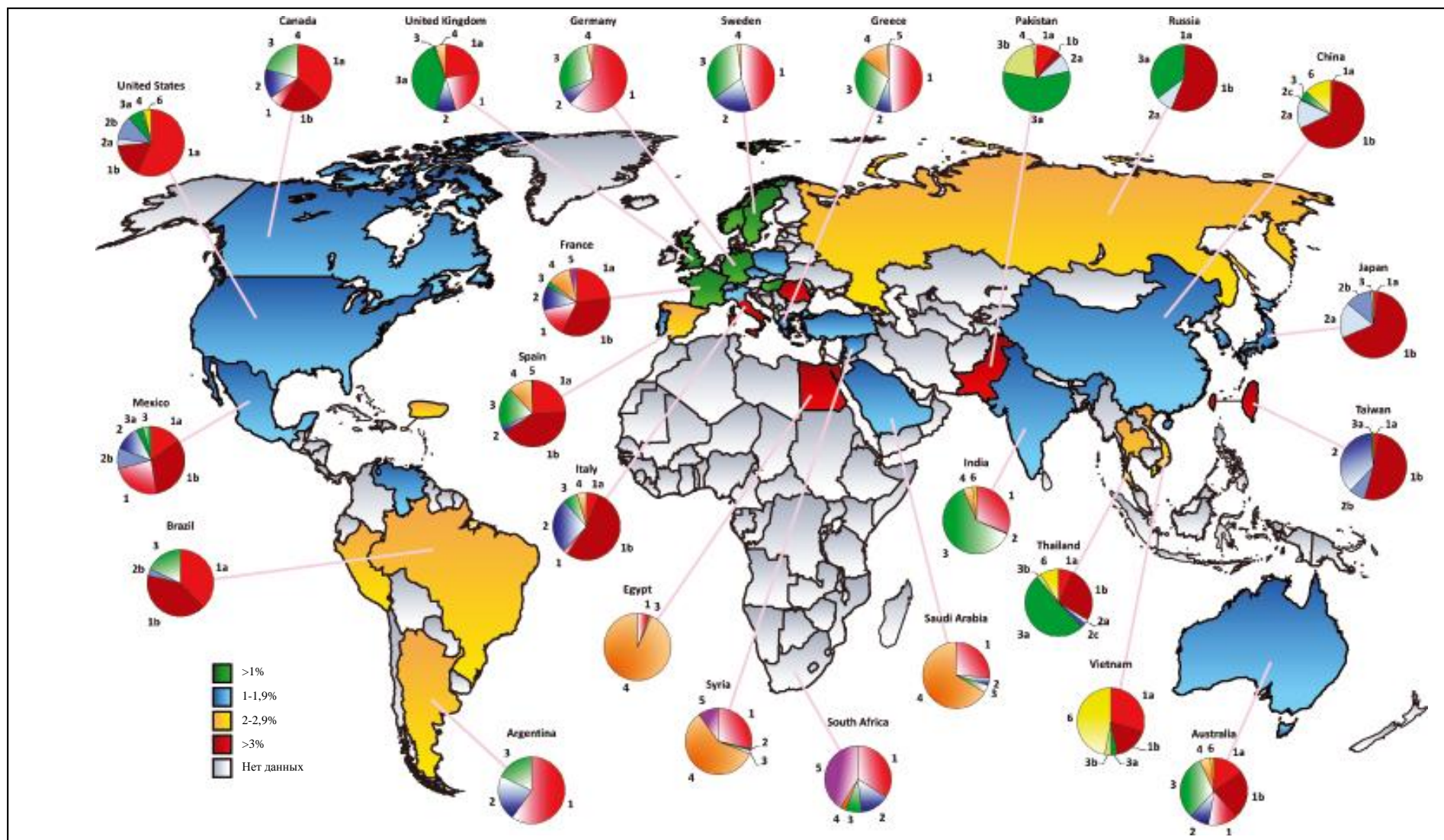


Рис.1.3 Встречаемость ВГС среди взрослого населения и распределение генотипов в мире (Cornberg и др., 2011).

изолятов генотипа 3 на данной территории (Mellor и др, 1995). Предполагается, что изоляты этого генотипа, особенно субтипа 3a, распространяются по всему миру из этого региона (Афганистан, Пакистан, Тайланд) вместе с наркотиками, предназначенными для внутривенного употребления.

Генотипы 4, 5 и 6 в отличие от вышеописанных генотипов встречаются только в определенных географических регионах и вместе составляют около 20% случаев ВГС в мире. В странах Ближнего Востока, таких как Египет,

Саудовская Аравия и Сирия преимущественно выявляют ВГС 4 генотипа (Sievert и др, 2011). Так же он широко распространен в Центральной Африке (Njouom и др, 2003). В последнее время 4 генотип выявляется и в Европе, особенно среди потребителей инъекционных наркотиков и иммигрантов. Генотип 5 характерен для стран Южной Африки, где он является доминирующим, и доля его там составляет >40% от всех генотипов ВГС. Однако и он начинает распространяться за пределы своего ареала: так, неоднократно выявляли ВГС 5 генотипа во Франции, Испании, Сирии, Бельгии и спорадические случаи были зафиксированы в других местах (Antaki и др, 2010). Изоляты генотипа 6 встречаются исключительно в странах Юго-Восточной Азии: Гонконге, Вьетнаме и других, с наибольшей концентрацией в Тайланде. За пределами этого региона его выявляют у американцев и австралийцев азиатского происхождения (Sievert и др, 2011).

В России доминирующим субтипом является субтип 1b (Kalinina и др., 2001; Shustov и др., 2005). Выполненные в 1997 году исследования по типированию изолятов ВГС, выявленных в образцах сывороток из европейской части России (337), Уральского региона (19), Восточной Сибири (39) и Дальнего востока (28) показали, что на территории России циркулируют субтипы 1a, 1b, 2a, 2b и 3a со значительным преобладанием субтипа 1b (65%). При этом были выявлены некоторые закономерности распределения генотипов: так субтип 1a обнаруживали преимущественно в городах европейской части (21% в Санкт-Петербурге), частота встречаемости генотипа 2 возрастала в

направлении с запада на восток и снижалась в том же направлении для субтипа 3a (Lvov и др., 1996).

Однако картина распределения генотипов на любой выбранной территории со временем изменяется, что связано с проникновением новых субтипов или сменой ведущего фактора риска, поскольку распределение генотипов также связано с различными путями передачи инфекции. Так субтипы 1a и 3a связывают с употреблением наркотиков, в то время как субтип 1b чаще передается с продуктами крови (Esteban и др., 2008). Это было показано в Санкт-Петербурге при сравнении изолятов ВГС, выявленных у пациентов отделения гемодиализа (1b-89%, 3a-7%) и представителей общей популяции Санкт-Петербурга, вне зависимости от наличия в анамнезе употребления наркотических средств (3a-50%, 1b-39%) (Kalinina и др., 2001), а также лиц употребляющих наркотики внутривенно (3a-57%, 1b-29% и 1a-12%) (Paintsil и др., 2009). В Якутии, у больных хроническим гепатитом С выявляли субтип 1b в 77%, а 3a в 10% случаев, в то время как у потребителей наркотиков 1b обнаруживали в 43%, а 3a в 36% случаев (Семенов и др., 2009). До введения обязательного скрининга крови в 1994 году, основным фактором риска передачи ВГС являлись медицинские процедуры, следствием чего явилось повсеместное распространение субтипа 1b. В настоящее время, из-за роста употребления внутривенных наркотиков в России наблюдается возрастание доли субтипов 1a и 3a (Kuzin и др., 2011).

1.6 Понятие рекомбинации ВГС, данные об известных рекомбинантах всех типов

Дополнительным механизмом, обеспечивающим генетическую изменчивость вирусов, является рекомбинация. Этот процесс, как правило, имеет важное значение для большинства РНК-содержащих вирусов. Однако до недавнего времени данные о рекомбинации ВГС считались сомнительными (Yun и др., 1996), и предполагалось, что эти события крайне редки в естественных условиях, а образующиеся рекомбинанты, как правило,

нежизнеспособны (Viazov и др, 2000). Тем не менее, в последнее десятилетие были обнаружены и подтверждены естественные рекомбинанты ВГС как межгенотипные, так и внутригенотипные (межсубтипные), а также внутрисубтипные, что изменило представление о возможности рекомбинации для этого вируса. Предыдущее мнение об отсутствии рекомбинации ВГС было основано на следующих причинах. Во-первых, до 2002 года не было выявлено и убедительно охарактеризовано ни одного рекомбинантного изолята ВГС (Kalinina и др, 2002). Кроме того, существуют экспериментальные доказательства того, что в ВГС-инфицированных клетках предотвращается суперинфекция другими изолятами ВГС (Tscherne и др, 2007). Учитывая, что для свершения акта вирусной рекомбинации необходимо одновременное заражение одной и той же клетки двумя различными вирусными частицами, невозможность подобной суперинфекции предотвращает появление рекомбинантных изолятов (González-Candelas и др, 2011).

Тем не менее, в 1999 году при исследовании образцов, собранных от ВГС инфицированных жителей Санкт-Петербурга, были получены противоречивые результаты. Так, дополнительное определение нуклеотидной последовательности района 5'UTR-core для 146 ранее секвенированных по гену NS5b изолятов выявило несоответствие результатов генотипирования. 6 образцов были отнесены к субтиту 2k при анализе района 5'UTR-core, в то время как филогенетический анализ фрагмента гена NS5b отнес их к субтипу 1b. Для остальных изолятов подобных генотипических расхождений получено не было. Эти 6 изолятов, полученные от разных пациентов, формировали отдельные кластеры на филогенетических деревьях, построенных для обоих исследуемых районов генома, располагаясь при этом на ветвях, образованных разными генотипами, что косвенно свидетельствовало об общем рекомбинантном происхождении этих изолятов. В дальнейшем была подтверждена точка рекомбинации, расположенная в гене NS2 между нуклеотидами 3175 и 3176 (Kalinina и др, 2002), а изолят получил название RF1_2k/1b.

После этого первого случая обнаружения и подтверждения рекомбинации сообщения о новых естественных рекомбинантах ВГС стали появляться достаточно часто. Так, при обследовании пациентов с хроническими заболеваниями печени в Перу был обнаружен внутригенотипный рекомбинантный изолят P22, относящийся к субтипу 1b при генотипировании региона 5'UTR-core и – к субтипу 1a при генотипировании NS5b. Установлена точка рекомбинации в позиции 8321, что соответствует началу гена NS5b. Этот изолят было предложено назвать RF2_1a/1b, по аналогии с рекомбинантным изолятом из Санкт-Петербурга (Colina и др, 2004).

Далее, среди образцов, полученных от доноров крови во Вьетнаме в 2000-2002 годах, два также показали различные результаты генотипирования при исследовании районов гена Core и NS5b. Для одного из них было установлено наличие микст инфекции, для второго подтверждена рекомбинация (Norppornpanth и др, 2006).

Данные обо всех обнаруженных на текущий момент рекомбинантных изолятах ВГС, имеющих естественное происхождение с подтвержденной точкой рекомбинации, представлены в Таблице 1.2. Все они, за исключением изолятов типа 2b/1a, 2b/1b и 2k/1b, были выявлены однократно. Рекомбинантные изоляты ВГС типа 2b/1a, 2b/1b и 2k/1b, , впоследствии определяли и в других исследованиях (Moreau и др., 2006; Tallo и др., 2007; Kurbanov и др., 2007; 2008; Demetriou и др., 2009; Morel и др., 2010; Viazov и др., 2010; Raghwanі и др., 2012; Hedskog и др., 2015). Филогенетический анализ пяти геномных последовательностей изолятов 2b/1a и четырех 2b/1b не показал никакой видимой кластеризации рекомбинантных последовательностей друг с другом, что свидетельствует об их происхождении в результате индивидуальных событий рекомбинаций (Hedskog и др., 2015). Напротив, рекомбинантные изоляты ВГС типа 2k/1b, впервые обнаруженные в Санкт-Петербурге, проявляют филогенетическую общность, образуя отдельную кладу при сравнении с изолятами субтипов 1b и 2k. Что является аргументом в пользу их происхождения в результате единственного акта рекомбинации, а не

Таблица 1.2 Естественные рекомбинантные изоляты ВГС

Изолят	Место обнаружения	Расположение сайта рекомбинации*	Регистрационный номер(a) Genbank	Ссылка
Межгенотипные рекомбинанты				
RF1_2k/1b	Россия	ген NS2, н. 3175-3176	AY587845	(Kalinina и др., 2002)
D3, 2i/6p	Вьетнам	начало NS3, между н. 3405 и 3464	DQ155560	(Noppornpanth и др., 2006)
SE-03-07-1689, RF3_2b/1b	Филлипины	начало NS3, н. 3466-3467	DQ364460	(Kageyama и др., 2006)
RI, 2/5	Франция	начало NS3, между н. 3420 и 3440	AM408911	(Legrand-Abravanel и др., 2007)
D177, RF_2b/6w	Тайвань	начало NS3, н. 3429	EU643835	(Lee и др., 2010)
HC10-0804, 2b/1b	Япония	начало NS3, н. 3443-3444	AB622121	(Yokoyama и др., 2011)
JF779679, 2b/1a	США	начало NS3, н. 3405-3416	JF779679	(Bhattacharya и др., 2011)
Внутригенотипные/межсубтипные рекомбинанты				
PE22, RF2_1b/1a	Перу	ген NS5b, н. 8321	AJ582127 AJ582131 AJ582134	(Colina и др., 2004)
HC-J1, 1a/1c	Япония	2 сайта в районе E1-E2b, н. 1407 и 2050	D10749	(Cristina и др., 2006)
Khajal, 1a/1c	Индия	5 сайтов в районе Core-NS3, н. 801, 1261, 2181, 3041, 3781	AY651061	(Ross и др., 2008)
H23, 1b/1a	Уругвай	ген Core, н. 387	EU934902-07	(Moreno и др., 2009)
Внутрисубтипные рекомбинанты				
1b	Испания	ген NS5b, а.к. 2243	AY378694	(Moreno и др., 2006)

* согласно нумерации нуклеотидов изолята pJ6CF субтипа 2a, уникальный шифр базы данных GenBank AF177036).

множественных событий с участием аналогичных родительских изолятов. На сегодняшний день эти изоляты образуют единственную известную циркулирующую рекомбинантную форму (CRF - рекомбинантная форма, которая была выявлена неоднократно у различных пациентов) ВГС. Поэтому, по аналогии с номенклатурой, принятой для рекомбинантов ВИЧ-1, эту форму предложено было назвать CRF01_1b2k (Kuiken и др., 2009).

Интересно отметить, что точка рекомбинации для всех межгенотипных рекомбинантов всегда располагается на стыке генов NS2 и NS3, а 5' часть генома всегда относится ко второму генотипу. В то время как межсубтипные рекомбинантные изоляты образованы только субтипами первого генотипа, без какого-либо определенного группирования сайтов рекомбинации.

Кроме вошедших в таблицу рекомбинантных изолятов, существует еще ряд предполагаемых рекомбинантов, для которых не был установлен сайт рекомбинации. Сообщение о первом таком случае появилось еще в 1996 году (Yun и др., 1996), когда было отмечено несоответствие результатов генотипирования по двум разным регионам генома для двух изолятов ВГС, выделенных в Гондурасе. Хотя дальнейшие исследования по установлению точки рекомбинации не проводились, это несоответствие может свидетельствовать о существовании рекомбинантного изолята 1a/3a. Сайт рекомбинации также не был установлен для предполагаемых межгенотипных рекомбинантных изолятов 3a/1b и 2a/1a, выделенных на Тайване (Lee и др., 2010) и для предполагаемого межсубтипного рекомбинантного изолята R49, обнаруженного в Португалии и являющегося результатом рекомбинации субтипов 4a и 4d (Calado и др., 2011). Поскольку для этих изолятов не подтвержден сайт рекомбинации, мы не можем быть абсолютно уверены в том, что имеем дело с рекомбинантным изолятом, а не случаем микст-инфекции.

Исходная необходимость для формирования рекомбинантного штамма — это одновременное заражение хозяина двумя различными изолятами а также их одновременное присутствие в одной и той же клетке. Это могут быть вирусные квазивиды, что является предпосылкой для образования внутрисубтипных

рекомбинантов, или микст-инфекция – для внутри- и межгенотипных рекомбинантов. Однако, хотя микст-инфекции ВГС или суперинфекция обнаруживаются, особенно после переливания крови, пересадки органов и гемодиализа, а также среди внутривенных наркоманов, весьма редкое образование жизнеспособных рекомбинантных штаммов говорит о существовании определенных лимитирующих факторов.

Одним из таких факторов может быть известное разделение ВГС-вариантов между плазмой крови и мононуклеарами периферической крови (МПК), когда вследствие автономной репликации ВГС в МПК, квазивиды, циркулирующие в плазме крови, отличаются от содержащихся в МПК (Okuda и др, 1999). Были описаны случаи выявления в плазме крови и МПК ВГС различных генотипов и субтипов. Так, при циркулирующем в плазме крови ВГС субтипа 1a, МПК содержали ВГС субтипов 1a и 1b, при этом только В-клетки содержали субтип 1b, а моноциты и CD8 Т-лимфоциты – циркулирующий 1a. В другом случае, при наличии в плазме крови ВГС генотипа 4, в МПК выявляли ВГС генотипов 4 и 1 (генотип 1 – в В- и CD8 Т-клетках, генотип 4 в моноцитах). Эта генотипическая раздробленность сохранялась, по крайней мере в течение года, и как предполагается, является результатом микст-инфекции (Roque-Afonso и др, 2005).

Как было показано для некоторых РНК-вирусов, суперинфекция исключает возможность последующей коинфекции. На сегодняшний день только исследования на культуре клеток могут показать, так ли это для ВГС (Tscherne и др, 2007). *In vitro* было показано, что при одновременном заражении клетки двумя различными изолятами ВГС наблюдалась совместная репликация, в то время как клетки, инфицированные ВГС, были устойчивы к вторичному заражению. С другой стороны, исследования множественной инфекции ВГС, а так же суперинфекции показывают, что один из изолятов быстро начинает превалировать над остальными, и этот доминантный изолят способен вызывать как первичную, так и вторичную инфекцию (Laskus и др, 2001). И если два

различных изолята успешно инфицируют одну и ту же клетку, рекомбинация может произойти.

Описано 2 механизма рекомбинации: репликативный и нерепликативный, и каждый имеет свои ограничения. Процесс рекомбинации может встречать препятствия на различных уровнях, что мешает частому появлению жизнеспособных рекомбинантов (Worobey и др, 1999). Эти ограничения, так же, как и более слабый уровень репликации рекомбинантного штамма по сравнению с родительскими, могут объяснять низкую частоту выявления рекомбинантных изолятов.

Наиболее популярная теория образования рекомбинантных изолятов ВГС включает репликативный механизм, описанный для других РНК вирусов и известный так же как «copy-choice model» «template-switching mechanism». Он подразумевает синтез рекомбинантной цепи в два этапа: 1. синтез РНК с матрицы-донора, последующая остановка RdRp и диссоциация репликативного комплекса от матрицы; 2. связывание RdRp с матрицей-акцептором с образованием нового репликативного комплекса, и переключение с копирования матрицы-донора на копирование матрицы-акцептора без высвобождения синтезируемой цепи. Этот механизм зависит от наличия специфических последовательностей, а так же требует особой вторичной структуры РНК.

В случае RF1_2k/1b были обнаружены две стабильные шпильчатые структуры HS1 и HS2, расположенные до и после точки рекомбинации в «+» цепи родительских генотипов 1b и 2k. Но при этом они отсутствуют у известных рекомбинантов 2k/1b и в «-» цепи генотипов 1b и 2k. Район между шпильками HS1 и HS2 содержит короткий участок (н. 3177-3188), высококонсервативной для всех генотипов нуклеотидной последовательности, которая может служить в качестве матрицы при повторной инициации синтеза РНК на акцепторной РНК. А последовательность поли(А) (н. 3270-3275), характерная для субтипа 2k, играет роль промотора. Несмотря на то, что в случае ВГС, синтез «+» цепи РНК происходит чаще, чем синтез «-» цепи,

наиболее вероятно, что рекомбинация произошла во время синтеза «-» цепи РНК с РНК родительского генотипа 1b в качестве матрицы-донора и РНК генотипа 2k в качестве матрицы-акцептора (Kalinina и др, 2004).

Репликативный механизм формирования 2i/6 также был подтвержден. В регионе вокруг точки рекомбинации была обнаружена нуклеотидная последовательность с высокой степенью гомологии между двумя предполагаемыми родительскими генотипами и стабильные шпилечные структуры в «+» цепи референсного изолята шестого генотипа (Noppornpanth и др, 2006).

Присутствие последовательности второго генотипа в структурной части генома межгенотипных рекомбинантных изолятов косвенно подтверждает, что этот генотип необходим для рекомбинации ВГС, особенно на втором этапе образования репликативного комплекса и повторной инициации репликации, подразумевая, что не все генотипы ВГС способны к рекомбинации (Morel и др, 2011).

Второй возможный механизм рекомбинации – это нерепликативное воссоединение разрывов. Этот механизм хорошо описан для ДНК-содержащих вирусов, но мало известно о его роли в процессе рекомбинации РНК-вирусов. Несколько исследований подтверждают существование нерепликативной РНК рекомбинации для Q β бактериофага *in vitro* (Chetverina и др, 1999) и полиовирусов *in vivo* (Gmyl и др, 1999), однако только в присутствии вирусной полимеразы. Еще одна публикация описывает RdRp-независимый механизм *in vivo* рекомбинации BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus, вирус диареи крупного рогатого скота), принадлежащем семейству *Flaviviridae* (Gallei и др, 2004). Однако еще предстоит выяснить, возможен ли этот механизм для ВГС.

Стандартным методом обнаружения рекомбинации между различными генотипами и субтипами ВГС является генотипирование, основанное на филогенетическом анализе, по крайней мере, двух геномных регионов, расположенных как можно дальше друг от друга. На практике обычно используются регионы 5'UTR и NS5b. В случае расхождения результатов

генотипирования используют биоинформационный анализ для определения вероятных родительских последовательностей и точки рекомбинации. Внутрисубтипных рекомбинантов в популяции квазивидов можно определить только посредством применения биоинформационных методов (Morel и др, 2011).

Однако, используемый в рутинной практике генотипический анализ, основанный только на одном фрагменте генома, сильно ограничивает возможность выявления рекомбинантных изолятов ВГС, а так же выявления их истинной встречаемости. Действительно, большинство меж- и внутригенотипных рекомбинантов ВГС были обнаружены случайно. Более того выбор схемы лечения ВГС инфекции и характер последующего вирусологического ответа сильно зависят от генотипа ВГС с «плохо поддающимися терапии» генотипами 1 и 4 и «легко вылечивающимися» генотипами 2 или 3 (François и др, 2009). Диагностическая ошибка в генотипировании ВГС и не определение рекомбинантного изолята могут иметь важное значение для выбора схемы лечения и его результата.

Межгенотипные рекомбинанты имеют нуклеотидные последовательности разных генотипов в структурной и неструктурной части их генома. И лечение пациентов, инфицированных ВГС подобного типа, представляет собой проблему. Изучение восприимчивости RF1_2k/1b к противовирусной терапии *in vivo*, с использованием химерных мышей с гуманизированной печенью, показало, что RF1_2k/1b ведет себя как генотип, плохо реагирующий на терапию (Kurbanov и др, 2008). Это подтверждается также данными о расследовании случая микст инфекции, когда ранее субдоминантный субтип 2k/1b стал доминантным после исчезновения доминантного субтипа 3a в результате 24 недельной комбинированной терапии пегилированным интерфероном и рибавирином (Morel и др, 2010).

Выбор схемы противовирусной терапии в случае меж- и внутрисубтипных рекомбинантных изолятов не представляет особой проблемы, поскольку все регионы генома относятся к одному генотипу. Тем не менее, в результате

подобной рекомбинации могут получиться генетические варианты, слабее реагирующие на противовирусную терапию по сравнению с родительскими изолятами (Sentandreu и др, 2008). Процесс рекомбинации среди квазивидов, циркулирующих в одном организме, может привести к генерации мутантов, ускользающих от иммунного давления, как это ранее отмечалось для других РНК вирусов.

