DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105

УДК 616.36-002+616.98:578.828HIV

Ю.В. Останкова[1], Д.Э. Валутите[1], Е.Б. Зуева[1], Е.Н. Серикова[1], А.Н. Щемелев[1], S. Boumbaly[4,5], T.A.L. Balde[4], А.В. Семенов[1, 2, 3]

ПЕРВИЧНЫЕ МУТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

[1]ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; [2]ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; [3]ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; [4]Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика; [5]Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинее, Гвинейская Республика

Цель. Оценка распространенности первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС в гене NS5b у пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ. **Материалы и методы.** Материалом исследования служили 196 бразцов плазмы крови пациентов, проживающих на территории СЗФО, с впервые выявленным ВИЧ. Образцы обследовали на наличие антител анти-HCV и РНК ВГС. В случае выявления РНК ВГС осуществляли амплификацию с использованием трех пар праймеров, совместно фланкирующих ген NS5b. После секвенирования нуклеотидной последовательности указанного гена определяли субтип вируса и выявляли мутации лекарственной устойчивости. **Результаты и обсуждение.** Антитела к ВГС выявлены у 18,87 % ВИЧ-инфицированных лиц, РНК ВГС – у 18,36 % пациентов, включая 89,18 % анти-ВГС-позитивных и 1,88 % анти-ВГС-негативных больных. Показано, что ко-инфекция чаще встречается у мужчин (77,8 %), чем у женщин (22,2 %). Выявлено отличие по вирусной нагрузке ВИЧ между группами с моноинфекцией ВИЧ и с ко-инфекцией ВИЧ + ВГС, показано достоверное отличие групп по количеству CD4+ лифоцитов. При филогенетическом анализе субтипы ВГС распределены следующим образом: ВГС 1b – 47,2 %, ВГС 3a – 30,6 %, ВГС 1a – 13,9 %, ВГС 2a – 5,5 % и единственный образец определен как ВГС 2k – 2,8 %. В девяти образцах (25 %) обнаружены мутации NS5b в положениях, связанных с развитием лекарственной устойчивости ВГС, в том числе по два образца среди ВГС генотипов 1a и 3a, а также пять образцов среди ВГС 1b. Мутации среди ВГС 1a представляли собой замены C316Y и N444D, среди ВГС 1b выявлены замены C316N, C451S, S556N/G. У пациентов с ВГС 3a выявлены два образца с мутацией D310N, ассоциированной с неблагоприятным прогнозом заболевания. Полученные данные рационально использовать для оценки динамики распространенности первичной фармакорезистентности ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц.

Ключевые слова: вирус гепатита С, ко-инфекция ВИЧ + ВГС, мутации лекарственной устойчивости, первичные мутации устойчивости, терапевтически наивные пациенты, секвенирование.

Корреспондирующий автор: Останкова Юлия Владимировна, e-mail: shenna1@yandex.ru.

Для цитирования: Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Boumbaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Первичные мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 3:97–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105

Поступила 02.06.20. *Принята к публ.* 23.06.20.

Yu.V. Ostankova[1], D.E. Valutite[1], E.B. Zueva[1], E.N. Serikova[1], A.N. Shchemelev[1], S. Boumbaly[4,5], T.A.L. Balde[4], A.V. Semenov[1,2,3]

Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection

[1]Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation;
[2]Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russian Federation;
[3]North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russian Federation;
[4]Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;
[5]Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée/International Research Center on Tropical Infections in the Republic of Guinea, Republic of Guinea

Abstract. **Objective** of our work was to assess prevalence of the primary HCV drug resistance mutations in the NS5b gene in patients with newly diagnosed HIV infection. **Materials and methods.** The study material was 196 blood plasma samples from patients living in the North-Western Federal District with newly diagnosed HIV. Samples were examined for the anti-HCV antibodies and HCV RNA presence. If HCV RNA was detected, amplification was performed using three primers pairs that co-flanked the NS5b gene. After sequencing the indicated gene nucleotide sequence, the virus subtype was determined and drug resistance mutations were detected. **Results and discussion.** Antibodies to HCV were detected in 18.87 % of HIV-infected individuals. HCV RNA was detected in 18.36 % of the patients, including 89.18 % anti-HCV-positive and 1.88 % anti-HCV-negative. It was shown that co-infection is more common in men (77.8 %) compared to women (22.2 %) – $\chi2 = 3.996$ at $p = 0.0456$, $df = 2$. The difference in the HIV viral load between the groups with HIV monoinfection and with HIV + HCV coinfection was demonstrated ($\chi2 = 6.284$ at $p = 0.0432$, $df = 2$). A significant difference between the groups by the CD4 + lyphocytes number was shown. In the phylogenetic analysis, the HCV subtypes are distributed as follows: HCV 1b – 47.2 %, HCV 3a – 30.6 %, HCV 1a – 13.9 %, HCV 2a – 5.5 % and only one sample was defined as HCV 2k – 2.8 %, respectively. Nine samples (25 %) presented NS5b mutations in

