



Происхождение, распространенность и ответ на терапию гепатита С, вызванного химерным вирусом генотипа 2k/1b

Simone Susser¹, Julia Dietz¹, Bernhard Schlevogt³, Eli Zuckerman⁵, Mira Barak⁶, Valeria Piazzolla⁷, Anita Howe⁸, Holger Hinrichsen⁹, Sandra Passmann¹, Rasha Daniel⁶, Markus Cornberg^{3,4}, Alessandra Mangia⁷, Stefan Zeuzem¹, Christoph Sarrazin^{1,2,*}

¹ Goethe-University Hospital, Medical Clinic 1, Frankfurt, Germany; ² St. Josefs-Hospital, Medical Clinic 2, Wiesbaden, Germany; ³ Hannover Medical School, Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover, Germany; ⁴ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Hannover-Braunschweig, Germany; ⁵ Liver Unit, Carmel Medical Center and Rappaport Faculty of Medicine, The Technion, Haifa, Israel; ⁶ Haifa and Western Galilee Laboratory, Clalit Health Services, Nesher, Israel; ⁷ Liver Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, San Giovanni Rotondo, Italy; ⁸ British Columbia Center for Excellence for HIV/AIDS, Vancouver, Canada; ⁹ Gastroenterology, Gastroenterologische Schwerpunkt Praxis, Kiel, Germany

Актуальность и цели. Об эпидемиологии и распространенности рекомбинантных штаммов вируса гепатита С (HCV) генотипа 2/1, которые могут представлять трудность при лечении противовирусными препаратами прямого действия (ПППД), известно немного. Настоящее исследование имеет целью изучить эпидемиологию и филогенез штаммов HCV генотипа 2/1 и поощряет скрининг на генотип для выбора схемы ПППД, с помощью которой можно достичь оптимального устойчивого вирусологического ответа (УВО).

Методы. Образцы, полученные от пациентов, инфицированных HCV генотипа 2 (согласно коммерческому генотипированию), из Германии, Италии и Израиля, были повторно генотипированы путем секвенирования по Сэнгеру. Затем были проведены вирусологический, эпидемиологический и филогенетический анализы, включающие другие химерные варианты.

Результаты. Анализ последовательностей 442 штаммов с предполагаемым HCV генотипа 2 выявил 61 химерный

вариант (генотип 2k/1b, $n = 59$; 2a/1b, $n = 1$; 2b/1a, $n = 1$). У пациентов из Италии химерных вариантов обнаружено не было, зато в Германии и Израиле их частота составила 14 и 25 % соответственно. Лечение пациентов с химерным вирусом софосбувиром и рибавирином привело к вирусологическому рецидиву у 25 (93 %) из 27 пациентов. Почти все пациенты, получавшие схему ПППД для генотипа 1 изначально (8 из 9 пациентов) или после рецидива (13 из 13), достигли УВО. Большинство пациентов с химерными вариантами 2k/1b (88 %) были родом из 8 различных областей бывшего Советского Союза. Все известные химерные варианты 2k/1b несли одну и ту же точку разрыва рекомбинации и составляли один филогенетический кластер, тогда как филогенез всех остальных химерных вариантов был другим.

Выводы. Вариант HCV генотипа 2k/1b возник вследствие одного единственного рекомбинационного события — скорее всего, на территории бывшего Советского Союза, тогда как другие химерные варианты уникальны и развивались независимо. Относительно высокая распространенность наблюдается вдоль потоков эмиграции в Германии и Израиле. Предполагается, что в странах с меньшей интенсивностью миграции из бывшего Советского Союза распространенность химерных вариантов 2k/1b будет ниже. Лечение софосбувиром и рибавирином неэффективно, но схемы, разработанные для генотипа 1, по-видимому, работают.

Резюме. Рекомбинантный HCV встречается чаще, чем ожидалось. Выявлен новый рекомбинантный вариант (HCV генотипа 2a/1b). Скрининг на рекомбинантные вирусы будет способствовать повышению частоты ответа на прямую противовирусную терапию.

© 2017 European Association for the Study of the Liver.

Ключевые слова: генотип HCV, химерный вариант, филогенез, эпидемиология, лечение ПППД, УВО.

Получено 25 января 2017 г.; получено с поправками 18 мая 2017 г.; принято в печать 23 мая 2017 г.; доступно онлайн 13 июня 2017 г.

* Автор, ответственный за переписку. Адрес: Goethe-University Hospital, Medical Clinic 1, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt/Main, Germany. Tel.: +49 69 6301 5122; fax: +49 69 6301 83112.

E-mail: sarrazin@em.uni-frankfurt.de (C. Sarrazin).

Сокращения: 3D — терапия паритапревиром/омбитасвиром/дабувиром; HCV — вирус гепатита С; SOF/R — софосбувир + рибавирин; ПППД — противовирусные препараты прямого действия; УВО — устойчивый вирусологический ответ.

Введение

Распространенный повсеместно вирус гепатита С (HCV) ведет к тяжелому повреждению печени у пациентов с хронической инфекцией. С хроническим гепатитом С связаны развитие цирроза, гепатоцеллюлярного рака, печеночной недостаточности и, в конечном итоге, смерть [1]. Недавнее исследование оценило распространенность хронического гепатита С в мире в 80 (диапазон 64–103) млн человек [2]; смертность от заболеваний печени, вызванных HCV, составляет около 500 000 человек в год [3].