Все еще остается неясной взаимосвязь рекомбинации и восприимчивости к противовирусной терапии. Ответ на этот вопрос могло бы дать наблюдение за ходом лечения пациентов, инфицированных рекомбинантными изолятами ВГС, и анализ генетической вариабельности этих изолятов в течение противовирусной терапии, особенно геномных регионов, непосредственно определяющих чувствительность к интерферону (PKR-связывающий домен в гене NS5a, РeРND в гене E2). В настоящее время сконструировано несколько химерных ВГС геномов, содержащих гены неструктурных белков генотипа 2a и структурную часть гетерологичного генотипа ВГС. Эти химеры способны к эффективной репликации и производству инфекционных частиц в клеточной культуре (Gottwein и др, 2007; Pietschmann и др, 2006). Однако, сложно сравнивать эти *in vitro* исследования с естественными межгенотипными ВГС рекомбинантами, большинство из которых имеет репликативный аппарат первого генотипа, предполагающий большую адаптацию естественных рекомбинантных изолятов ВГС к воздействию интерферона, что играет положительную роль в их селекции (Morel и др, 2011).

1.7 Заключение

Подводя итог, следует отметить, что в настоящее время вирусный гепатит С является актуальной проблемой для здравоохранения как в Российской Федерации, так и во всем мире. По-прежнему в России уделяется недостаточно внимания изучению вопросов молекулярной эпидемиологии ВГС с привлечением современных молекулярно-биологических подходов, таких как подтверждающие серологические тесты, ПЦР анализ, генотипирование,

использование специальных программ для обработки эпидемиологических данных. Большинство эпидемиологических данных в России получено на основе официальной статистики, что не может быть отражением реальной картины заболеваемости. Данные по генотипическому разнообразию изолятов ВГС получены лишь для отдельных популяционных групп в некоторых регионах Российской Федерации и для небольших отрезков времени (Lvov и др., 1996; Viazov и др., 1997; Kalinina и др., 2001; Шустов и др., 2004; Гаврилова и др., 2007; Семенов и др., 2009; Kuzin и др., 2011). Стоит отметить, что данные о распространённости, генотипическом разнообразии ВГС зависят от исследованных популяционных групп, их возрастного состава, а также от преобладающих путей передачи вируса в популяции. Кроме того, известно, что картина распределения генотипов на любой выбранной территории со временем изменяется, что связано с проникновением новых субтипов из регионов, где они эндемичны. Мониторинг циркулирующих генотипов необходим для углубленной эпидемиологической оценки территории. Наиболее целесообразным при проведении эпидемиологического исследования является комплексный подход, включающий в себя одновременное получение информации по генотипам вируса, факторам риска и путям передачи инфекции на выбранной территории.

Опасность инфекции ВГС состоит в высокой степени хронизации, прогрессировании в цирроз и рак печени, что ухудшает качество жизни работоспособного населения и увеличивает смертность. При отсутствии специфической профилактики гепатита С в современной клинической практике особое место принадлежит вопросам лечения пациентов гепатитом С. В литературе имеются данные о разной чувствительности генотипов ВГС к проводимой терапии (Fried и др., 2002; Poordad и др., 2012), поэтому определение генотипа ВГС является важным фактором для выбора схемы интерферонотерапии при лечении ВГС инфицированных пациентов. Показано, что пациенты, инфицированные ВГС 2 или 3 генотипа, лучше поддаются лечению, быстрее и значительно чаще достигают стойкого вирусологического

ответа, по сравнению с пациентами, инфицированными ВГС генотипа 1. Однако в случае рекомбинантных изолятов ВГС лечение пациентов представляет собой большую проблему, поскольку остается неясной взаимосвязь рекомбинации и восприимчивости к противовирусной терапии, так как межгенотипные рекомбинанты имеют нуклеотидные последовательности разных генотипов в структурной и неструктурной части их генома. Представители CRF01_1b2k ВГС являют собой комбинацию последовательностей «легко вылечивающегося» генотипа 2 и «плохо поддающегося терапии» генотипа 1. И в ходе рутинной диагностики, использующей единственный регион генома, будут определены как изоляты второго генотипа, с назначением соответствующей терапии. В то время как несколько исследований показало, что CRF01_1b2k ведет себя как генотип, плохо реагирующий на интерферон (Kurbanov и др., 2008; Morel и др., 2010). Диагностическая ошибка в генотипировании ВГС и не определение рекомбинантного изолята может иметь серьезные последствия из-за выбора неверной схемы лечения и его неудовлетворительного результата. Выявление истинной встречаемости рекомбинантных изолятов на территории Западной Сибири, их происхождение, преимущественные пути передачи в сравнении с другими субтипами ВГС, а также разработка удобного метода диагностики рекомбинантных изолятов типа 2k/1b является весьма актуальным, представляет научный интерес и поэтому было выбрано темой настоящей работы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор образцов

2.1.1 Группа пациентов с диагнозом острый гепатит

В период с 2001 по 2002 гг. было проведено молекулярно-эпидемиологическое исследование вирусных гепатитов среди пациентов Клиники инфекционных болезней городской больницы №5 г. Барнаула (Алтайский край). Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с “Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан” (ред. Указ Президента РФ от 24.12.1993 N 2288, Федеральные законы от 02.03.1998 № 30-ФЗ, от 20.12.1999 № 214-ФЗ). Комплект документов был утвержден этическим комитетом ГНЦ ВБ “Вектор”. К участию в исследовании приглашали пациентов, достигших 18 летнего возраста, поступивших с клиническими признаками острого гепатита (лихорадка, желтуха, боль в животе, боль в суставах, увеличение печени, слабость, утомляемость, повышение уровня АЛТ, изменение лейкоцитарной формулы крови (повышение уровня лимфоцитов). Каждый пациент подписывал договор с руководителем проекта об условиях своего участия (т.н. “Информированное согласие”). Для повышения мотивации к участию всем обследованным обеспечивали возможность узнать результаты исследования на вирусные гепатиты и получить консультацию врача. От каждого пациента, согласившегося принять участие в обследовании, был получен образец сыворотки крови (8-10 мл) и собрана индивидуальная информация посредством структурированного интервью по анкете. Забор крови производился из локтевой вены с использованием стерильных одноразовых систем для забора крови "Вакутайнер" ("BD", Германия; сертификат соответствия РОСС.DE.ИМО8.A01047). Такой метод забора крови обеспечивал отсутствие кросс-контаминации.

В период с 1 сентября 2001 г. по 26 декабря 2002 г. были собраны сыворотки крови от 1043 пациентов Клиники инфекционных болезней

городской больницы №5 г. Барнаула (Алтайский край). Группа участников исследования включала только первично госпитализированных по поводу гепатита пациентов. Никто из них ранее не тестировался на наличие в крови маркеров вирусных гепатитов.

2.1.2 Группа пациентов с диагнозом хронический гепатит

Для определения генотипа ВГС и с целью проверки работы мультитиплексной системы для скринингового генотипирования ВГС на клинических образцах были получены образцы сывороток крови от пациентов

- 1) ГУЗ Государственный Новосибирский Областной Клинический Диагностический Центр, г. Новосибирск с диагнозом «хронический гепатит С»
- 2) обратившихся в ФБУН ГНЦ ВБ Вектор для выявления маркеров ВГС. Всего было получено 1010 образцов, собранных в период с 01.01.2005 г. по 31.12.2014 г.

2.2 Эпидемиологическое исследование

2.2.1 Анкетирование

Эпидемиологическая часть работы выполнена по схеме “поперечного” (cross-sectional) исследования. От каждого обследуемого был получен не только образец сыворотки крови, но собрана демографическая информация и эпидемиологический анамнез в отношении ранее перенесённых гепатитов; симптомы, имеющиеся у пациента на момент поступления; нозокомиальные и профессиональные факторы риска; факторы риска, связанные с особенностями поведения и привычками; перенесённые немедицинские травматические манипуляции; социально-экономические данные. Для этого, каждому обследуемому предлагали ответить на вопросы заранее разработанной анкеты в условиях индивидуального интервью.

2.2.2 Обработка эпидемиологических данных

Для выявления статистически значимых факторов риска инфицирования ВГС в обследованных группах собранные данные анкет и результаты

лабораторных исследований были обработаны с использованием программ EpiInfo 2005 (Su, 2003) и SPSS 14 (Бююль и Цёфель, 2002). Число инфицированных в группах людей, подверженных и не подверженных действию факторов риска, выражали с помощью четырёхпольных таблиц сопряжённости, к которым применяли критерий χ -квадрат с поправкой Йетса на непрерывность (для категориальных признаков) или двусторонний точный критерий Фишера (в последнем случае - если ожидаемые частоты в любой из клеток таблицы сопряжённости были меньше 5). Оба критерия применяли для ситуации двустороннего сравнения, критическое значение для достигнутого уровня значимости выбрали на уровне 5%. Силу статистической связи между каждым фактором риска и статусом по инфекции ВГС выражали с помощью отношения шансов (OR, odds ratio) с соответствующими доверительными интервалами. Достоверность различий количественных признаков исследовали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Критическое значение достигнутого уровня значимости (p) для ситуации двустороннего оценивания было 5%.

2.3 Диагностические тест-системы

Сыворотки, собранные от пациентов с клиническими признаками острого гепатита, анализировали на наличие маркёров гепатитов А, В, С и Е. Иммуноферментный анализ сывороток (ИФА) на наличие серологических маркеров проводили в лицензированной и аттестованной лаборатории МСЧ-163 (пос. Кольцово) с использованием коммерческих тест-систем производства ЗАО “Вектор-Бест” (<http://www.vector-best.ru>): “РекомбиБест анти-ВГС” скрининговый тест - для выявления общих IgG к ВГС; “РекомбиБест анти-ВГС подтверждающий тест” - для выявления IgG к Core и NS белкам ВГС; “Вектогеп В-HBs-антиген” скрининговый тест, “Вектогеп В-HBs-антиген подтверждающий тест-стрип” - для выявления HBs-антигена, “ВектоHBcAg-антитела” - для выявления суммарных антител к Core-антигену ВГВ; “ВектоHBcAg-IgM-стрип” - для выявления IgM к Core-антигену ВГВ;

“ВектоНВе-антиген” - для выявления НВе -антигена ВГВ; “ВектоНВе-IgG” - для выявления IgG к НВе антигену ВГВ; “Вектогеп А-IgМ стрип” – для выявления IgМ к ВГА; “Вектогеп Е-IgМ стрип” – для выявления IgМ к ВГЕ, “Вектогеп Е-IgG стрип”- для выявления IgG к ВГЕ.

Образцы, собранные в период октябрь-декабрь 2001 года и июль-декабрь 2002 года и серопозитивные на IgG ВГС, тестировали методом обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) для обнаружения РНК ВГС. Сыворотка считалась серопозитивной, если она давала позитивный ответ в скрининговой тест-системе и в подтверждающем тесте.

2.4 Химические реактивы, ферменты и наборы

В работе были использованы следующие реактивы:

Реактивы производства ICN: додецилсульфат натрия (SDS), этилендиаминтетрауксусная кислота, Na-соль (EDTA-Na₂), вода (RNase, DNase free), фенол, натрий ацетат, реактив для удаления РНКазной контаминации RNase-AWAY, изопропиловый спирт, трисгидроксиметиламинометан, ацетат аммония, ацетат магния, акриламид, бис-акриламид, этидий бромистый, темед, персульфат аммония.

Реактивы производства Amersham Pharmacia Biotech: обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони (Mo-MLV), поставляемая с буфером (10X Mo-MLV буфер); статистический гексамерный праймер (pdN₆).

Реактивы производства ООО «Сибэнзим»: дезоксинуклеотид-трифосфаты (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ДНК-полимераза Taq.

Реактивы производства «Нижефармхимпром»: уксусная кислота ледяная, хлороформ.

Реактивы производства Boehringer Mannheim: гликоген.

Реактивы производства Sigma: формамид, глицерин.

Набор для секвенирования производства Beckman Coulter: CEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit.

2.5 Диагностика РНК ВГС

2.5.1 Выделение суммарной РНК

Полученные пробирки «Вакутайнер» с образцами крови центрифугировали на центрифуге ОПН-3 при 3000 об/мин в течение 10 мин. для полного отделения сыворотки от сгустка. На каждую пробирку «Вакутайнер» после получения образца крови наклеивался ярлык с тем же самым шифром, что на анкете и на форме информированного согласия. Шифр представлял собой трёхбуквенное обозначение фамилии, имени и отчества лица, проводившего анкетирование пациента, и порядковый номер анкетизируемого данным лицом пациента (например, MOI1, KNG2 и т.д.). Каждую сыворотку переносили в 4 одноразовые пробирки на 1,5мл и подписывали тем же шифром, что и на пробирке «Вакутайнер». Кроме того, сывороткам присваивалась отдельная сквозная нумерация для отслеживания общего количества полученных проб.

Пробирки, содержащие 1мл сыворотки крови для анализа методом ОТ-ПЦР, хранили в отдельных коробках, отдельно от сывороток, предназначенных для анализа методом ИФА, при -70° . Такая расфасовка была проведена для того, чтобы минимизировать многократное оттаивание-замораживание образцов сывороток и предотвратить их возможную контаминацию ранее амплифицированной ДНК. Выделение суммарных РНК проводили из 50 мкл сыворотки методом SDS/EDTA/фенол. Данная методика была оформлена в соответствии с требованиями Службы качества, согласована с отделом биобезопасности и утверждена в 2004 г. директором института Молекулярной Биологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»

2.5.2 Обратная транскрипция (ОТ)

Комплементарные ДНК синтезировали на матрице суммарной РНК с использованием статистического праймера dN₆. Синтез проводили в 20 мкл раствора состава: 50 mM Tris-HCl pH8.3, 40 mM KCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 15 нг/мкл гексамера dN₆, 70

е.а. обратной транскриптазы Mo-MuLV (Amersham, USA) при 37⁰С в течение 1 часа.

2.5.3 ПЦР-амплификация

Были предприняты специальные меры по предотвращению возможной контаминации растворов, вследствие попадания продуктов ПЦР или переноса материала из образца в образец. Меры включали в себя физическое разделение процедур с проведением отдельных этапов работы в разных помещениях и разных ламинарах; использование отдельных наборов пипеток для выделения РНК, проведения ОТ и первого раунда ПЦР, проведения второго раунда ПЦР, анализа продуктов амплификации.

Структуры праймеров, использованных для амплификации районов генома ВГС 5'-UTR, Core и NS5B, приведены в Таблице 2.1 (в данной таблице также представлены теоретически и экспериментально подобранные оптимальные температуры отжига в ПЦР T_{ann}). Для амплификации 5'-UTR области использовали пару праймеров S50+AS52 для проведения первого раунда и S51+AS53 – для второго (Stuyver et al., 1993). Пробы суммарных кДНК, в которых ПЦР области 5'-UTR выявил присутствие вирус-специфических последовательностей, использовали для амплификации фрагментов генов Core и NS5b. Для этого использовали: при амплификации фрагмента гена NS5b пару праймеров R52+R54 для проведения первого раунда и R53+R55 – для проведения второго; при амплификации фрагмента гена Core пару праймеров R56+R59 для первого раунда и R57+R58 – для второго. Праймеры R52, R54, R53, R55, R56, R57, R58, R59 были синтезированы и любезно предоставлены коллегами из CDC.

Амплификацию осуществляли в 30 мкл смеси, содержащей 60 mM Трис-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,2 mM каждого dNTP, 0,08 о.е./мл праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq (ЗАО “Сибэнзим”, г. Новосибирск). Температурные условия амплификации для разных пар праймеров подбирали экспериментально (типичные условия: 95⁰С -1 мин, T_{ann} -

Таблица 2.1 Праймеры для амплификации фрагментов генома ВГС

N	Код	Последовательность ¹ (5'-3')	T _{ann} °C ²
5'-UTR			
1	S50	CCCTGTGAGGAACTWCTGTCTTCACGC	55
2	AS52	GGTGACGGTCTACGAGACCT	55
3	S51	TCTAGCCATGGCGTTAGTRYGAGTGT	55
4	AS53	CACTCGCAAGCACCCATCAGGCAGT	55
Core			
5	R56	TGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTA	55
6	R59	AGGAAGATAGARAAAGAGCAACCGGG	55
7	R57	GAGCAACCGGGCARRTTCCCTGTTGC	50
8	R58	TGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTG	50
NS2			
9	NS2_s1	CAAATGGGAATGGGTGGTCCCTCCTGTTTCTRCTCCTYGCG	60
10	NS2_as1	CCACCCCTGCCCTTCAAGGCTATCGGCYGGSCCCAG	60
11	NS2_s2	ACTCCTTGCGGACGCCAGAGTCTGCGCGTGCTTGTGGATG	55
12	NS2_as2	CCGGCCCCAGAAATATCTCCCTCCCCCTTCGGGCGGAGAC	55
NS2 - генотипспецифические			
13	1_1b	GGTTGCAATATTTTATCACCAG	60
14	2_1b	GTGCATGCATGTTGGTGCGGA	55
15	3_1b	TGATGATCTTGGTGTCCATGTCAGA	55
16	4_1b	CAGAAGTATCTCCCTCCCCCT	60
17	1_2	CCGCGATGGCATCATATGGG	60
18	2_2	CCGGGTGTATTGTTTGACATA	55
19	3_2	AGTCTCCACCCCTTGGARGT	55
20	4_2	CCTGGATCTCTCCAGCTTGTTT	60
21	1_3a	GCTAACAAGCCTGCTTTATCCAT	60
22	2_3a	ATGCTCGTGCGCTCCGTGAT	55
23	3_3a	CAGAGACAGGCAGCCCCGAA	55
24	4_3a	GCCAACCCATCTCCCGATAGT	60
NS5B			
25	R52	TGGGSTTCYCRTATGATACCCGCTGCTTTGA	60
26	R54	GGCAGAGTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA	60
27	R53	GCTGYTTTGACTCMACRGTCAGT	55
28	R55	CTRGTCATAGCCTCCGTGAAGYCTC	55
Дополнительные праймеры для секвенирования полного генома			
29	1180F	TTTGTGGCGCGGCCATGATAGCGGC	55
30	1198F	TAGCGGCCCAAGCAGTCATCATTTTCGCC	55
31	1584F	AACACCAACGGCAGTTGGCACATCAA	55
32	1599F	TGGCACATCAACCGCACTGCCYTGAAYTGCAA	55
33	1813R	GGTGGRTARTGCCAGCAATAGGGCCTC	55
34	2082F	TGCCCCACKGACTGCTTCMGAAGCA	55
35	2194R	TAATGCCACAGCCTATAGGGGTA	55
36	2617R	GCGCTGGCCGCATGCAAAATGACTAGCTTCTC	55
37	2680R	CCCTTGATGTRCCAGGCRGC	55
38	8333R	GTCACAACATTGGTAAATTGACTCCTC	55
39	8383R	TAAAGCCGCTCTGTGAGCGAC	55
40	8487F	TACTTGAAGGCCTCTGCAGCCTGTCGAGC	55
41	8553F	GACGACCTTGTCGTTATCTGTGA	55
42	8859F	TGGGCAAGGATGATTCTGATGAC	55
43	8979R	GTAGGTCAAGTGGCTCAATGGAGTA	55
44	NS4_3as	GCCACCCACCCCCCAAGATGTT	55
45	NS4_3s	TTCTGGGCGAAGCACATGTGGAA	55
46	3'_1as	ACATGATCTGCAGAGAGGCCA	55
47	3'_2as	CAGAGAGGCCAGTATCAGCACT	55
48	3'_s	ACCAAGCTTAAACTCACTCCAAT	55

Для вырожденных положений использована однобуквенная номенклатура IUPAC/IUB;

² экспериментально подобранная температура отжига.

1 мин, 72⁰ С -1 мин, 40 циклов –для первого раунда ПЦР и 30 циклов – для второго).

2.6 Определение генотипа

2.6.1 Детекция и очистка продуктов амплификации

Реакционные смеси ПЦР, содержащих продукты амплификации в объеме 5 мкл, подвергали электрофорезу в 6% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 1X TAE (20 mM трисгидроксиметиламинометан, 20 mM CH₃COOH, 1 mM ЭДТА). Гели окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл) и визуализировали в УФ свете. Очистку продуктов амплификации проводили методом пассивной элюции из геля. Для этого участки геля, содержащие фрагменты ДНК ожидаемого размера, вырезали из гелевой пластины и измельчали гель путём центрифугирования через сделанные крестообразные надрезы в дне 500 мкл пробирки в 1,5 мл пробирку. К измельчённому гелю добавляли 600 мкл буфера для пассивной элюции (0,5 M ацетат аммония, 0,01 M MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS), перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 12 часов. Затем к смеси добавляли 600 мкл фенола (уравновешенного при pH 8,0) и 200 мкл 70% этанола, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин. В данных условиях происходит разделение водной и органической фаз, причём кусочки ПААГ остаются на дне пробирки, что позволяет отобрать водную фазу, не захватывая акриламид. Водную фазу отбирали в новую пробирку, остатки фенола экстрагировали равным объёмом хлороформа, добавляли к ней 20 мкг гликогена и ацетата натрия до 0.3M и осаждали ДНК равным объёмом изопропилового спирта. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в 10 мкл деионизованной воды.

2.6.2 Определение нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли методом прямого секвенирования (Kretz и др., 1994). Секвенирование

продуктов амплификации проводили по обеим цепям с использованием автоматического секвенатора Beckman CEQ2000 XL. Использовали наборы реактивов CEQ DTCS Kit (Beckman, Cat# 608000) согласно инструкции производителя.

2.6.3 Анализ последовательностей

Для генотипирования изолятов ВГС проводили филогенетический анализ последовательностей фрагментов 5'-UTR, Core и NS5B. Использовали последовательности прототипных изолятов ВГС, представленные в Таблице 2.2

Для проведения филогенетического анализа рекомбинантных изолятов использовали последовательности прототипных изолятов ВГС, указанных в Таблице 2.3. 25 нуклеотидных последовательностей субтипа 1b были выбраны случайным образом из представленных в базе данных Genbank последовательностей полноразмерных геномов ВГС в серии реконструкций филогенетических деревьев, для обеспечения максимальной филогенетической информативности и географической репрезентативности. Были использованы все последовательности фрагментов генов Core/E1 и NS5b субтипа 2k (n=24), имеющиеся в базе данных Genbank.

Нуклеотидные последовательности выравнивали с использованием программы ClustalW V1.83 (Thompson и др., 1994). Статистический анализ выровненных последовательностей проводили с помощью программ MEGA V4 (Tamura и др., 2007) и TREE-PUZZLE V5.2 (Schmidt и др., 2002). Филогенетический анализ проводили с использованием программ MEGA V4 и PHYLIP V3.6c (Felsenstein, 2002). Для оценки достоверности группирования применяли перестановочный тест (Felsenstein, 1985).

2.7 Определение точки рекомбинации

2.7.1 Дизайн праймеров для области NS2

Для амплификации области гена NS2 были выбраны последовательности праймеров для проведения первого и второго раунда ПЦР. Праймеры были

Таблица 2.2 Подтверждённые генотипы/субтипы ВГС¹

Генотип	Локус/изолят(ы)	Регистрационный номер(а) Genbank	Ссылки
Генотип 1			
1a	HPCPLYPRE, HPCCGAA	M62321, M67463	(Choo et.al., 1991; Inchauspe et.al, 1991)
1b	HPCJCG, HPCHUMR	D90208, M58335	(Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991)
1c	HPCCGS, AY051292	D14853, AY051292	(Okamoto et al., 1994)
Генотип 2			
2a	HPCPOLP, JFH-1	D00944, AB047639	(Okamoto et al., 1991; Kato et al., 2001)
2b	HPCJ8G, JPUT971017	D10988, AB030907	(Okamoto et al., 1992b; Murakami et al., 2001)
2c	BEBE1	D50409	(Nakao et al., 1996)
2k	VAT96	AB031663	(Samokhvalov et al. 2000)
Генотип 3			
3a	HPCEGS, HPCK3A	D17763, D28917	(Sakamoto et al., 1994; Yamada et al., 1994)
3b	HPCFG	D49374	(Chayama et al., 1994)
3k	HPCJK049E1	D63821	(Tokita et al. 1996)
Генотип 4			
4a	HCV4APOLY	Y11604	(Chamberlain et al., 1997a)
Генотип 5			
5a	EUH1480, SA13	Y13184, AF06449	(Chamberlain et al., 1997b; Bukh et al., 1998)
Генотип 6			
6a	HCV12083, 6a33	Y12083, AY858526	(Adams et al., 1997)
6b	Th580	D84262	(Tokita et al., 1998)
6d	VN235	D84263	(Tokita et al., 1998)
6g	HPCJK046E2	D63822	(Tokita et al. 1996)
6h	VN004	D84265	(Tokita et al., 1998)
6k	VN405	D84264	(Tokita et al., 1998)

¹ Таблица из статьи Simmonds P. (Simmonds et al., 2005)

Таблица 2.3. Прототипные изоляты ВГС, используемые для филогенетического анализа рекомбинантных изолятов.