the positions related to the development of drug resistance of HCV, including two samples among HCV genotypes 1a and 3a (i.e., 5.6 % of the total HIV + HCV group), as well as five samples among HCV 1b (13.9 % of the total group). Mutations among HCV 1a were C316Y and N444D substitutions. Among HCV 1b, C316N, C451S, S556N/G substitutions were identified. Among patients with HCV 3a, 2 samples (5.6 %) with a D310N mutation associated with an unfavorable disease prognosis were found. The introduction of direct sequencing of HCV nucleotide sequences into the routine laboratory diagnostics will allow us to estimate the primary drug resistance mutations prevalence in risk groups to predict the HCV life-threatening complications development – fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma, as well as the outcome of antiviral therapy prognosis. The data obtained can be rationally used to assess the dynamics of the HCV primary pharmacoresistance prevalence among HIV-infected individuals.

Key words: Hepatitis C virus, coinfection with HIV + HCV, drug resistance mutations, primary resistance mutations, treatment naive patients, sequencing.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Yulia V. Ostankova, e-mail: shenna1@yandex.ru.

Citation: Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V. Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2020; 3:97–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105

Received 02.06.20. *Accepted* 23.06.20.

Ostankova Yu.V., ORCID: http://orcid.org/0000-0003-2270-8897
Valutite D.E., ORCID: http://orcid.org/0000-0002-0931-102X
Zueva E.B., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0579-110X
Serikova E.N., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0547-3945
Schemelev A.N., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3139-3674
Semenov A.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3223-8219

Согласно данным ВОЗ, распространенность вируса гепатита С (ВГС) в мире составляет примерно 2,8 %, затрагивая более 185 млн человек, в связи с чем ВГС остается одной из глобальных проблем здравоохранения [1].

ВГС приводит как к острым, так и хроническим заболеваниям печени, при острой стадии инфекции большинство людей не испытывают никаких симптомов [2]. В течение 6 месяцев после заражения 15–45 % инфицированных могут спонтанно выздороветь без какого-либо лечения, в то время как у 55–85 % разовьется хронический вирусный гепатит С (ХВГС) с персистирующей инфекцией, связанный с развитием цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), печеночной недостаточности [2].

ВГС классифицирован на восемь генотипов по составу нуклеотидных последовательностей, отличающихся друг от друга на 31–33 %, генотипы 1–4 и 6–7 подразделяют, в свою очередь, на переменное число генетически более близких субгенотипов, отличающихся друг от друга на 20–25 % (в настоящее время описано более 100 субгенотипов) [3]. Наиболее распространенным в мире генотипом является ВГС 1 (46 %), за которым следуют генотипы 3 (22 %), 2 (13 %) и 4 (13 %) [4]. При этом, хотя генотипы 1, 2 и 3 представлены во всем мире, их относительная распространенность варьирует в зависимости от географического района. Так, 1a и 1b являются наиболее распространенными в Европе, США, Японии, ВГС 3a – в Индии, Непале и Пакистане, ВГС 4 преобладает на Ближнем Востоке и в Северной Африке, генотипы 5 и 6, по-видимому, наиболее распространены в Южной Африке и Гонконге соответственно, генотип 7 – в Африке, генотип 8 – в Индии [3]. Несмотря на то, что большинство инфекций ВГС в мире относятся к вариантам 1 и 3, встречаемость более редких генотипов в тех или иных регионах может быстро увеличиваться, если они оказываются связаны с эффективными путями передачи, так как в определении глобальной распространенности разных типов вируса социальные, поведенческие и демографические факторы, включая международную миграцию, являются более важными, чем генетические вариации вируса [5]. В Российской Федерации (РФ) преобладают субгенотипы 1b и 3a, циркулирующие в различных соотношениях в регионах страны, затем следуют ВГС 1a и 2 [6].

Прогрессирование заболеваний печени, связанных с ВГС, можно предотвратить путем длительного подавления вирусной репликации эффективными лекарственными средствами. Длительное время лечение ХВГС было основано на комбинации пегилированного интерферона альфа и рибавирина (PegIFN / RBV), однако этот способ отягощен серьезными побочными реакциями как минимум у 10 % пациентов, а устойчивый вирусологический ответ достигается только у 50 % инфицированных генотипом 1 и 4. Революцией в терапии ХВГС стала разработка препаратов прямого противовирусного действия (ППД), направленных на ключевые белки вируса: протеазу NS3, полимеразу NS5B и белок NS5A. Схемы, сочетающие комбинации препаратов, нацеленных на разные мишени, приводят к увеличению частоты устойчивого вирусологического ответа до уровня выше 90 % и сокращают продолжительность лечения до 12 недель и менее [7].

