

УДК 616.36-022.6

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И УРОВЕНЬ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕПАТИТ С-ИНФЕКЦИИ

© 2012 г.

Т.Н. Быстрова, Ю.В. Михайлова

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной

gepatit-byistrova@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2012

С использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме «real-time» даны качественная и количественная характеристики структуры генотипов вируса гепатита С и особенности их распространения у различных контингентов населения в зависимости от формы инфекции, давности заболевания и возраста обследованных лиц. Не получено статистически достоверных данных о взаимосвязи генотипа вируса и уровня вирусной нагрузки.

Ключевые слова: гепатит С-инфекция, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени, генотипирование вируса гепатита С, вирусная нагрузка.

Введение

В настоящее время парентеральные вирусные гепатиты занимают одно из ведущих мест в инфекционной патологии человека. Несмотря на успехи, достигнутые в изучении гепатита С (ГС), сложность структуры и многофакторность развития эпидемического процесса до сих пор не позволили раскрыть в полной мере все закономерности течения ГС-инфекции [1, 2]. Лабораторная диагностика инфекции основывается на определении антител к вирусу ГС (анти-ВГС) с помощью серологических методов и РНК ВГС с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Внедрение молекулярно-генетических методов исследования показало, что значительное влияние на интенсивность течения инфекционного процесса ГС оказывает наиболее высокая генетическая гетерогенность вируса по сравнению с другими возбудителями вирусных гепатитов [3, 4]. Сегодня генотипирование ВГС и количественное определение РНК используются в эпидемиологических исследованиях и клинической практике для подбора оптимальной схемы лечения, прогнозирования и оценки эффективности интерферонотерапии [4]. Несмотря на это вопрос о взаимосвязи уровня вирусной нагрузки и генотипов вируса до сих пор остается открытым [5].

Исходя из вышесказанного, цель данной работы – сравнительная характеристика генотипической структуры вируса и уровня вирусной нагрузки у лиц с различными вариантами ГС-инфекции.

Экспериментальная часть

На наличие специфических маркеров ГС за период с 2007 по 2011 гг. обследованы 637 образцов сыворотки крови от пациентов инфекционных стационаров с предварительным диагнозом «вирусный гепатит» и 1238 образцов от медицинских работников, пациентов отделений гемодиализа и гематологии ЛПУ и пациентов наркологических стационаров Нижегородской области. Последние контингенты относятся к группам повышенного риска инфицирования ГС и страдают хронической ГС-инфекцией или являются «носителями» ВГС. До недавнего времени в практике общественного здравоохранения о «носительстве» ВГС судили по обнаружению анти-ВГС, что не корректно, поскольку должно быть подтверждено наличием РНК ВГС. Последующее исследование включало качественное определение РНК вируса у 345 анти-ВГС-позитивных и 217 анти-ВГС-негативных лиц. Количественный анализ и генотипирование изолятов вируса были проведены в РНК-позитивных образцах. В предыдущих исследованиях нами было показано, что применение ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» не только позволяет увеличить чувствительность метода, но и идентифицировать больший процент генотипов вируса [6]. Поэтому дальнейшее совершенствование методики для дифференциации ранее нетипированных проб было основано на ОТ-ПЦР «real-time» с учетом концентрации вируса в исследуемых образцах.

Для типирования низкокопийных проб проведено повторное выделения РНК с использованием сорбции на магнитных частицах с концентрированием на нескольких этапах экстракции, что позволило увеличить на порядок количество выделенных копий РНК и, как следствие, в большинстве случаев провести генотипирование с использованием стандартных протоколов. При анализе генотипической структуры вируса под наблюдением находилось взрослое население в возрасте от 20 до 78 лет, 34.9% из которых составили лица в возрасте 20–30 лет. Среди обследованных преобладали мужчины (68%), женщины составили 32%. Лица с известным возрастом были выделены в две возрастные группы: 20–29 лет включительно и старше 30 лет. Подобное разделение на возрастные группы показано в работе А.В. Шустова [3], автор обосновывает его методами математической статистики. Структура генотипов ВГС в зависимости от давности инфицирования проанализирована у 137 лиц с установленным диагнозом хронического ГС (ХГС).

Статистическая обработка результатов проведена по общепринятой методике с использованием пакета программ *Statistica 6.0* и *Biostat*. Определяли показатель средних величин (M), стандартную ошибку средних величин этих показателей (m), достоверность различий показателей в сравниваемых группах с использованием t -критерия Стьюдента (различия считали достоверными при вероятности $> 95\%$ ($p \leq 0.05$)).