Генотип	Локус/изолят(ы)	Регистрационный номер(а) Genbank	Место выявления
Генотип 1			
1a	HCV-PT	M62321	США
1a	HCV-H	M67463	США
1b	HCVT161	AB049094	Япония
1b	HCVT191	AB049096	Япония
1b	HCVT217	AB049100	Япония
1b	HCVT221	AB049101	Япония
1b	274933RU	AF176573	Россия

1b	MD14	AF207755	Япония
1b	MD21	AF207762	Япония
1b	HCV-TR1	AF483269	Турция
1b	HCV-A	AJ000009	Австралия
1b	HCV-AD78	AJ132996	Германия
1b	AY587016	AY587016	Китай
1b	N589	AY587844	Россия
1b	HC-C2	D10934	Китай
1b	JT	D11168	Япония
1b	J33	D14484	Япония
1b	HCV-K1-R1	D50480	Япония
1b	HCV-JS	D89815	Япония
1b	HCV-J	D90208	Япония
1b	HEBEI	L02836	Китай
1b	HPCGENANTI	M84754	Тайвань
1b	HCV-L2	U01214	Корея
1b	HCU16362	U16362	Корея
1b	HCU89 019	U89019	Тайвань
1b	JK1	X61596	Япония
1c	AY051292	AY051292	Индия
1c	HC-G9	D14853	Индонезия
Генотип 2			
2a	NDM228	AF169002	Япония
2a	HC-J6	D00944	Япония
2b	MD2B-1	AF238486	Япония
2k	VAT96	AB031663	Молдова
2k	ALT837	AB327019	Россия
2k	UZ64	AB327020, AB081065	Узбекистан
2k	UZ65	AB327021, AB081066	Узбекистан
2k	G2MP004	AB327023, DQ220876	Франция
2k	G2MP117	AB327028, DQ220901	Франция
2k	G2MP118	AB327029, DQ220910	Франция
2k	G2MP119	AB327030, DQ220908	Франция
2k	G2MP120	AB327031, DQ220893	Франция
2k	G2MP121	AB327032, DQ220896	Франция
2k	G2MP122	AB327033, DQ220892	Франция
2k	G2MP123	AB327034, DQ220907	Франция
2k	G2MP124	AB327035, DQ220905	Франция
2k	G2MP125	AB327036, DQ220894	Франция
2k	G2MP126	AB327037, DQ220900	Франция
2k	G2MP127	AB327038, DQ220895	Франция
2k	G2MP128	AB327039, DQ220889	Франция
2k	G2MP129	AB327040, DQ220906	Франция
2k	G2MP134	AB327042, DQ221089	Франция
2k	G2MP135	AB327043, DQ221090	Франция
2k	50555-R	AY768136	Великобритания
2k	02AZ103	FJ435489	Азербайджан
2k	02AZ134	FJ435510	Азербайджан
2k	02AZ149	FJ435522	Азербайджан
Генотип 3			
3a	K3A	D28917	Великобритания
Генотип 4			
4a	ED43	Y11604	Египет
Генотип 5			
5a	SA13	AF064490	Южная Африка
Генотип 6			
6a	Th580	D84262	Тайланд
Генотип 7			
7a	QC69	EF108306	Канада

выбраны на основании сравнения нуклеотидных последовательностей прототипных изолятов ВГС субтипов 1b, 2k и рекомбинантного изолята 796 StP 2k/1b. Всего для сравнения использовали нуклеотидные последовательности 10 изолятов. Структуры праймеров, использованных для амплификации гена NS2 ВГС, приведены в Таблице 2.1 (в таблице также представлены экспериментально подобранные оптимальные температуры отжига в ПЦР T_{ann}).

Использовали следующие условия ПЦР для амплификации гена NS2: 1-й раунд: 95⁰С – 30 секунд, 60⁰С – 30 секунд, 72⁰С – 45 секунд, 30 циклов; 2-й раунд: 95⁰С – 30 секунд, 55⁰С – 30 секунд, 72⁰С – 30 секунд, 30 циклов.

Праймеры второго раунда ПЦР: NS2_s2 и NS2_as2 в дальнейшем использовали для секвенирования.

2.7.2 Пошаговое сканирование (bootscan)

Bootscan анализ проводили, используя программу SimPlot, version 3.5.1 (Ray, S. C. распространяется автором, доступно <http://www.welch.jhu.edu/~sray/download>) и программу для Bootscan анализа из пакета программ PHYLIP для филогенетического анализа (Salminen, M. O., and W. Cobb. 1998. Bootscanning package for Unix/Linux version 1. National Public Health Institute, Helsinki, Finland).

2.8 Дизайн праймеров для скринингового определения генотипа ВГС

Были выбраны последовательности праймеров в гене NS2, специфические для субтипов 1b, 2a/2c/2k и 3a. Праймеры были выбраны на основании сравнения нуклеотидных последовательностей прототипных изолятов ВГС субтипов 1a (3 изолята), 1b (5), 2a (4), 2b (4), 2c (1), 2k (1), 2k/1b (4), 3a (4). Всего для сравнения использовали нуклеотидные последовательности 26 изолятов. Элаймент фрагмента генома ВГС с отмеченным положением выбранных генотипспецифических праймеров представлен на рис.2.1. Структуры праймеров приведены в Таблице 2.1 (в

Genomic alignment data showing sequence coordinates and corresponding nucleotide sequences. The data is organized into blocks with headers indicating coordinates (e.g., 2920, 2940, 2960, 2980, 3000) and sample identifiers (e.g., 1A_AF00960, 1A_M62321, 1A_D10749, 1B_AF05424, 1B_D13558, 1B_D90208, 1B_AF16506, 2A_AB04764, 2A_AF16900, 2A_AF23848, 2A_D00944, 2C_D50409, 2K_AB03166, 687REC_AY5, KNG327REC, 747REC_AY0, 796REC_AY0, 2B_AB03090, 2B_AF23848, 2B_D10988, 2B_AY23274, 3A_AF04686, 3A_D17763, 3A_X76918, 3A_D28917). The sequences are aligned across these coordinates, with some positions highlighted in green (e.g., 2920, 2940, 2960, 2980, 3000) and others in yellow (e.g., 3020, 3040, 3060, 3080, 3100). The sequences are presented in a tabular format, with the sample identifier on the left, the sequence on the right, and the coordinate on the far right.

2B_AF23848 : .CAG.TGG.C.-.-.T.CAAGC...G...C...T...T.ATC.ACT...AGC.C-G.TT...G.CT...A.C.C...G.T.G : 3238
2B_D10988 : .CAGATGG.C.-.-.T.CAAGC...CG...C...T...T.ATC.ACT...GC.C-G.TT...G.C...AA.C.C...G.T.G : 3275
2B_AY23274 : .TAG.TGG.C.-.-.T.CAAGC...G...C...T...CT.GTC.ACT...AGCTC-G.T.A.A.G.CT...A.C.C...G.T.A : 3238
3A_AF04686 : .CAGATGGTTCAA-...CCAA...G...C.AG.G...A.G.A.C.T...CGCAGC-T...TAA...C.A.A...CACT...C.A : 3279
3A_D17763 : .CAGATGGTTCAA-...CCAA...G...C.AG.G...AA.G.A.C.T...CGCTGC-T.T.CAA...C.A.A...CACT...T.A : 3279
3A_X76918 : .CAGATGGTT.AA-...CCAA...G...C.AG.G...AA.G.A.C.T...CGCAGC-T...CAA...A.A...CACT...T.A : 3238
3A_D28917 : .CAGATGGTTCAA...CCAA...G...C.AG.G...AA.G.A.C.T...CGCAGC-...CAA...C.A.A...CACT...T.A : 3279
CAG TGG CA T G C C A G G T C G C G G C G C G C G T

* 3320 * 3340 * 3360 * 3380 * 3400

1A_AF00960 : GTCTTCTCCCGAATGGAGACCAAGCTCATCGTGGGGGCGAGATACCGCCGCGTGCAGTACATCAACGGCTTGCCCGTAGGGGCC : 3363
1A_M62321 :A.....T.T.C.....C..... : 3363
1A_D10749 :A.....G.C.....C..... : 3363
1B_AF05424 :TGCC.....G.....C.....A.....C.....T.....T.G.....TTG.TC.A.....C.....A.....GA : 3363
1B_AF05424 :TGCC.....G.....C.....A.....C.....T.....T.G.....TTG.TC.A.....C.....A.....GA : 3364
1B_D13558 :TGAC.....G.....C.....A.....C.....A.....T.G.....TTG.TC.A.....C.....A.....GA : 3363
1B_D90208 :TGAC.....T.A.....C.....C.....G.....T.G.....TCG.TC.A.....C.....A.....GA : 3351
1B_AF16506 :TGAC.....A.....C.....A.....C.....G.....T.G.....CTG.TC.A.....C.....A.....GA : 3351
2A_AB04764 : A...AGT.CG...AG.AG...GTC...A...G...G...G...T.G...G.TC.AC...AC.T...G.C...ACTC.T : 3371
2A_AF16900 : A...AGT.CG...AG.AG...GTC...A...G...G...G...T.A...G...T.AC...AC.T...T.G.C...RCTC.T : 3374
2A_AF23848 : A...AGT.CG...AG...G...GTC...A...G...G...G...T.A...G...T.AC...AC.T...A.C...ACTC.T : 3340
2A_D00944 : A...AGT.CG...AA.AG...GTC...A...G...G...A...T.T...G.T...T.AC...AC.T...G.C...ACTT... : 3374
2C_D50409 : A...AG.C...GG.AG...GT...G...G...G.A.G.T.T...AC...GC.T...GCTC... : 3374
2K_AB03166 :AG.C...AA.AG...TGT...A...G...G...A...T...T.GC...GC.T...C...CTT...T : 3375
687REC_AY5 :TGAC.....A.....C.....G.....G.....T.G...TCTG...A.....C.....A.....GA : 3302
KNG327REC :TGAC.....A.....C.....G.....G.....TCTG...T.....C.....A.....GA : 760
747REC_AY0 :TGAT.....A.....C.....G.....G.....TCTG...T.....C.....A.....GA : 3286
796REC_AY0 :TGAC.....A.....C.....G.....G.....TCTG...T.....C.....A.....GA : 3296
2B_AB03090 : G...AG.C...AG...GT...T...G...A.TG.A.T.A...C.GC.T...C.C.G.T.C.GA.GCTA.TA : 3375
2B_AF23848 : G...AG.CG...AG...G...TGT...T...G...A.TG.A.T.A...C.GC.T...C.C.G.T.C.GA.GCTA.TA : 3338
2B_D10988 : G...AG.C...AG...G...TGT...T...G...A.TG.A.T.A...C.GC.T...C.C.G.T.C.GA.GCTA.TA : 3375
2B_AY23274 : G...TAG.C...AG.AG...TGTA...T...G...A.TG.A.T.A...C.GC.T...C.C.G.T.C.GA.GCTA.TA : 3338
3A_AF04686 : A.A.TAGT.CC...A.T...G...C...G...A.A.T...A.T.TC.TTG...GC...T...G...ATTAT... : 3379
3A_D17763 : A.A.TAGT.CC...A.T...G...C...G...A.A.T...A.T.TC.TTG...GC...T...G...ATTAT... : 3379
3A_X76918 : A.A.TAGT.CC...A.T...G...C...G...A.A.T...A.T.TC.TTG...GC...T...G...ATTAT... : 3338
3A_D28917 : A.A.TAGT.CC...A.T...G...C...G...A.A.T...A.T.TC.TTG...GC...T...G...ATTAT... : 3379
AGT CC G C G G G T G C C C C A T

* 3420 * 3440 * 3460 * 3480 * 3500

1A_AF00960 : AGGAGATACTGCTTGGCCGACCGGCAAGTGTCTCAAGGGGTGGAGGTGCTGGCGCCATCACGGCGTACGCCACGAGAGGCCCTCCTAGG : 3463
1A_M62321 : G.....T.....A.....G..... : 3463
1A_D10749 : G.....C.A.....T.....A.....T.....A.....G..... : 3463
1B_AF05424 :T.TT.G...A...G...T.TA.TC.C.AAGGGC.A...C.AC.C.T...C...T...A...A...C.G...G.A.T... : 3463
1B_AF05424 :T.TT.G...A...G...T.TA.TC.C.AAGGGC.A...C.AC.C.T...C...T...A...A...C.G...G.A.T... : 3464
1B_D13558 :T.TT.G...A...G...T.TA.TC.T.AAGGGC.A...C.AC.C.T...A.C...T...A...A...C.G...G.A.T... : 3463
1B_D90208 :T.A.A...A...G...T.A.TT.T.GAGAGC...C.C.C.T...T...C...TT...A...A...C.G...G.T... : 3451
1B_AF16506 :T.T.G...A...G...T.TC.T.AGGGGC...C.AC.C.T.T...C...T...A...A...C.G...T.A.T... : 3451
2A_AB04764 :C.C...C...T.T.T.CTACAC...A.C.T...C.C.T...C...T...A...A...AC...T...T.G... : 3471
2A_AF16900 : G...C.C...C...T.T.T.CTACAC...C.T...T.C...C...T...C...T...AC...Y...T.G... : 3474
2A_AF23848 : G...T.T.C...C...T.T.T.CTATAC...C.T...C.C...C...T...C...T...C...T...T.G... : 3440
2A_D00944 : G...G.C...C...C...T.T.T.CTATAC...TC.T.C.C...C...T...T...T...AC...C...TT.G... : 3474
2C_D50409 : A...G.C...G...C...T.T.T.TACAC...T.A...C.C.C.T...C...C...A...CC...GT.G.GA : 3474
2K_AB03166 :G.G...G.C...A...AGTACACT...AACCT...T...C...T...T...C...T...TT.G.G... : 3475
687REC_AY5 : SA.....T.G...G...TA.CC.T.AGGG.C...C.C.C.C...T...T...T...A...C.G...T.A.T... : 3402
KNG327REC :G.....A.CC.T.AAGGGC...C.AC.C.C...T...C...T...A...C.G...A.T... : 3386
747REC_AY0 : G.....T.T.G...G...TA.CC.T.AAGGGC...C.C.C.T.A.T...C...T...A...A...AC.G...A.T... : 3396
796REC_AY0 : G...AG.T...C.C...T.T.T.CTACAC...A.C.C.T.A.T...T...C...A...T...TC.T...T.G... : 3475
2B_AB03090 : G...G.T...C.C...T.T.T.CTACAC...G...A.C.C.A.T...T...T...C...A...T...TC.T...G... : 3438
2B_AF23848 : G...G.T...C.C...T.T.T.CTACAC...G...A.C.C.A.T...T...T...A...T...TC.T...T.G... : 3475
2B_D10988 : G...AG.T...C.C...T.T.T.CTACAC...G...A.A.C.C.C.T...T...T...T...TA.T...TC.T...T... : 3438
2B_AY23274 : G...AG.T...C.C...T.T.T.CTACAC...G...A.A.C.C.C.T...T...T...T...TA.T...TC.T...T... : 3479
3A_AF04686 : GT...G.GT...T.G.A...T.T.T.ACTATCGGGAG.T...T...G...C...T...C...G...A...A...A...T...G...T... : 3479
3A_D17763 : GT...G.GT...T.G.A...T.T.T.ACTATCGGGAG.T...T...C...C...T...C...G...T...A...A...A...T...G...T... : 3479
3A_X76918 : GT...G.GT...T.G.A...T.T.T.ACTATCGGGAG.T...T...C...C...T...C...G...T...A...A...A...T...G...T... : 3438
3A_D28917 : GT...G.GT...T.G.A...T.T.T.ACTATCGGGAG.T...T...G...C...T...A...A...G...A...T...A...T...T...T... : 3479
G A T T CTAT C G C C T C C

* 3520 * 3540 * 3560 * 3580 * 3600

1A_AF00960 : GTGTATAATCACCAGCCTGACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAAGTCCAGATCGTCAACTGCTACCCAAACCTTCTCTGGCAACGTGCATC : 3563
1A_M62321 :A.....T.....G..... : 3563
1A_D10749 :A.....T.....G.....T...T... : 3563
1B_AF05424 : T...C...C...T...C.A...G...G...C.A.A.G...T.AG.G.T.T...C.A.A...T...T...G...C... : 3563
1B_AF05424 : T...CG.C...T...C.A...G...G...C.A.A.G...T.AG.G.T.T...C.A.A...T...T...G...C... : 3564
1B_D13558 : T...C...C...T...C.A...G...G...C.A.A.G...T.AG.G.T.T...C.A.A...T...T...G...C... : 3563
1B_D90208 : C...C...C...T...C.A...T...G...G...C.C.T.G...T...G.GC.C.C.C.A.A.G...T...T...G...C... : 3551
1B_AF16506 : C...C...C...T...C.A...T...G...G...C.C.T.G...T...G.AG.G...C.C.A.A...T...T...G...C... : 3551
2A_AB04764 : TAC...G.GGTG...A...G...G...C.T.G.CAG...CA...CC...A...A...G...C...C.A.TC.T.GT...C.G... : 3571
2A_AF16900 : YGC...G.GGTG...TA...G...G...T...G.CAG...CA...CC...G...A...G...C...C.G.TC.T.GT...T.G...A.C... : 3574
2A_AF23848 : CGCC...G.GGTG...A...G...G...C...G.CAG...CA...CC...G...AA...A...C...C.G.TC...GT...C.G...A.C...T : 3540
2A_D00944 : CACC...G.GGTG...A...G...G...C...G.CAG...CA...CC...G...AC...T...G...C...C.G.TC...GT...C.G...AAC... : 3574
2C_D50409 : CGCC...G.GGTG...A...G...G...C...G.CGG...CCA...CT...G...A...T...G.TT...C...T...A...T...T...T.G...A.CA... : 3574
2K_AB03166 : TAC...G.GGTG...TA...A...G...T...G.CGG...CAA...CT...A...A...G...T...C...G.TC...T...T.A...C.GG...ACA... : 3575
687REC_AY5 : C...C...CG...T...C.A...GG...G...C...G...AG.G.C.C...A.A...T...T...C...G...C...TG... : 3502
KNG327REC : : -
747REC_AY0 : C...C...C...T...C.A...T...G...G...C...G...AG.G.C.C...A.A...T...A...C...G...C...T... : 3486
796REC_AY0 : T...C...C...T...C.A...T...G...G...C...G...AG.G.C.C...A.A...T...T...C...G...C...TG... : 3496
2B_AB03090 : TGCC...TG.GGT...A...C...C...TG.GCA...CC...GC...G...C...CT.C.TC...A...T...T...GG...A.CT...T : 3575
2B_AF23848 : TGC...CG.GGT...A...G...C...G...GCA...CT...AC.A...G...TC...TT.C.TC...A...T...T...G...A.CT...T : 3538
2B_D10988 : TGC...CG.GGT...A...G...C...TG.GCA...CT...GC...G...TC...CT.C.TC...A...T...T...GG...A.C...T : 3575
2B_AY23274 : TGC...CG.GGT...T...C...G...TG.GCA...CA...GC...G...TC...CT.C.TC...A...T...T...GG...A.CT...T : 3538
3A_AF04686 : AC...TG.G...T...T...A...T...G...GTG...ACC...A...G...G.GC.T.T.G...G...A.GT...AACAG.G : 3579
3A_D17763 : AC...TG.G...T...T...A...T...G...GTG...ACC...A...G...G.GC.T.T.G...G...A.GT...AACAG.A : 3579
3A_X76918 : AC...TG.G...TG.T...T...A...T...G...GTG...ACC...A...G...G.GC.T.T.G...G...T.A.GT...AACAG.G : 3538
3A_D28917 : AC...TG.G...T...T...A...T...G...GTG...ACC...A...G...G.GC.T.T.G...G...G...A.GT...AACAG.A : 3579
T C CG G T A G G G CC G G GC C C C A T GG A C

Рис. 2.1 Выровненные нуклеотидные последовательности фрагмента генома ВГС (район 2878-3477 н.). Цветом выделено расположение праймеров, специфичных для различных субтипов: желтым – 2а, 2с и 2к, зеленым – 1b, голубым – 3а. Синим цветом и ↓ указано месторасположение точки рекомбинации.

таблице также представлены экспериментально подобранные оптимальные температуры отжига в ПЦР T_{ann}).

Амплификацию проводили, как описано в 2.5.3. Реакционные смеси ПЦР, содержащие продукты амплификации в объеме 5 мкл, подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле, содержащем 1X TAE (20 mM трисгидроксиметиламинометан, 20 mM CH_3COOH , 1 mM ЭДТА). Гели окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл) и визуализировали в УФ свете. Амплифицированный продукт второго раунда имел разную длину для каждого из генотипов (193 п.н. – для 1b, 430 п.н. – для 2a, 2c и 2k, 309 п.н. – для 2k/1b рекомбинантных изолятов, 242 п.н. – для изолятов субтипа 3a).

2.9 Определение геномной последовательности изолята PSA424

Для амплификации фрагментов генома использовали праймеры описанные в 2.5.3 и 2.7.1. Дополнительно были выбраны последовательности праймеров на основании сравнения нуклеотидных последовательностей изолятов ВГС 1b (5), 2k (1), 2k/1b (2). Всего для сравнения использовали нуклеотидные последовательности 8 изолятов. Структуры праймеров приведены в Таблице 2.1 (в таблице также представлены экспериментально подобранные оптимальные температуры отжига в ПЦР T_{ann}).

Амплификацию проводили, как описано в 2.5.3. Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли, как описано в 2.6.2.

2.10 Определение времени формирования рекомбинантных изолятов

Для оценки даты рекомбинации и образования CRF01_1b2k исследовали два отдельных набора выровненных последовательностей, содержащих последовательности рекомбинантных изолятов, а так же доступных близкородственных изолятов родительских субтипов (2k для 5'-части генома, 1b для 3' части). Использовали различные значения уровня нуклеотидных замен/сайт/год для каждого из наборов: для региона NS3-NS5b применяли

скорость накопления замен, оцененную для субтипа 1b (Gray и др., 2011), в то время как для региона core/NS2 применяли среднюю скорость между рассчитанными для субтипов 1a и 1b, поскольку на данный момент нет данных о скорости молекулярной эволюции субтипа 2k. Времена дивиргенции изолятов рассчитывали методом Байеса, применяя марковские цепи моделирования по Монте-Карло (200 млн генераций), в пакете программ BEAST (Drummond и др., 2007)

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристики обследуемой группы

3.1.1. Половозрастной состав группы

В исследование были включены 1043 пациента с клиническими признаками острого гепатита, поступившие в Клинику инфекционных болезней городской больницы №5 г. Барнаула (Алтайский край), образцы сывороток которых были собраны в период с сентября 2001 г. по декабрь 2002 г.

Среди 1043 обследованных пациентов инфекционной больницы г. Барнаул было 417 (40%) женщин (возраст от 13 до 77 л., средний 31,2 г., медианный 27 л.) и 626 (60%) мужчин (возраст 13-74 года, средний 29,0 л., медианный 25 л.). В группе преобладали лица молодого возраста (60,9% - пациенты до 30 лет) (рис. 3.1). Большинство пациентов являются жителями г. Барнаул (87,3%), 11,5% - жители Алтайского края и 12 пациентов (1,2%) проживают в других областях (4-из Новосибирской области, по 2 представителя Республики Алтай и Казахстана и по 1 человеку из Московской, Кемеровской областей и Красноярского и Хабаровского краев).

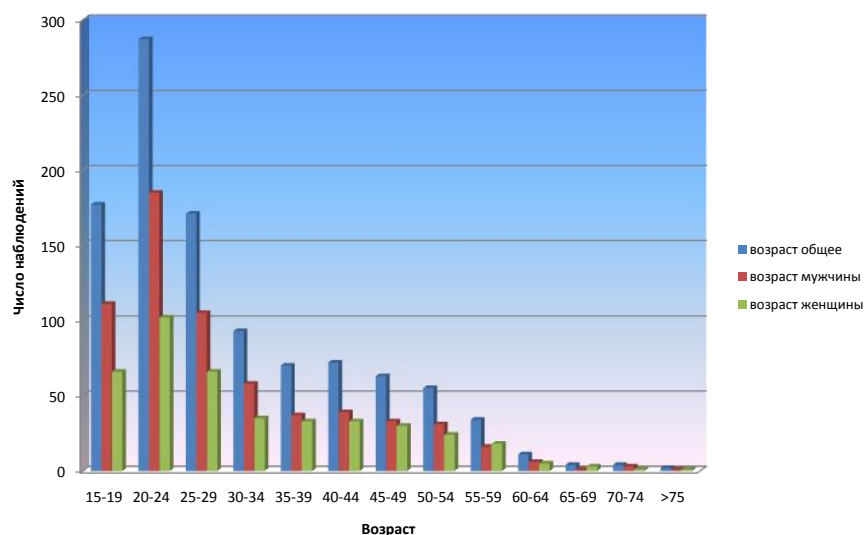


Рис. 3.1 Половозрастная структура группы пациентов с клиническими признаками острого гепатита.