HCV — генетически высокоразнородный вирус; выделяют 7 генотипов и 67 субгенотипов [4], с дивергенцией нуклеотидных последовательностей до 30 % [5]. Причиной такого широкого разнообразия штаммов HCV служит высокая частота мутаций, которые постоянно возникают за счет сочетания быстрой репродукции вируса и множества ошибок, которые случаются из-за неточности вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Альтернативным механизмом появления дивергентных геномов HCV считается генетическая рекомбинация. С момента ее первого описания в 2002 г. [6] межгенотипный рекомбинантный штамм HCV RF_2k/1b выявлялся у пациентов с гепатитом С редко [7, 8]. Предполагается, что он возник в Санкт-Петербурге (Россия) где-то между 1923 и 1956 г. [9]. Исследований распространенности рекомбинантных HCV немного, однако сообщалось, что в Грузии 76 % пациентов с генотипом 2 являются носителями химерного варианта 2k/1b [8].

Другие рекомбинантные штаммы HCV (2b/1a, 2b/1b, 2k/5a, 2i/6p и 2b/6w) описываются спорадически [10–15], как и внутригенотипные рекомбинанты [16]. Филогенетический анализ большинства вариантов не проводился.

За прошедшие годы стали доступны различные противовирусные препараты прямого действия (ПППД), направленные на неструктурные белки вируса NS3, NS5A или NS5B, что дало значительное повышение частоты устойчивого вирусологического ответа (УВО) [17]. Одним из основных требований при подборе оптимальной схемы лечения для каждого пациента является точное определение генотипа и субгенотипа HCV. Выбор как идеального сочетания препаратов, так и длительности лечения зависит главным образом от результатов генотипирования HCV. У пациентов, инфицированных неопределенными химерными вирусами, лечение может быть неэффективным [7].

Стандартные тесты при генотипировании HCV очень точно отделяют генотипы 1a и 1b, но ограниченно способны выделить субгенотипы генотипа 2. Поскольку большинство тестов направлено на нетранслируемый регион 5' или сердцевинную область в образцах, отличных от генотипа 1, методы для выявления химерных штаммов HCV не разработаны. Относительно новым является метод генотипирования HCV с использованием секвенирования следующего поколения [18]. В отличие от других тестов гены NS3, NS5A и NS5B HCV анализировались на определение генотипа. Основное преимущество этого метода — способность выявлять смешанные инфекции, включая прогнозирование соотношения. Но опять же выявление химерных штаммов HCV невозможно.

В этом исследовании мы протестировали на рекомбинации большую группу штаммов HCV генотипа 2 из разных стран. Кроме того, мы оценили эффективность различных схем ПППД и проследили филогенетическое развитие химер. Распространенность и происхождение рекомбинантов HCV генотипа 2k/1b в настоящее время могут быть связаны с миграционными процессами.

Пациенты и методы

Пациенты

Для участия в исследовании пациенты с гепатитом С генотипа 2 были приглашены в Университетскую больницу Франкфурта-на-Майне и Медицинскую школу Ганновера ($n = 346$). Дополнительно было включено 44 последовательных образца HCV генотипа 2, полученных у пациентов в Израиле, и 52 последовательных образца — в Италии.

Вирусная нагрузка РНК HCV измерялась на устройстве COBAS® AmpliPrep-Cobas TaqMan HCV-Test версии 2.0 (Roche Diagnostics, Германия).

Гистологические результаты биопсии печени классифицировались местными патоморфологами в соответствии с международными стандартизованными критериями. Для более эффективного сравнения результатов, полученных от различных патоморфологов, отдельные стадии фиброза были зафиксированы как стадия 0–1, 2 или 3–4 (т. е. отсутствие или минимальный фиброз, умеренный фиброз или выраженный фиброз/цирроз, согласно системе Metavir F1–4).

Все клинические исследования были одобрены местными этическими комитетами. Исследование было проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и правилами надлежащей клинической практики.

Генотипирование HCV

Генотипирование HCV проводилось с помощью теста обратной гибридизации (Versant® HCV Genotype 1.0 и 2.0 (LiPA), Innogenetics, Бельгия, и Siemens Diagnostics, Германия) или тестов в реальном времени (Abbott RealTime HCV Genotype II, Abbott Molecular, США; COBAS® HCV GT, Roche Molecular Diagnostics, США). Эти тесты использовали 5'-нетранслируемый регион для идентификации генотипов 1–6 HCV. Для различения субгенотипов 1a и 1b с помощью теста LiPA дополнительно исследовали сердцевинную область и ген NS5B вместе (тест Roche) и по отдельности (тест Abbott).

Аmplификация генов сердцевинной области HCV, NS3, NS5A, NS5B и популяционное секвенирование

Регион, кодирующий сердцевинную область HCV, соединение NS2/NS3, гены протеазы NS3, NS5A и полимеразы NS5B были амплифицированы методом полимеразной цепной реакции и популяционного секвенирования. Методы выделения РНК HCV, амплификации и секвенирования NS3, NS5A, NS5B описаны ранее [19]. Для сердцевинной области и соединения NS2/NS3 использовались следующие праймеры тем же методом: sCore_outer–CCATAGTGGTCTGCCGAAC, sCore_inner*–GCTAGCCGAG TAGCGTTG, asCore_2a–CATTGGARCAGTCATTRGTC, asCore_2b/k–GTTCGAG CAATCRTRTRGTTG, asCore_2c–GCTRGAGTTAGACAAATCG, NS2–2k-outF–CCGCAG CYTATGGTGGTTG, NS2–1b-outR–GACTCAACGGGTACAATKTC, NS2–2k-innF–TCCGGYGTRGTGTTTGAC, NS2–1b-innR–GGCAGACAGYGGACCAC.

Анализы проводились с использованием стандартной программы BLAST, оптимизированной для высокосходных

Исследовательская статья

последовательностей (megablast) [20]. Кроме того, все последовательности вручную сопоставлялись с прототипными последовательностями (cop1, VAT96, H77, HC-J6, D10988) с известными генотипами и субгенотипами.