В 2016 г. ВОЗ предложила глобальную стратегию по ликвидации вирусных гепатитов к 2030 г. В отношении ВГС целью этой работы является снижение числа случаев заболевания на 90 %, повышение безопасности медицинских процедур, сокращение смертности на 65 %, увеличение доли людей, которым осуществлена диагностика инфекции, до 90 % и доли вылеченных – до 80 % [8].

Поскольку в настоящее время продолжительность лечения, показатели излечения и необходи-

мость применения специфических ППППД, а также интерферона и рибавирина частично зависит от генотипа и субтипа ВГС, разработка национальных стратегий лечения требует детального понимания относительной распространенности геновариантов ВГС в стране. Еще одной проблемой является продолжающаяся передача ВГС среди населения в группах высокого риска. Относительная величина частоты передачи вируса внутри страны и за рубежом может быть ключевым параметром для оценки успеха отдельных национальных стратегий лечения. Национальные программы по элиминации и профилактике могут быть успешными только в том случае, если значительная часть заражений происходит внутри страны, в то время как международная координация становится более важной при повышении частоты трансграничной передачи вируса. Исследователи в Швейцарии показали, что, хотя передача возбудителя между странами сохраняется, внутренняя передача со временем приобретает большее значение, то есть диагностический скрининг с особым акцентом на группы высокого риска может стать значимым шагом в национальной стратегии по ликвидации ВГС и должен рассматриваться в качестве одного из главных приоритетов [9]. Косвенные данные свидетельствуют о важной роли передачи ВГС внутри страны среди ВИЧ-инфицированных лиц: пациенты, у которых ВИЧ генетически близок с таковым у пациентов с ко-инфекцией ВИЧ + ВГС, имеют более высокий риск заражения ВГС. Это также указывает на высокую частоту передачи ВГС в семейных/партнерских очагах данного контингента и позволяет выявить лиц с высоким риском инфицирования ВГС [10]. В отсутствие вакцинации для предотвращения инфекции и повторного заражения ВГС важным элементом стратегий элиминации вируса является лечение людей с высоким риском передачи его другим. Исходя из вышесказанного, люди, живущие с ВИЧ-инфекцией (ЛЖВ), определены как группа, в которой микроэлиминация ВГС представляется возможной, потому что такие больные с большей вероятностью будут выявлены и имеют больший доступ к ППППД ВГС, чем другие группы населения [11]. В то же время ко-инфекция ВИЧ + ВГС вызывает особую озабоченность еще и потому, что скорость прогрессирования заболевания печени в этой популяции более высока и фактически является одной из наиболее распространенных причин смерти среди ВИЧ-инфицированных лиц, получающих антиретровирусную терапию (АРВТ), и в целом смертность при ко-инфекции ВИЧ + ВГС выше, чем при моноинфекциях ВГС или ВИЧ [12]. Причем вирусная нагрузка ВИЧ является независимым предиктором прогрессирования фиброза печени у этих пациентов.

Однако высокая скорость репликации ВГС и отсутствие механизма коррекции мутационных замен определяют естественную изменчивость, способствующую быстрому появлению устойчивых к лекарствам геновариантов [13]. Генотип ВГС, субтип и наличие ассоциированных с фармакорезистентностью мутаций являются ключевыми детерминантами выбора режимов лечения ППППД, в связи с чем неверное определение генотипа и несвоевременное выявление мутаций лекарственной устойчивости могут привести к неоптимальным схемам лечения, неудачному исходу терапии, если используются не пангенотипические схемы [14]. В связи с этим особое значение приобретает определение генотипов, субтипов и мутаций ВГС в значимых для распространения вируса внутри страны группах риска, в том числе и среди ВИЧ-инфицированных лиц. В контексте многих новых ППППД важно получить популяционные данные об изменениях лекарственной устойчивости ВГС среди не получавших лечение лиц, чтобы выявить мутации, которые влияют на результат терапии.

Целью нашей работы стала оценка распространенности первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС в гене NS5b у пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ.

Материалы и методы

Исследование одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург). В работе использована плазма крови 196 пациентов, проживающих на территории Северо-Западного федерального округа, с впервые выявленным ВИЧ.

Образцы обследовали на наличие антител анти-HCV и РНК ВГС.

Экстракцию РНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции. Для выявления ВГС анализ присутствия вируса проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс HCV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Вирусную нагрузку ВГС и ВИЧ определяли с использованием коммерческих наборов производства ФБУН ЦНИИЭ (Москва) «АмплиСенс HCV-Монитор-FL» и «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» соответственно, согласно инструкциям производителя.