3.1.2. Эпидемиологические данные для инфицированных лиц

Собранные образцы сывороток были тестированы в коммерчески доступных тест-системах производства ЗАО «Вектор-Бест» для выявления антител к антигенам ВГС. Из 1043 обследованных пациентов Клиники инфекционных болезней антитела IgG к антигенам ВГС были выявлены у 368 (35,3%) пациентов. При этом маркеры инфекции ВГС присутствовали у 42,3% обследованных мужчин (265/626) и у 24,7% женщин (103/417) .

В Таблице 3.1 приведены отношения шансов (OR), отражающие статистические связи между рядом выбранных факторов риска и серопозитивностью по маркёрам ВГС. Статистический анализ был выполнен для общей группы (все обследованные пациенты, n=1043), а также нескольких подгрупп, выбранных следующим образом:

1. Все оцененные с помощью интервью факторы, показавшие статистически значимые ($p < 0.05$) значения OR, ранжировали по порядку убывания величины OR.

2. Из исходной группы исключали всех лиц, подверженных действию фактора риска с наибольшим OR, и, таким образом, получали подгруппу меньшего объёма. Вышеописанную процедуру провели несколько раз (см. комментарии к Таблице 3.1).

Среди исследованных факторов риска наибольшие величины отношения шансов были выявлены для вопросов, касающихся употребления наркотиков и связанных с ними обстоятельств. В бивариантном анализе статистически значимыми факторами риска были внутривенное употребление наркотиков (n=1043, OR=12,5), интраназальное употребление наркотиков (OR=3,9), пребывание пациента в наркологической или психиатрической больнице (OR=4,6). Частота выявления маркёров ВГС у лиц, употребляющих наркотики внутривенно, была ожидаемо высока (82,6%, 123/149). Интересно, что среди людей, отрицавших внутривенные инъекции наркотиков, но сообщивших об эпизодах интраназального употребления, частота встречаемости маркёров ВГС также была велика (47,1%, 8/17). Впрочем, для получения статистически

Таблица 3.1 Факторы риска¹ серопозитивности по маркёрам ВГС. Результаты бивариантного анализа².

	Все обследованные	A	B	C	D
N=	1043	894	751	738	679
Анти-ВГС (+)	368 (35,3%)	245 (27,4%)	189 (25,2%)	182 (24,7%)	158 (23,3%)
1. Употреблял наркотики внутривенно					
	12,53				
2. Имел более 1 полового партнёра					
	3,03	1,91			
3. Перенёс переливание крови или её компонентов					
	НД ³	НД	3,56		
4. Имеет медицинскую специальность и работает врачом					
	НД	2,37	3,39	2,92	
5. Работает в учреждении здравоохранения (по любой специальности)					
	НД	НД	НД	2,08	НД
6. На работе имел контакты с человеческой кровью					
	НД	1,81	2,40	2,26	НД
7. Перенёс хирургические операции (любые)					
	НД	НД	НД	НД	1,45
8. Перенёс операции под общей анестезией					
	НД	1,45	1,54	1,49	1,60
9. Сделал татуировку					
	2,11	НД	НД	НД	НД
10. Находился на лечении в наркологической или психиатрической клинике					
	4,62	НД	НД	НД	НД
11. Употреблял наркотики интраназально					
	3,92	НД	НД	НД	НД
12. В анамнезе перенесённые сифилис или гонорея					
	3,15	НД	НД	НД	НД
13. Пол (муж./жен.) (n2sex)					
	2,24	1,57	НД	1,42	НД
14. Возраст > 25 лет					
	0,68	НД	НД	НД	НД

¹ Все приведённые в таблице признаки или события, кроме пола (13), возраста (14), вопросов о специальности и работе (4, 5), о перенесённых ЗППП (12), относятся к временному периоду длительностью 6 мес. до появления первых клинических признаков заболевания.

² приведены значения отношения шансов, происходящие из таблиц сопряжённости (crude OR). Значение отношения шансов приведено только, если оно статистически значимо с 95% доверительной вероятностью.

³ “НД” - оценка статистически не значима.

Столбец “Все обследованные” - пациенты, впервые поступившие в инфекционную больницу г. Барнаул с клиническими признаками острого гепатита;

Столбцы А-D соответствуют результатам расчётов в подгруппах, сформированных следующим образом:

Подгруппа А – из всех обследованных выбраны лица, не употреблявшие внутривенные наркотики;

Подгруппа В – из подгруппы “А” выбраны лица, сообщившие о том, что имели не более 1 полового партнёра в период 6 мес. до начала заболевания;

Подгруппа С – из подгруппы “В” выбраны лица, не подвергавшихся переливаниям крови или её компонентов в период 6 мес. до начала заболевания;

Подгруппа D – из подгруппы “С” удалены все лица, работающие врачами.

обоснованных выводов о роли интраназального употребления наркотиков в качестве самостоятельного фактора риска было собрано недостаточно данных.

Ожидаемые положительные связи были выявлены и для других факторов, связанных с рискованным поведением. Так, риск серопозитивности по маркерам ВГС был повышен у людей, делавших татуировки в период 6 мес. до начала заболевания ($OR=2,1$). Половые контакты с более, чем одним половым партнером (за тот же период времени) оказались фактором риска как в общей группе ($n=1043$, $OR=3,0$), так и среди лиц, отрицавших внутривенную наркоманию ($n=894$, $OR=1,9$). Перенесённые респондентом сифилис или гонорея также были фактором риска по ВГС ($OR=3,2$).

Среди оцененных нозокомиальных факторов статистически значимый эффект ($OR=3,6$) был выявлен для гемотрансфузий (среди людей, не употреблявших наркотики и имевших не более 1 полового партнёра за 6 мес. до начала заболевания). В нескольких обследованных подгруппах повышенные риски ($OR=1,5$) выявлены также у людей, перенесших хирургические операции, выполненные под общей анестезией.

Профессиональные факторы риска у включённых в наше исследование людей были невелики, но показали статистически значимые связи со статусом по маркерам инфекции ВГС в подгруппах лиц, отрицавших употребление внутривенных наркотиков. Статистически значимо повышенные риски в этой подгруппе были выявлены у людей, работающих врачами ($n=894$, $OR=2,4$) и у лиц, контактировавших с человеческой кровью на рабочем месте ($OR=1,8$).

Иммунологические маркеры ВГС чаще выявляли у лиц моложе 26 лет, чем у людей более старшего возраста ($OR=0,7$). Риск инфицирования ВГС был выше для мужчин, чем для женщин ($OR=2,2$). Среди других социально-демографических характеристик индивидов факторами защиты оказались наличие у респондента высшего образования ($OR=0,5$) и наличие у респондента семьи ($OR=0,6$).

Для вычисления популяционных атрибутивных долей были использованы логистические регрессионные модели. В Таблице 3.2. приведены AF и PAF для

Таблица 3.2 Атрибутивные доли для выбранных факторов риска серопозитивности по маркёрам ВГС среди пациентов инфекционной больницы г. Барнаула.

	Популяционная атрибутивная доля (PAF)	Атрибутивная доля среди лиц, подверженных действию фактора (AF)
Мужчины		
Употреблял внутривенные наркотики	23,98%	63,2%
Количество половых партнёров >1	8,36%	40,5%
Общая атрибутивная доля (model-based) ¹	33,93%	
Общая атрибутивная доля (model-free) ¹	33,23%	
Женщины		
Употребляла внутривенные наркотики	9,75%	66,3%
Контактировала с кровью на рабочем месте	8,49%	42,5%
Перенесла хирургические операции под общей анестезией	11,73%	30,1%
Общая атрибутивная доля (model-based)	29,18%	
Общая атрибутивная доля (model-free)	28,75%	

¹ Общие атрибутивные доли не являются суммами популяционных атрибутивных долей, вычисленных для каждого из факторов риска по отдельности, а вычисляются из подогнанной регрессионной модели (model-based) по методу [9], либо непосредственно из исходных данных (model-free), как описано в [13]. Оценки, полученные двумя разными способами, оказались весьма близки.

выбранных факторов риска. Приведённые результаты показывают, что среди опрошенных нами потребителей внутривенных наркотиков >60% случаев острого гепатита, сопровождающегося позитивностью по анти-ВГС, можно объяснить заражением ВГС в результате употребления наркотиков. В то же время, из числа обследованных пациентов-мужчин лишь в примерно 24% случаев, а среди обследованных женщин – в примерно 10% случаев заражение связано с внутривенной наркоманией. У обследованных женщин примерно 8,5% случаев можно объяснить действием профессионального фактора риска (контактом с человеческой кровью на рабочем месте), а примерно 12% случаев - перенесёнными инвазивными медицинскими процедурами.

Приведённые общие атрибутивные доли показывают, что приблизительно 34% случаев серопозитивности по маркерам ВГС у пациентов-мужчин объясняется действием двух факторов риска, а у пациенток можно статистически обоснованно связать с тремя факторами только 29% таких случаев.

Большая часть популяционного риска, к сожалению, остаётся необъясненной, что отражает, во-первых, сложности получения статистически поддержанных оценок параметров эпидемического процесса в поперечных исследованиях ограниченного объема, во-вторых, трудности сбора информации, относящейся к рискованному поведению, а также, вероятно, неискренностью обследуемых.

Полученные результаты не противоречат закономерностям, выявленным нами в ходе исследований, проведённых в других городах Западной Сибири (Shustov и др., 2002), а также опубликованным результатам других исследователей, изучавших факторы риска ВГС в России (Балаян М.С, 1999).

Резюмируя вышеприведенные данные по изучению факторов риска по инфекции ВГС в группе пациентов с симптомами острого гепатита, можно утверждать, что заражение ВГС в результате внутривенного употребления наркотиков – через нестерильный инъекционный инструментарий или из-за введения контаминированного препарата наркотика, – объясняет высокую инфицированность среди наркоманов. Помимо внутривенной наркомании, у пациентов-мужчин важную роль имеют факторы, связанные с сексуальным поведением, а у женщин – профессиональные и нозокомиальные риски. Впрочем, общие атрибутивные доли, показывающие какую долю случаев можно объяснить действием факторов риска, перечисленных в Таблице 3.2, не превышают 34% в случае мужчин и 30% в случае женщин. Таким образом, собранные от обследованной группы пациентов данные эпиданамнеза не позволяют статистически обоснованно связать большую часть популяционного риска с наркоманией или другими исследованными факторами. Однако выявленное нами высокое соотношение инфицированных мужчин и женщин и

значительное число случаев ВГС инфекции, приходящееся на возраст до 35 лет, косвенно указывает на употребление внутривенных наркотиков, как на главный фактор риска инфицирования ВГС на исследованной территории.

3.2. Встречаемость субтипов ВГС на территории Алтайского края

Для определения встречаемости субтипов ВГС на территории Алтайского края, а также для оценки изменения эпидемиологической обстановки по инфекции ВГС из общей выборки пациентов Клиники инфекционных болезней были отобраны 2 группы пациентов, находившихся на лечении в период с октября по декабрь 2001 года (группа 1) и в аналогичный период 2002 года (группа 2). Данные по выявлению РНК ВГС в исследованных группах приведены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 Встречаемость маркеров ВГС в группах пациентов инфекционной больницы г. Барнаула.

	Период сбора образцов	Исследовано образцов, n	Позитивные в ИФА n, (%)	Позитивные в ОТ-ПЦР n, (%)*
Группа 1	окт-дек 2001	280	109 (38,9%)	96 (88,1%)
Группа 2	окт-дек 2002	133	41 (31,5%)	36 (85,7%)
всего		413	150 (36,3%)	132 (88,0%)

*-процентное содержание от числа позитивных в ИФА сывороток.

Как видно, за год на территории Алтайского края существенно сократилась заболеваемость как острыми гепатитами в целом (280 случаев в исследуемый период 2001 года против 133 случаев в 2002), так и острым вирусным гепатитом С – с 38,6% в 2001 году до 31,5% в 2002 в структуре причин острого гепатита. Это согласуется с данными о снижении заболеваемости ВГС в России после 2001 года (<http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat/rosstatsite/main/population/healthcare/>).

При определении РНК ВГС в обследованных группах использовали метод ОТ-ПЦР для амплификации фрагмента 5'UTR, как наиболее консервативного и диагностически значимого района генома ВГС. Для полученных фрагментов определяли нуклеотидные последовательности, которые затем использовали для филогенетического анализа.

Среди пациентов инфекционной больницы г. Барнаул генотипическое разнообразие изолятов ВГС оказалось следующим: в объединенной группе пациентов (группа 1 + группа 2) преобладал субтип 1b – 79 образцов (59,8%), следующий по распространенности субтип 3a - 40 образцов (30,4%) и 13 образцов были отнесены к генотипу 2, поскольку характерные для территории России субтипы 2a и 2c невозможно однозначно генотипировать по последовательности 5'UTR (Simmonds и др., 2005). На рис. 3.3 представлен генотипический профиль двух обследованных групп.

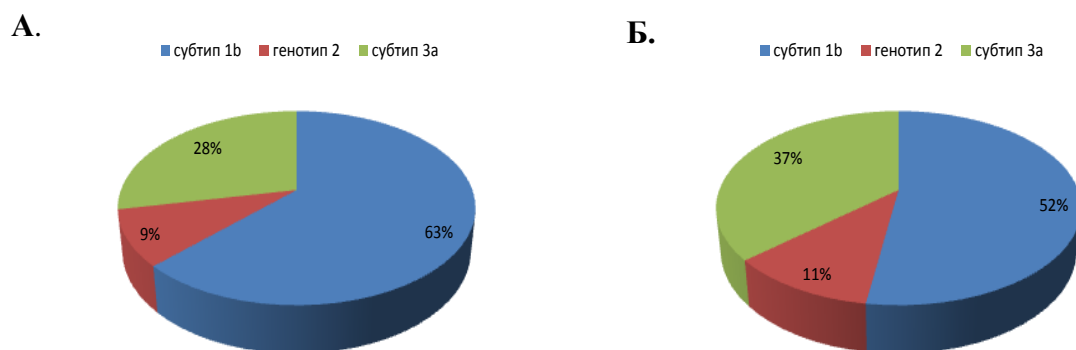


Рис. 3.2 Генотипическое разнообразие изолятов ВГС двух групп пациентов с острым гепатитом. **А.** группа пациентов, находившихся на лечении в период с октября по декабрь 2001 года. **Б.** группа пациентов, находившихся на лечении в период с октября по декабрь 2002 года.

Как можно заметить, встречаемость генотипов ВГС за год сильно не изменилась, по-прежнему лидировал субтип 1b, а на втором месте 3a, однако очевидно возрастание частоты встречаемости субтипа 3a, на фоне уменьшения частоты субтипа 1b. По данным литературы, такая закономерность в изменении частоты встречаемости субтипов часто характерна для территорий, на которых

уровень ВГС увеличился вслед за сильным ростом употребления внутривенных наркотиков (Krekulova и др, 2001; 2009), что еще раз косвенно подтверждает наш вывод, что употребление внутривенных наркотиков является ведущим фактором риска в данном регионе.

Сравнение встречаемости различных генотипов ВГС в группах пациентов разного возраста (рис. 3.3) выявило отличия в распределении субтипов. Случаи выявления изолятов 2 генотипа фиксировались равномерно, вне зависимости от возраста, в то время как, субтипы 1b и 3a в наибольшем количестве присутствовали у лиц молодого возраста. Однако, выявление субтипа 3a практически ограничивается возрастом 30 лет и у людей старше 30 лет фиксируются единичные случаи, напротив, частота выявления субтипа 1b с возрастом возросла с 60,4% в группе 20-24 года, до 77,7% в группе >30 лет. Преобладание субтипа 1b у лиц старшего возраста обычно связывают с нозокомиальной природой его распространения, предполагая, что субтип 3a циркулирует в среде наркоманов.

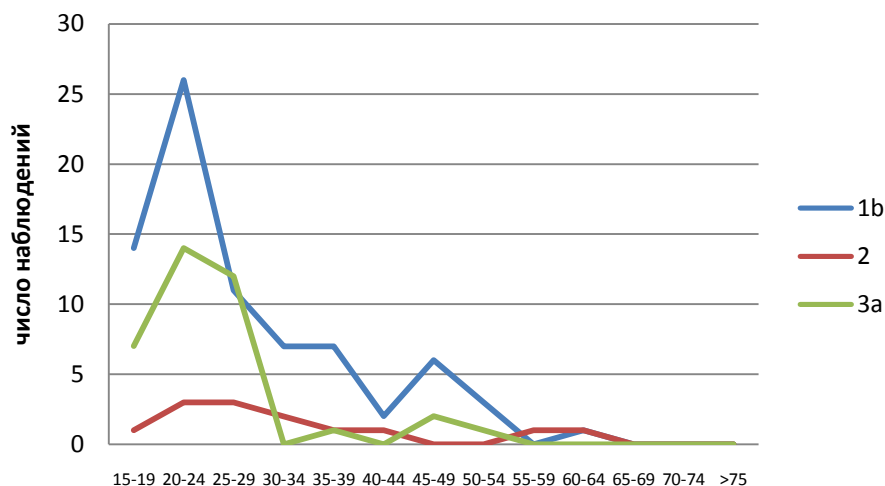


Рис. 3.3 Возрастное распределение встречаемости различных субтипов ВГС.

Несмотря на отмеченные тенденции распространения этих субтипов, значительное количество изолятов 1b, выявленных среди молодых людей, где ведущую роль в распространении инфекции играет наркомания, а так же доля

инфицированных этим субтипом среди пациентов, признавших употребление наркотиков (рис.3.4) заставляет нас признать тот факт, что субтип 1b попал в популяцию употребляющих наркотики и циркулирует там наряду с субтипом 3a.

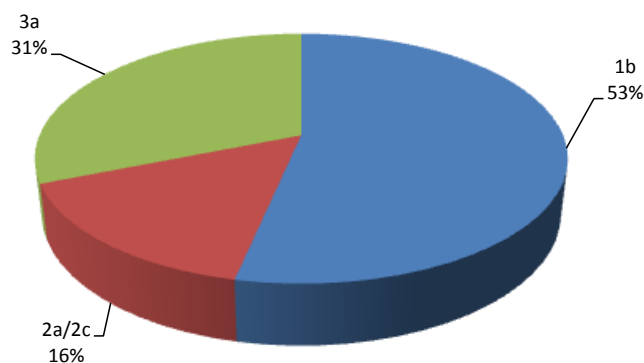


Рис. 3.4 Генотипическое разнообразие изолятов ВГС, среди пациентов, признавших употребление наркотиков.

Анализ генотипического распределения ВГС в группах пациентов с различными факторами риска не выявил значимых отличий в соотношении субтипов. В качестве факторов риска были рассмотрены употребление наркотиков, работа врачом, донорство, наличие факта кровопереливания, операции или эндоскопии, как в течение жизни, так и в последние 6 месяцев перед заболеванием. Из всех групп при рассмотрении действия нозокомиальных факторов риска были исключены лица, употребляющие наркотики. Для всех групп за исключением медперсонала, было получено распределение субтипов, сходное с таковым в общей группе. В группе медработников существенно преобладал субтип 1b – 91,6%.

Наблюдаемое отсутствие отличий в распределении говорит о единой циркуляции субтипов в популяции, независимо от группы риска. С другой стороны, тот факт, что в группе медработников, на которых наиболее воздействуют внутрибольничные факторы риска инфицирования, уровень встречаемости субтипа 1b существенно выше, чем в общей группе обследованных, и то, что доноры у которых был обнаружен субтип 3a были

достоверно младше доноров с выявленным субтипом 1b, может свидетельствовать, что не все респонденты были откровенны с нами, при ответе на вопросы, касающиеся употребления наркотиков. Присутствие в рассмотренных группах лиц, утаивших употребление наркотиков, может исказить картину распределения субтипов в группах с воздействием нозокомиальных факторов риска.

Выбранный нами для детекции РНК район 5'UTR отличается высокой консервативностью и является идеальным для диагностики ВГС, но это же делает его малопригодным для выявления филогенетических связей между различными изолятами. С этой целью нами были амплифицированы фрагменты генов Core и NS5b. В этом случае мы имеем обратную ситуацию. Эти районы генома: Core (расположенный вблизи 5'-конца генома ВГС) и NS5b (расположенный вблизи 3'-конца генома) – по уровню консервативности хорошо подходят для филогенетического анализа, кроме того, анализ двух геномных последовательностей ВГС, расположенных на достаточном удалении друг от друга, позволяет точнее определять встречаемость различных генотипов в исследуемых группах. С использованием такого подхода становится также возможным выявлять рекомбинантные изоляты, которые при генотипировании только по одному из районов генома способны завышать истинную встречаемость одного из родительских генотипов. С другой стороны, ОТ-ПЦР этих районов обладает меньшей чувствительностью, по сравнению с ОТ-ПЦР 5'UTR, поэтому не для всех изолятов, положительных в ОТ-ПЦР района 5'UTR, были получены фрагменты генов Core и NS5b. Для 50 образцов, показавших положительный результат амплификации по обоим районам генома, были определены нуклеотидные последовательности. Размер районов генома ВГС, для которых были определены последовательности, составил 405 н. для области Core и 253 н. для области NS5b (указанные числа не включают длину последовательностей праймеров).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолятов ВГС субтипа 1b выявил гетерогенную популяцию генетических вариантов

данного субтипа, циркулирующую на территории Алтайского края. Значительная часть исследованных изолятов образовывала близкородственные кладистические группы, включающие изоляты, выделенные как на всей территории России и стран бывшего Советского Союза, так и на территории Сибири. Для ряда изолятов ближайшими соседями на филогенетическом древе являлись только изоляты, выявленные за пределами России и сопредельных государств.

Отнесенные по результатам секвенирования района 5'UTR к генотипу 2 изоляты MOI317 и HIA335 в филогенетическом анализе последовательностей фрагментов генов Core, NS5b были определены как изоляты субтипов 2a и 2c соответственно (приложение рис. В).

При анализе последовательностей мы обнаружили, что подавляющее число изолятов субтипа 3a, выделенных на территории бывшего Советского Союза образуют 3 кладистические группы, не включающие, за редким исключением, изоляты, выделенные в других местах (приложение рис.С). При этом внутри каждой клады изоляты, выделенные из разных источников, часто формируют отдельные ветви. Подобное группирование свидетельствует о глобальной интродукции на территорию Советского Союза трех генетических форм ВГС субтипа 3a и их последующем распространении. Поскольку данный субтип ВГС эпидемиологически связывают с употреблением внутривенных наркотиков, можно предположить, что рост наркомании на территории бывшего Советского Союза обеспечил проникновение этих форм из эндемичных регионов и их дальнейшее широкое распространение.

Все исследованные нами изоляты субтипа 3a, выделенные в г. Барнауле, входили в состав описанных филогенетических групп, что говорит о том, что на территории Алтайского края циркулируют изоляты ВГС субтипа 3a, типичные для территории бывшего Советского Союза (приложение рис. D).

Проведенный филогенетический анализ обоих фрагментов для всех исследованных изолятов ВГС подтвердил установленные нами ранее субтипы 1b – в 29 и 3a – в 16 случаях и позволил определить субтипы у двух,

отнесенных по результатам анализа области 5'UTR ко второму генотипу изолятов: 2a – 1, 2c – 1. Для двух изолятов анализ фрагмента области Core ВГС показал их принадлежность к субтипу 2k, анализ фрагмента области NS5b – к субтипу 1b (рис.3.5). Преобладание субтипов 1b и 3a при спорадических случаях генотипа 2 является характерным для территории Сибири и России в целом (Viazov и др., 1997; Lvov и др., 1996). В то же время изоляты ВГС, неоднозначно типизируемые при использовании различных областей генома, до сих пор не были обнаружены у населения Сибири, несмотря на достаточно интенсивное изучение молекулярной вариабельности ВГС в данном регионе (Шустов и др., 2002; 2004; 2005; Кочнева и др., 2005).

3.3 Подтверждение точки рекомбинации обнаруженных изолятов 2k/1b.