Определение рекомбинантных точек разрыва

Вычисление рекомбинантных точек разрыва проводилось с помощью программы выявления рекомбинаций версии 4.80 (RDP4), использующей максимальный критерий χ^2 (MAXCHI) [21]. Участок длиной 742 пары нуклеотидов в диапазоне -370 ... +371 был проанализирован путем сопоставления на все предполагаемые химерные варианты. Специфические позиции нуклеотидов/аминокислот всегда были относительно начала NS3 и нумеровались в соответствии со штаммом H77.

Филогенетический анализ

Множественные сопоставления были проведены, используя программу MUSCLE версии 3.8.31 на веб-сайте EBI [22]. Филогенетический и эволюционный анализы проводились с помощью программы MEGA версии 7.23. Для оценки дерева максимальной вероятности предпочтение отдавалось модели General Time Reversible. Визуализация филогенетического дерева осуществлялась с помощью программы FigTree версии 1.4.2. Матрицы процентной идентичности создавались с помощью программы Clustal2.1 на веб-сайте EBI [22].

Результаты

Распространенность генотипов HCV, включая рекомбинантные штаммы

Из образцов из Германии генотип 2 HCV был выделен в 346. Секвенирование сердцевинной области HCV и гена NS3 выявило исходную неверную классификацию генотипа 2 тестами Versant® HCV Genotype 1.0 и 2.0 (LiPA), Abbott RealTime HCV Genotype II или Roche Cobas® HCV GT в 56 образцах. Из этих 56 образцов 7 могли быть отнесены к различным генотипам HCV (1a, 1b, 3a или 4d). Для остальных образцов определение генотипа или субгенотипа HCV могло быть сделано с помощью анализа последовательностей. Таким образом, в этой группе было выявлено 50 рекомбинантных вирусов (табл. 1, А).

Из Израиля 44 образца HCV имели генотип 2. У 25 % ($n = 11$) из 44 пациентов выявлен рекомбинантный вариант 2k/1b.

Кроме того, 52 образца с HCV генотипа 2 из Италии были проанализированы с помощью секвенирования по Сэнгеру. Проверка последовательностей с помощью программы BLAST показала, что 46 образцов были HCV генотипа 2с, 3 — генотипа 1а, 2 — генотипа 1b и 1 — генотипа 4d.

Результаты определения генотипов и субгенотипов для генов сердцевинной области, NS3, NS5A и NS5B выявленных рекомбинантных штаммов показаны в табл. 1, В.

Клинические характеристики пациентов, инфицированных рекомбинантными штаммами HCV

Подробные характеристики пациентов и клинические параметры приведены в дополнительных табл. S1 и S2 приложения. Корреляция между наличием у пациентов рекомбинантных вирусов и определенными стадиями фиброза, концентрациями РНК HCV или повышением активности печеночных ферментов не наблюдалась (данные не приводятся).

Страна происхождения пациентов, инфицированных рекомбинантным вирусом

У 59 из 61 пациента, инфицированного рекомбинантными вирусами, штамм HCV относился к генотипу 2k/1b. У остальных 2 пациентов были идентифицированы редкие химеры HCV генотипа 2 (2a/1b и 2b/1a). Эти пациенты были родом из России и Германии. У 50 из 59 пациентов, инфицированных HCV генотипа 2k/1b, была известна страна происхождения. Большинство этих пациентов (88 %; 44 из 50) были родом из бывшего Советского Союза. 21 пациент был российского происхождения, 11 — из Грузии, 4 — из Украины, 3 — из Азербайджана, 2 — из Армении, 2 — из Казахстана и 1 — из Таджикистана. Из остальных 6 пациентов 3 были родом из Западной Европы (Германия, $n = 2$; Греция, $n = 1$), 1 — из Восточной Европы (Румыния) и 2 — с Ближнего Востока (Израиль) (рис. 1).

Лечение пациентов, инфицированных рекомбинантным вирусом 2k/1b

Из германской когорты 37 из 50 пациентов с химерными вирусами начали терапию ПППД, 27 пациентов получали

Таблица 1. (А) Частота рекомбинантных штаммов HCV в Германии, Италии и Израиле. (В) Подробные результаты определения генотипа и субгенотипа в каждом проанализированном гене HCV во всех рекомбинантных штаммах

| А | | | | | | |
|---------------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|------|------|-----|
| Отдельные образцы с генотипом 2 | Германия ($n = 346$) | Италия ($n = 52$) | Израиль ($n = 44$) | | | |
| 2k/1b | 48 (13,9 %) | 0 | 11 (25 %) | | | |
| 2a/1b | 1 (0,3 %) | 0 | 0 | | | |
| 2b/1a | 1 (0,3 %) | 0 | 0 | | | |
| В | | | | | | |
| | Сердцевинная область | NS2 | NS3 | NS5a | NS5b | n |
| 2k/1b | 2k | 2k/1b | 1b | 1b | 1b | 59 |
| 2a/1b | 2a | 2a | 1b | 1b | 1b | 1 |
| 2b/1a | 2b | 2b | 1a | 1a | 1a | 1 |

