

Чуб Елена Владимировна

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

03.01.03 – «молекулярная биология»

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Кольцово 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, пос. Кольцово Новосибирской области.

Научный руководитель Нетесов Сергей Викторович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

Официальные оппоненты: Беклемишев Анатолий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии ФГБНУ «НИИ биохимии» СО РАН

Кулемзин Сергей Викторович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН»

Защита состоится «18» декабря 2015 г. в 09-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирского района Новосибирской области, тел. (383)336-74-28

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и на интернет-сайте <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор  В.А. Белявская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 поражения печени, приводящего к развитию цирроза печени и/или 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), далее последовало постепенное снижение количества заболевших до 1,5 случая на 100 тыс. населения в 2013 году (<http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat/rosstatsite/main/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 так же 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 за последние 20 лет дал бы возможность выявить динамику основных факторов риска и эффективность 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 счете 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. Лечение же пациентов, инфицированных рекомбинантными ВГС,

представляет собой дополнительную проблему, поскольку остается неясной взаимосвязь рекомбинантного характера изолята и его восприимчивости к противовирусной терапии. Ответ на этот вопрос могло бы дать наблюдение за ходом лечения пациентов, инфицированных рекомбинантными изолятами ВГС, и анализ генетических изменений этих изолятов в ходе противовирусной 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.

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

Задачи исследования:

1. Проведение комплексного молекулярно-эпидемиологического исследования проб от больных гепатитом 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 581 изолята 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 1957-1970 гг.

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 1957-1970гг.

Вклад автора:

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

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 124 страницах, включает 13 таблиц и 21 рисунок и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, а также список литературы, состоящий из 176 источников отечественных и зарубежных авторов.

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 12 тезисах трудов конференций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основные характеристики обследованных больных

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 было одобрено этическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор». К участию в исследовании приглашали пациентов, достигших 18 летнего возраста, поступивших с клиническими признаками острого гепатита, на добровольной основе после подписания информированного согласия. От каждого участника исследования (n=1043) с помощью вакуутайнера был получен образец сыворотки крови (8-10 мл) и собрана индивидуальная информация посредством структурированного интервью по анкете.

Эпидемиологические данные для инфицированных лиц

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.). Среди обследованных пациентов с клиническими признаками острого гепатита преобладали лица молодого возраста (60,9% - пациенты до 30 лет).

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 1. приведены отношения шансов (OR), отражающие статистические связи между рядом выбранных факторов риска и серопозитивностью по маркёрам ВГС.

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

Таблица 1. Факторы риска серопозитивности по маркёрам ВГС. Результаты бивариантного анализа ¹.

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

² “НД” - оценка статистически не значима.

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

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.

Ожидаемые положительные связи были выявлены и для других факторов, связанных с рискованным поведением. Так, риск серопозитивности по маркёрам 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.

Доля лиц с профессиональными факторами риска у включённых в наше исследование людей была невелика, но статистически значимые связи со статусом по маркерам инфекции ВГС в подгруппах лиц, отрицавших употребление внутривенных наркотиков, были показаны. В частности, статистически значимые 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 ($OR=0,6$). 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. Выявленная нами значительно большая доля инфицированных мужчин в сравнении с женщинами и подавляющее 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.

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 2.

Таблица 2. 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/#>).

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. 1 представлен генотипический профиль двух обследованных групп.

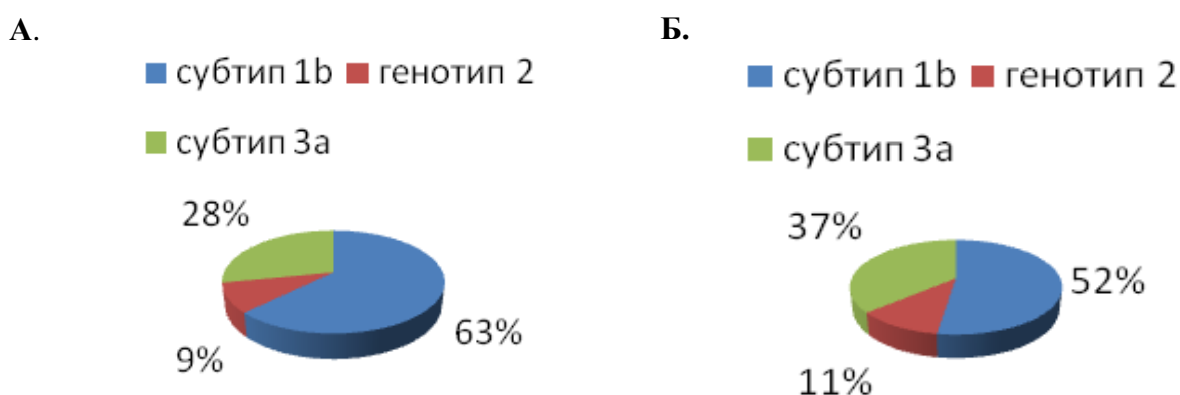


Рис. 1. Генотипическое разнообразие изолятов ВГС двух групп пациентов с острым гепатитом. А. группа пациентов, находившихся на лечении в период с октября по декабрь 2001 года. Б. группа пациентов, находившихся на лечении в период с октября по декабрь 2002 года.

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, что еще раз косвенно подтверждает наш вывод о том, что употребление внутривенных наркотиков является ведущим фактором риска в данном регионе.

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 же медработников существенно преобладал субтип 1b – 91,6%.