С целью подтверждения рекомбинации субтипов 2k/1b для изолятов KNG318 и KNG327 была определена полная нуклеотидная последовательность гена NS2, описанного ранее как возможное месторасположение точки рекомбинации (Kalinina et al., 2002). Размер секвенированного фрагмента, включающего, помимо гена NS2, фланкирующие области, составил 760 н. Сравнение полученных последовательностей с гомологичными, депонированными в базе данных GenBank (рис. 3.6), а также результаты анализа с использованием метода bootscan (рис. 3.7) подтвердили наличие

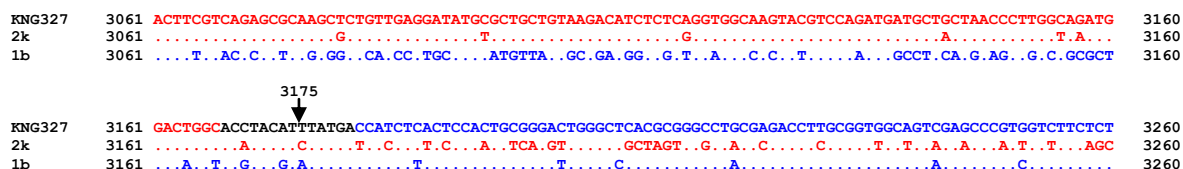


Рис.3.6 Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена NS2 ВГС изолята KNG327 и прототипных изолятов генотипов 2k и 1b.

точки перекреста для обоих выявленных нами рекомбинантных изолята в нуклеотидной позиции 3175 генома ВГС (согласно нумерации нуклеотидов изолята pJ6CF субтипа 2a, AF177036 в базе данных GenBank).

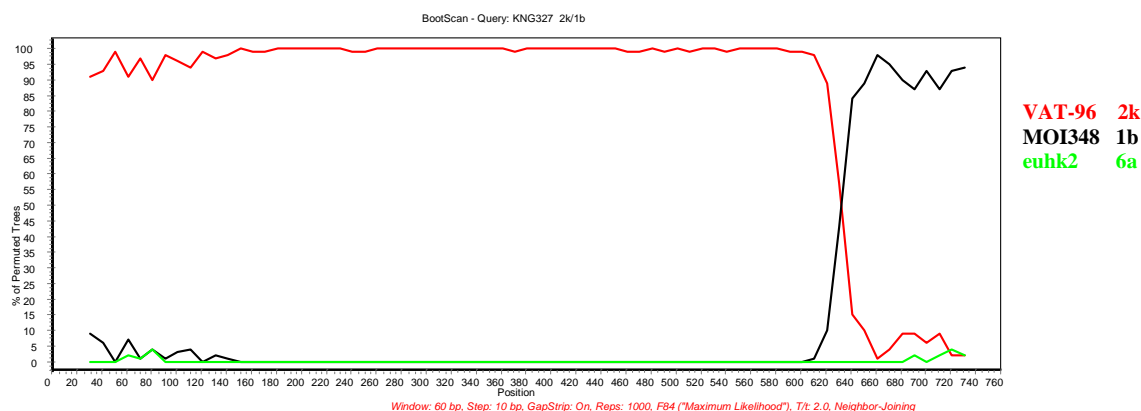


Рис. 3.7 Bootscan анализ рекомбинантного изолята KNG327 основанный на последовательности гена NS2. Исходные генотипы представлены субтипом 1b, изолят MOI348 и субтипом 2k, изолят VAT-96. Изолят euhk2, субтипа 6a использован в качестве внешней группы. Нуклеотидные позиции нумерованы от начала гена NS2.

3.4 Данные о носителях изолятов 2k/1b, клиническая картина

Мы установили контакт с пациентом, поименованным в нашей работе KNG318 – одним из двух, для которых было установлено наличие рекомбинации. Были получены и протестированы образцы сыворотки крови членов его семьи: жены и дочери, никто из них на тот момент не проявлял симптомов вирусного гепатита С. В крови дочери отсутствовали серологические маркеры ВГС инфекции, в то время как в образце крови, полученном от жены, было показано наличие как антител к ВГС, так и вирусной РНК. Филогенетический анализ выявил генотипическую неоднозначность, аналогичную указанным выше случаям: анализ фрагмента области Core показал принадлежность изолята к субтипу 2k, анализ фрагмента области NS5b – к субтипу 1b. В дальнейшей нашей работе этот образец упоминается как HIA1002.

Для пациентов, от которых получены образцы с кодами KNG318 и HIA1002, на основании проведенного опроса удалось выделить некоторые клинико-эпидемиологические особенности. Указанные лица проживают в городской местности и являются супругами. Вероятный путь заражения мужа – через использование загрязненных игл при инъекциях. Согласно данным эпиданамнеза, данный пациент имел случаи внутривенного употребления наркотиков и совместное с другими лицами использование шприцов и игл для этих целей. Предполагаемый путь инфицирования жены – предположительно, половой через мужа. Диагноз «острый гепатит» был поставлен жене спустя год после установления аналогичных симптомов у супруга. В образцах крови, полученных от обоих пациентов, помимо маркеров инфекции ВГС, обнаружен HBsAg при отсутствии серологических маркеров острого гепатита В (anti-HBc IgM) и отсутствии ДНК вируса гепатита В.

Для добровольца, от которого получен образец KNG327, не удалось определить путь заражения. Данный пациент на основании опроса не был отнесен ни к одной из известных групп риска инфицирования ВГС, однако сообщил, что в течение шести месяцев до заболевания проходил лечебные процедуры, связанные с нарушением целостности кожных покровов в сельском медицинском учреждении. Кроме того, данный пациент до момента госпитализации, по-видимому, не имел каких-либо контактов с другими обнаруженными носителями рекомбинантных изолятов.

На основании сравнения историй болезни всех трех пациентов, у которых были обнаружены рекомбинантные изоляты ВГС, и остальных пациентов с диагнозом «острый гепатит», вошедших в исследование в рамках настоящей работы, не было обнаружено отличий в течении болезни и исходе заболевания в период обследования между случаями инфицирования рекомбинантными вариантами ВГС и случаями инфицирования ВГС генотипов 1 или 2. Очевидно, малое количество выявленных носителей рекомбинантных изолятов не позволяет определить эпидемиологические факторы, способные влиять на распространение рекомбинантов. Тем не менее, встречаемость рекомбинантных

изолятов ВГС типа 2k/1b на уровне 3% в Санкт-Петербурге (Kalinina et al., 2002), достаточно удаленном от места нашего исследования, позволяет предположить распространенность рекомбинантов данного типа на всей территории России. Небольшая же выявляемость рекомбинантов изолятов ВГС в первую очередь может быть связана с принятой повсеместно практикой использовать для установления генотипа только один район генома, в качестве которого чаще всего выступает 5'-UTR, как наиболее консервативный и диагностически значимый регион. В то время, как для точного определения генотипа ВГС и выявления возможных рекомбинантных изолятов необходимо типировать два района генома, наиболее удаленных друг от друга, что требует больших затрат финансов и времени.

Рекомбинантные изоляты ВГС типа 2k/1b при проведении рутинной лабораторной диагностики будут определены как изоляты ВГС генотипа 2, что повлечет за собой выбор схемы лечения более легкой, чем это может быть необходимо для достижения стойкого вирусологического ответа.

3.5 Создание мультиплексной системы для скринингового генотипирования изолятов ВГС. Выявление новых рекомбинантных изолятов

Для определения изолятов с данным типом рекомбинации мы разработали метод скринингового генотипирования с использованием ПЦР со специфическими праймерами. Были выбраны последовательности праймеров в гене NS2, специфические для субтипов 1b и 2k, таким образом, что точка рекомбинации располагалась внутри целевого продукта. Поскольку изоляты ВГС, циркулирующие на территории России в подавляющем числе случаев относятся к субтипам 1b, 3a и субтипам генотипа 2: 2a, 2c и 2k, было решено включить в нашу мультипраймерную систему также праймеры для определения изолятов субтипа 3a. Структуры праймеров приведены в Таблице 2.1 (в данной таблице также представлены теоретически и экспериментально подобранные оптимальные температуры отжига в ПЦР T_{ann}). В связи с высокой

вариабельностью генома ВГС и различием на уровне 30% между различными генотипами, не удалось подобрать универсальные праймеры для проведения 1 раунда амплификации, что и определило использование 6 генотипспецифических праймеров для 1 раунда амплификации и 6 – для второго раунда.

Амплифицированный продукт второго раунда имел разную длину для каждого из генотипов (193 п.н. – для 1b, 430 п.н. – для 2a, 2c и 2k, 309 п.н. – для 2k/1b рекомбинантных изолятов, 242 п.н. – для изолятов субтипа 3a). Детекцию проводили в 1% агарозном геле, результат представлен на рис. 3.8.

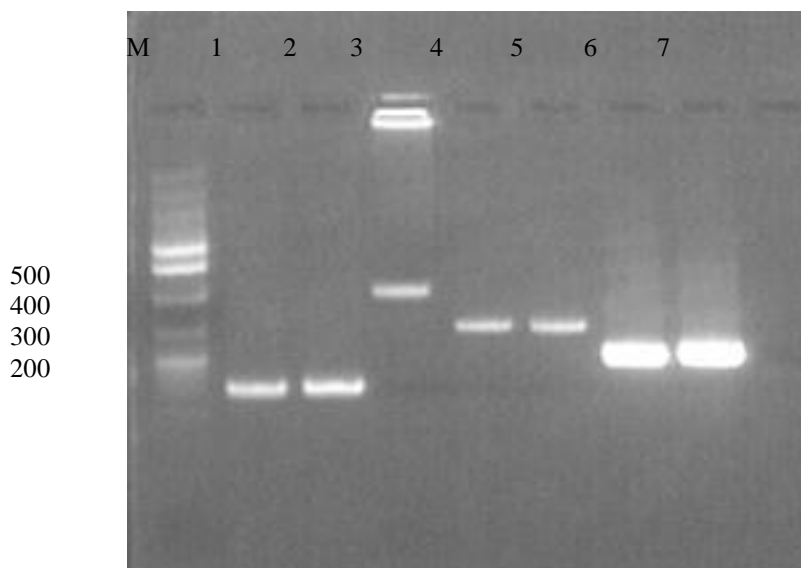


Рис. 3.8 Электрофореграмма в 1% агарозном геле продуктов амплификации в мультипраймерной системе для скринингового генотипирования изолятов ВГС: 1, 2 – субтип 1b; 3- субтип 2a; 4, 5 – рекомбинантные изоляты типа 2k/1b; 6, 7 – субтип 3a.

Для оценки специфичности созданной диагностической мультиплексной системы в качестве анализируемых образцов использовали 50 изолятов ВГС, для которых была определена нуклеотидная последовательность фрагментов генов core и NS5b, на основании чего был точно установлен субтип ВГС (см. раздел 3.2). Во всех 50 случаях был получен положительный результат в ПЦР и установлен субтип, соответствующий ранее определенному (Таблица 3.4).

Субтипы второго генотипа 2а и 2с были типированы как изоляты генотипа 2, поскольку дизайн используемых праймеров не позволяет дифференцировать субтипы 2а, 2с и 2к.

Таблица 3.4 Оценка специфичности мультиплексной системы

Субтип ВГС ¹	Число исследованных образцов	Длина полученного ПЦР фрагмента, н.	Установленный субтип ВГС	Число положительных результатов
1b	29	193	1b	29
2а	1	430	2	1
2с	1	430	2	1
2к/1b	2	309	2к/1b	2
3а	16	242	3а	16

¹ Субтип ВГС, определен на основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов core и NS5b.

Далее разработанная тест-система использовалась нами для выявления рекомбинантов ВГС типа 2к/1b в г. Новосибирске в период 2005-2014 гг. Было исследовано 1010 образцов сывороток крови, полученных от пациентов ГУЗ Государственный Новосибирский Областной Клинический Диагностический Центр, г. Новосибирск с подозрением на ВГС инфекцию, а также обратившихся в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» для диагностики ВГС. Маркеры ВГС были выявлены в 581 образце, которые затем анализировали с использованием разработанной мультиплексной тест-системы. Генотип был определен для 496 образцов: субтип 1b был установлен для 278 (56,0%) образцов, субтип 3а – для 155 (31,3%), генотип 2 определили в 58 (11,7%) случаях, 5 (1,0%) образца являлись рекомбинантами типа 2к/1b (Таблица 3.5). Для 85 образцов не удалось установить генотип, используя созданную систему для генотипирования, из-за отрицательного результата ПЦР, несмотря на наличие РНК, установленное в результате ПЦР-анализа области 5'-UTR.

Для четырех, вновь выявленных рекомбинантных изолятов (PSA-62, PSA-108, PSA-1001 и PSA-1742), были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов Core, E1, NS2 и NS5b. Для изолята PSA-424 определена последовательность полного генома. Нуклеотидную

Таблица 3.5 Генотипический профиль коллекции образцов сывороток крови, полученных от пациентов с подозрением на ВГС инфекцию г. Новосибирск в период 2005-2014 г.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	всего
Число исследованных образцов	120	210	128	148	102	111	56	36	46	53	1010
НСV+	74	141	80	73	53	68	24	16	28	24	581
генотипировано	68	126	63	52	47	60	18	14	26	22	496
1b	40	76	31	27	24	36	11	6	13	14	278
3a	19	38	24	16	19	18	3	4	8	6	155
2a/2c/2k	7	11	8	8	4	6	4	3	5	2	58
2k/1b	2	1		1				1			5

последовательность фрагмента гена NS2 использовали для подтверждения точки рекомбинации, остальные полученные последовательности применялись при проведении филогенетического анализа рекомбинантных изолятов (см. раздел 3.6)

Полученный нами результат показывает состоятельность созданной тест-системы подходящей для скринингового генотипирования. Положительного результата, т.е. установления генотипа, удалось достичь для 85% исследованных образцов. Кроме того, использование данной системы позволило выявить 5 новых рекомбинантных изолятов типа 2k/1b, не прибегая к определению нуклеотидной последовательности двух различных регионов генома, что дает несомненный финансовый и временной выигрыш. К недостаткам созданной системы можно отнести несколько более низкую чувствительность, по сравнению с чувствительность ОТ-ПЦР района 5'-UTR, а также ограниченный спектр выявляемых субтипов и невозможность определять другие типы рекомбинантных изолятов ВГС. С другой стороны, более 90% изолятов ВГС, выявляемых на территории России и до 99% на территории Сибири относятся к субтипам 1b, 2a, 2c и 3a (Viazov et al., 1997; Львов и Дерябин, 1997; Львов и др., 1997; Шустов и др., 2002; Шустов и др., 2004; Shustov et al., 2005; Кочнева и др., 2005), которые успешно определяются нашей

тест-системой, что делает ее подходящей для скринингового генотипирования в клинической практике.

3.6 Филогенетическое сравнение полученных изолятов 2k/1b с описанными ранее

Значительная распространенность рекомбинантных форм ВГС типа 2k/1b может свидетельствовать как об общем происхождении и последующей дивергенции таких вариантов патогена в различных регионах, так и о независимых актах рекомбинации. На сегодняшний день не имеется данных для определения истинных путей возникновения и распространения рекомбинантных форм ВГС. С одной стороны, субтип 1b является превалирующим как на территории России, так и в странах Западной Европы (Simmonds, 1999), а изоляты субтипа 2k хоть и не столь многочисленны, но их единичные случаи выявляются не только в России, в частности, в Санкт-Петербурге (Kalinina et al., 2002), но и за ее пределами, например в Молдове (Samokhvalov et al., 2000), Узбекистане (Kurbanov et al., 2003) и Франции (Thomas et al., 2006), что свидетельствует о существенной распространенности данного субтипа. Параллельная циркуляция ВГС этих двух субтипов на значительной территории могла привести к нескольким независимым событиям рекомбинации. С другой стороны, низкий уровень обнаружения новых рекомбинантных форм показывает, что, хотя рекомбинация имеет место в эволюции ВГС, это событие достаточно редкое, по крайней мере, по сравнению с ВИЧ. В пользу единого происхождения выявленных к настоящему времени рекомбинантов типа 2k/1b может свидетельствовать, в первую очередь, высокое филогенетическое родство между всеми обнаруженными изолятами этого типа.

Как упоминалось выше, после впервые описанного случая обнаружения рекомбинантных изолятов типа 2k/1b в Санкт-Петербурге, рекомбинанты данного типа определяли еще в нескольких исследованиях. В Таблице 3.6 представлены эпидемиологические данные и данные о последовательностях,

Таблица 3.6 Эпидемиологические данные для всех выявленных к настоящему времени рекомбинантных изолятов типа 2k/1b

Название изолята	Возраст /пол пациента	Год выявления	Место выявления	Страна происхождения	Фактор риска	ссылка
611		1999	Россия (Санкт-Петербург)	Россия		(Kalinina и др, 2002)
674		1999	Россия (Санкт-Петербург)	Россия		(Kalinina и др, 2002)
687		1999	Россия (Санкт-Петербург)	Россия		(Kalinina и др, 2002)
747		1999	Россия (Санкт-Петербург)	Россия	IDU	(Kalinina и др, 2002)
796		1999	Россия (Санкт-Петербург)	Россия		(Kalinina и др, 2002)
AZ051	34/М	2000	Азербайджан	Азербайджан	IDU	Не опубликовано
AZ082	38/М	2000	Азербайджан	Азербайджан	IDU	Не опубликовано
AZ105	32/М	2001	Азербайджан	Азербайджан	IDU	Не опубликовано
AZ114	41/М	2001	Азербайджан	Азербайджан	IDU	Не опубликовано
AZ129	30/М	2001	Азербайджан	Азербайджан	IDU	Не опубликовано
AZ139	33/М	2001	Азербайджан	Азербайджан	IDU	Не опубликовано
KNG318	30/М	2002	Россия (Барнаул)	Россия	IDU	(Kurbanov и др, 2008)
KNG327	25/М	2002	Россия (Барнаул)	Россия		(Kurbanov и др, 2008)
HIA1002	29/F	2003	Россия (Барнаул)	Россия	ST	(Kurbanov и др., 2008)
ALT-30	34/F	2000	Россия (Алтай)	Россия		(Kurbanov и др, 2008)
PSA-62	50/М	2005	Россия (Новосибирск)	Россия	гемотрансфузии	(Kurbanov и др, 2008)
PSA-108	37/М	2005	Россия (Омск)	Россия		(Kurbanov и др, 2008)
PSA-424	26/F	2006	Россия (Новосибирск)	Россия	медработник	Не опубликовано
PSA-1001	44/М	2008	Россия (Новосибирск)	Россия		Не опубликовано
PSA-1742	24/М	2012	Россия (Новосибирск)	Россия		Не опубликовано
AZ15	22/М		Узбекистан	Узбекистан	IDU	(Kurbanov и др, 2008)
UZ-IDU19		2006	Узбекистан	Узбекистан	IDU	(Kurbanov и др, 2007)
HC9A99966		2006	Ирландия	Грузия		(Moreau и др., 2006)
HC9A98987		2006	Ирландия	Россия		(Moreau и др, 2006)
CYHCV037		2005	Кипр	Грузия	IDU	(Demetriou и др, 2009)
CYHCV093		2007	Кипр	Грузия	ST	(Demetriou и др, 2009)
M21	30/М	2007	Франция	Грузия	IDU	(Morel и др., 2010)
M212				Россия	IDU	(Viazov и др, 2010)
M935				Россия	IDU	(Viazov и др, 2010)
2038-98		2005	Эстония	Эстония	гемотрансфузии	(Tallo и др., 2007)
P077	35/М	2006	Нидерланды	Россия	IDU	(Raghwani и др., 2012)
P079	42/М	2006	Нидерланды	Грузия		(Raghwani и др., 2012)
P108	35/М	2007	Нидерланды	Грузия	IDU	(Raghwani и др., 2012)
P135	35/F	2005	Нидерланды	Грузия		(Raghwani и др., 2012)
P159	39/М	2007	Нидерланды	Грузия		(Raghwani и др., 2012)
P179	21/М	2000	Нидерланды	Грузия	IDU	(Raghwani и др., 2012)
AM_Azerbaijan		2014	Франция	Азербайджан		(Ramière С и др., 2014)
KV_Armenia		2014	Франция	Армения		(Ramière С и др., 2014)
ZN_Georgia		2014	Франция	Грузия		(Ramière С и др., 2014)
GS_Georgia		2014	Франция	Грузия		(Ramière С и др., 2014)
CA_Georgia		2014	Франция	Грузия		(Ramière С и др., 2014)
CD_Georgia		2014	Франция	Грузия		(Ramière С и др., 2014)
NA_Armenia		2014	Франция	Армения		(Ramière С и др., 2014)
Pat F	53/М		США		IDU	(Hedskog и др., 2015)
Pat J	35/М		США		IDU	(Hedskog и др., 2015)
Pat K	50/М		США		Татуировки, общие инструменты	(Hedskog и др., 2015)
Pat L	29/М		США		нозокомальный	(Hedskog и др., 2015)

IDU- внутривенное потребление наркотиков; ST- сексуальный путь; **красным** отмечены изоляты, обнаруженные в ходе нашего исследования

зарегистрированных в базе данных Genbank для всех выявленных на текущий момент рекомбинантных изолятов типа 2k/1b (n=47).

Нами были проанализированы фрагменты генов Core (последовательность длиной 359 н.), E1 (384 н.), NS2 (255 н.) и NS5b (338 н.). Для оценки уровня вариабельности указанных регионов генома в анализ были включены нуклеотидные последовательности прототипных изолятов субтипов 1b (HPCJCG, уникальный номер в базе данных Genbank - D90208), 2k (VAT96, AB031663) – в качестве родительских субтипов и субтипа 3a (HPCEGS, D17763) - в качестве внешней группы.

Следует отметить, что сравнительный анализ по каждому региону проводился не для всех выявленных в настоящее время рекомбинантных изолятов, а только для тех, чьи нуклеотидные последовательности исследуемого региона присутствовали в базе данных Genbank. Наиболее консервативным из рассмотренных был, как и следовало ожидать, фрагмент гена Core: выявленный процент гомологии между нуклеотидными последовательностями изолятов, относящихся к разным генотипам составлял 81-85% (Таблица 3.7). В группе из 14 рекомбинантных изолятов гомология составляла 96-98% (наибольший процент наблюдался между последовательностями изолятов, выделенными в Санкт-Петербурге). Максимальное различие было выявлено между последовательностями изолятов KNG327 и 611 и составило 12 замен на участке размером 359 нуклеотида.

Таблица 3.7 Процент гомологии между нуклеотидными последовательностями фрагмента гена Core (359 н.) рекомбинантных изолятов типа 2k/1b и прототипных изолятов субтипов 1b, 2k и 3a.

	1b	3a	2k	611	687	674	747	796	KNG318	KNG327	СУНСV037	СУНСV093
1b		84%	85%	84%	85%	84%	85%	85%	83%	83%	85%	85%
3a			83%	82%	83%	83%	83%	83%	81%	81%	82%	82%
2k				96%	97%	96%	97%	96%	95%	95%	95%	96%
611					98%	98%	98%	98%	96%	96%	97%	97%
687						98%	98%	98%	97%	96%	97%	97%
674							98%	98%	97%	96%	96%	97%
747								98%	97%	97%	97%	97%
796									97%	97%	98%	97%
KNG318										97%	96%	96%
KNG327											96%	96%
СУНСV037												96%

Выявленный уровень гомологии последовательностей рекомбинантных изолятов всех рассмотренных регионов представлен в Таблице 3.8. Для всех рассмотренных районов генома была показана высокая идентичность среди рекомбинантных изолятов, при этом уровень гомологии последовательностей рекомбинантных изолятов был несколько выше, чем в случае их сравнения с последовательностью прототипного изолята родительского субтипа. Наблюдаемая нами идентичность последовательностей рекомбинантных изолятов свидетельствует, что существующая в настоящий момент вирусная популяция CRF1_1b2k, вероятно, является результатом единственного возникновения в популяции и последующего распространения, а не следствием конвергентной эволюции различных вирусных штаммов.

Таблица 3.8 Сравнение уровня гомологии нуклеотидных последовательностей различных регионов генома рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b

Исследуемый регион	Core	E1	NS2	NS5b
Длина исследуемого фрагмента, н.	359	384	255	338
Количество рекомбинантных изолятов, n	14	36	30	37
Уровень гомологии между последовательностями рекомбинантных изолятов, %	96-98	89-98	89-92	93-98
Уровень гомологии последовательностей рекомбинантных изолятов и изолята родительского субтипа (2k для генов Core и E1, 1b для гена NS5b), %	95-97	87-91	Не определяли	91-94
Уровень гомологии последовательностей рекомбинантных изолятов и изолята референсного субтипа 3a, %	81-85	55-58	57-62	63-66

Мы провели филогенетический анализ регионов Core-E1 и NS5b всех выявленных рекомбинантных изолятов, для которых были доступны нуклеотидные последовательности (Рис. 3.9, Рис. 3.10). Рекомбинантные изоляты, изученные в настоящей работе, и изоляты того же типа, описанные

Рис. 3.9 Филогенетическое дерево, построенное методом NJ, нуклеотидных последовательностей фрагмента генов Core/E1 (861-1298, в соответствии с системой нумерации AF009606) рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b. Приведены индексы статистической поддержки узлов дерева, превышающие 70, а также масштаб шкалы генетических расстояний.