Результаты и их обсуждение

С целью изучения распространенности ГС-инфекции была определена частота выявления анти-ВГС среди обследуемых контингентов населения. Аналогично литературным данным показано, что наибольшей частотой обнаружения антител характеризовались пациенты наркологических стационаров (92.5±2.7%), намного реже анти-ВГС были выявлены у больных с установленным диагнозом «вирусный гепатит», пациентов гемодиализа и медицинских работников (32.0±1.8%, 11.7±2.4% и 5.0±1.0% соответственно) [4, 7, 8]. В то время как у больных ГС в 11.3% случаев установлен диагноз острого ГС (ОГС), все обследованные лица из групп риска имели диагноз хронического ГС. Ранее проведенные нами исследования показали, что определение развернутого спектра анти-ВГС позволяет в ряде случаев дифференцировать хронические формы инфекции от острых. Так, среди больных с ОГС до-

стоверно чаще выявляется только капсидный белок вируса, а у анти-ВГС-позитивных лиц с ХГС наблюдалось достоверное преобладание полного белкового спектра (core, NS3, NS4, NS5) [9].

Показано, что частота обнаружения РНК ВГС составила 91.7±7.9% при острой и 72.3±3.8% при хронической фазе заболевания. Анализ репликативной активности вируса у серопозитивных лиц с ХГС позволил выявить контингент обследованных с реактивацией инфекционного процесса, представляющих непосредственную эпидемическую опасность. Так, частота обнаружения РНК у серопозитивных лиц групп повышенного риска была достаточно высокой и колебалась от 51.4±8.2% у медицинских работников до 80.5±4.2% у пациентов наркологических стационаров.

Кроме того, в ряде случаев было проведено определение РНК ВГС у анти-ВГС-негативных лиц группы повышенного риска инфицирования, позволившее своевременно выявить потенциальные источники инфекции на ранних сроках развития заболевания (в период серологического окна) в 0.9±0.4% случаев.

Дальнейшее типирование РНК-позитивных образцов показало следующее распределение циркулирующих генотипов: 1a – 3.2±1.1%; 1b – 42.1±3.2%; 2 – 4.5±1.3%; 3a – 37.7±3.1%, с превалированием в равной доле субтипов 1b и 3a. Аналогичные данные по соотношению указанных генотипов получены исследователями по ряду других территорий РФ [3]. Обращает на себя внимание, что в 5.3±1.4% случаев были обнаружены микст-варианты доминирующих генотипов: 1b+3a, 1a+1b.

Выявлена неоднородность генотипической структуры вируса у различных контингентов населения (рисунок). Так, больные ГС и пациенты наркологических стационаров отличались значительным разнообразием выявленных генотипов и наличием микст-вариантов генотипов. По нашему мнению, подобно данным других авторов, наличие микст-генотипов ВГС может свидетельствовать о возможности повторного инфицирования другим штаммом вируса [7]. В то же время медицинские работники и пациенты отделений гемодиализа характеризовались циркуляцией только двух субтипов вируса: 1b (81.0±8.5%) достоверно преобладал над 3a (19.0±8.5%) ($p < 0.01$), что согласуется с литературными данными [7, 10]. Следует отметить, что в 8.1±1.7% случаев генотип определен не был.

Частота обнаружения субтипов 1b и 3a не зависела от формы инфекции, они одинаково

преобладали как при остром ($50.0 \pm 15.8\%$ для 1b и $40.0 \pm 13.4\%$ для 3a), так и хроническом ГС ($43.2 \pm 5.2\%$ и $31.8 \pm 4.9\%$ соответственно). Аналогичные данные получены при анализе возрастной структуры инфицированных. Так, генотипы 1b и 3a одинаково доминировали как в возрастной группе 20–29 лет, так и у лиц старше 30 лет. При этом аналогично данным А.В. Шустова [3], у лиц старше 30 лет показана тенденция к равномерному увеличению удельного веса 1b с возрастом (с $26.1 \pm 6.5\%$ в 30 лет до $68.8 \pm 6.7\%$ – старше 50 ($p < 0.01$)) и снижению доли 3a (с $50.0 \pm 7.3\%$ до $10.4 \pm 4.4\%$ соответственно ($p < 0.01$)). Следует отметить, что только у лиц старше 30 лет выявлен 2-ой генотип ВГС [11]. Учитывая литературные данные о наличии корреляции между способом инфицирования и генотипом вируса, можно предположить возможные изменения в соотношении соответствующих путей передачи ВГС среди населения Нижегородской области в зависимости от возраста инфицированных лиц [3, 7].

При анализе генотипической структуры вируса отмечено, что с увеличением срока инфицирования от 5 до 15 лет и более наблюдается тенденция к снижению доли 1b и росту доли 3a. С одинаковой частотой были выявлены 2-ой генотип вируса и микст-субтипы: 1b+3a и 1b+1a ($6.5 \pm 2.5\%$). 2/3 всех больных ХГС с данными генотипами были инфицированы в течение последних 5 лет. Кроме того, именно в этот период впервые был выявлен 1a субтип ВГС. Все

вышесказанное свидетельствует об изменениях в структуре генотипов ВГС, циркулирующих у населения Нижегородской области на протяжении последних двадцати лет.