Для 50 образцов были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов Core (405 н.) и NS5b (253 н.). Проведенный филогенетический анализ обоих фрагментов для всех исследованных изолятов ВГС подтвердил установленные нами ранее субтипы 1b – в 29 и 3а – в 16 случаях и позволил определить субтипы у двух, отнесенных по результатам анализа области 5'UTR ко второму генотипу изолятов: 2а – 1, 2с – 1. При этом для двух изолятов анализ фрагмента области Core ВГС показал их принадлежность к субтипу 2к, анализ фрагмента области NS5b – к субтипу 1b (рис.2).

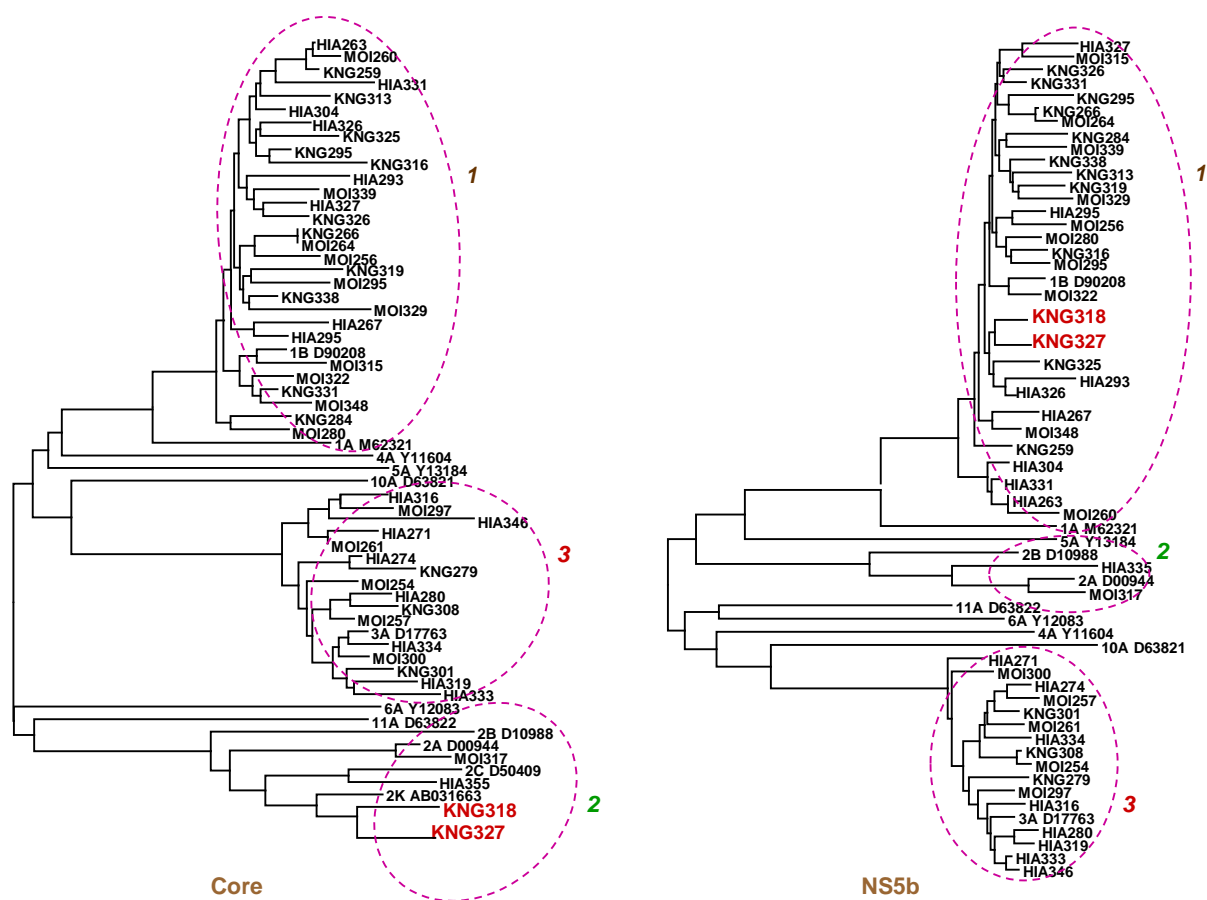


Рис. 2. Филогенетические деревья, построенные методом NJ для нуклеотидных последовательностей фрагментов гена Core ВГС (405 н.) и NS5b (253 н.) изолятов ВГС, полученных от пациентов с острым гепатитом, г. Барнаул. Для прототипных изолятов указан субтип и шифр базы данных GenBank. Ветви генотипов и обозначены соответствующими цифрами.

Преобладание субтипов 1b и 3а при спорадических случаях генотипа 2 является характерным для территории Сибири и России в целом. В то же время изоляты ВГС, неоднозначно типизируемые при использовании различных областей генома, ранее не были обнаружены у населения Сибири, несмотря на интенсивное изучение молекулярной вариабельности ВГС в данном регионе.

Характеристики обнаруженных изолятов 2k/1b, подтверждение точки рекомбинации

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). Сравнение полученных последовательностей с гомологичными, депонированными в базе данных GenBank (рис. 3), а также результаты анализа с использованием метода bootscan (рис. 4) подтвердили наличие точки перекреста для всех трех выявленных нами рекомбинантных изолятов в нуклеотидной позиции 3175 генома ВГС (согласно нумерации нуклеотидов изолята pJ6CF субтипа 2a, AF177036 в базе данных GenBank).