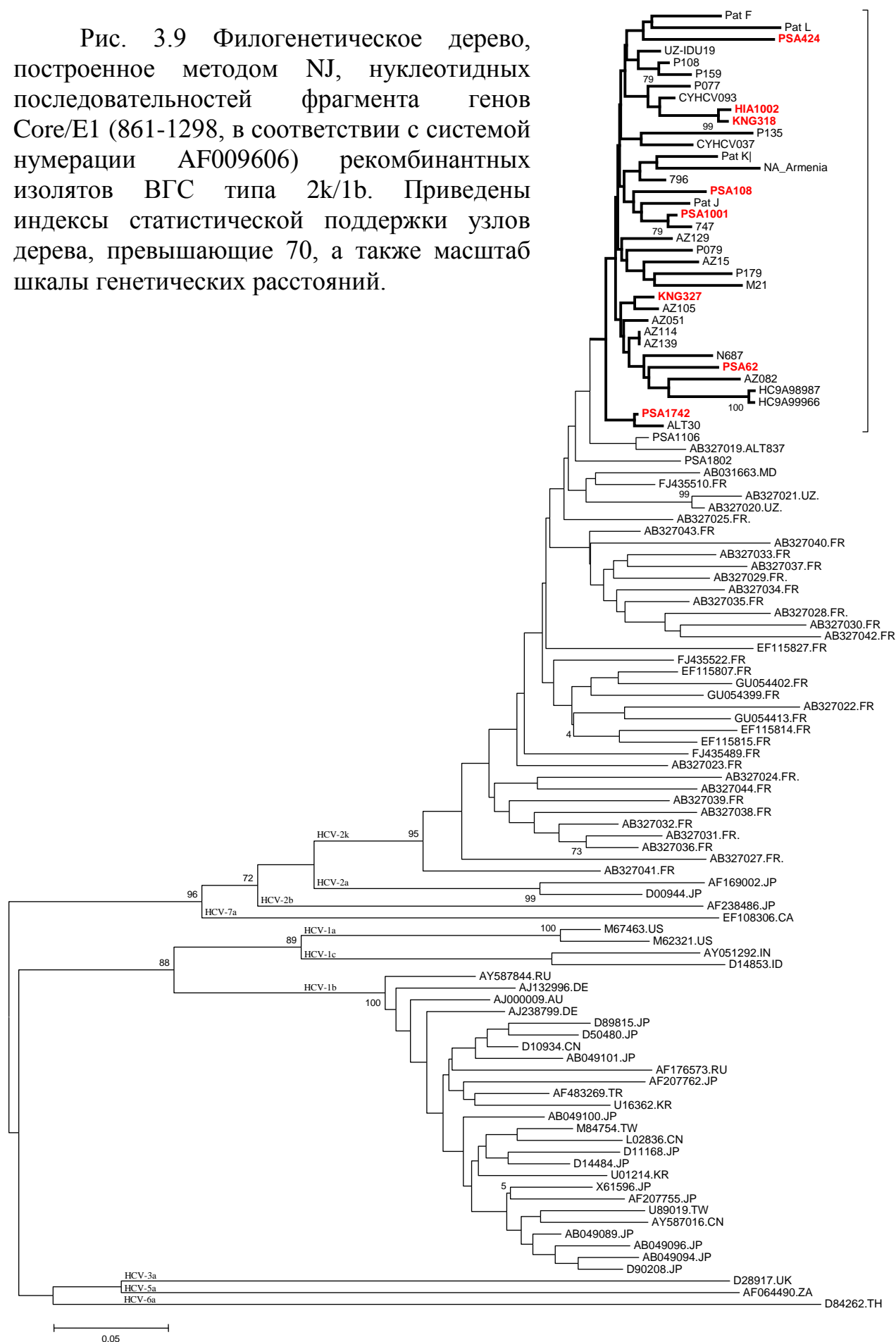
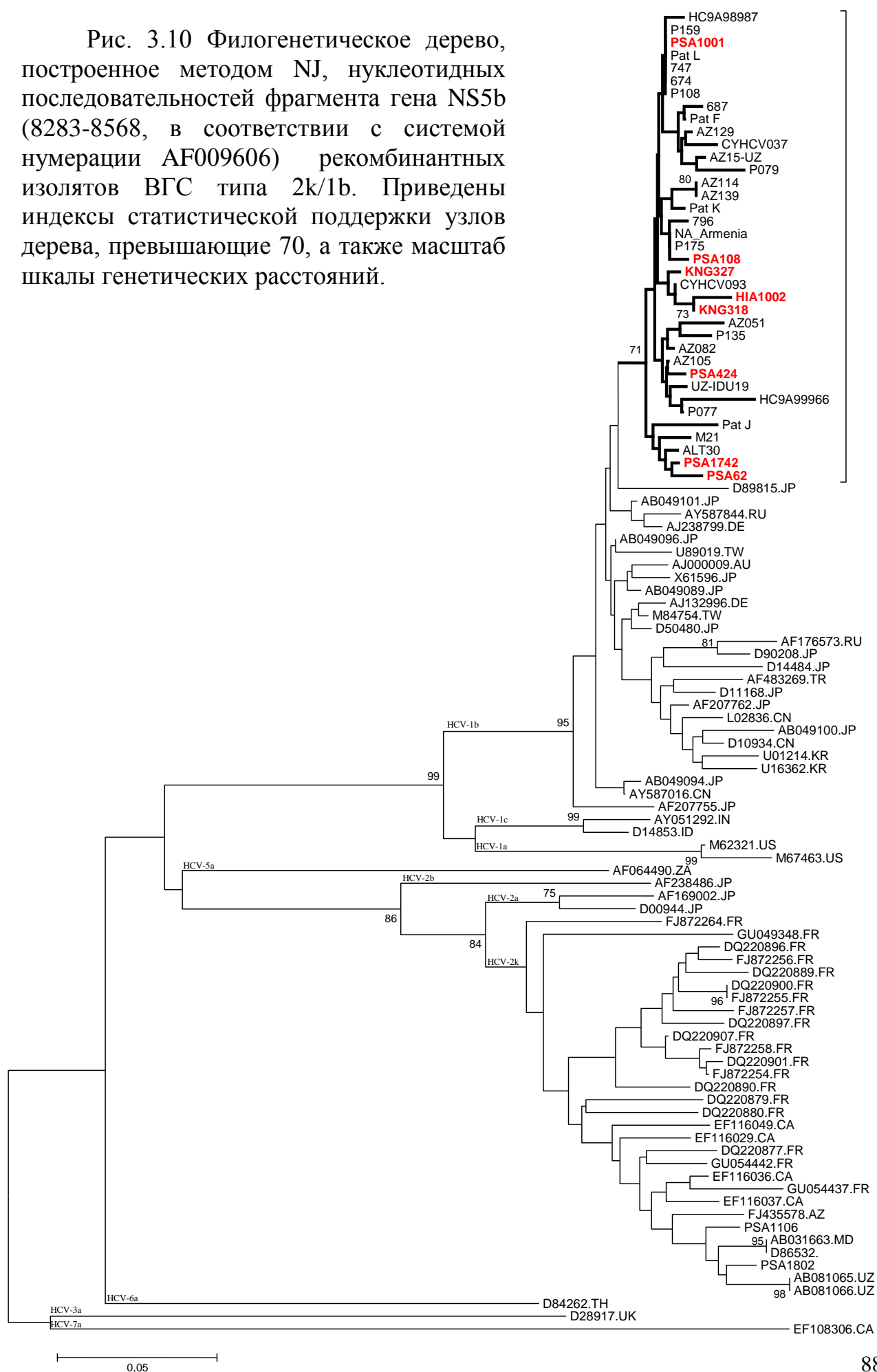


Рис. 3.10 Филогенетическое дерево, построенное методом NJ, нуклеотидных последовательностей фрагмента гена NS5b (8283-8568, в соответствии с системой нумерации AF009606) рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b. Приведены индексы статистической поддержки узлов дерева, превышающие 70, а также масштаб шкалы генетических расстояний.



другими авторами, при использовании применяемого метода построения филогенетических деревьев образовывали близкородственные кладистические группы (по одной на каждом дереве), не включающие нерекомбинантные прототипные изоляты любого другого типа. Такие группы наблюдались при использовании для анализа фрагментов генов Core/E1 (Рис. 3.9) и NS5b (Рис. 3.10). При этом не было отмечено группирования изолятов по территориальному признаку (месту выявления, и происхождения) и по предполагаемым путям инфицирования. Индексы статистической поддержки узлов не были высокими (<70% и 71% для филогенетических деревьев, построенных на основании последовательностей фрагментов генов core/E1 и NS5B, соответственно) и не достигли статистической значимости, возможно, из-за малой длины проанализированных последовательностей. Для проверки этого предположения мы провели анализ протяженных последовательностей рекомбинантных изолятов. Для 9 изолятов была известна нуклеотидная последовательность полного генома, еще для двух – последовательность структурной части генома. Мы определили полногеномную последовательность изолята PSA424 и использовали ее для проведения анализа. Филогенетический анализ проводили отдельно для 5' части генома до точки рекомбинации и для 3' части, после точки рекомбинации (рис. 3.11).

При использовании этого подхода удалось показать статистически значимые индексы поддержки узлов (96% и 100%). Филогенетическая близость всех рекомбинантных изолятов типа 2k/1b, наблюдаемая в двух удаленных друг от друга геномных регионах, расположенных по разные стороны от точки рекомбинации, а также в районе ее расположения (рис.3.12) указывает на общность происхождения изолятов в результате единственного акта рекомбинации.

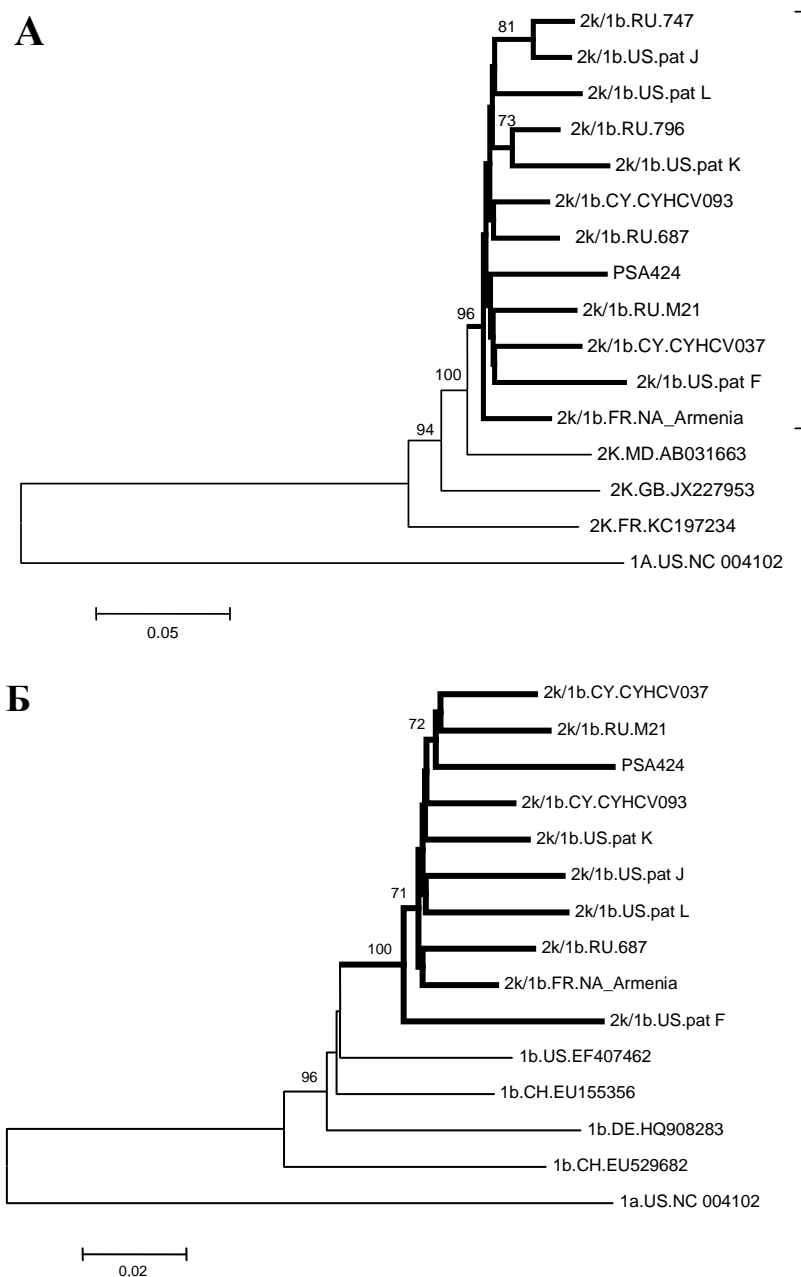


Рис. 3.11 Филогенетические деревья, построенные методом NJ, нуклеотидных последовательностей 5' части, длиной 3139 н. (А) и 3' части, длиной 5952 н. (Б) генома рекомбинантных изолятов ВГС. Приведены индексы статистической поддержки узлов дерева, превышающие 70, а также масштаб шкалы генетических расстояний.

3175
↓

```

2k      : .....A.....A.....A.....C.....T..C...T..C...A...TCA.GT.....TGCTAGT..G.....C.....C.....
KNG318  : ...T.....T.....T.....C.....T.....T.....C.....
HIA1002 : ...T.....T.....C.....T.....T.....C.....
KNG327  : .....C.....T.....G.....
PSA108  : .....T.....T.....A.....A.....
PSA62   : .....T.....G.....T.....A.....
ALT30   : C..A.....T.....AA.....T.....
AZ-15   : ...T..A..T.....T.....T.....T.....G..A..
UZ-IDU19 : .....C.....C.....T.....
611     : ...T.....A.....A.....T.....
687     : .....G.....C.....C.....T.....A.....
674     : .....A.....A.....C.....
747     : .....A.....C.....
796     : .....C.....T.....T.....C.....
HC9A99966 : .....G.....C.....T.....T.....AA.....
CYHCV037 : .....T.....T.....A.....G.....
CYHCV093 : .....T.....T.....A.....C.....
1b      : A...C..C..T.....A...GCCT.CA.G.AG...G.CCGCGCT...A..T..G...G..A.....T.....T.....
          tGG aAgTA gTCCAgATGatgcTgcTaAccCTtGg agatgGACTGGcACcTACaTtTATgAcCAtCT aCtCCAcTGcggggacTGGGccacg gGccTaCGaGAcCT GCgG

```

Рис. 3.12 Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена NS2 рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b и прототипных изолятов субтипов 2k и 1b.

Расчеты, произведенные с помощью метода молекулярных часов, показали, что рекомбинация произошла в интервале 1959-1977 гг (Рис 3.13).

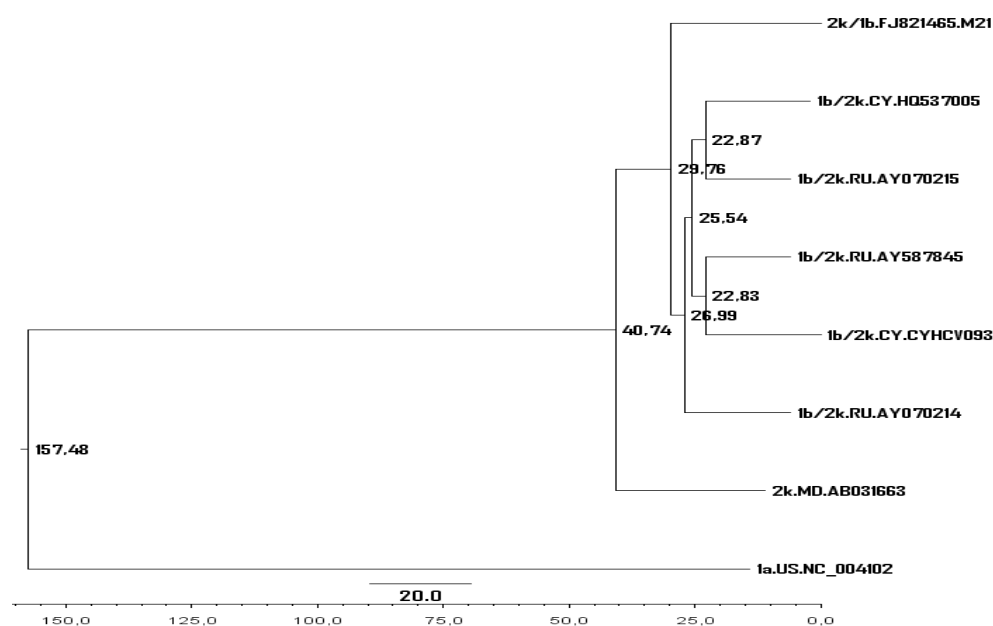


Рис.3.13 Хронограмма, построенная на основании нуклеотидных последовательностей 5' части генома, длиной 3139 н. изолятов CRF01_1b2k и его родительских подтипов. Времена дивергенции оценены с использованием программы BEAST. Значения времен дивергенции в годах приведены в узлах дерева.

3.7 Оценка доли изолятов 2k/1b в общей популяции ВГС на территории бывшего СССР

Изоляты 2k/1b, впервые обнаруженные в Санкт-Петербурге, и являющиеся объектом исследования в нашей работе, образуют единственную известную циркулирующую рекомбинантную форму ВГС. К настоящему моменту выявлено 47 рекомбинантных изолята этого типа в разных странах, включая изоляты, обнаруженные нами (таблица 3.6). Средний возраст лиц, инфицированных CRF01_1b2k, на момент выявления у них ВГС составлял 34,5 года (n=27), что несколько выше, чем средний возраст инфицированных ВГС пациентов из Алтайского края, вошедших в наше исследование (29 лет, n=368). Это соотношение сохранялось при рассмотрении только пациентов из Сибирского региона, их средний возраст составлял 33,2 года (n=9). Рекомбинантные изоляты намного чаще выявляли у мужчин (n=23), чем у женщин (n=4).

В нашем исследовании были обнаружены 8 рекомбинантных изолятов и только 2 изолята, относящихся к одному из родительских субтипов 2k. Вероятно, приобретение рекомбинантом неструктурной части генома, содержащей гены, кодирующие репликативный комплекс от родительского субтипа 1b, дало преимущество в распространении по сравнению с субтипом 2k. Этот факт большей встречаемости рекомбинантной формы можно объяснить попаданием CRF01_1b2k в группу риска, например в среду потребителей наркотиков, где скорость распространения вируса существенно выше, чем в остальной популяции. Такое предположение подтверждается фактом, что больше всего CRF01_1b2k выявляют среди наркоманов. Однако было бы ошибочным считать, что CRF01_1b2k распространяется преимущественно среди наркоманов. Зачастую и сам дизайн исследования предполагает работу в основном с этой социальной группой, не затрагивая основную популяцию. Так были выявлены рекомбинантные изоляты в Азербайджане (данные не опубликованы), Узбекистане (Kurbanov и др., 2007) и России (Viazov и др., 2010). В нашем исследовании, направленном на изучение

эпидемиологической обстановки с ВГС среди так называемой «основной популяции» только 1 из 8 носителей CRF01_1b2k признал употребление наркотиков, что может быть вызвано намеренным скрыванием этой информации. В других случаях наиболее вероятной причиной инфицирования являлись: сексуальная трансмиссия; перенесенные множественные гемотрансфузии и хирургические операции; контакт с инфицированной кровью на рабочем месте. В трех случаях не удалось установить предполагаемый путь заражения. Таким образом, нельзя однозначно связывать распространение CRF01_1b2k только с внутривенным употреблением наркотиков.

Встречаемость рекомбинантов ВГС типа 2k/1b на уровне 3% в Санкт-Петербург (Kalinina и др., 2002), достаточно удаленном от места нашего исследования, позволяет предположить распространение рекомбинантов данного типа по всей территории России. А недавнее обнаружение аналогичных форм ВГС в других странах (таблица 3.6) позволяет существенно расширить возможный ареал циркуляции таких изолятов. В нашей работе, при исследовании групп пациентов с острым и хроническим вирусным гепатитом С из двух Сибирских регионов: Алтайского Края и Новосибирской области – в обеих группах были выявлены рекомбинантные изоляты ВГС. Среди жителей Алтайского края, проявлявших симптомы острого гепатита, рекомбинанты выявляли с частотой 1,3%, аналогичный уровень (1,0%) был продемонстрирован среди пациентов с вирусным гепатитом С, проживающих в Новосибирской области. Учитывая данные первой работы (Kalinina и др., 2002), мы можем оценить встречаемость рекомбинантных изолятов 2k/1b на уровне не менее 1% на всей территории России.

Следует отметить, что, несмотря на то, что за последние годы рекомбинантные изоляты выявляли в таких странах, как Россия, Азербайджан, Армения, Узбекистан, Ирландия, Эстония, Кипр, США, Франция и Нидерланды, большинство из них, прямо или косвенно были связаны со странами бывшего Советского Союза (таблица 3.6). Учитывая то, что наиболее филогенетически близкие (по результатам анализа области Core-E1) к

рекомбинантам изоляты ВГС субтипа 2k из числа присутствующих в Genbank были выделены в Молдове (VAT96, номер в базе данных GenBank AB031663), на территории Алтайского края (ALT837, AB327019) и в нашем исследовании в Новосибирской области (PSA1106, PSA1802) (рис.3.13) кажется наиболее вероятным, что местом происхождения CRF01_1b2k является территория бывшего Советского Союза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящего исследования являлось изучение распространенности, путей передачи и генетического разнообразия рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b на территории Западной Сибири.

Изучение встречаемости серологических маркеров ВГС на территории Алтайского края в течении 2001-2002 гг. показало наличие АТ к ВГС у 35,3% пациентов с симптомами острого гепатита, что демонстрирует значительную роль ВГС в развитии острого гепатита среди пациентов, проживающих на этой территории. Было показано, что лица молодого возраста более подвержены действию факторов риска инфицирования ВГС, по сравнению с группой людей старшего возраста.

Проведенный нами анализ факторов риска инфицирования ВГС указал на употребление наркотиков как на наиболее значимый фактор. В ходе исследования мы выявили статистически достоверную связь между сексуальным поведением и наличием инфекции ВГС. Значимые связи со статусом по маркерам инфекции ВГС в подгруппах лиц, отрицавших употребление внутривенных наркотиков, показали медицинские манипуляции (наличие переливаний крови или её компонентов, перенесенные хирургические операции, общая анестезия) и профессиональные факторы риска (работа врачом, контакт с человеческой кровью на рабочем месте).

Изучение генотипического разнообразия изолятов ВГС показало, что на территории Алтайского края преобладающим субтипом является субтип 1b, следующий по распространенности – субтип 3a, с меньшей частотой встречаются субтипы второго генотипа. Выявленное соотношение генотипов, в целом соответствует полученным ранее данным по генотипическому разнообразию ВГС в г. Новосибирске. Стоит отметить, что, несмотря на многочисленные исследования, свидетельствующие о преимущественном распространении среди наркоманов субтипов 1a (характерен для США и стран Западной Европы) и 3a, в нашей работе не было отмечено существенных

различий в частоте выявления субтипов ВГС среди лиц, употребляющих наркотики и среди пациентов общей группы. Отличное от общего распределение генотипов было выявлено только в группе медработников, где субтип 1b определяли в 91,6% случаев.

Проведенный филогенетический анализ двух отдаленных друг от друга районов генома ВГС выявил присутствие в популяции рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b. Рекомбинантные изоляты ВГС нами были впервые обнаружены на территории Сибирского региона, хотя их встречаемость на уровне 1,5%, показанная в нашей работе, возможно, говорит об их широкой распространенности. Отсутствие информации о подобного рода рекомбинантах мы связываем, в первую очередь, с неверным определением генотипа в ходе рутинной диагностики. Принятая практика устанавливать генотип по одному региону генома, а чаще всего им является 5'UTR, приводит к ошибочному отнесению рекомбинантных изолятов типа 2k/1b ко второму генотипу. Поскольку генотип ВГС принципиален при выборе тактики интерферонотерапии, правильное определение генотипа является очень важным в лечении инфекции ВГС.

С этой целью мы разработали мультиплексную систему для скринингового генотипирования изолятов ВГС, которая позволяет определять субтипы циркулирующие на территории России: 1b, 2a, 2c, 2k, 2k/1b и 3a. Определение генотипа требует проведения двух раундов ПЦР со специфическими праймерами и последующей детекции продуктов амплификации а 1% агарозном геле. Генотип устанавливали по длине получившегося фрагмента. Систему тестировали на 581 клиническом образце сывороток крови, полученных от пациентов с хронической инфекцией ВГС (г. Новосибирск). Проведенные исследования позволили определить генотип для 496 образцов, 5 из которых являлись рекомбинантными изолятами типа 2k/1b.