Обратную транскрипцию проводили на неспецифичных праймерах с использованием коммерческого набора реагентов «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) для синтеза первой цепи кДНК, согласно инструкции производителя. Реакцию останавливали нагреванием в течение 5 мин при температуре 70 °C. Далее осуществляли амплификацию с использованием трех пар праймеров, совместно фланкирующих ген NS5b ВГС.

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 3–30 пМ каждого олигопраймера, 0,8–1,0 мМ каждого дезок-

синуклеотида, 5,8 мМ $MgCl_2$, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США), буфер для Taq ДНК-полимеразы, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл. Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при температуре 95 °С в течение 15 мин устанавливали 30–40 циклов в режиме: 95 °С – 20 сек, 52–58 °С – 20–30 сек, 72 °С – 120 сек; затем финальная элонгация при температуре 72 °С – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально методом электрофореза в 2 % агарозном геле (120 В, 40 мин; 1xTBE), окрашенном бромидом этидия.

Для последующего исследования использовали специфичные праймеры. Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США) в трех повторах, на прямых и обратных праймерах. Пробы исследовали с помощью генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Типирование ВГС осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена NS5b. Первичный анализ проводили с помощью программы NCBI Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGAv.7.0, используя алгоритм ClustalW [15]. Для последующего филогенетического анализа применяли метод Maximum Likelihood, позволяющий провести оптимизацию деревьев в соответствии с моделью General Time Reversible и Gamma Distributed (GTR + G), при оценке достоверности генетических связей использовали многократную генерацию выборок методом Монте-Карло (bootstrap) для 1000 независимых построений каждого филогенетического древа. Графическое изображение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей полного генома ВГС относительно референсного образа H77 получали с помощью online программы Sequence locator в базе данных ВГС (https://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html). Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий определено значение вероятности $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Возраст пациентов в группе варьировал от 18 до 65 лет и составил в среднем (36,5±14,7) лет. Количество мужчин преобладало по сравнению с женщинами – 63,3 и 36,7 % соответственно.

В нашем исследовании антитела к ВГС выявлены у 18,87 % ВИЧ-инфицированных лиц. При использовании коммерческого набора «АмплиСенс® HCV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) РНК ВГС выявили у 18,36 % пациентов, включая 89,18 % анти-ВГС-позитивных и 1,88 % анти-ВГС-негативных больных. Таким образом, среди РНК ВГС-позитивных пациентов 8,3 % были серонегативны. Выявление РНК ВГС у пациентов без анти-HCV, по всей видимости, связано с тем, что при диагностике острой инфекции ВГС у пациентов с ВИЧ-инфекцией серологические маркеры могут не определяться [16]. При анализе выявления ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц в зависимости от пола показано, что ко-инфекция чаще встречается у мужчин (77,8 %) по сравнению с женщинами (22,2 %): $\chi2=3,996$ при $p=0,0456$, $df=2$.

Вирусная нагрузка ВГС среди анти-HCV-негативных пациентов составила в среднем $1,9\cdot10^4$ МЕ/мл, в то время как среди анти-HCV-позитивных больных – $6,4\cdot10^6$ МЕ/мл. При оценке вирусной нагрузки среди больных с моноинфекцией и с ко-инфекцией показано, что она составляет в среднем 4,4 $\log_{10}$ и 4,6 $\log_{10}$ копий/мл соответственно. При этом среди пациентов с моноинфекцией 54,4 % обследуемых имели вирусную нагрузку менее 4 $\log_{10}$ копий/мл, 29,4 % – больше 4 и меньше 5 $\log_{10}$ копий/мл, 16,2 % – более 5 $\log_{10}$ копий/мл. В группе пациентов с ко-инфекцией распределение по вирусной нагрузке представлено таким образом: 50, 16,7 и 33,3 % соответственно. Таким образом, распределение вирусной нагрузки ВИЧ в группе с ко-инфекцией достоверно отличалось от группы с моноинфекцией ВИЧ ($\chi2=6,284$ при $p=0,0432$, $df=2$).

При анализе количества CD4+ лимфоцитов показано, что в группе с моноинфекцией ВИЧ 5,6 % пациентов с CD4+ <200 клеток/мкл, 35 % с 200–400 клеток/мкл, 59,4 % с >400 клеток/мкл. В группе с ко-инфекцией ВИЧ + ВГС распределение было следующим: 11,1, 55,6 и 33,3 % пациентов соответственно. Показано достоверное отличие групп: $\chi2=8,187$ при $p=0,0167$, $df=2$.

