

УДК 616.36-002:616.988(470.341)

ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Т.Н. Быстрова¹, О.В. Корочкина², Ю.В. Михайлова¹, О.С. Карувваккат¹,¹ ФГУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной»,² ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»*Михайлова Юлия Владимировна – e-mail: gepatit-bystrova@yandex.ru*

В настоящей работе рассмотрена генотипическая структура вируса гепатита С среди пациентов инфекционных стационаров Нижегородской области с использованием метода ПЦР с электрофоретической и с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «Real-Time». Показаны значительное разнообразие циркулирующих генотипов, доминирующие субтипы и их неравномерное распределение на исследуемой территории.

Ключевые слова: гепатит С-инфекция, вирус гепатита С, полимеразная цепная реакция, генотипическая структура вируса.

The genotypical structure of the virus of hepatitis C among the patients of infectious hospitals of Nizhny Novgorod region with the use of the method of polymerase chain reaction with electrophoretic and hybridization-fluorescent detection in the regimen «Real-Time» is given in the article. There are shown the considerable diversity of circulating genotypes, dominating subtypes and their uneven distribution on the examined territory.

Key words: hepatitis C- infection, virus of hepatitis C, polymerase chain reaction, genotypical structure of virus

Введение

Повсеместное распространение, исключительно высокая хронизация делают проблему гепатита С (ГС) особенно актуальной. Наиболее детально изучены закономерности течения и развития острых форм ГС, в то время, как именно хронические и скрытые варианты инфекции определяют основную часть эпидемического процесса, социальную значимость и прогноз данной инфекции [1, 2]. Большое влияние на течение инфекционного процесса ГС оказывает значительная генетическая гетерогенность вируса, по-разному влияя на особенности течения болезни, эффективность противовирусной терапии, а возможно, и на частоту хронизации инфекции [2–5].

В настоящее время определение генотипов вируса ГС (ВГС) имеет не только клиническое, но и значительное эпидемиологическое значение. Помимо знаний о частоте выявления отдельных генотипов в различных регионах РФ, не менее важным являются исследования динамики генотипического разнообразия ВГС в пределах одной территории, с учетом полного спектра маркеров инфекции, с целью прогнозирования изменений эпидемиологической ситуации, предотвращения дальнейшего распространения инфекции. В частности, доминирование и возможный дальнейший рост доли субтипа 1b, который значительно снижает эффективность интерферонотерапии, ведет к увеличению длительно существующих источников ГС-инфекции. В случае создания кандидатной вакцины возможность ее применения и эффективность также будут определяться степенью изученности популяционной структуры ВГС, а именно, знанием преобладающих генотипов.

Цель исследования: изучение структуры генетических вариантов вируса гепатита С, циркулирующих среди населения Нижегородской области.

Материалы и методы

С целью изучения особенностей распространения ГС на основе данных официальной статистики проведен сравнительный анализ динамики заболеваемости манифестным острым (ОГС) и хроническим ГС (ХГС), включая латентную форму инфекции, на территории Нижегородской области в

сравнении с данными по РФ за период с 1997 по 2009 г. В сыворотках крови 637 лиц, госпитализированных с предварительным диагнозом: «вирусный гепатит» в стационары различных городов Нижегородской области, определены анти-ВГС методом ИФА. Анти-ВГС-позитивные образцы проверены на наличие РНК ВГС, генотипированы методом ПЦР с различными методами детекции полученных результатов. Использование электрофоретической детекции в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, позволяет дифференцировать 1a, 1b, 2, 3a генотипы ВГС, в то время как гибридационно-флуоресцентная детекция в режиме «Real-Time» дает возможность дополнительно определять четвертый генотип вируса [3,4]. При изучении 132 историй болезни лиц с заключительным диагнозом: «ХГС» проанализирована структура генотипов вируса в зависимости от давности инфицирования. Пациенты с известным возрастом разделены на 4 группы с интервалом в 10 лет. Полученные данные обработаны в программе Biostat.

Результаты и их обсуждение

Анализ официально регистрируемых данных в период с 1997 по 2009 г. отражает снижение заболеваемости ОГС; а также стабилизацию ХГС в последние годы как по РФ в целом, так и в Н. Новгороде на уровне 37–41⁰/₀₀₀₀ и 63–79⁰/₀₀₀₀ соответственно. На протяжении всего периода наблюдения отмечен рост соотношения между показателями ОГС и ХГС (для Н. Новгорода: с 1:0,7 в 1997 г. до 1:52 в 2009 г.). Кроме того, в отличие от некоторых территорий РФ, когда пики заболеваемости острым и хроническим ГС разделены пятью годами, в Н. Новгороде выраженный подъем ОГС сопровождался пиком регистрации ХГС уже через 3 года. Полученные данные свидетельствуют об интенсивности эпидемического процесса ГС на исследуемой территории, о значительном росте темпов накопления источников инфекции, отражая широкий потенциал нозоформы.