В связи с тем, что работы по взаимосвязи уровня вирусной нагрузки и генотипа вируса носят противоположный характер, нами был проведен анализ генотипической структуры вируса в зависимости от уровня вирусной нагрузки [5]. Были установлены некоторые различия в уровне вирусной нагрузки в зависимости от выявленного генотипа. Так, в 2/3 исследованных образцов количественное содержание РНК ВГС составило 10^5 МЕ/мл и более, что, согласно современным критериям, является высокой вирусной нагрузкой (пограничное значение $800\,000$ МЕ/мл) [12]. В то время как при наличии генотипов 1a и 2 количество РНК в пробе колебалось в пределах $10^4 - 10^6$ МЕ/мл, более 82% исследованных образцов с субтипами 1b и 3a отличались высокой вирусной нагрузкой (10^5 МЕ/мл и более). На основании полученных данных можно предположить, что более высокая вирусная нагрузка является одним из факторов, определяющих превалирование субтипов 1b и 3a на территории РФ. Кроме того, при субтипе 3a доля проб с содержанием РНК ВГС более 10^7 МЕ/мл была в 3 раза выше, чем у лиц с генотипом 1b, где также отмечены подобные находки ($50.0 \pm 9.4\%$ и $12.0 \pm 5.5\%$ соответственно) ($p < 0.01$). Следует отметить, что вирусная нагрузка выше 10^7 МЕ/мл выявлена

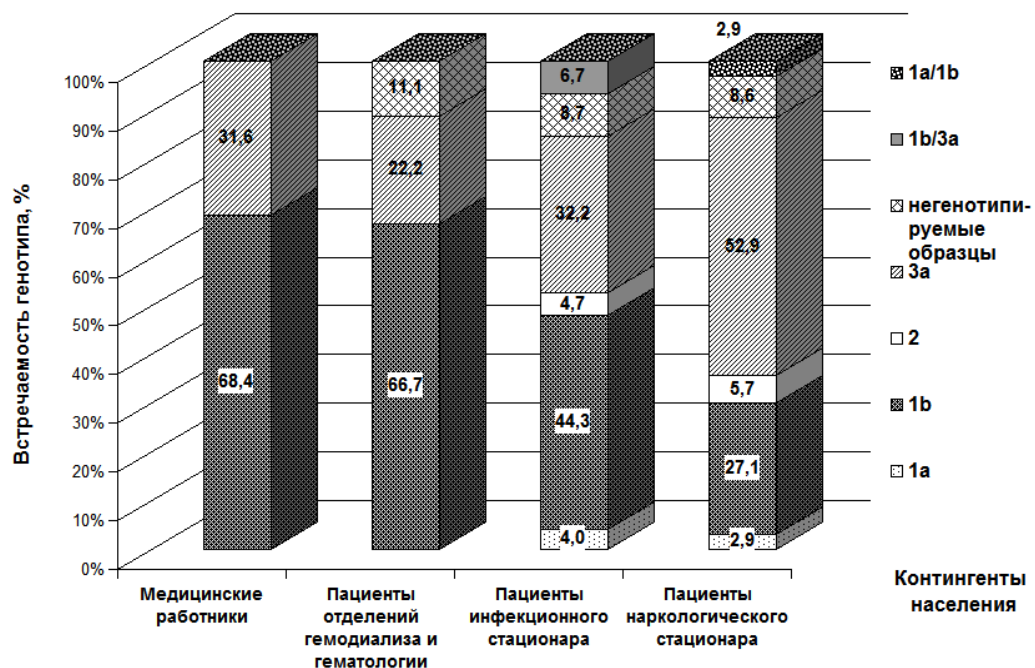


Рис. Генотипическая структура вируса гепатита С у различных контингентов населения

только в двух обследованных группах: среди пациентов гематологического отделения ЛПУ и наркологического стационара. Это может быть обусловлено повышением уровня репликативной активности ВГС на фоне сниженного иммунитета у гематологических больных и постоянным увеличением дозы вируса при реинфицировании у лиц, страдающих зависимостью от нескольких психоактивных веществ.