Для 36 образцов удалось получить нуклеотидные последовательности гена NS5b. При филогенетическом анализе показано преобладание генотипа 1 (61,1 %) по сравнению с генотипами 3 (30,6 %) и 2 (8,3 %). Субтипы ВГС распределены следующим образом: ВГС 1b оказался наиболее распространенным вариантом вируса в обследуемой группе и составил 47,2 %, затем следует ВГС 3a – 30,6 %, ВГС 1a – 13,9 %, ВГС 2a – 5,5 % и единственный образец определен как ВГС 2k – 2,8 %. Филогенетические отношения между исследованными образцами ВГС и референсными штаммами из международной базы данных GenBank представлены на рис. 1.

Мы не выявили ассоциации вирусной нагрузки ВГС, ВИЧ, а также количества CD4+ лимфоцитов с генотипами ВГС.

Хотя в целом ген NS5b умеренно консервативен, домен ладони (от 188 до 227 и от 287 до 370) счи-

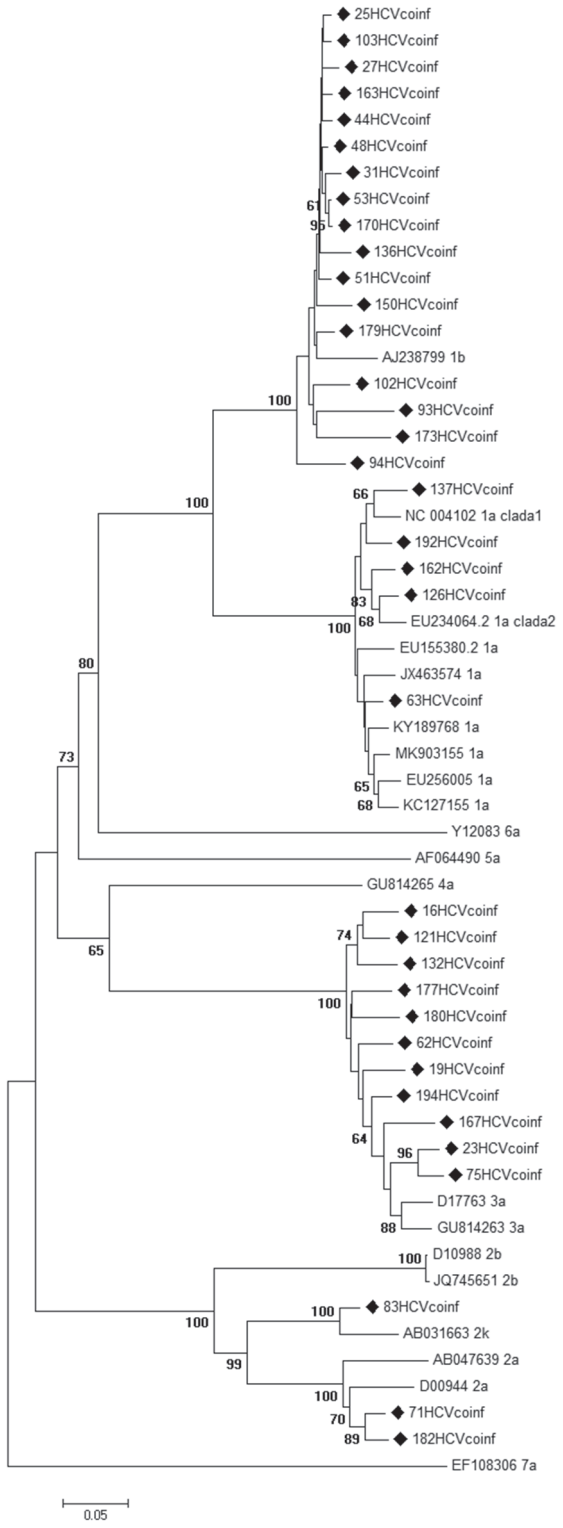

Рис. 1. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена NS5b вируса гепатита С, выделенного от пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ, проживающих в СЗФО. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа образца. Ромбами обозначены образцы, исследованные в настоящей работе. Даны значения bootstrap ≥60

Fig. 1. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of NS5b gene of HCV isolated from patients with newly identified HIV infection, residing in NWFD. References sequences are marked with GenBank codes with indication of sample genotype. The diamonds label the samples studied within the frames of this work. Presented are the values with bootstrap ≥60

тается более стабильным (60,5 % аминокислотных остатков), в то время как домены «пальцы» (от 1 до 187 и от 228 до 286) и «большой палец» (от 371 до 563) демонстрируют большую вариабельность – 50 и 53,4 % стабильных АА соответственно, а β-петля (остатки с 443 по 454) в пределах области большого пальца высокоизменчива (41,7 % стабильны). Ген ВГС NS5b кодирует полимеразу, отвечающую за репликацию вируса и содержащую шесть значимых для ее ферментативной активности мотивов (последовательностей), обозначаемых AF, что делает этот регион важной потенциальной мишенью для разработки эффективных противовирусных препаратов [17].