KNG327	3061	ACTTCGTCAGAGCGCAAGCTCTGTTGAGGATATGCGCTGCTGTAAGACATCTCTCAGGTGGCAAGTACGTCAGATGATGCTGCTAACCCCTTGGCAGATG	3160
2k	3061G.....T.....G.....A.....T.A.....	3160
1b	3061T..AC.C..T..G.GG..CA.CC.TGC....ATGTTA..GC.GA.GG..G.T..A...C.C..T....A...GCCT.CA.G.AG..G.C.GCGCT	3160
↓ 3175			
KNG327	3161	GACTGGCACCTACATTTATGACCACTCTCACTCCACTGCGGGACTGGGCTCACGCGGGCTGCGAGACCTTGCGGTGGCAGTCGAGCCCGTGGTCTTCTCT	3260
2k	3161A.....C.....T..C...T.C...A..TCA.GT.....GCTAGT..G..A..C.....C.....T..T..A...A.T...T...AGC	3260
1b	3161A..T..G...G.A.....T.....T.....C.....A.....A.....C.....	3260

Рис. 3. Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена NS2 ВГС изолята KNG327 и прототипных изолятов генотипов 2k и 1b.

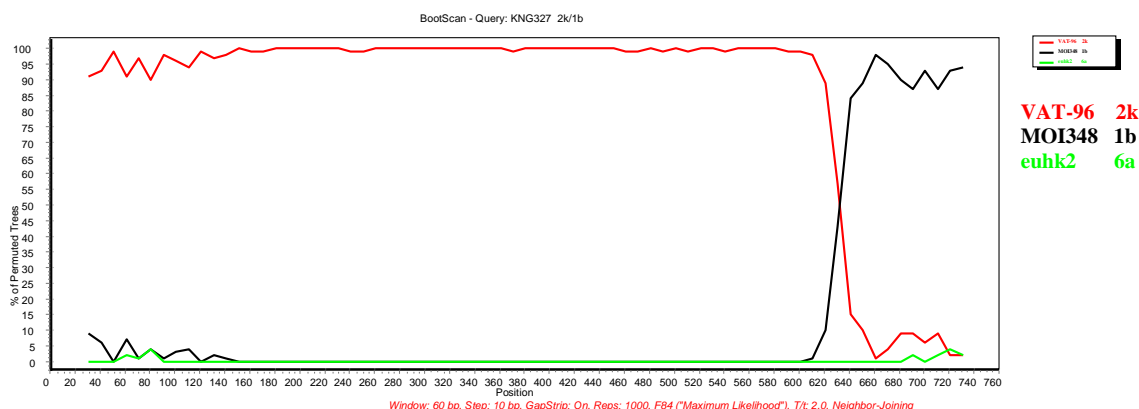


Рис. 4. Bootscan анализ рекомбинантного изолята KNG327 основанный на последовательности гена NS2. Исходные генотипы представлены субтипом 1b, изолят MOI348 и субтипом 2k, изолят VAT-96. Изолят euhk2, субтипа 6a использован в качестве внешней группы. Нуклеотидные позиции нумерованы от начала гена NS2.

На основании сравнения историй болезни обоих 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. К сожалению, небольшое 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. Сравнительно небольшая выявляемость рекомбинантных 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. 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.

Создание мультиплексной системы для скринингового генотипирования изолятов ВГС

Для определения изолятов с данным типом рекомбинации 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 мультиплексную систему также праймеры для определения изолятов субтипа 3a. Структуры праймеров приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Праймеры для скринингового генотипирования изолятов ВГС

N	Код	Последовательность ² (5'-3')	субтип	Позиция ¹ , н.
1	1_1b	GGTTGCAATATTTTATCACCAG	1b	S 2887-2908
2	2_1b	GTGCATGCATGTTGGTGCGGA	1b	S 3113-3133
3	3_1b	TGATGATCTTGGTGTCCATGTCAGA	1b	AS 3282-3306
4	4_1b	CAGAAGTATCTCCCTCCCCCT	1b	AS 3370-3390
5	1_2	CCGCGATGGCATCATATGGG	2a/2c/2k	S 2960-2980
6	2_2	CCGGGTGTATTGTTTGACATA	2a/2c/2k	S 2997-3017
7	3_2	AGTCTCCACCCCTTGARGT	2a/2c/2k	AS 3407-3427
8	4_2	CCTGGATCTCTCCAGCTTGTTTC	2a/2c/2k	AS 3512-3435
9	1_3a	GCTAACAAGCCTGCTTTATCCAT	3a	S 2978-3000
10	2_3a	ATGCTCGTGCGCTCCGTGAT	3a	S 3121-3140
11	3_3a	CAGAGACAGGCAGCCCGCAA	3a	AS 3344-3363
12	4_3a	GCCAACCCATCTCCCGATAGT	3a	AS 3403-3423

¹ Ориентация: S - сенс, AS - антисенс. Указаны положения 5'-и 3'-концов праймеров на геноме прототипного изолята HCV-1 (Choo et al., 1989);

² Для вырожденных положений использована однобуквенная номенклатура IUPAC/IUB;

Аmplифицированный 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. 5.

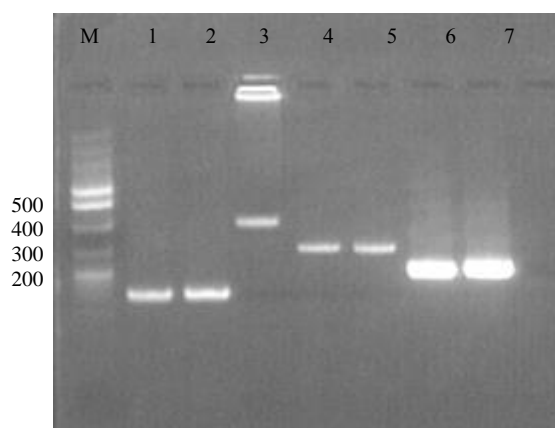


Рис. 5. Электрофореграмма в 1% агарозном геле продуктов амплификации в мультипраймерной системе для скринингового генотипирования изолятов ВГС: 1, 2 – субтип 1b; 3- субтип 2a; 4, 5 – рекомбинантные изоляты типа 2k/1b; 6, 7 – субтип 3a.