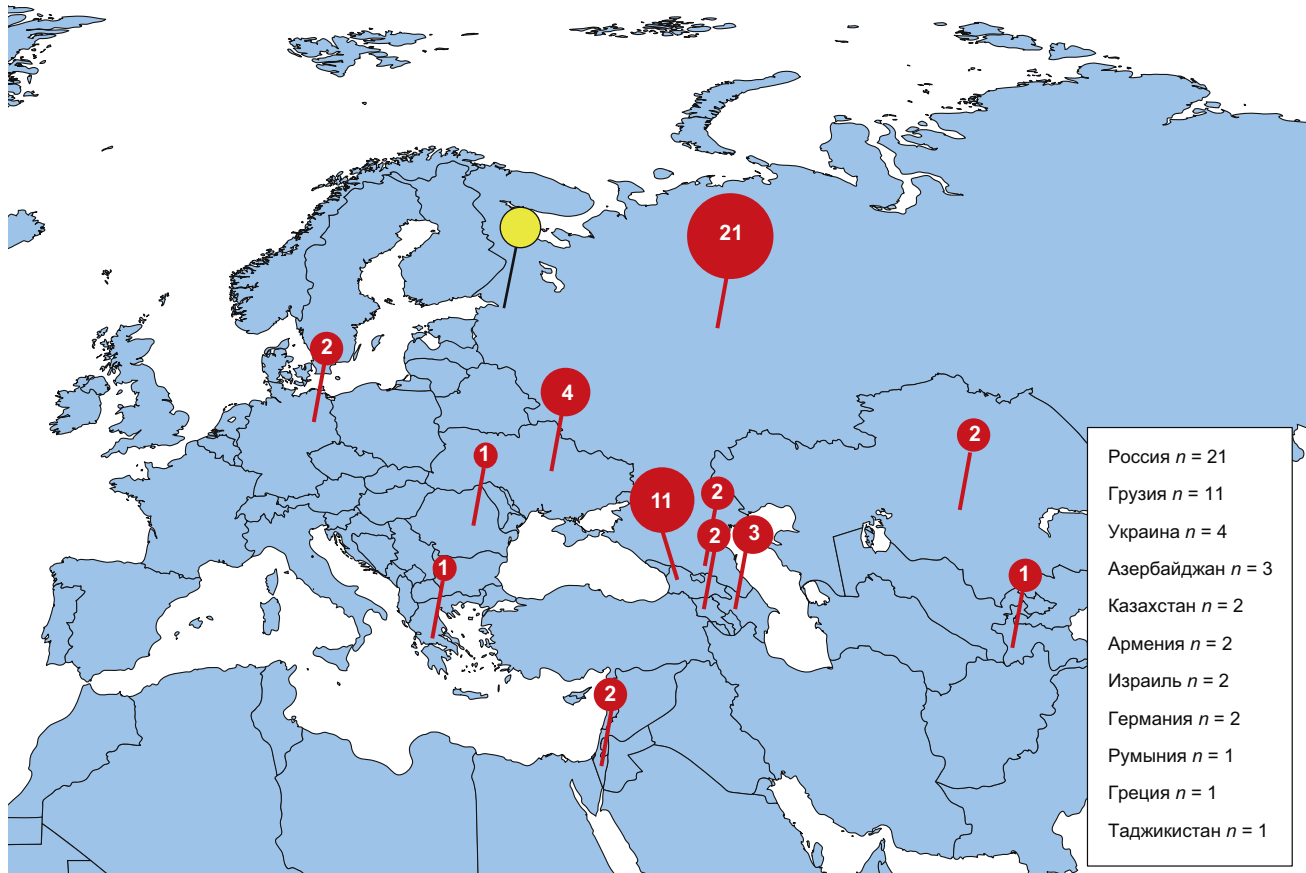


Рис. 1. Географическое распределение происхождения пациентов с вирусом 2k/1b

современное стандартное лечение при генотипе 2 — софосбувир + рибавирин (SOF/R) в течение 12 нед. Только 2 (7,4 %) из этих пациентов достигли УВО, у остальных 25 (92,6 %) пациентов имел место вирусологический рецидив. И наоборот, 10 остальных пациентов получали схему ПППД для генотипа 1, поскольку анализ устойчивости перед началом лечения показал наличие химерных вирусов. 2 из этих пациентов ответили на даклатасвир/софосбувир, 2 — на паритапревир/омбитасвир/дасабувир (терапия 3D), у 4 из 5 пациентов применялась схема ледипасвир/софосбувир ± рибавирин. 1 пациент, получавший ледипасвир/софосбувир/рибавирин, выбыл из-под наблюдения. Поскольку на момент сбора образцов безинтерфероновые схемы не были еще одобрены, ни один из пациентов из Израиля не получал ПППД, но 4 из 11 больных с химерными вирусами были пролечены пегилированным интерфероном-α и рибавирином сроком до 24 нед., у 2 человек была успешно достигнута эрадикация вируса.

Из 25 пациентов из Германии, у которых возник рецидив после лечения SOF/R, 14 получили терапию «спасения» ингибитором NS5A и софосбувиром или 3D-схему с рибавирином либо без него (LDV/SOF, n = 2; LDV/SOF/R, n = 3; DCV/SOF/R, n = 1; PTVr/OMB/DSV, n = 5; VEL/SOF, n = 3), 13 из них достигли по крайней мере УВО через 12 нед. после завершения лечения; у 1 пациента лечение еще продолжается (табл. 2).

Рекомбинантные точки разрыва

Успешный анализ последовательностей предполагаемого региона, где происходит рекомбинация, был проведен у 59 из 61 пациента. Рекомбинантный участок вариантов 2k/1b был обнаружен на уровне нуклеотидов от -232 до -219, что соответствовало аминокислотам от -77 до -73 и было идентичным во всех случаях (рис. 2). Сравнение точек разрыва уже опубликованных вариантов 2k/1b (n = 11) с рекомбинантами настоящего исследования показало одинаковое расположение, как и высокую идентичность последовательностей [7]. У 2 пациентов (G_16, G_40) анализ на регионы точек разрыва не был успешным. Никакие специфические признаки, как то вирусная нагрузка, отдельные характеристики (например, цирроз), не объясняли неудачу в определении последовательностей у этих пациентов.