При анализе нуклеотидных последовательностей данного гена среди пациентов с генотипом 3а выявлены два образца (5,6 %) с мутацией D310N, ассоциированной с неблагоприятным прогнозом заболевания. Как уже сказано выше, примерно у 25 % больных ХВГС заболевание печени прогрессирует до фиброза, цирроза, печеночной недостаточности и ГЦК, причем скорость прогрессирования варьирует от нескольких лет до нескольких десятилетий. Прямые цитопатические эффекты вируса могут способствовать заболеванию, но считается, что они вторичны по отношению к иммуноопосредованному повреждению паренхимы печени. К прогрессированию заболеваний печени ведет и ряд мутаций ВГС, в том числе замена D310N в гене NS5b. Отметим, что данная мутация может индуцироваться при монотерапии рибавирином [18].

Несмотря на то, что разработаны пангенотипические ППП Д, такие как комбинация софосбувира и даклатасвира, софосбувира и велпатасвира, глекапревира и пибрентасвира, определение генотипа ВГС при планировании терапии все еще имеет большое значение, так как естественные мутации в разных генотипах вируса могут влиять на исход лечения в зависимости от выбранной схемы терапии. Так, генетический барьер устойчивости к ППП Д обычно ниже у генотипа 1а по сравнению с 1b [19], а генотип 3а чувствителен к терапии интерфероном, но при этом для генотипа 3 характерны естественные полиморфные варианты, способные нарушать ответ на ингибиторы NS5a при циррозе [20].

В исследованной нами группе в девяти образцах (25 %) обнаружены мутации NS5b в положениях, связанных с развитием лекарственной устойчивости ВГС. Так, мы выявили по два образца с фармакорезистентными мутациями среди ВГС генотипов 1а и 3а (то есть по 5,6 % от общей группы ВИЧ + ВГС), а также пять образцов среди ВГС 1b (13,9 % от общей группы). Мутации среди ВГС 1а представляли собой замену цистеина на тирозин в положении 316 (C316Y), способную ослаблять противовирусную эффективность некоторых ненуклеозидных ингибиторов, например дасабувира. В одном из этих образцов также показана мутация N444D. Отметим также, что при филогенетическом анализе четыре образца ВГС 1а подразделялись на клады 1 и 2, связанные с

частотой естественных мутаций фармакорезистентности: для клады 1 показана устойчивость к симепревиру, но не к паритапревиру, а для клады 2 характерна перекрестная устойчивость к симепревиру и паритапревиру [21].

Фармакорезистентная мутация в положении 316 (замена C316N) показана и среди ВГС 1b, в одном образце одновременно присутствовала мутация S556N. Еще в одном образце выявили мутации фармакорезистентности C451S и S556G. Отметим, что замена C316N является одной из самых распространенных фармакорезистентных мутаций ВГС 1b среди пациентов, не получавших ПППД в Азии, а также на территории бывшего СССР [22].

Таким образом, мутации лекарственной устойчивости чаще встречаются среди ВГС 1b, однако их более высокая распространенность обусловлена присутствием замены C316N, обеспечивающей низкий уровень устойчивости к тегобувиру и HCV-796 у штаммов генотипа 1b.

Как известно, в модели нейтральной эволюции зависящее от стохастических факторов распространение нейтральных мутаций может приводить к фиксации даже неблагоприятных изменений генома, если вирус циркулирует в сравнительно небольшой популяции, например в среде потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) или в других группах риска [23]. Сочетание высокой скорости репликации ВГС, низкой точности вирусной полимеразы, селективного давления со стороны иммунной системы и медикаментозного лечения приводят к развитию вирусных квазидисперсных популяций с высоким разнообразием нуклеотидных последовательностей, потенциально способных накапливать варианты вируса с мутациями лекарственной устойчивости к ПППД даже в отсутствии терапии. В процессе негативного отбора исключаются неблагоприятные изменения, однако благоприятные, например способствующие репликации, приводят к конкурированию таких вариантов вируса в динамичном процессе непрерывного положительного отбора. И даже несмотря на то, что нуклеотидная последовательность преобладающего в квазидисперсной популяции ВГС в организме одного хозяина может быть близка к максимальной репликационной способности вируса, существование большой и разнообразной вирусной популяции допускает быстрые адаптивные модификации в ответ на внешние изменения. Это, в свою очередь, может приводить к появлению фармакорезистентных мутаций вируса до лечения и практически мгновенному приспособлению, то есть отсутствию вирусологического ответа, при начале терапии [24]. В проведенном исследовании в США мутации устойчивости к ПППД обнаруживали у пациентов, не получавших терапии, независимо от генотипа вируса, в основном они были с низким уровнем резистентности, за исключением единичных случаев, причем встречаемость образцов с такими мутациями одновременно в генах NS5b и NS5a была ниже при генотипе 1a по сравнению с ВГС 1b [24]. Исследование распространенности устойчивых к лекарственным средствам мутаций среди терапевтически-наивных больных ХВГС в Японии также продемонстрировали встречаемость фармакорезистентных штаммов ВГС 1b и сравнительную редкость появления значимых замен более чем в одном регионе вируса [25].