Анти-ВГС среди пациентов обнаружены в 32,0±1,8%, что свидетельствует о наличии у них инфекции, вызванной ВГС. В подавляющем большинстве у этих пациентов установлен диагноз ХГС (96,0±1,6%). Как известно, ГС редко диагностируется в фазе острого заболевания, являясь, в основном,

хронической инфекцией, что связано с ярко выраженной хронической способностью возбудителя. В отличие от ОГС, когда РНК ВГС обнаружена во всех исследованных случаях, репликативная активность вируса при ХГС составила $76,0 \pm 3,5\%$, свидетельствуя о стадии реактивации инфекционного процесса.

Проведенное генотипирование выявило в Нижегородской области следующие генотипы ВГС: 1b – $42,6 \pm 4,0\%$; 1a – $4,1 \pm 1,6\%$; 2 – $4,7 \pm 1,7\%$; 3a – $32,4 \pm 3,8\%$, которые, согласно данным литературы, являются типичными для территории РФ [3–6]. При этом были получены сравнимые результаты генотипирования как при использовании ПЦР с электрофорезной детекцией, так и в режиме «реального времени». Следует отметить, что применение метода ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией позволяет увеличить аналитическую чувствительность тест-систем (согласно заявленным характеристикам: 100 МЕ/мл для «Real-Time» в сравнении с 10^3 МЕ/мл при гель-электрофорезе) [3, 7]. Это особенно важно для идентификации образцов, нетипируемых с помощью электрофоретической детекции. Это может быть связано с низкой вирусной нагрузкой (согласно литературным данным – менее 10^4 МЕ/мл) и наличием редких микст-вариантов генотипов [7, 8]. Применение «Real-Time» позволило сократить число нетипируемых вариантов с $26,5 \pm 1,7$ до $9,5 \pm 2,4\%$. Образцы, в которых генотип повторно не определялся, требуют дальнейшего анализа методом секвенирования. Кроме того, в $7,0 \pm 2,0\%$ установлено наличие микст-генотипов – 1b/3a, которые выявлены только с использованием гибридационно-флуоресцентной детекции. Обнаружение микст-вариантов генотипов, возможно, связано с повторным инфицированием другим штаммом вируса.

В отличие от большинства территорий РФ, где наблюдается выраженное преобладание генотипа 1b ВГС, в Нижегородской области субтипы 1b и 3a преобладали в равной мере [9, 10]. Аналогичные данные получены Пахалковой Е.В. (2004), Цыганко Е.В. (2007), Маркиным Н.В. (2004) по Омской, Свердловской и Ростовской области [4–6]. Вместе с тем, выраженная неравномерность эпидемического процесса ГС на исследуемой территории проявилась и в неоднородности генотипической структуры вируса. Так, в отличие от Н. Новгорода и Балахны, где не выявлено различий в частоте обнаружения доминирующих субтипов 1b и 3a, в Дзержинске 1b достоверно преобладал над 3a ($p < 0,05$). Остальные субтипы вируса выявлялись значительно реже и также неравномерно на исследуемой территории. Наибольшая доля микст-генотипов приходилась на лиц, госпитализированных в стационары Н. Новгорода, что составило $70,0 \pm 1,5\%$ от общего количества образцов с 1b/3a. В Н. Новгороде и Балахне отмечены единичные находки генотипов 1a и 2, которые не циркулируют в Дзержинске. В то же время, именно на больных ГС в г. Дзержинске приходилась наибольшая доля нетипируемых образцов ($17,6 \pm 3,1\%$). Все вышесказанное обуславливает необходимость исследования региональных особенностей генотипической структуры ВГС, особенно преобладающих генотипов, для изучения эволюционных проявлений эпидемического процесса ГС в современных условиях на конкретной территории.

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

преобладали как при остром, так и хроническом ГС. Так, при ОГС в $50,0 \pm 15,8\%$ выявлен генотип 1b и в $40,0 \pm 13,4\%$ – 3a. Частота обнаружения доминирующих генотипов при ХГС составила $43,2 \pm 5,2\%$ и $31,8 \pm 4,9\%$ соответственно. При этом ХГС отличался значительным разнообразием выявляемых генотипов, включая субтипы 1a ($3,4\%$) и 2 ($6,8\%$), а также микст-генотипов 1b/3 ($8,0\%$), ни один из которых не был выявлен в фазе острой инфекции. Обращает на себя внимание, что субтип 1a у больных ХГС начинает выявляться лишь в период 2006–2010 гг.