Мы наблюдали 2 пациентов с редкими рекомбинантными вариантами HCV, из которых 1 не был описан. У 1 женщины из России обнаружился генотип 2a в сердцевинной области и генотип 1b в генах NS3, NS5A и NS5B. Рекомбинантный участок варианта 2a/1b располагался на уровне нуклеотида +49. Это положение было уникальным и ранее не описанным для других рекомбинантов (рис. 3, А). Еще 1 пациент, 62-летний мужчина из Германии, имел вариант 2b/1a. Генотип HCV 2b был выявлен в сердцевинной области, тогда как NS3, NS5A и NS5B относились к генотипу 1a.

Таблица 2. Частота УВО при исходной и повторной терапии ПППД у пациентов, инфицированных HCV генотипа 2k/1b

| | Исходная терапия ПППД | Повторная терапия ПППД* |
|-------------|--------------------------|----------------------------|
| SOF/R | 2/27 (7 %) | — |
| DCV/SOF ± R | 2/2 (100 %) | 1/1 (100 %) |
| LDV/SOF ± R | 4/5 (80 %) | 5/5 (100 %) |
| PTV/OMB/DSV | 2/2 (100 %) | 5/5 (100 %) |
| VEL/SOF | — | 2/2 (100 %) |

DCV — дактасвир; DSV — дасабувир; LDV — ледипасвир; OMB — омбитасвир; PTV — паритапревир; R — рибавирин; SOF — софосбувир; VEL — велпатасвир.

*У 1 пациента лечение еще продолжается.



Рис. 2. Рекombинантные точки разрыва рекомбинантов HCV генотипа 2k/1b. Сопоставление рекомбинантных участков от 36 нуклеотидных последовательностей HCV генотипа 2k/1b. Последовательности сравнивались с контрольными штаммами HCV_1b_con1 и VAT96_2k. Была показана область от нуклеотида -255 до -194 (относится к нуклеотидным позициям, отвечающим началу NS3 и соответствующим контрольному штамму H77) в пределах соединения NS2. Точки разрыва располагались между нуклеотидами -232 и -219 (относится к нуклеотидным позициям, отвечающим началу NS3 и соответствующим контрольному штамму H77).

Для этого варианта точка разрыва была расположена на уровне нуклеотида +16 (рис. 3, B) и этим отличалась от других описанных вариантов 2b/1a (6-7, -36 ... -41, 6-5 соответственно) [7].

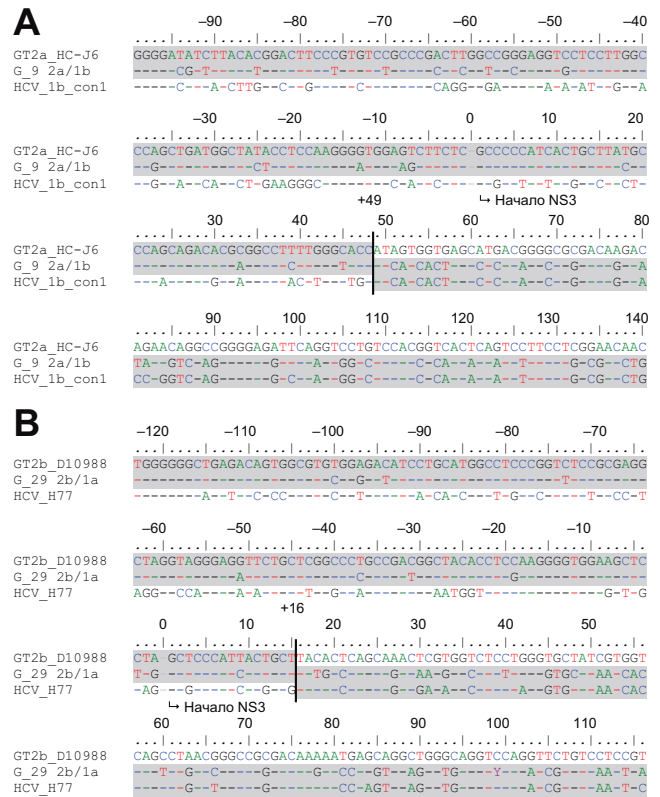
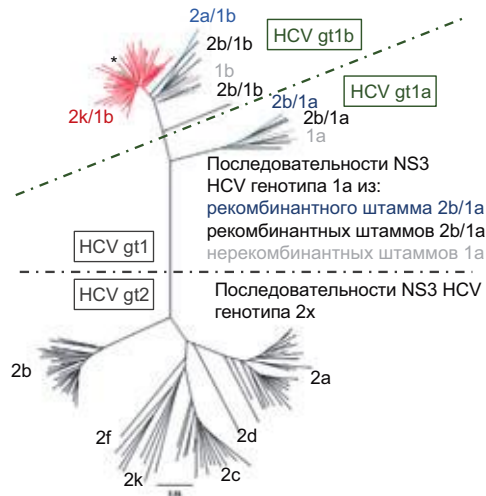


Рис. 3. Рекombинантные точки разрыва. (A) Рекombинантные точки разрыва рекомбинантов HCV генотипа 2a/1b. Сопоставление рекомбинантных участков последовательностей нуклеотидов генотипа 2a/1b с контрольными штаммами GT2a_HC-J6 и HCV_1b_con1. Была показана область от нуклеотида -99 до +140 (относится к нуклеотидным позициям, отвечающим началу NS3 и соответствующим контрольному штамму H77) в пределах соединения NS2/NS3. Точки разрыва располагались в нуклеotide +49 (относится к нуклеотидным позициям, отвечающим началу NS3 и соответствующим контрольному штамму H77). (B) Рекombинантные точки разрыва рекомбинантов HCV генотипа 2b/1a. Сопоставление рекомбинантных участков последовательностей нуклеотидов генотипа 2b/1a с контрольными штаммами GT2b_D10988 и HCV_H77. Была показана область от нуклеотида -123 до +116 (относится к нуклеотидным позициям, отвечающим началу NS3 и соответствующим контрольному штамму H77) в пределах соединения NS2/NS3. Точки разрыва располагались между нуклеотидами +16 (относится к нуклеотидным позициям, отвечающим началу NS3 и соответствующим контрольному штамму H77).