В связи с вышесказанным особый интерес вызвал образец генотипа 1b с мутациями C451S и S556G в NS5b-регионе. Мы секвенировали и проанализировали полный геном ВГС данного образца. Графическое изображение его нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, выполненное с использованием on-line программы Sequence locator в базе данных ВГС https://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html, представлено на рис. 2.

Нуклеотидные последовательности генов, на которые направлено действие ПППД, продемонстрировали высокую гетерогенность в позициях, потенциально связанных с лекарственной устойчивостью вируса. Замены, выявленные в генах NS3, NS5a, NS5b, представлены в таблице.

Мутация V170I в NS3-регионе ассоциирована с устойчивостью к газопревиру, боцепревиру, симепревиру, телапревиру, воксилапревиру. Естественные полиморфные варианты NS3, связанные со снижением лекарственной чувствительности, ранее наблюдались у терапевтически-наивных пациентов, причем, несмотря на то, что устойчивые вирусные штаммы у таких больных присутствуют в очень ограниченном количестве, специфические мутации протеазы NS3 могут играть важную роль в модулировании развития резистентности и изменении вирусной адаптивности [26].

Мутация P58L в NS5a-регионе ассоциирована с

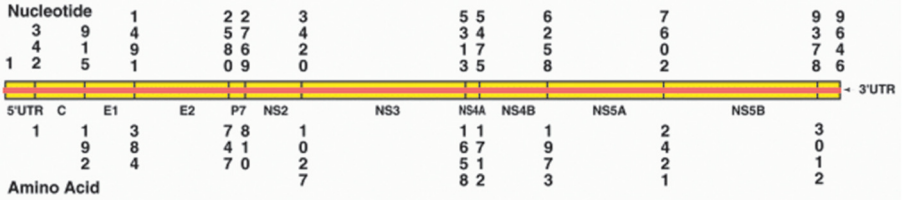

Рис. 2. Графическое изображение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей полного генома ВГС образца 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18). Обозначены структурные элементы генома, представлены нуклеотидные и соответствующие аминокислотные позиции

Fig. 2 Graphical image of nucleotide and amino acid sequences of complete HCV genome of 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18) sample. Structural elements of the genome are indicated, nucleotide and corresponding amino acid positions are presented

Мутации, выявленные в регионах NS3, NS5a, NS5b ВГС образца 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18).

Mutations identified in NS3, NS5a, NS5b regions of HCV of 150HCV-coinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18) sample

Ген Gene	Мутация Mutation
NS3	A66G, T72I, P86Q, K87A, L94M, F147S, V170I
NS5a	K6R, S17T, L34I, P58L, I63M, T64A, H85Y, T87S, R108K, E117D, V164A, E171D, V174S, Q181H, L183P
NS5b	M57L, R65Q, M71I, Q90K, V116T, Q127L, A218S, I262V, V338A, P356A, L362R, H374Y, T377S, G378N, L419F, C451S, E455D, Q464H, A513S, K523S, S549G, S556G

устойчивостью к даклатасвиру, а также, предположительно, может быть связана с резистентностью к ледипасвиру [27].

Как уже сказано выше, изменения генов C451S и S556G в NS5b-регионе становятся причиной устойчивости ВГС к дасабувиру, делеобувиру и JTK-109, при этом непосредственно мутацией устойчивости является хорошо охарактеризованная ранее замена S556G, в то время как C451S лишь снижает чувствительность. Отметим также замену L419F, не описанную как фармакорезистентная, однако мутация L419M/S в этой позиции демонстрирует устойчивость к тегобувиру и HCV796. Отметим, что, хотя для мутации NS5b S556G показана частая сочетаемость с мутациями NS5b L159F или M414I/T, в нашем образце такого сочетания не выявлено [22].

Помимо замен в традиционно анализируемых для выявления мутаций лекарственной устойчивости генах, мы обнаружили изменения L91M в гене Core, которые при ВГС генотипа 1b не только могут влиять на ответ на интерферон, но и связаны с развитием гепатоцеллюлярной карциномы, причем в России эта мутация широко распространена [28].

Нуклеотидная последовательность полного генома изолята ВГС 150HCVcoinf (HCV_NWFD_1cg_coinf18) депонирована в международную базу данных GenBank под номером MT512570.