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. Во всех 50 случаях был получен положительный результат в ПЦР и установлен субтип, соответствующий ранее определенному (Таблица 4).

Таблица 4. Оценка специфичности мультипраймерной системы

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

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

Выявление рекомбинантных изолятов ВГС типа 2k/1b в г. Новосибирске в период 2005-2014г.

Далее разработанная тест-система использовалась нами для выявления рекомбинантов ВГС типа 2k/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 образцов, субтип 3a – для 155, генотип 2 определили в 58 случаях, 5 образцов являлись рекомбинантами типа 2k/1b (Таблица 5). Для 85 образцо

Таблица 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
РНК HCV+	74	141	80	73	53	68	24	16	28	24	581
генотипировано	68 (92%)*	126 (90%)	63 (79%)	52 (71%)	47 (89%)	60 (88%)	18 (75%)	14 (87%)	26 (93%)	22 (91%)	496 (85%)
1b	40 (54%)	76 (54%)	31 (39%)	27 (37%)	24 (45%)	36 (53%)	11 (46%)	6 (38%)	13 (46%)	14 (58%)	278 (48%)
3a	19 (26%)	38 (27%)	24 (30%)	16 (22%)	19 (36%)	18 (26%)	3 (13%)	4 (25%)	8 (29%)	6 (25%)	155 (26%)
2a/2c/2k	7 (9%)	11 (8%)	8 (10%)	8 (11%)	4 (8%)	6 (9%)	4 (16%)	3 (18%)	5 (18%)	2 (8%)	58 (10%)
2k/1b	2 (3%)	1 (1%)		1 (1%)				1 (6%)			5 (1%)

* - процентное содержание от числа РНК HCV+

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.

Все образцы, в которых выявили маркеры ВГС, также генотипировали используя тест-систему «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL». Результаты генотипирования совпали для 540 образцов из 581 (1b – 278, 3a – 155, генотип 2 – 58, генотип не определен – 49 образцов). Разхождение результатов наблюдали для 41 образца: в 36 случаях генотип не был определен разработанной системой, в то время как, используя «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL» установили субтип 1b – для 27, 3a – для 6, генотип 2 – для 3 образцов; 5 рекомбинантных образцов определены «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL» как генотип 2.

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

Полученный нами результат показывает состоятельность созданной тест-системы подходящей для скринингового генотипирования. Положительного результата, т.е. установления генотипа, удалось достичь для 85% исследованных образцов. Чувствительность скрининговой системы несколько ниже коммерческой «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL», что объясняется, в первую очередь, высокой вариабельностью генома в районе рекомбинации; однако, 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 как несколько более низкую чувствительность, по

сравнению с чувствительность ОТ-ПЦР района 5'-UTR, так и 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.

Филогенетическое сравнение

полученных изолятов 2k/1b с описанными ранее

Значительная уже сейчас 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 выявления истинных путей возникновения и распространения рекомбинантных форм ВГС. С одной стороны, субтип 1b является преобладающим 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, доля в популяции рекомбинантных форм ВГС 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.

Были проанализированы фрагменты генов Core (359 н.), E1 (384 н.), NS2 (255 н.) и NS5b (338 н.) всех выявленных в настоящее время рекомбинантных изолятов (n=47). Для оценки уровня вариативности указанных регионов генома в анализ были включены нуклеотидные последовательности прототипных изолятов субтипов 1b, 2k – в качестве родительских субтипов и субтипа 3a – в качестве внешней группы. Следует отметить, что сравнительный анализ по каждому региону проводился только для тех рекомбинантных изолятов, чьи нуклеотидные последовательности исследуемого региона присутствовали в базе данных Genbank. Выявленный уровень гомологии последовательностей рекомбинантных всех рассмотренных регионов представлен в Таблице 6. Для всех рассмотренных регионов 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.

Мы провели филогенетический анализ регионов Core-E1 и NS5b всех выявленных рекомбинантных изолятов, для которых были доступны нуклеотидные последовательности. Рекомбинантные изоляты, изученные в настоящей работе, и изоляты того же типа, описанные другими авторами, при использовании применяемого метода построения филогенетических деревьев образовывали близкородственные кладистические группы (по одной на каждом дереве), не

Таблица 6. 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

включающие нерекомбинантные прототипные изоляты любого другого типа. Такие группы наблюдались при использовании для анализа фрагментов генов Core/E1 (Рис. 6) и NS5b (Рис. 7). При этом не было отмечено группирования изолятов по территориальному признаку (месту выявления, и происхождения) и по предполагаемым путям инфицирования. Индексы статистической поддержки узлов были высокими (71% и 88% для филогенетических деревьев, построенных на основании последовательностей фрагментов генов core/E1 и NS5B, соответственно), но не достигли статистической значимости, возможно, из-за малой длины проанализированных последовательностей.

Для проверки этого предположения был проведен анализ протяженных последовательностей рекомбинантных изолятов, с использованием полногеномной последовательности изолята PSA424 и 11 нуклеотидных последовательностей рекомбинантных изолятов из базы данных GenBank. Филогенетический анализ проводили отдельно для 5'-части генома до точки рекомбинации и для 3'-части, после точки рекомбинации (рис. 8). При использовании этого подхода удалось показать статистически значимые индексы поддержки узлов (96% и 100%).