Эволюционные и филогенетические признаки рекомбинантных штаммов HCV

Филогенетический анализ последовательностей сердцевинной области, NS3, NS5A, NS5B и соединения NS2/NS3 выявил, что все варианты генотипа 2k/1b, описанные в этом исследовании, составляют единый кластер для каждого из этих генов (данные для ядра, NS5A, NS5B и NS2/NS3 не приводятся). Последовательности части 1b других опубликованных рекомбинантов (2a/1b, 2b/1b [7, 11]) располагались четко за пределами этого кластера, и различий с нерекombинантными штаммами HCV генотипа 1b

Последовательности NS3 HCV генотипа 1b из:
 рекомбинантных штаммов 2k/1b
 рекомбинантного штамма 2a/1b
 рекомбинантных штаммов 2b/1b
 нерекомбинантных штаммов 1b



Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей NS3 HCV, *RF1_2k/1b

Рис. 4. Эволюционные взаимоотношения таксонов.

Эволюционная история была выведена, используя метод объединения соседних пар [35, 36]. Показано оптимальное дерево с суммарной длиной ветвей 7,73474637. Дерево изображено в масштабе с длиной ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, использованные для построения филогенетического дерева. Эволюционные расстояния были вычислены, используя параметрический метод 2 Кимуры [37], и представлены в единицах количества нуклеотидных замен на участок. Анализ включал 164 нуклеотидных последовательности. Все позиции с покрытием участка менее 95 % были исключены. То есть в любой позиции допускалось менее 5 % пробелов в сопоставлении отсутствующих данных и неопределенных нуклеотидов. В окончательном наборе данных было 363 позиции. Эволюционный анализ проводился с помощью программы MEGA7 [23]. Результаты показаны в виде радиального дерева. Красный цвет — штаммы 2k/1b ($n = 41$ из базы данных исследования, дополнительные цифры последуют); 8 контрольных штаммов из PubMed: HQ537005, HQ537006, JX227952, FJ821465, KM102765, KM102768, KM102769, KM102770); зеленый — штамм RF1_2k/1b (AY587845); синий — штамм 2a/1b (из базы данных исследования, дополнительные цифры последуют); бирюзовый — штамм 2b/1a (из базы данных исследования, дополнительные цифры последуют); серый — нерекомбинантные штаммы 1a ($n = 6$) и 1b ($n = 9$) из собственной базы данных; черный — штаммы 2b/1a ($n = 5$; JF779679, KM102760, KM102761, KM102762, KM102763), 2b/1b ($n = 7$; AV622121, AV558135, AV677528, DQ364460, KM102764, KM102766, KM102767), 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, и 2k ($n = 75$ из базы данных исследования).
 gt — генотип.

найден не было. Исходный Санкт-Петербургский вариант и другие опубликованные последовательности 2k/1b также входят в этот кластер [6, 7, 26–28]. Это явно позволяет предположить, что единый штамм 2k/1b образовался в прошлом путем рекомбинации. Этот штамм, вероятно, передавался напрямую или при медицинских процедурах многим другим пациентам в бывшем Советском Союзе.

Последовательности NS3 HCV генотипа 1a явно отделились от кластеров генотипа 1b. Здесь мы не видим филогенетических различий в проанализированных последовательностях независимо от того, происходят они от рекомбинантного или нерекомбинантного вирусного генома (рис. 4). Это ожидаемо для независимо рекомбинированных геномов.

Сходство между последовательностями NS3 различных кластеров было выявлено путем создания матриц процентной идентичности. Медиана идентичности NS3 в геномах 2k/1b ($n = 45$) с RF1_2k/1b в качестве контроля (100 %) находилась на $93,94 \pm 1,0$ % (диапазон 91–96 %). Для сравнения, последовательности NS3 нерекомбинантного генотипа 1b ($n = 10$) показывали медиану идентичности с RF1_2k/1b $89,95 \pm 1,1$ % (диапазон 88–91 %). Впервые описанный вариант 2a/1b совпал с RF1_2k/1b на 88,43 %. Мы также проанализировали рекомбинантный вариант 2b/1a в нашем собственном исследовании ($n = 1$) по сравнению с другими опубликованными вариантами 2b/1a ($n = 5$). Идентичность составила $88,98 \pm 1,3$ % (диапазон 86–89 %) для NS3 генотипа 1a. Рекомбинантные варианты были распределены в кластерах обоих субгенотипов 1a [29]. Наконец, мы проверили недавно опубликованные геномы 2b/1b ($n = 7$) и обнаружили сходство на $83,61 \pm 1,2$ % (диапазон 82–85 %) с последовательностями NS3 генотипа 1b.

Естественные полиморфизмы и замены, связанные с устойчивостью

Мы проверили гены NS3, NS5A и NS5B, отвечающие за устойчивость к ПППД, которые уже были подтверждены для HCV генотипа 1b. В NS3 мы обнаружили замены, связанные с устойчивостью, у 4 пациентов (A156T и D168E). У 17 пациентов были найдены естественные полиморфизмы в позициях T54(S), V36(L), Q80(L), S122(N/T) и V170(I).

Большинство вариантов было обнаружено в гене NS5A, но с устойчивостью были связаны варианты только у 5 пациентов (L31M и A92T). Остальные варианты (K24R, R30Q, Q54H/L/Y, P58S и A92V) представляли вариации аминокислот, для которых какая-либо связь с устойчивостью не описана. Примечательно, что более половины объектов (55,3 %) показали полиморфизм A92V. В генотипе 1a могла быть выделена последовательность NS5A варианта 2b/1a, часть M28T. 3 гена NS5A не удалось секвенировать. В последовательностях NS5B не было найдено полиморфизмов или замен, связанных с устойчивостью к ингибиторам полимеразы NS5B. Последовательности 4 генов NS5B определить не удалось.