Определение уровня вирусной нагрузки не только позволило установить некоторую зависимость от генотипа вируса, но и оценить эффективность проводимого типирования. Так, увеличение чувствительности методики путем концентрирования копий РНК в пробе позволило генотипировать до 67% ранее не типлируемых образцов, вирусная нагрузка которых колебалась в пределах $10^3 - 10^5$ МЕ/мл. В подавляющем большинстве были идентифицированы 1b и 3a субтипы вируса ($56.7 \pm 9.0\%$ и $26.7 \pm 8.1\%$ соответственно), что закономерно объясняется их доминированием на исследуемой территории. Вирусная нагрузка 70% повторно нетипируемых проб была ниже, чем порог аналитической чувствительности тест-системы (<150 МЕ/мл). В ряде случаев не удалось типировать достаточно высококопийные пробы (с вирусной нагрузкой 10^3-10^5 МЕ/мл), что может быть связано с наличием редкого генотипа ВГС или мутационных изменений в участках генома вируса, используемых для создания праймеров в коммерческих тест-системах. Для решения последней задачи наиболее адекватным методом является секвенирование данных проб, основанное на генотипировании не одной, а сразу нескольких областей генома ВГС [7]. Следует принимать во внимание, что секвенирование по-прежнему остается весьма дорогостоящим, хотя и эффективным методом лабораторной диагностики.

Заключение

Таким образом, на территории Нижегородской области показано значительное разнообразие циркулирующих генотипов ВГС с доминированием в равной доле субтипов 1b и 3a. Тенденция к снижению доли 1b и росту 3a с увеличением срока инфицирования, а также появление ранее не выявляемого субтипа вируса свидетельствуют об изменениях в структуре генотипов, циркулирующих на исследуемой территории на протяжении последних двадцати лет. Выявлена некоторая взаимосвязь между уровнем вирусной нагрузки и доминирующими субтипами вируса. При этом полученные данные

не являются статистически достоверными, что требует увеличения фактического материала в дальнейшем.

Список литературы

1. Бобкова М.Р. Молекулярно-генетические методы в изучении эпидемиологии инфекций, возбудители которых передаются парентеральным путем. Автореферат дис. ... д-ра биол. наук. М.: ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, 2002. 44 с.
2. Шляхтенко Л.И., Мукомолов С.Л., Сулягина Л.Г. и др. Пути совершенствования эпидемиологической диагностики вирусных гепатитов В и С // Мир вирусных гепатитов. 2006. № 1. С. 2–10.
3. Шустов А.В. Генотипическое разнообразие изолятов и молекулярная вариабельность вируса гепатита С у населения Новосибирской области. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Кольцово: ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», 2003. 22 с.
4. Ильченко Л.Ю., Осканова Р.С., Сторожаков Г.И. Вирус гепатита С и особенности течения ВГС-инфекции у онкогематологических больных // Мир вирусных гепатитов. 2010. № 2. С. 9–14.
5. Саттарова М.И. Хронический вирусный гепатит С (некоторые аспекты пато-, морфогенеза, диагностики и клинического течения). Автореферат дис. ... канд. мед. наук. Душанбе: НИИ гастроэнтерологии АН Республики Таджикистан, 2007. 23 с.
6. Быстрова Т.Н., Михайлова Ю.В., Николаева О.А. Сравнительная характеристика ПЦР с электрофоретической и гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме «реального времени» для выявления вируса гепатита С // Матер. VII НПК с междун. участием «Молекулярная диагностика- 2010». М., 2010. С. 204–206.
7. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., et al. A natural intergenotypes recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg // Virology. 2002. V. 76. № 8. P. 4934–4043.
8. Баранов А.В. Эпидемиологические факторы и клинко-иммунологические аспекты патогенеза хронического гепатита С. Автореферат дис. ... д-ра мед. наук. М.: ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, 2009. 30 с.
9. Михайлова Ю.В. Распространенность гепатит С-инфекции на территории крупного промышленного города средневропейской части России // Сб. тез. Юбилейной НПК молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины». СПб.: СПбМАПО, 2010. С. 196–198.
10. Мохонов В.В. Молекулярно-биологическая характеристика генома вируса гепатита С (изолята 274933RU), выделенного на территории РФ. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. М.: ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, 2001. 22 с.
11. Быстрова Т.Н., Михайлова Ю.В. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса гепатита С, циркулирующих на территории с умеренной активностью эпидемического процесса // Инфекционные болезни. М.: Династия, 2011. Т. 9. № 2. С. 28–31.

12. Чуланов В.П., Шипулин Г.А. Роль молекулярных методов диагностики в оптимизации алгоритмов лечения вирусного гепатита С // Лабораторная медицина. 2006. № 8. С. 1–10.

**GENOTYPE STRUCTURE AND VIRAL LOAD LEVELS
IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF HCV INFECTION**

T.N. Bystrova, Yu.V. Mikhailova

Real time RT-PCR was used to characterize the structure of hepatitis C virus genotypes and to quantify viral load in groups of patients with various forms of infection, duration of infection and age. No statistic correlation between viral load and HCV genotype was revealed.

Keywords: HCV infection, real time RT-PCR, genotyping and quantification of HCV.