Всего в нашей работе было выявлено 8 рекомбинантных изолятов, 3 у пациентов с острым гепатитом С и 5 у пациентов с хронической инфекцией. Сравнение историй болезни пациентов, у которых были обнаружены

рекомбинантные изоляты ВГС, и остальных пациентов с диагнозом «острый гепатит», вошедших в исследование, не выявило отличий в течении заболевания между случаями инфекции рекомбинантными вариантами ВГС и ВГС генотипа 1 или 2. Предполагаемые пути инфицирования рекомбинантными изолятами были различны и включали: употребление наркотиков, бытовой или сексуальный путь, медицинские манипуляции, заражение на рабочем месте. Для 3 случаев установить действовавшие факторы риска не удалось.

Сравнение нуклеотидных последовательностей 4 районов генома ВГС выявило высокую степень гомологии среди всех известных в настоящее время рекомбинантных изолятов типа 2k/1b. Филогенетический анализ последовательностей подтвердил общность их происхождения. Рекомбинантные изоляты, изученные в настоящей работе, и изоляты, описанные другими авторами, образовывали близкородственные кладистические группы, не включающие нерекомбинантные прототипные изоляты любого другого типа. Такие группы наблюдались как при использовании для анализа фрагментов генов Core/E1, расположенных на 5'конце генома и относящихся к субтипу 2k, так и фрагментов гена NS5b, на 3'конце генома, принадлежащих субтипу 1b. Подобная филогенетическая близость делает гипотезу о едином происхождении рекомбинантов типа 2k/1b наиболее вероятной. Расчеты, произведенные с помощью метода молекулярных часов, показали, что рекомбинация произошла в интервале 1959-1977 гг. Предполагается, что местом происхождения CRF01_1b2k является территория бывшего Советского Союза. Основанием подобной теории служат следующие факты:

- выделенные в разных странах рекомбинантные изоляты прямо или косвенно были связаны со странами бывшего Советского Союза;
- наиболее филогенетически близкие (по результатам анализа области Core-E1) к рекомбинантам изоляты ВГС субтипа 2k из числа присутствующих в Genbank были выделены в Молдове,

Узбекистане, на территории Алтайского края и Новосибирской области.

Встречаемость рекомбинантных изолятов на территории России в настоящее время мы оцениваем на уровне не менее 1%.

ВЫВОДЫ:

1. В ходе комплексного молекулярно-эпидемиологического исследования ВГС у пациентов с симптомами острого гепатита в г. Барнаул впервые на территории Сибири были выявлены 3 случая инфицирования рекомбинантной формой CRF01_1b2k ВГС. Подтверждена точка рекомбинации в последовательности гена NS2.

2. Впервые разработана мультиплексная тест-система для скринингового генотипирования изолятов ВГС, позволяющая определять большинство субтипов, циркулирующих на территории России: 1b, 2a, 2c, 2k, 2k/1b и 3a. Показана специфичность и чувствительность созданной тест-системы.

3. Проведены сравнительные годовые исследования структуры генотипов ВГС, в клинических образцах собранных в 2005-2014г. в г. Новосибирске. Выявлено: субтип 1b в 278 случаях (56,0%), субтип 3a – в 155 (31,3%), генотип 2 - в 58 (11,7%) случаях. 5 (1,0%) образцов являлись рекомбинантами типа 2k/1b.

4. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов Core, E1, NS2 и NS5b 8 обнаруженных в Барнауле и Новосибирске рекомбинантных изолятов типа 2k/1b показал близкое филогенетическое родство между ними, а также 27 рекомбинантами, описанными к настоящему времени в Санкт-Петербурге, Азербайджане, Армении, Эстонии, Нидерландах и Ирландии, Франции и США. Уровень гомологии составил для гена Core – 97%, E1 – 94%, NS2 – 92%, NS5b – 96%.

5. Филогенетический анализ геномов рекомбинантов показал общность происхождения изолятов типа 2k/1b и их широкую циркуляцию на территории России. Анализ 5'-части генома рекомбинантных изолятов, относящейся к субтипу 2k, показал, что наиболее близкие изоляты субтипа 2k ранее были выявлены в Молдове, Узбекистане и России в 1996-2013 гг. Частота встречаемости рекомбинантных изолятов в Сибирском регионе оценивается в районе 1 %.

6. Методом молекулярных часов показано, что наиболее вероятное время появления рекомбинантной формы CRF01_1b2k в интервале 1959-1977гг.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бююль, А., Цёфель, П. SPSS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей / Пер. с нем.-СПб.: ООО “ДиаСофтЮП”, 2002. - 608 с.
2. Гаврилова И.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф. и др. Распространенность, генотипическое разнообразие и факторы риска гепатита С среди больных с хроническими вирусными гепатитами в Новосибирской области // Инфекционные болезни.-2007.- 5.-С. 9-15.
3. Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф. и др. Этиология острых гепатитов и генотипическое разнообразие вирусов гепатитов А, В, С и Е в трех регионах Сибири // Инфекционные болезни.-2005.- 3.-С. 26-31.
4. Кузин С.Н., Лисицина Е.В., Самохвалов Е.И. и др. Распространение гепатита С и отдельных генотипов вируса гепатита С в регионе с умеренной активностью эпидемического процесса // Вопросы вирусологии.-1999.- 44.-С. 79-82.
5. Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Миширо С. и др. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ // Вопросы вирусологии.-1997.- 4.- С. 157-161.
6. Семенов С.И., Терехова М.В., Индеева Л.Д. и др. Распространенность и генетическая характеристика вируса гепатита с в якутии. // Якутский медицинский журнал. 2009. С. 129–132.
7. Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф. и др. Частота встречаемости маркеров гепатита С и факторы риска у персонала больниц Новосибирской области // Журн. Микробиол. Эпидемиол. и Иммунол.-2002.- 2.- С. 26-32.
8. Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф. и др. Частоты встречаемости маркёров, распределение генотипов и факторы риска вирусного гепатита С среди некоторых групп населения Новосибирской области // Журн. Микробиол. Эпидемиол. и Иммунол. -2004.- 5.-С. 20-25.

9. Шустов А.В., Мишин В.П., Максютлов А.З. и др. Встречаемость маркеров вируса гепатита С и различных его генотипов у пациентов 1 муниципальной инфекционной клинической больницы г. Новосибирск // *Вопр. Вирусол.*-2000.- 6.-С. 22-27.
10. Alavian S.M., Tabatabaei S.V., Behnava B., и др. Optimal duration of treatment for HCV genotype 1 infection in slow responders: a meta-analysis. // *Hepat Mon.* 2011. № 11. С. 612–619.
11. Ali S.A., Donahue R.M.J., Qureshi H., и др. Hepatitis B and hepatitis C in Pakistan: prevalence and risk factors. // *Int J Infect Dis.* 2009. № 13. С. 9–19.
12. Antaki N., Craxi A., Kamal S., и др. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. // *Liver Int.* 2010. № 30. С. 342–355.
13. Appel N., Schaller T., Penin F., и др. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. // *J. Biol. Chem.* 2006. № 281. С. 9833–9836.
14. Banerjee A., Ray R.B., Ray R. Oncogenic Potential of Hepatitis C Virus Proteins. // *Viruses.* 2010. № 2. С. 2108–2133.
15. Bartenschlager R., Frese M., Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. // *Adv. Virus Res.* 2004. № 63. С. 71–180.
16. Barth H., Schafer C., Adah M.I., и др. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. // *J. Biol. Chem.* 2003. № 278. С. 41003–41012.
17. Bhattacharya D., Accola M.A., Ansari I.H., и др. Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States. // *Virol J.* 2011. № 8. С. 458.
18. Boulant S., Montserret R., Hope R.G., и др. Structural Determinants That Target the Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets. // *Journal of Biological Chemistry.* 2006. № 281. С. 22236 –22247.
19. Bressanelli S., Tomei L., Roussel A., и др. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

1999. № 96. C. 13034–13039.

20. Bukh J., Apgar C.L., Yanagi M. Toward a surrogate model for hepatitis C virus: An infectious molecular clone of the GB virus-B hepatitis agent. // *Virology*. 1999. № 262. C. 470–478.

21. Bürckstümmer T., Kriegs M., Lupberger J., и др. Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. // *FEBS Lett*. 2006. № 580. C. 575–580.

22. Burbelo P.D., Dubovi E.J., Simmonds P., и др. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host.// *J. Virol*. 2012. Jun. 86(11). C. 6171-6178.

23. Calado R.A., Rocha M.R., Parreira R., и др. Hepatitis C virus subtypes circulating among intravenous drug users in Lisbon, Portugal. // *J. Med. Virol*. 2011. № 83. C. 608–615.

24. Callens N., Ciczora Y., Bartosch B., и др. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. // *J. Virol*. 2005. № 79. C. 15331–15341.

25. Del Campo J.A., Rojas A., Romero-Gómez M. Entry of hepatitis C virus into the cell: A therapeutic target. // *World J. Gastroenterol*. 2012. № 18. C. 4481–4485.

26. Drexler J.F., Corman V.M., Müller M.A., Evidence for novel hepaciviruses in rodents.// *PLoS Pathog*. 2013. 9(6).

27. Candotti D., Temple J., Sarkodie F., и др. Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana, West Africa. // *J. Virol*. 2003. № 77. C. 7914–7923.

28. Carrère-Kremer S., Montpellier C., Lorenzo L., и др. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. // *J. Biol. Chem*. 2004. № 279. C. 41384–41392.

29. Carrère-Kremer S., Montpellier-Pala C., Cocquerel L., и др. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. // *J. Virol*. 2002.

№ 76. С. 3720–3730.

30. Chak E., Talal A.H., Sherman K.E., и др. Hepatitis C virus infection in USA: an estimate of true prevalence. // *Liver Int.* 2011. № 31. С. 1090–1101.

31. Chetverina H.V., Demidenko A.A., Ugarov V.I., и др. Spontaneous rearrangements in RNA sequences. // *FEBS Lett.* 1999. № 450. С. 89–94.

32. Chlabicz S., Flisiak R., Grzeszczuk A., и др. Known and probable risk factors for hepatitis C infection: a case series in north-eastern Poland. // *World J. Gastroenterol.* 2006. № 12. С. 141–145.

33. Cocquerel L., Voisset C., Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. // *J. Gen. Virol.* 2006. № 87. С. 1075–1084.

34. Colina R., Casane D., Vasquez S., и др. Evidence of Intratypic Recombination in Natural Populations of Hepatitis C Virus. // *J Gen Virol.* 2004. № 85. С. 31–37.

35. Contreras A.M., Ochoa-Jiménez R.J., Celis A., и др. High antibody level: an accurate serologic marker of viremia in asymptomatic people with hepatitis C infection. // *Transfusion.* 2010. № 50. С. 1335–1343.

36. Cornberg M., Razavi H.A., Alberti A., и др. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. // *Liver Int.* 2011. № 31 Suppl 2. С. 30–60.

37. Cristina J., Colina R. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. // *Virol. J.* 2006. № 3. С. 53.

38. Curran R., Jameson C.L., Craggs J.K., и др. Evolutionary trends of the first hypervariable region of the hepatitis C virus E2 protein in individuals with differing liver disease severity. // *J. Gen. Virol.* 2002. № 83. С. 11–23.

39. Deleersnyder V., Pillez A., Wychowski C., и др. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. // *J. Virol.* 1997. № 71. С. 697–704.

40. Demetriou V.L., van de Vijver D.A.M.C., Kostrikis L.G. Molecular epidemiology of hepatitis C infection in Cyprus: evidence of polyphyletic infection. // *J. Med. Virol.* 2009. № 81. С. 238–248.

41. Duberg A.-S., Pettersson H., Aleman S., и др. The burden of hepatitis C

in Sweden: a national study of inpatient care. // J. Viral Hepat. 2011. № 18. C. 106–118.

42. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. // World J. Gastroenterol. 2007. № 13. C. 2406–2415.

43. Egger D., Wölk B., Gosert R., и др. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. // J. Virol. 2002. № 76. C. 5974–5984.

44. El-Hage N., Luo G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. // J. Gen. Virol. 2003. № 84. C. 2761–2769.

45. El-Serag H.B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. // Gastroenterology. 2012. № 142. C. 1264–1273.e1.

46. Esteban J.I., Sauleda S., Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. // J. Hepatol. 2008. № 48. C. 148–162.

47. Evans M.J., Rice C.M., Goff S.P. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004. № 101. C. 13038–13043.

48. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution.-1985.- 39.-P. 787-791.

49. Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.-2002

50. Forns X., Thimme R., Govindarajan S., и др. Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000. № 97. C. 13318–13323.

51. François C., Castelain S., Duverlie G., и др. Optimizing the treatment of chronic viral hepatitis C. // Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2009. № 3. C. 607–613.

52. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., и др. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. // *N. Engl. J. Med.* 2002. № 347. C. 975–982.
53. Fusco M., Girardi E., Piselli P., и др. Epidemiology of viral hepatitis infections in an area of southern Italy with high incidence rates of liver cancer. // *Eur. J. Cancer.* 2008. № 44. C. 847–853.
54. Gallei A., Pankraz A., Thiel H.-J., и др. RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. // *J. Virol.* 2004. № 78. C. 6271–6281.
55. Gerlach J.T., Diepolder H.M., Zachoval R., и др. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. // *Gastroenterology.* 2003. № 125. C. 80–88.
56. Gmyl A.P., Belousov E.V., Maslova S.V., и др. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. // *J. Virol.* 1999. № 73. C. 8958–8965.
57. Gonzalez M.E., Carrasco L. Viroporins. // *FEBS Lett.* 2003. № 552. C. 28–34.
58. González-Candelas F., López-Labrador F.X., Bracho M.A. Recombination in hepatitis C virus. // *Viruses.* 2011. № 3. C. 2006–2024.
59. Gottwein J.M., Scheel T.K.H., Hoegh A.M., и др. Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. // *Gastroenterology.* 2007. № 133. C. 1614–1626.
60. Greenland S., Drescher K. Maximum likelihood estimation of the attributable fraction from logistic models. // *Biometrics.* 1993. № 49. C. 865–872.
61. Hahm B., Han D.S., Back S.H., и др. NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. // *J. Virol.* 1995. № 69. C. 2534–2539.
62. Hedskog C., Doeble B., Chodavarapu K., Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. // *Hepatology.* 2015. Feb. №61(2). C. 471-480.
63. Huang L., Hwang J., Sharma S.D., и др. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. // *J. Biol. Chem.* 2005. № 280. C. 36417–36428.

64. Hüppe D., Zehnter E., Mauss S., и др. [Epidemiology of chronic hepatitis C in Germany--an analysis of 10,326 patients in hepatitis centres and outpatient units]. // *Z Gastroenterol.* 2008. № 46. С. 34–44.
65. Irshad M., Dhar I. Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. // *Med Princ Pract.* 2006. № 15. С. 405–416.
66. Ishida S., Kaito M., Kohara M., и др. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. // *Hepatol. Res.* 2001. № 20. С. 335–347.
67. Ivashkina N., Wölk B., Lohmann V., и др. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. // *J. Virol.* 2002. № 76. С. 13088–13093.
68. Jokhio A.H., Bhatti T.A., Memon S. Knowledge, attitudes and practices of barbers about hepatitis B and C transmission in Hyderabad, Pakistan. // *East. Mediterr. Health J.* 2010. № 16. С. 1079–1084.
69. Kageyama S., Agdamag D.M., Alesna E.T., и др. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. // *J. Med. Virol.* 2006. № 78. С. 1423–1428.
70. Kalinina O., Norder H., Magnus L.O. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. // *J. Gen. Virol.* 2004. № 85. С. 1853–1857.
71. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., и др. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. // *J. Virol.* 2002. № 76. С. 4034–4043.
72. Kalinina O., Norder H., Vetrov T., и др. Shift in predominating subtype of HCV from 1b to 3a in St. Petersburg mediated by increase in injecting drug use. // *J. Med. Virol.* 2001. № 65. С. 517–524.
73. Kapoor A., Simmonds P., Gerold G., и др. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. № 108. С. 11608–11613.

74. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. // *Microb. Comp. Genomics*. 2000. № 5. С. 129–151.
75. Kato N., Ootsuyama Y., Ohkoshi S., и др. Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. № 189. С. 119–127.
76. Kershenovich D., Razavi H.A., Sánchez-Avila J.F., и др. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. // *Liver Int.* 2011. № 31 Suppl 2. С. 18–29.
77. Kerzman H., Green M.S., Shinar E. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in Israel: a case-control study between native Israelis and immigrants from the former Soviet Union. // *Transfusion*. 2007. № 47. С. 1189–1196.
78. Kim S.-J., Kim J.-H., Kim Y.-G., и др. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. // *J. Biol. Chem.* 2004. № 279. С. 50031–50041.
79. Kolykhalov A.A., Feinstone S.M., Rice C.M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. // *J. Virol.* 1996. № 70. С. 3363–3371.
80. Krekulova L., Rehak V., Madrigal N., и др. Genotypic and epidemiologic characteristics of hepatitis C virus infections among recent injection drug user and nonuser populations. // *Clin. Infect. Dis.* 2001. № 33. С. 1435–1438.
81. Krekulová L., Reháč V., Strunecký O., и др. [Current situation and trends in the hepatitis C virus genotype distribution among injecting drug users in the Czech Republic]. // *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2009. № 58. С. 84–89.
82. Kretz K., Callen W., Hedden V. Cycle sequencing. // *PCR Methods Appl.* 1994. № 3. С. S107–112.
83. Kunkel M., Lorinczi M., Rijnbrand R., и др. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. // *J. Virol.* 2001. № 75. С. 2119–2129.

84. Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., и др. Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. // *Hepatology Research*. 2007. № 38. С. 457–464.
85. Kurbanov F., Tanaka Y., Chub E., и др. Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1_2k/1b. // *J. Infect. Dis.* 2008. № 198. С. 1448–1456.
86. Kuzin S.N., Samokhvalov E.I., Zabolotina E.E., и др. [Hepatitis virus genotype structure in patients with chronic hepatitis C]. // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011. С. 33–38.
87. Laskus T., Wang L.F., Radkowski M., и др. Exposure of hepatitis C virus (HCV) RNA-positive recipients to HCV RNA-positive blood donors results in rapid predominance of a single donor strain and exclusion and/or suppression of the recipient strain. // *J. Virol.* 2001. № 75. С. 2059–2066.
88. Lee Y.-M., Lin H.-J., Chen Y.-J., и др. Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: Full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form_2b6w. // *J. Med. Virol.* 2010. № 82. С. 57–68.
89. Legrand-Abravanel F., Claudinon J., Nicot F., и др. New Natural Intergenotypic (2/5) Recombinant of Hepatitis C Virus. // *J Virol.* 2007. № 81. С. 4357–4362.
90. Lemm J.A., O’Boyle D. 2nd, Liu M., и др. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. // *J. Virol.* 2010. № 84. С. 482–491.
91. Lindenbach B.D., Rice C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. // *Nature*. 2005. № 436. С. 933–938.
92. Lole K.S., Jha J.A., Shrotri S.P., и др. Comparison of hepatitis C virus genotyping by 5’ noncoding region- and core-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and use of the assay for determining subtype distribution in India. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. № 41. С. 5240–5244.
93. Lundin M., Monné M., Widell A., и др. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. // *J. Virol.* 2003. № 77. С. 5428–5438.

94. Lvov D.K., Samokhvalov E.I., Tsuda F., и др. Prevalence of hepatitis C virus and distribution of its genotypes in Northern Eurasia. // Arch. Virol. 1996. № 141. С. 1613–1622.
95. Martínez-Bauer E., Forns X., Armelles M., и др. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. // J. Hepatol. 2008. № 48. С. 20–27.
96. McLauchlan J., Lemberg M.K., Hope G., и др. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. // EMBO J. 2002. № 21. С. 3980–3988.
97. Mellor J., Holmes E.C., Jarvis L.M., и др. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. // J. Gen. Virol. 1995. № 76 (Pt 10). С. 2493–2507.
98. Monazahian M., Böhme I., Bonk S., и др. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. // J. Med. Virol. 1999. № 57. С. 223–229.
99. Moreau I., Hegarty S., Levis J., и др. Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. // Virol. J. 2006. № 3. С. 95.
100. Morel V., Descamps V., François C., и др. Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed Hepatitis C infection: a case report. // J. Clin. Virol. 2010. № 47. С. 382–386.
101. Morel V., Fournier C., François C., и др. Genetic recombination of the hepatitis C virus: clinical implications. // J. Viral Hepat. 2011. № 18. С. 77–83.
102. Moreno M.P., Casane D., López L., и др. Evidence of recombination in quasispecies populations of a Hepatitis C Virus patient undergoing anti-viral therapy. // Virol. J. 2006. № 3. С. 87.
103. Moreno P., Alvarez M., López L., и др. Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. // Virol. J. 2009. № 6. С. 203.

104. Morikawa K., Lange C.M., Gouttenoire J., и др. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. // *J. Viral Hepat.* 2011. № 18. С. 305–315.
105. Munir S., Saleem S., Idrees M., и др. Hepatitis C Treatment: current and future perspectives. // *Viol J.* 2010. № 7. С. 296.
106. Negro F. Divisions of Clinical Pathology and of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital, Geneva, Switzerland. Newly diagnosed case data from the Swiss Federal Office of Public Health. Conversation with Razavi HA. Center for Disease Analysis, Kromite, Louisville, CO, USA, 5 November 2010.
107. Nelson P., Mathers B., Cowie B., и др. The epidemiology of viral hepatitis among people who inject drugs: Results of global systematic reviews. // *Lancet.* 2011. № 378. С. 571–583.
108. Nguyen V.T.T., McLaws M.-L., Dore G.J. Prevalence and risk factors for hepatitis C infection in rural north Vietnam. // *Hepatol Int.* 2007. № 1. С. 387–393.
109. Njouom R., Pasquier C., Ayoub A., и др. High rate of hepatitis C virus infection and predominance of genotype 4 among elderly inhabitants of a remote village of the rain forest of South Cameroon. // *J. Med. Virol.* 2003. № 71. С. 219–225.
110. Noppornpanth S., Lien T.X., Poovorawan Y., и др. Identification of a Naturally Occurring Recombinant Genotype 2/6 Hepatitis C Virus. // *J Virol.* 2006. № 80. С. 7569–7577.
111. Okuda M., Hino K., Korenaga M., и др. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. // *Hepatology.* 1999. № 29. С. 217–222.
112. Painsil E., Verevchkin S.V., Dukhovlinova E., и др. Hepatitis C virus infection among drug injectors in St Petersburg, Russia: social and molecular epidemiology of an endemic infection. // *Addiction.* 2009. № 104. С. 1881–1890.
113. Penin F., Combet C., Germanidis G., и др. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein

hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. // J. Virol. 2001. № 75. С. 5703–5710.

114. Pietschmann T., Kaul A., Koutsoudakis G., и др. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. № 103. С. 7408–7413.

115. Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., и др. Binding of hepatitis C virus to CD81. // Science. 1998. № 282. С. 938–941.

116. Pöhlmann S., Zhang J., Baribaud F., и др. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. // J. Virol. 2003. № 77. С. 4070–4080.

117. Poordad F., Dieterich D. Treating hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. // J. Viral Hepat. 2012. № 19. С. 449–464.

118. Poynard T., Marcellin P., Lee S.S., и др. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). // Lancet. 1998. № 352. С. 1426–1432.

119. Probst A., Dang T., Bochud M., и др. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. // J. Viral Hepat. 2011. № 18. С. 745–759.

120. Raghwani J., Thomas X.V., Koekkoek S.M., и др. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. // J. Virol. 2012. № 86. С. 2212–2220.

121. Ramalho F. Hepatitis C virus infection and liver steatosis. // Antiviral Res. 2003. № 60. С. 125–127.

122. Rantala M., van de Laar M.J.W. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. // Euro Surveill. 2008. № 13.

123. Reed K.E., Gorbalenya A.E., Rice C.M. The NS5A/NS5 Proteins of Viruses from Three Genera of the Family Flaviviridae Are Phosphorylated by

Associated Serine/Threonine Kinases. // Journal of Virology. 1998. № 72. С. 6199 – 6206.

124. Roque-Afonso A.-M., Ducoulombier D., Di Liberto G., и др. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. // J. Virol. 2005. № 79. С. 6349–6357.

125. Ross R.S., Verbeeck J., Viazov S., и др. Evidence for a complex mosaic genome pattern in a full-length hepatitis C virus sequence. // Evol. Bioinform. Online. 2008. № 4. С. 249–254.

126. Sakamoto N., Enomoto N., Kurosaki M., и др. Sequential change of the hypervariable region of the hepatitis C virus genome in acute infection. // J. Med. Virol. 1994. № 42. С. 103–108.

127. Saunier B., Triyatni M., Ulianich L., и др. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. // J. Virol. 2003. № 77. С. 546–559.