Заключение

Первый описанный штамм HCV генотипа 2k/1b был выделен у пациента в Санкт-Петербурге (Россия) и идентифицирован в 2001 г. Kalinina et al. [6]. Полагают, что штамм возник на территории бывшего Советского Союза между 1923 и 1956 г. [9]. Где именно образовался исходный химерный вариант 2k/1b, неизвестно, поскольку эпидемиологические данные из различных стран бывшего Советского Союза отсутствуют. Однако очень высокая распространен-

Исследовательская статья

ность рекомбинантного штамма 2k/1b отмечается, по недавним сообщениям, в Грузии [8]. Все пациенты в нашей когорте с рекомбинантным вирусом 2k/1b получали лечение в Германии или Израиле, но все они были родом из 11 различных стран и 89 % — из стран бывшего Советского Союза. Начиная с 1989 г. множество людей эмигрировали из бывшего Советского Союза. До 2006 г. большинство из них уехало в Израиль (979 000), США (325 000) и Германию (219 000) [24], тогда как в Италию уезжали редко. Это может объяснять, почему среди пациентов с гепатитом С генотипа 2 относительно высокая распространенность (14–25 %) инфицированных рекомбинантным вариантом 2k/1b наблюдалась в Германии и Израиле, а в Италии химер не обнаружено. Поскольку во Франкфурте и Ганновере находятся специализированные центры для пациентов с вирусными гепатитами, реальная распространенность генотипа 2k/1b неизвестна. Таким образом, для Германии, как и для многих стран Европы, необходимо больше данных для определения распространенности вирусных рекомбинантов. На основе количества эмигрантов из бывшего Советского Союза за последние 30 лет можно ожидать, что мы также обнаружим значительное количество химерных вирусов в США и Скандинавских странах [25], где доля инфекций, вызванных HCV генотипа 2, даже выше, чем в Германии и Израиле, и достигает 19,3 % [2].

Химеры HCV генотипа 2k/1b обычно описывают как вирусы генотипа 2 при исследовании с помощью коммерческих тестов для гибридизационного генотипирования. Ни один из этих тестов не годится для определения какого-либо химерического генома [30, 31]. При тестах в реальном времени результаты для различных регионов могут действительно дать разные генотипы, но не исключены и двойные инфекции. Предполагается, что анализ последовательностей NS5B достаточен для выявления химер 2k/1b [32, 33], но единственный безопасный способ выявить любой химерный вирус — определение последовательности рекомбинантных участков. Пациенты получали SOF/R в течение 12 нед. — стандартный подход при гепатите С, вызванном HCV генотипа 2. На практике же мишени в пределах репликационного механизма HCV в этих рекомбинантах были закодированы в последовательности HCV генотипа 1b. Поэтому неудивительно, что лечение SOF/R было неэффективным с частотой рецидивов более 90 %. Лишь у нескольких пациентов с вариантом 2k/1b генотип был определен верно путем секвенирования перед началом лечения. Эти пациенты изначально получали терапию, разработанную для генотипа 1. Пациенты с вирусологическим рецидивом после лечения SOF/R в дальнейшем также получили схему для генотипа 1. Обе группы показали, что лечение на основе ПППД, эффективное при гепатите С генотипа 1b, также эффективно у пациентов с химерным HCV генотипа 2k/1b с частотой УВО 96 % (21 из 22).

Все химеры с генотипом 2k/1b обнаружили одинаковые точки разрыва в рекомбинантном участке на карбокси-конце NS2. Более того, все последовательности 2k/1b (сердцевинная область, NS3, NS5A, NS5B и соединение NS2/NS3) составляли один филогенетический кластер. Это четко указывает на единое рекомбинационное событие, приведшее к появлению штамма HCV с генотипом 2k/1b. В дальнейшем химерный HCV генотипа 2k/1b передавал-

ся неизвестными путями, которые могли включать переливание крови и другие медицинские процедуры на территории бывшего Советского Союза. Это подкрепляется тем фактом, что первые рекомбинанты 2k/1b возникли в то же время, когда Сергеем Юдиным был открыт первый в мире банк крови в Институте Склифосовского (Москва) в 1930 г. [34]. После этого в бывшем Советском Союзе и других странах также были открыты банки крови. Отсюда возможна широкая передача HCV, включая рекомбинантный штамм 2k/1b, путем переливания крови.

Мы также наблюдали другие редкие рекомбинантные варианты: 2b/1a у пациента из Германии и 2a/1b у российского пациента. Филогенетический анализ показал, что эти штаммы не были родственны 2k/1b и другим ранее описанным химерам 2b/1a. Также рекомбинантные участки располагались в разных частях генома. По-видимому, эти варианты возникли при независимых рекомбинационных событиях и массовой передаче другим пациентам еще не произошло. В отличие от химер 2k/1b варианты 2b/1a, вероятно, появлялись преимущественно в Западной Европе и Северной Америке. Необходимы дополнительные международные исследования, чтобы оценить распространенность этих редких рекомбинантных вариантов.

Таким образом, миграционные потоки сделали вклад в относительно высокое количество вариантов HCV генотипа 2k/1b в Германии и Израиле. В странах с меньшей миграцией из бывшего Советского Союза ожидается низкая распространенность химер 2k/1b. Лечение SOF/R у пациентов с гепатитом С генотипа 2k/1b неэффективно. Однако схемы, разработанные для генотипа 1, дают весьма эффективную эрадикацию рекомбинантных вирусов. Единственное рекомбинационное событие привело к формированию выявленных вариантов HCV генотипа 2k/1b, тогда как другие уникальные химерные варианты возникали независимо.