Наблюдаемый высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей и филогенетическая близость всех рекомбинантных изолятов типа 2k/1b, показанная для двух удаленных друг от друга геномных регионов, расположенных по разные стороны от точки рекомбинации, а также в районе ее расположения указывает на общность происхождения изолятов в результате единственного акта рекомбинации. Таким образом, существующая в настоящий момент вирусная популяция CRF1_1b2k, по всей вероятности, является результатом единственного возникновения в популяции и последующего распространения данного рекомбинанта, а не следствием конвергентной эволюции различных рекомбинантных вирусных штаммов.

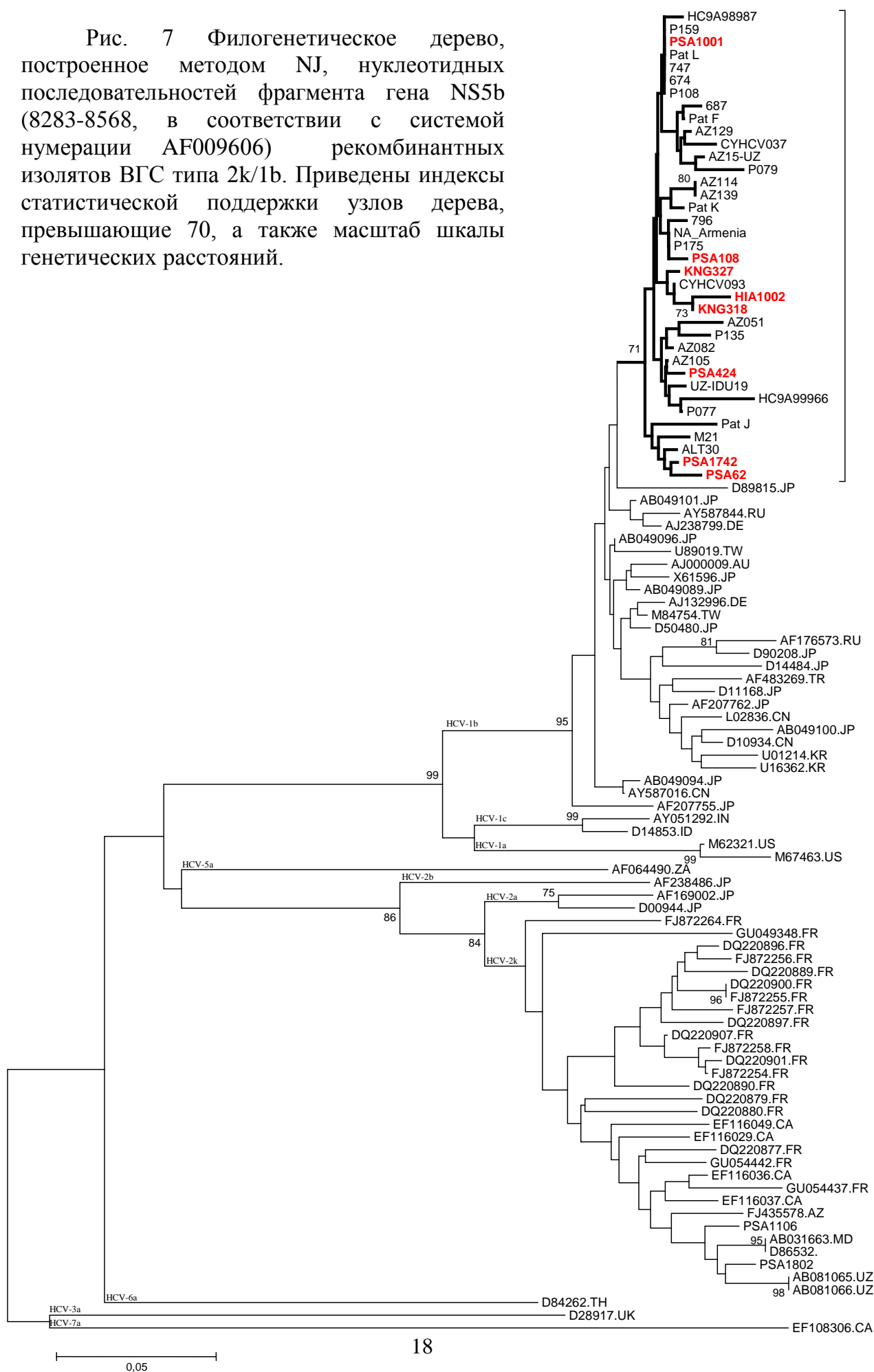
Для определения времени образования рекомбинантов CRF01_1b2k был применен байесовский метод датирования, реализованный в программе Beast. Для последовательностей 5'-части (от начала гена Core до точки рекомбинации) и 3'-части генома (от точки рекомбинации до конца гена NS5b) CRF01_1b2k и близкородственных изолятов родительских субтипов были построены хронограммы с помощью программы TreeAnnotator v1.5.4 из пакета Beast, которые затем визуализировали в программе FigTree (Рис 9). Расчетное время дивергенции изолятов

Phylogenetic tree showing relationships between various plant accessions. The tree is rooted on the left and branches to the right. Accessions are labeled with names and IDs. Some names are in red: Pat L, PSA424, HIA1002, KNG318, PSA108, PSA1001, KNG327, PSA62, PSA1742, and D84262.TH. Bootstrap values are indicated at some nodes: 79, 99, 796, 79, 100, 99, 4, 73, 96, 100. A scale bar at the bottom right indicates 0.01 substitutions per site.