128. Sauter D., Himmelsbach K., Kriegs M., и др. Localization determines function: N-terminally truncated NS5A fragments accumulate in the nucleus and impair HCV replication. // J. Hepatol. 2009. № 50. С. 861–871.

129. Savvas S.P., Koskinas J., Sinani C., и др. Changes in epidemiological patterns of HCV infection and their impact on liver disease over the last 20 years in Greece. // J. Viral Hepat. 2005. № 12. С. 551–557.

130. Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., и др. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. // EMBO J. 2002. № 21. С. 5017–5025.

131. Schmidt H.A., Strimmer K., Vingron M., и др. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. // Bioinformatics. 2002. № 18. С. 502–504.

132. Schmidt-Mende J., Bieck E., Hugle T., и др. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. // J. Biol. Chem. 2001. № 276. С. 44052–44063.

133. Schregel V., Jacobi S., Penin F., и др. Hepatitis C virus NS2 is a

protease stimulated by cofactor domains in NS3. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009. № 106. C. 5342–5347.

134. Sentandreu V., Jiménez-Hernández N., Torres-Puente M., и др. Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. // PLoS ONE. 2008. № 3. C. e3239.

135. Serebrov V., Pyle A.M. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. // Nature. 2004. № 430. C. 476–480.

136. Sharma S.D. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. // Indian J. Med. Res. 2010. № 131. C. 17–34.

137. Shimizu Y.K., Feinstone S.M., Kohara M., и др. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. // Hepatology. 1996. № 23. C. 205–209.

138. Shustov A.V., Kochneva G.V., Sivolobova G.F., и др. [Frequency of occurrence of Hepatitis C virus markers and risk factors among hospital personnel in the Novosibirsk region]. // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2002. C. 26–32.

139. Shustov A.V., Kochneva G.V., Sivolobova G.F., и др. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Western Siberia. // J. Med. Virol. 2005. № 77. C. 382–389.

140. Sievert W., Altraif I., Razavi H.A., и др. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. // Liver Int. 2011. № 31 Suppl 2. C. 61–80.

141. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. // J. Gen. Virol. 2004. № 85. C. 3173–3188.

142. Simmonds P., Bukh J., Combet C., и др. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. // Hepatology. 2005. № 42. C. 962–973.

143. Stockburger, D.W. Introductory statistics: concepts, models and applications. WWW Version 1.0. Revised 2/19/98. Southwest Missouri State University. (Electronic publication: <http://www.psychstat.smsu.edu/introbook/sbk00.htm>)

144. Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A., Duhamel, M., Vanderborght, B., Van Heuverswyn, H., Maertens, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay // J. Gen. Virol.-1993.-74.-P. 1093-1102.
145. Su, Y., Yoon, S.S. Epi info - present and future // AMIA Annu Symp Proc.-2003.-P. 1023.
146. Tallo T., Norder H., Tefanova V., и др. Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: fluctuations in the predominating subtype with time. // J. Med. Virol. 2007. № 79. C. 374–382.
147. Tamura K., Dudley J., Nei M., и др. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // Mol. Biol. Evol. 2007. № 24. C. 1596–1599.
148. Tan S.L., Katze M.G. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. // Virology. 2001. № 284. C. 1–12.
149. Tellinghuisen T.L., Foss K.L., Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. // PLoS Pathog. 2008. № 4. C. e1000032.
150. Thomas D.L., Seeff L.B. Natural history of hepatitis C. // Clin Liver Dis. 2005. № 9. C. 383–398, vi.
151. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. // Nucleic Acids Res. 1994. № 22. C. 4673–4680.
152. Tscherne D.M., Evans M.J., von Hahn T., и др. Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus. // J. Virol. 2007. № 81. C. 3693–3703.
153. Turhan V., Ardic N., Eyigun C.P., и др. Investigation of the genotype distribution of hepatitis C virus among Turkish population in Turkey and various European countries. // Chin. Med. J. 2005. № 118. C. 1392–1394.
154. Viazov S., Kuzin S., Paladi N., и др. Hepatitis C virus genotypes in different regions of the former Soviet Union (Russia, Belarus, Moldova, and

Uzbekistan). // J. Med. Virol. 1997. № 53. С. 36–40.

155. Viazov S., Ross S.S., Kyuregyan K.K., и др. Hepatitis C virus recombinants are rare even among intravenous drug users. // J. Med. Virol. 2010. № 82. С. 232–238.

156. Viazov S., Widell A., Nordenfelt E. Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event. // Infection. 2000. № 28. С. 21–25.

157. Wang C., Sarnow P., Siddiqui A. A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. // J. Virol. 1994. № 68. С. 7301–7307.

158. Weiner A.J., Brauer M.J., Rosenblatt J., и др. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. // Virology. 1991. № 180. С. 842–848.

159. Welbourn S., Pause A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. // Curr Issues Mol Biol. 2007. № 9. С. 63–69.

160. Wölk B., Sansonno D., Kräusslich H.G., и др. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. // J. Virol. 2000. № 74. С. 2293–2304.

161. Worobey M., Holmes E.C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. // J. Gen. Virol. 1999. № 80 (Pt 10). С. 2535–2543.

162. Yamaga A.K., Ou J.-H. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. // J. Biol. Chem. 2002. № 277. С. 33228–33234.

163. Yokoyama K., Takahashi M., Nishizawa T., и др. Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. // Arch. Virol. 2011. № 156. С. 1591–1601.

164. Yu G.-Y., Lee K.-J., Gao L., и др. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. // J. Virol. 2006. № 80. С. 6013–6023.

165. Yun Z., Lara C., Johansson B., и др. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. // J. Med. Virol. 1996. № 49. С. 155–160.

166. Zein N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. // Clin. Microbiol. Rev. 2000. № 13. С. 223–235.
167. Zhang M., Gaschen B., Blay W., и др. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. // Glycobiology. 2004. № 14. С. 1229–1246.
168. Zhong W., Uss A.S., Ferrari E., и др. De Novo Initiation of RNA Synthesis by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5B Polymerase. // J Virol. 2000. № 74. С. 2017–2022.
169. <http://euhcvdb.ibcp.fr>
170. <http://hcv.lanl.gov>
171. <http://s2as02.genes.nig.ac.jp>
172. <http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat/rosstatsite/main/population/healthcare>
173. <http://www.psychstat.missouristate.edu/sbk00.htm>
174. <http://www.vector-best.ru>
175. <http://www.welch.jhu.edu/~sray/download>
176. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/ru/>

Приложение

Рис. А Фрагменты филогенетического дерева, построенного методом NJ для 3591 нуклеотидной последовательности фрагмента гена NS5b (253 н.) ВГС субтипа 1b. Красным выделены исследуемые изоляты. Для последовательностей указано название географической области, в которой данный изолят был получен и шифр базы данных GenBank. Условные обозначения стран: AZ - Азербайджан, CY - Кипр, DE - Германия, EE - Эстония, ES - Испания, FR - Франция, LT - Литва, RU - Россия, TJ - Таджикистан, US - США, UZ - Узбекистан, VE - Венесуэла. Приведены индексы статистической поддержки узлов дерева, превышающие 60, а также масштаб шкалы генетических расстояний.

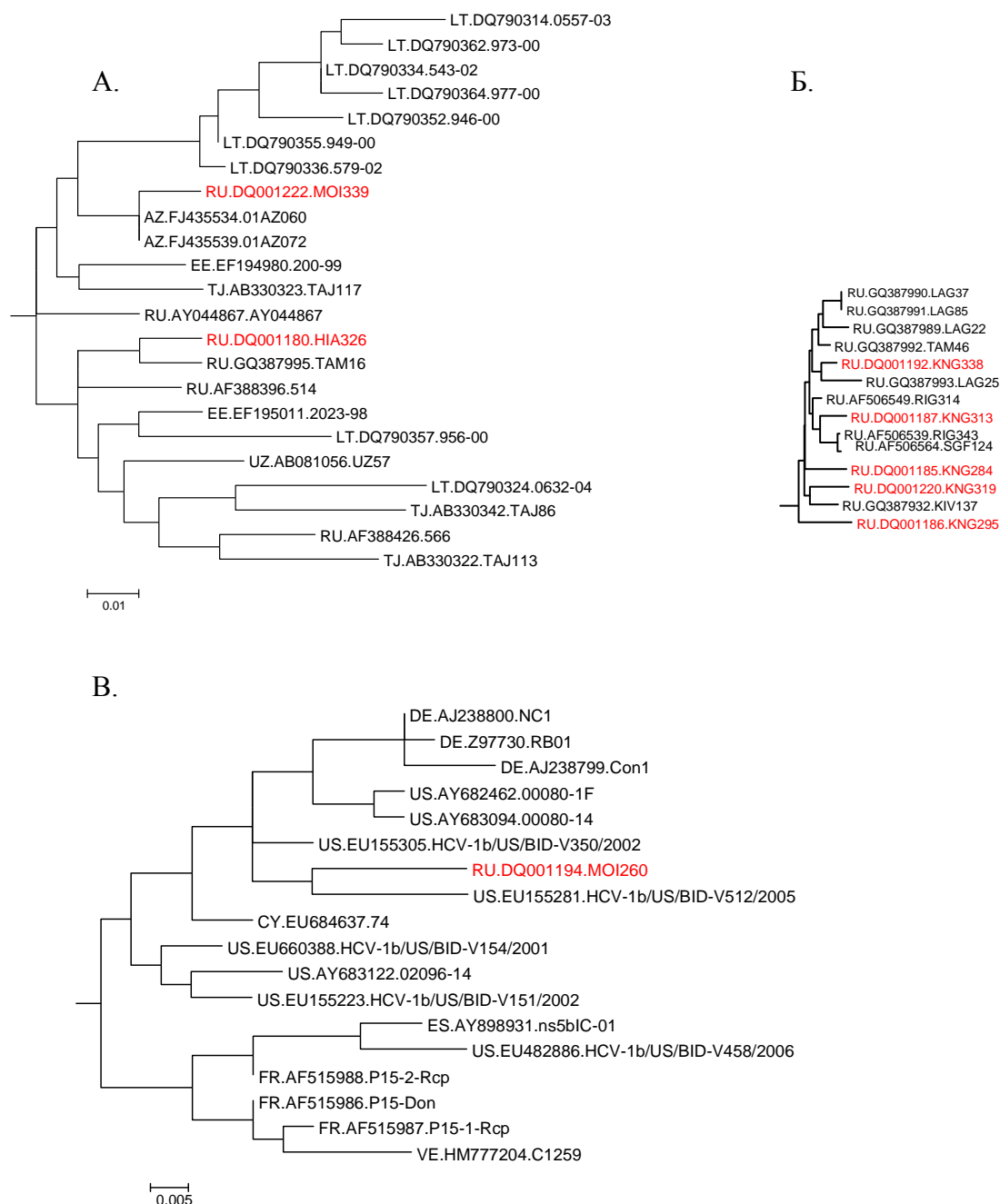
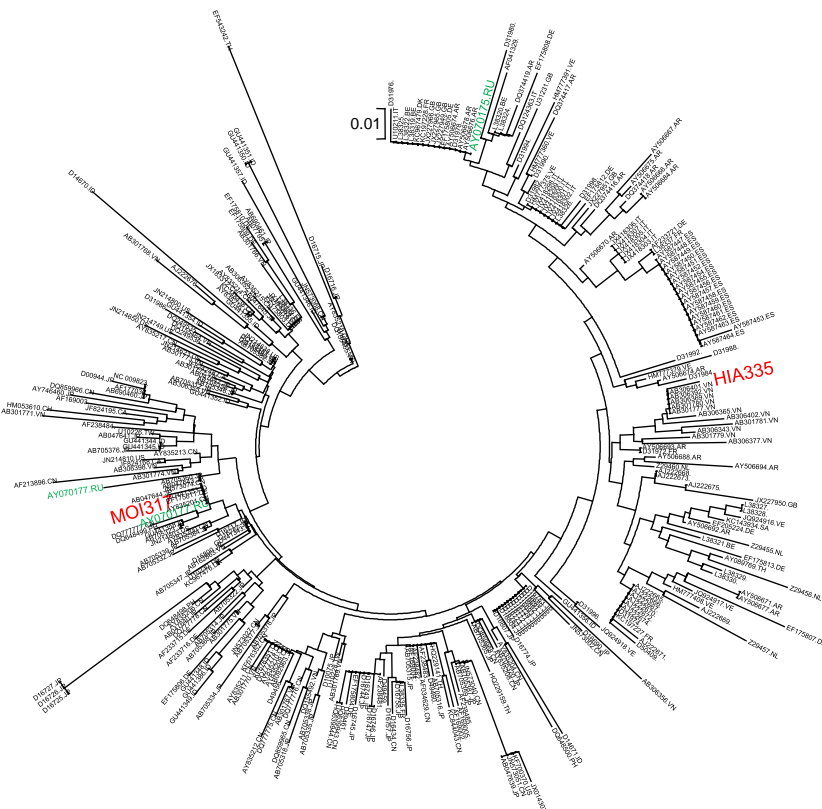


Рис. В Филогенетические деревья, построенные методом NJ для (А) 342 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *Core* (405 н.) и (Б) 354 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *NS5b* (253 н.) ВГС субтипов 2а и 2с. Красным выделены исследуемые изоляты. Для последовательностей указано название географической области, в которой данный изолят был получен и шифр базы данных GenBank. Условные обозначения стран: CY - Кипр, DE - Германия, EE - Эстония, ES - Испания, FR - Франция, LT - Литва, RU - Россия, TJ - Таджикистан, US - США, UZ - Узбекистан, VE - Венесуэла.

А.



Б.

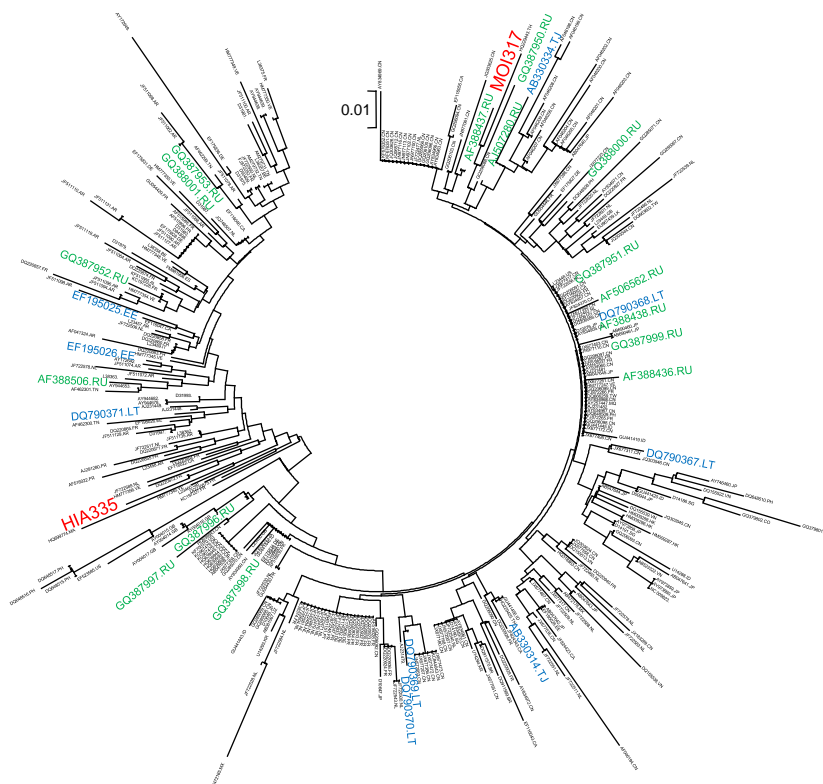
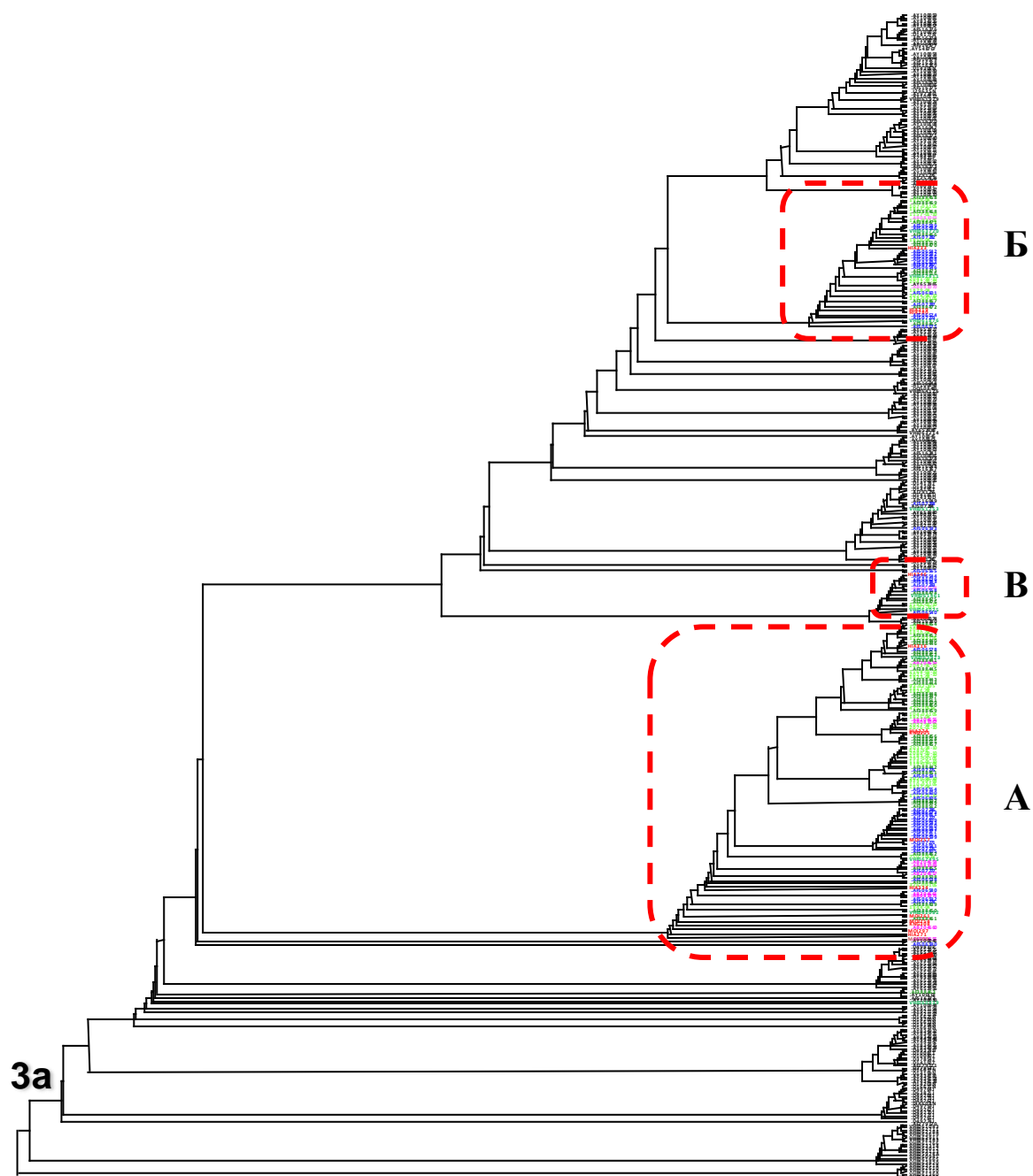


Рис. С Филогенетическое дерево, построенное методом NJ для нуклеотидных последовательностей фрагмента гена NS5b (253 н.) 450 изолятов субтипа 3a, извлеченных из базы данных Genbank, красный цвет маркирует изоляты, выделенные в г. Барнаул, синий – г. Новосибирск, темно-зеленый – Санкт-Петербург, светло-зеленый – Эстония, розовый – Узбекистан



A

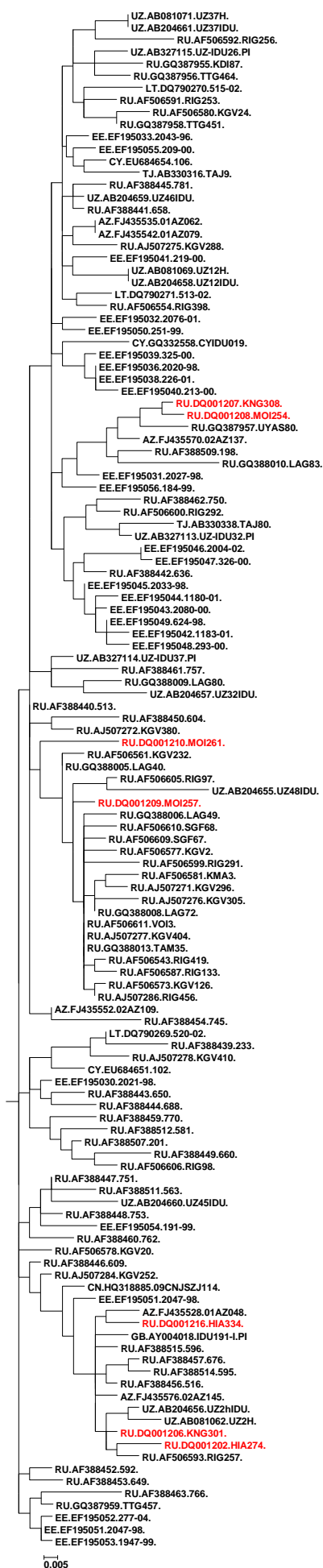
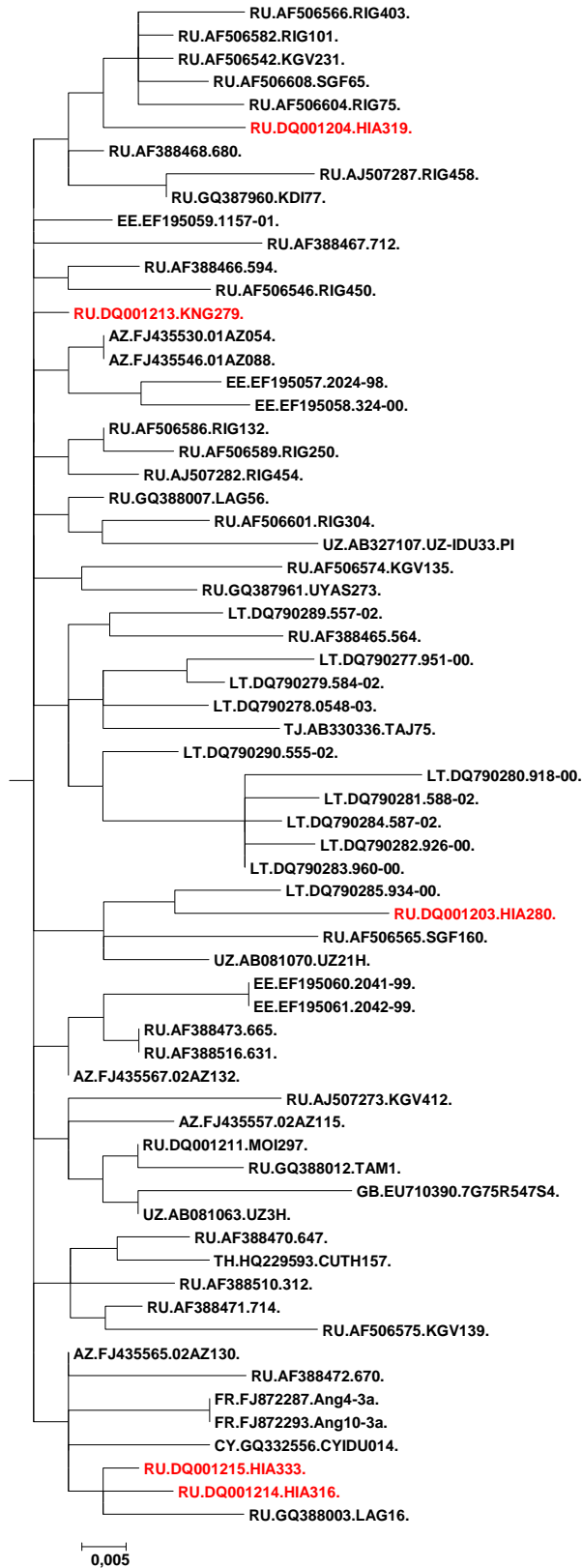


Рис. D Фрагменты филогенетического дерева, построенного методом NJ для 1548 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена NS5b (253 н.) ВГС субтипа 3а. Ветви маркированы согласно рис. 3.5. Красным выделены исследуемые изоляты. Условные обозначения стран: AZ - Азербайджан, СТ – Китай, СУ - Кипр, ЕЕ – Эстония, GB – Великобритания, FR – Франция, LT – Литва, RU - Россия, ТН – Тайланд, TJ - Таджикистан, UZ – Узбекистан.

Б



Б