Спонсоры

Исследование получило поддержку DZIF (Германского центра исследования инфекций) в виде гранта Christoph Sarrazin (TTU 05.902).

Конфликты интересов

Д-р Mangia сообщила о гонорарах от компаний BMS, Gilead, Janssen-Cilag, MSD во время проведения исследования. Д-р Schlevogt сообщил о получении грантов от компаний Abbvie и Gilead вне зависимости от проводимого исследования. Д-р Sarrazin сообщил о гонорарах от Abbvie, Abbott, BMS, Gilead, Janssen, Merck и грантах от Abbott, Gilead, Janssen, Siemens во время проведения исследования. Д-р Cornberg сообщил о гонорарах от Abbvie Deutschland GmbH, Bristol-Myers Squibb, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Biogen Idec, Falk Foundation e.V., Gilead Sciences, Janssen-Cilag, MSD Sharp & Dohme/Merck, Roche Diagnostics, Roche Pharma, Siemens вне зависимости от проводимого исследования. Д-р Zeuzem сообщил о гонорарах от компаний Abbvie, BMS, Gilead, Janssen, Merck вне зависимости от проводимого исследования. Остальные авторы не имеют конфликтов интересов.

Все подробности смотрите в дополнительном файле раскрытия конфликтов интересов ICMJE.

Вклад авторов

SS, SZ и CS — концепция и дизайн исследования. JD, MB, AH и SP — эксперименты и процедуры. JD, BS, MB, VP, AH, HH, RD, MC, EZ и AM — получение данных. Все авторы участвовали в написании и редактировании статьи.

Дополнительные материалы

Дополнительные материалы к статье представлены в англоязычном приложении на сайте <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.027>.

Литература

- [1] Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41–52.
- [2] Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014;61:S45–S57.
- [3] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095–2128.
- [4] Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014;59:318–327.
- [5] Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *J Gen Virol* 2004;85:3173–3188.
- [6] Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002;76:4034–4043.
- [7] Hedskog C, Doehle B, Chodavarapu K, et al. Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. *Hepatology* 2015;61:471–480.
- [8] Karchava M, Waldenstrom J, Parker M, et al. High incidence of the hepatitis C virus recombinant 2k/1b in Georgia: Recommendations for testing and treatment. *Hepatology* 2015;45:1292–1298.
- [9] Raghwanji J, Thomas XV, Koekkoek SM, et al. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. *J Virol* 2012;86:2212–2220.
- [10] Bhattacharya D, Accola MA, Ansari IH, Striker R, Rehrauer WM. Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States. *Virol J* 2011;8:458.
- [11] Kageyama S, Agdamag DM, Alesna ET, et al. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol* 2006;78:1423–1428.
- [12] Yokoyama K, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. *Arch Virol* 2011;156:1591–1601.
- [13] Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, et al. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol* 2007;81:4357–4362.
- [14] Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol* 2006;80:7569–7577.
- [15] Lee YM, Lin HJ, Chen YJ, et al. 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;82:57–68.
- [16] Galli A, Bukh J. Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 2014;22:354–364.
- [17] European Association for Study of L. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol* 2015;63:199–236.
- [18] Qiu P, Stevens R, Wei B, et al. HCV genotyping from NGS short reads and its application in genotype detection from HCV mixed infected plasma. *PLoS One* 2015;10(4):e0122082.
- [19] Dietz J, Susser S, Berkowski C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C. Consideration of viral resistance for optimization of direct antiviral therapy of hepatitis C virus genotype 1-infected patients. *PLoS One* 2015;10:e0134395.
- [20] Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 2008;36:W5–W9.
- [21] Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol* 2015;1:vev003.
- [22] Li W, Cowley A, Uludag M, et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* 2015;43:W580–W584.
- [23] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870–1874.
- [24] Tolts M. Post-Soviet Aliyah and Jewish Demographic Transformation. 15th World Congress of Jewish Studies. Jerusalem; 2009.
- [25] Denisenko M. Historical and Current Trends in Emigration from Russia. 2013. http://russiancouncil.ru/en/inner/?id_4=2292-top-content (accessed 05. September 2013).
- [26] Morel V, Descamps V, Francois C, et al. Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed Hepatitis C infection: a case report. *J Clin Virol* 2010;47:382–386.
- [27] Demetriou VL, Kyriakou E, Kostrikis LG. Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates. *Adv Virol* 2011;2011:710438.
- [28] Newman RM, Kuntzen T, Weiner B, et al. Whole genome pyrosequencing of rare hepatitis C virus genotypes enhances subtype classification and identification of naturally occurring drug resistance variants. *J Infect Dis* 2013;208:17–31.
- [29] Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J Viral Hepat* 2011;18:608–618.
- [30] Avo AP, Agua-Doce I, Andrade A, Padua E. Hepatitis C virus subtyping based on sequencing of the C/E1 and NS5B genomic regions in comparison to a commercially available line probe assay. *J Med Virol* 2013;85:815–822.
- [31] De Keukeleire S, Descheemaeker P, Reynders M. Potential risk of misclassification HCV 2k/1b strains as HCV 2a/2c using VERSANT HCV Genotype 2.0 assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;82:201–202.
- [32] De Keukeleire S, Descheemaeker P, Reynders M. Diagnosis of hepatitis C virus genotype 2k/1b needs NS5B sequencing. *Int J Infect Dis* 2015;41:1–2.
- [33] Schuermans W, Orlent H, Desombere I, et al. Heads or tails: genotyping of hepatitis C virus concerning the 2k/1b circulating recombinant form. *Int J Mol Sci* 2016;17.
- [34] Yudin SS. Transfusion of cadaver blood. *J Am Med Assoc* 1936;106:997–999.
- [35] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
- [36] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
- [37] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.