Accessions (from top to bottom):

- Pat L
- PSA424
- UZ-IDU19
- P108
- 79
- P159
- P077
- CYHCV093
- 99
- P135
- CYHCV037
- Pat K
- 796
- NA_Armenia
- PSA108
- Pat J
- PSA1001
- 747
- 79
- AZ129
- P079
- AZ15
- P179
- M21
- KNG327
- AZ105
- AZ051
- AZ114
- AZ139
- N687
- PSA62
- AZ082
- HC9A98987
- HC9A99966
- 100
- PSA1742
- ALT30
- PSA1106
- AB327019.ALT837
- PSA1802
- AB031663.MD
- FJ435510.FR
- 99
- AB327021.UZ.
- AB327020.UZ.
- AB327025.FR.
- AB327043.FR
- AB327040.FR
- AB327033.FR
- AB327037.FR
- AB327029.FR.
- AB327034.FR
- AB327035.FR
- AB327028.FR.
- AB327030.FR
- AB327042.FR
- EF115827.FR
- FJ435522.FR
- EF115807.FR
- GU054402.FR
- GU054399.FR
- AB327022.FR
- GU054413.FR
- EF115814.FR
- EF115815.FR
- FJ435489.FR
- AB327023.FR
- AB327024.FR.
- AB327044.FR
- AB327039.FR
- AB327038.FR
- AB327032.FR
- AB327031.FR.
- 73
- AB327036.FR
- AB327027.FR.
- AB327041.FR
- AF169002.JP
- D00944.JP
- AF238486.JP
- EF108306.CA
- M67463.US
- M62321.US
- AY051292.IN
- D14853.ID
- 96.DE
- J
- .DE
- D89815.JP
- D50480.JP
- 4.CN
- AB049101.JP
- AF176573.RU
- AF207762.JP
- AF483269.TR
- U16362.KR
- 3049100.JP
- M84754.TW
- L02836.CN
- D11168.JP
- D14484.JP
- U01214.KR
- X61596.JP
- AF207755.JP
- U89019.TW
- AY587016.CN
- AB049089.JP
- AB049096.JP
- AB049094.JP
- D90208.JP
- D28917.UK
- AF064490.ZA
- D84262.TH

Рис. 7 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.



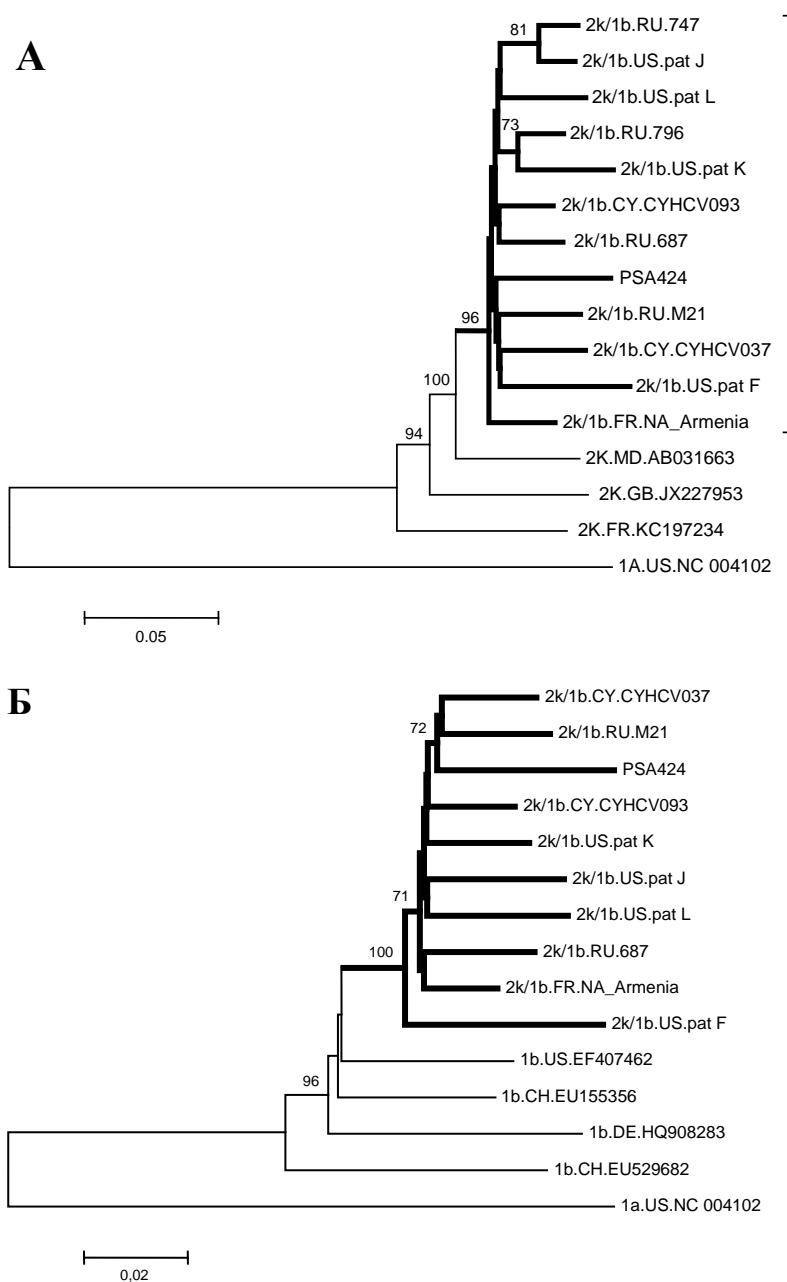


Рис. 8 Филогенетические деревья, построенные методом NJ, нуклеотидных последовательностей 5' части, длиной 3139 н. (А) и 3' части, длиной 5952 н. (Б) генома рекомбинантных изолятов ВГС. Приведены индексы статистической поддержки узлов дерева, превышающие 70, а также масштаб шкалы генетических расстояний.

CRF01_1b2k и VAT-96, наиболее близкого родительского изолята субтипа 2k составляет около 60 лет, тогда же началось разхождение CRF01_1b2k и ближайших изолятов субтипа 1b. Учитывая, что дивергенция внутри клады CRF01_1b2k началась 35-46 лет назад, мы можем предполагать, что наиболее вероятное время образования рекомбинантной формы в интервале 1957-1970 гг.