Среди обследованных лиц $67,0 \pm 3,3\%$ составляли мужчины и $33,0 \pm 3,3\%$ – женщины. При этом, у женщин 1b достоверно преобладал над 3a ($p < 0,01$), а у мужчин данные субтипы преобладали в равной доле. Другие генотипы выявлялись значительно реже и примерно одинаково в обеих группах.

Различия в частоте обнаружения доминирующих генотипов выявлены только у лиц 50 лет и старше, где 1b достоверно преобладал над 3a ($62,9 \pm 8,2\%$ и $8,6 \pm 3,7\%$ соответственно). В остальных возрастных группах 1b и 3a преобладали в равной мере. Следует отметить, что у лиц старше 30 лет наблюдалась тенденция к равномерному увеличению доли 1b с возрастом (с $22,5 \pm 6,6\%$ в 30 лет до $63,0 \pm 8,2\%$ у лиц старше 50 лет ($p < 0,01$)) и снижению удельного веса 3-го генотипа (с $50,0 \pm 7,9\%$ до $9,0 \pm 4,7\%$ соответственно ($p < 0,01$)). Аналогичные данные по возрастному распределению доминирующих генотипов получены Шустовым А.В. (2003) среди населения Новосибирской области [11].

Выводы

1. Несмотря на снижение официальных показателей заболеваемости, полученные данные свидетельствуют о высокой интенсивности латентного компонента эпидемического процесса ГС на территории Нижегородской области, о значительном росте темпов накопления источников инфекции, отражая широкий потенциал нозоформы.

2. Использование ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» не только позволяет увеличить чувствительность методики, но и дифференцировать большее число генотипов вируса.

3. Генотипическое разнообразие изолятов ВГС на территории Нижегородской области ограничено четырьмя генотипами: 1a, 1b, 2 и 3a.

4. Показано преобладание в равной доле субтипов 1b и 3a независимо от формы инфекции и давности заболевания.

5. Частота обнаружения микст-генотипов 1b/3 составила $7,0 \pm 2,0\%$ случаев.

6. Наблюдение за динамикой генотипической структуры ВГС должно являться необходимой составляющей эпидемиологического надзора за гепатит С-инфекцией на каждой конкретной территории.



ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Иванова Т.Г., Яковчук Е.М., Высоцкий В.С. и др. Проблемы вирусных гепатитов в современный период. Сборник трудов всерос. НПК «Современные проблемы эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций». СПб. 2010. С. 215.
3. Гушин А.Е., Носкова О.М., Шипулин Г.А. Разработка набора реагентов «АмплиСенс HCV-генотип» для определения субтипов 1a, 1b, 2a, 3a вируса гепатита С. Вопросы вирусологии. 2003. № 3. С. 45–48.

4. Пахалкова Е.В., Утянская И.Г. Распространение субтипов ВГС на территории Омска и Омской области. Сборник трудов V Всерос. НПК «Генодиагностика инфекционных болезней». М. 2004. Т. 1. С. 261-265.

5. Цыганко Е.В., Ковалев С.Ю. Распределение генотипов вируса гепатита С в г.Екатеринбурге: динамика эпидемиологического процесса. Сборник трудов 6-й Всерос. НПК с межд. участием «Молекулярная диагностика-2007». М. 2007. Т. 1. С. 279-283.

6. Маркин Н.В., Цема Н.И. и др. Распределение субтипов вируса гепатита С в Ростовской области. Сборник трудов V Всерос. НПК «Генодиагностика инфекционных болезней». М. 2004. Т. 1. С. 249-250.

7. Орлов С.Т., Неверов А.Д., Михайловская Г.В. и др. Разработка и апробация тест-системы «АмплиСенс HCV-генотип-FRT» на клиническом материале

и контрольных панелях QCMD. Сборник трудов 6-й Всерос. НПК с межд. участием «Молекулярная диагностика-2007». М. 2007. Т. 1. С. 320-323.

8. ПЦР в режиме реального времени. Под. ред. Ребрикова Д.В. М.: БИНОМ, 2009. 215 с.

9. Мукомолов С.Л., Калинина О.В. Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов. Мир вирусных гепатитов. 2003. № 12. С. 5-13.

10. Калинина О.В. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов вируса гепатита С, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Автореф.дис...кан. биол. наук. СПб. 2000. 23 с.

11. Шустов А.В. Генотипическое разнообразие изолятов и молекулярная вариабельность вируса гепатита С у Населения Новосибирской области. Автореф.дис...кан. биол.наук. Кольцово. 2003. 22 с.