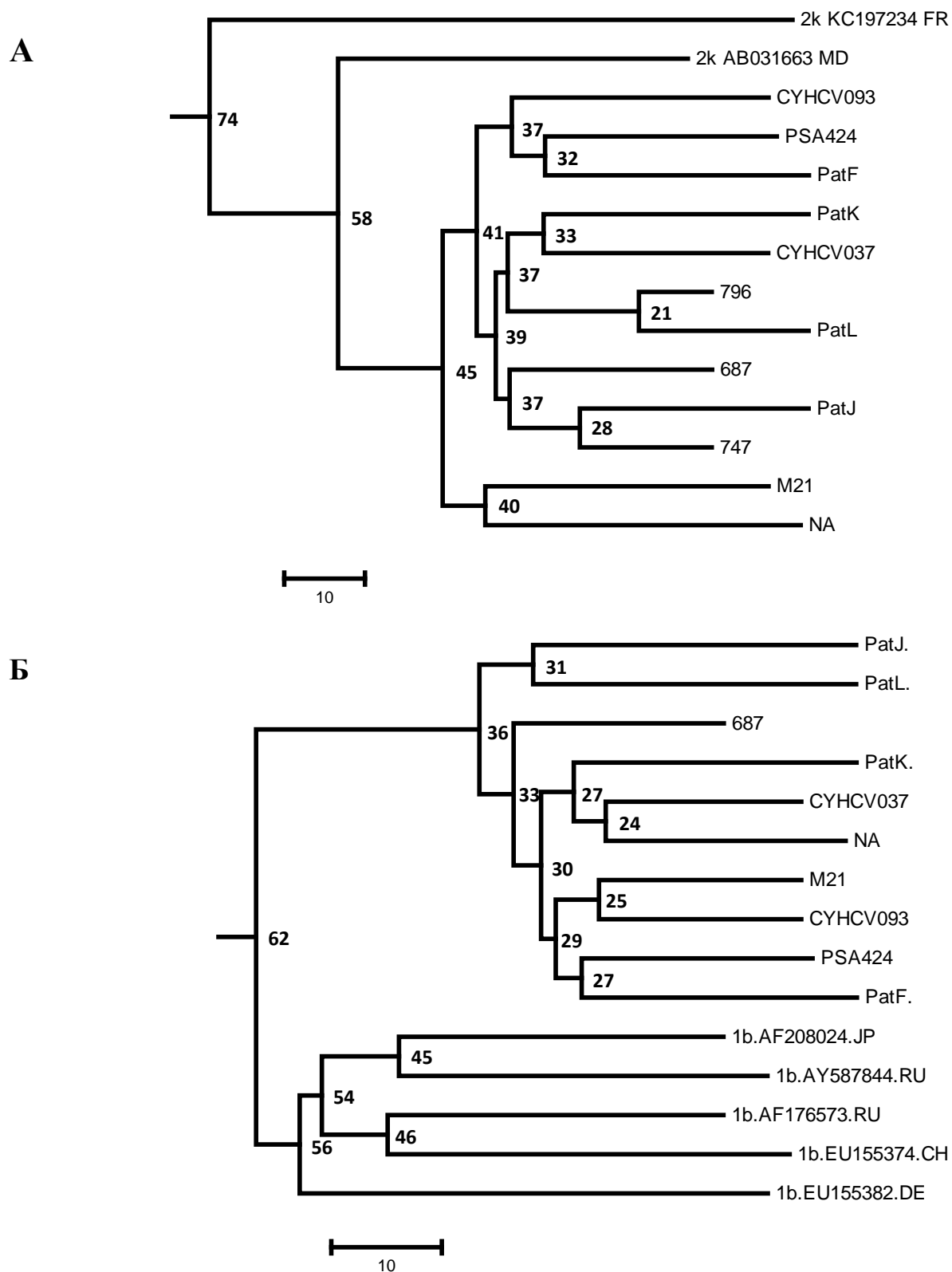


Рис. 9 Хронограммы, построенные на основании нуклеотидных последовательностей 5' части генома, длиной 2862 н. (А) и 3' части генома, длиной 5937 н. (Б) изолятов CRF01_1b2k и его родительских подтипов. Времена дивергенции оценены с использованием программы BEAST. Значения времен дивергенции в годах приведены в узлах дерева.

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. 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 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. 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. 6) кажется наиболее вероятным, что местом происхождения CRF01_1b2k является территория бывшего Советского Союза.

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 305 случаях (52,5%), субтип 3a – в 161 (27,7%), генотип 2 - в 61 (10,5%) случаях. 5 (0,8%) 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 1957-1970гг.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Матрос О.И., Гранитов В.М., Кочнева Г.В., Шустов А.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Чуб Е.В., Нетесов С.В. Особенности вирусных гепатитов в Алтайском крае в первые годы XXI века: клиника и эпидемиология. // Российские медицинские вести.- 2005.- № 3.- С. 57-60.

2. Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Шустов А.В., Гаврилова И.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Терновой В.А., Чаусов Е.В., Акинфеева Л.А., Гранитов В.М., Сахарова Е.Г., Губанова Л.И., Орловский В.Г., Нетесов С.В. Этиология острых гепатитов и генотипическое разнообразие вирусов гепатитов А, В, С и Е в трех регионах Сибири // Инфекционные болезни – 2005. - № 3. – С. 26-31.

3. Чуб Е. В., Кочнева Г. В., Гранитов В.М., Нетесов С. В. Рекомбинанты вируса гепатита С типа 2k/1b у населения Алтайского края // *Инфекционные болезни.* – 2007. - № 5.- С. 5-11.

4. Kurbanov F, Tanaka Y, Chub E, Maruyama I, Azlarova A, Kamitsukasa H, Ohno T, Bonetto S, Moreau I, Fanning LJ, Legrand-Abravanel F, Izopet J, Naoumov N, Shimada T, Netesov S, Mizokami M Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural

recombinant hepatitis C virus strain RF1_2k/1b // *J Infect Dis.* - 2008. – V.198(10). – P. 1448-56.

5. Barkhash A, Kochneva G, Chub E, Mikhailova S, Romaschenko A Possible involvement of polymorphisms in OAS2, OAS3, CD209, and TLR3 genes, associated with severe forms of tick-borne encephalitis, in predisposition to hepatitis C in a Russian population // *Microbes and Infection.* – 2014. - V. 16. - №. 5. - P. 445-449.

Доклады и тезисы конференций

1. Шустов А.В., Гаврилова И.В., Терновой В.А., Рудзевич Т.Н., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Фаворов М.О., Робертсон Б. Дж., Нетесов С.В. Генотипы вирусов А, В и С, циркулирующих среди населения Западной Сибири // Сборник трудов V Российской научно-практической конференции «Гепатит В, С и D - проблемы диагностики, лечения и профилактики». – Москва. – 2003. - С. 352-353.

2. Шустов А.В., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Ракова И.Г., Алешина М.В., Гаврилова И.В., Чуб Е.В., Акинфеева Л.А., Орловский В.Г., Сахарова Е.Г., Гранитов В.М., Губанова Л.И. Предварительные итоги сторожевого надзора за острыми вирусными гепатитами в трех городах Западной Сибири: Новосибирске, Барнауле и Иркутске // Материалы международной конференции «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний». - Сосновка, Новосибирская обл. - 2004. – Новосибирск: ЦЭРИС, 2004. – С. 301 – 302.

3. О.И.Матрос, Г.В.Кочнева, Е.В.Чуб, Г.Ф.Сиволобова, А.А.Гражданцева, А.В.Шустов, В.М.Гранитов, С.В.Нетесов. Генотипическое разнообразие изолятов вируса гепатита С в Алтайском крае // Сборник трудов 5-ой всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней». – Москва. - 2004. - Т. 1. - С. 254-256.

4. Чуб Е.В., Шустов А.В., Кочнева Г.В., Нетесов С.В. Генотипы изолятов вируса гепатита С у больных острыми гепатитами в г. Барнауле Алтайского края и выявление ВГС-рекомбинантов // Материалы Российской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных заболеваний». – Сосновка (Новосибирская обл.). - 2005. - С. 80.

5. Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Шустов А.В., Плясунов И.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Терновой В.А., Чаусов Е.В., Акинфеева Л.А., Гранитов В.М., Сахарова Е.Г., Губанова Л.И., Орловский В.Г. Молекулярное разнообразие геномов вирусов гепатитов А, В, С, Е и его диагностическое, клиническое и эпидемиологическое значение // Материалы Всероссийской конференции «Фундаментальные науки – медицине». – Новосибирск. - 2005. – С. 62.

6. Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Плясунова И.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Терновой В.А., Чаусов Е.В., Акинфеева Л.А., Гранитов В.М., Сахарова Е.Г., Губанова Л.И., Орловский В.Г., Нетесов С.В. Этиология гепатитов и генотипическое разнообразие вирусов гепатитов А, В, С и Е в трех регионах Сибири. // Тезисы III Российской научной конференции с международным участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера». – Новосибирск. – 2006. - С. 44.

7. Чуб Е.В., Kurbanov F., Mizokami M., Кочнева Г.В., Нетесов С.В. Обнаружение рекомбинантных вариантов вируса гепатита С в Сибири и разработка ПЦР-системы для их идентификации // Материалы Международной научно-практической

конференции «Молекулярная диагностика инфекционных болезней». – Минск. - 2007. - С.83-84.

8. Chub E., Kochneva G., Manuilov V., Sivolobova G., Grazhdantseva A., Kurbanov F., Tanaka Y., Mizokami M., Netesov S. Hepatitis C virus recombinants type 2k/1b were found in Siberia, Russia // XIV International Congress of Virology. – 2008. – Istanbul (Turkey). - P. 284.

9. Barkhash A., Kochneva G., Chub E., Mikhailova S., Romaschenko A. Possible involvement of polymorphisms in OAS2, OAS3, and CD209 genes, associated with severe forms of tick-borne encephalitis, in predisposition to hepatitis C in Russian population // 15th International Congress of Immunology. – 2013. – Milan. - P. 419.

10. Чуб Е.В., Кочнева Г.В., Нетесов С.В. Рекомбинантные варианты вируса гепатита С в Западной Сибири, Россия // Сборник тезисов научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней». – Новосибирск. - 2013. - С. 27-28.

11. Бархаш А.В., Кочнева Г.В., Чуб Е.В., Михайлова С.В., Воевода М.И., Ромащенко А.Г. Поиск генов предрасположенности человека к заболеваниям, вызываемым флавивирусами: клещевому энцефалиту и хроническому гепатиту С // Материалы Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. - Москва. - 2014. - С. 30-31.

12. Barkhash A.V., Kochneva G.V., Chub E.V., Voevoda M.I., Romaschenko A.G. IL28B and IL10 gene variability and human predisposition to chronic hepatitis C and tick-borne encephalitis, caused by related viruses // Abstracts of The 2014 Innate Immunity Summit. - London (Great Britain). - 2014. - P. 8.

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.б.н. И.В. Плясуновой, 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.