Остается неясным вопрос, являются ли выявленные нами мутации лекарственной устойчивости ВГС у лиц с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией результатом естественного полиморфизма вируса или следствием передачи от принимавших ПППД пациентов, особенно с учетом того, что ко-инфекция ВИЧ + ВГС широко распространена среди ПИН в Санкт-Петербурге [29]. Случаи обнаружения у пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией РНК ВГС в отсутствии антител анти-HCV, а также первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС заслуживают дальнейшего изучения с целью определения путей инфицирования, оценки распространенности мутаций в настоящее время и в динамике в группах риска при моно- и ко-инфекции при серопозитивном и серонегативном ВГС в Российской Федерации. Создание базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей штаммов вируса гепатита С, их характеристик вкупе с анамнестическими сведениями о пациентах, данными о наличии/отсутствии антител, а также ответом на применяемую терапию, как, например, было предложено для бактериальных и вирусных инфекций I–II групп патогенности, могло бы способствовать решению этих задач, что в дальнейшем может играть роль при разработке и подборе новых методов лечения [30].

В обследованной нами группе людей РНК вируса гепатита С показана у 18,36 % пациентов с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией, причем каждый четвертый из них имеет мутации лекарственной устойчивости ВГС в гене NS5b. При анализе полногеномной последовательности ВГС с мутациями в этом регионе мы выявили значимые фармакорезистентные замены в других регионах генома вируса. Принимая во внимание распространенность ВГС у ВИЧ-инфицированных пациентов, а также распространение первичных мутаций лекарственной устойчивости ВГС, своевременное обнаружение коинфекции у пациентов с ВИЧ и определение мутаций позволят выбрать оптимальную терапию. При этом в алгоритм обследования не получавших терапии ВГС-инфицированных лиц необходимо включать анализ полного генома вируса или, по крайней мере, анализ трех генов, на которые нацелены препараты прямого противовирусного действия (NS3, NS5a, NS5b).

Молекулярно-генетическая характеристика последовательностей ВГС будет способствовать последующей идентификации путей передачи патогена с целью контроля и/или предотвращения распространения инфекции. Полученные данные рационально использовать для оценки динамики распространенности первичной фармакорезистентности ВГС среди ВИЧ-инфицированных лиц.

Авторы подтверждают, что от всех участников исследования получено информированное согласие.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Petruzziello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol*. 2016; 22(34):7824–40. DOI: 10.3748/wjg.v22.i34.7824.

2. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999–2009 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(3):255–62. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262.

3. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., Subramanian M.G., McHutchison J.G., Mo H., Svarovskaia E., Shafran S.D. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C Virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis*. 2018; 218(11):1722–9. DOI: 10.1093/infdis/jiy401.

4. 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(1):S45–57. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.

5. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015; 61(1):77–87. DOI: 10.1002/hep.27259.

6. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клушкина В.В., Исаева О.В., Игнатьева М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации. *Журнал инфектологии*. 2017; 9(2):56–64. DOI: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64.

7. Asselah T., Boyer N., Saadoun D., Martinot-Peignoux M., Marcellin P. Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int*. 2016; 36(1):47–57. DOI: 10.1111/liv.13027.

8. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016–2021: towards ending viral hepatitis. 2016. [Электронный ресурс]. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf (дата обращения 11.05.20).

9. Salazar-Vizcaya L., Kouyos R.D., Metzner K.J., Caraballo Cortes K., Böni J., Shah C., Fehr J., Braun D.L., Bernasconi E., Mbunkah H.A., Hoffmann M., Labhardt N., Cavassini M., Rougemont M., Günthard H.F., Keiser O., Rauch A. Swiss HIV cohort study. Changing trends in international versus domestic HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men: a perspective for the direct-acting antiviral scale-up era. *J. Infect. Dis.* 2019; 220(1):91–9. DOI: 10.1093/infdis/jiz069.

10. Kouyos R.D., Rauch A., Böni J., Yerly S., Shah C., Aubert V., Klimkait T., Kovari H., Calmy A., Cavassini M., Battegay M., Vernazza P.L., Bernasconi E., Ledergerber B., Günthard H.F. Swiss HIV cohort study (SHCS). Clustering of HCV coinfections on HIV phylogeny indicates domestic and sexual transmission of HCV. *Int. J. Epidemiol.* 2014; 43(3):887–96. DOI: 10.1093/ije/dyt276.

11. Martin N.K., Boerekamps A., Hill A.M., Rijnders B.J.A. Is hepatitis C virus elimination possible among people living with HIV and what will it take to achieve it? *J. Int. AIDS Soc*. 2018; 2:e25062. DOI: 10.1002/jia2.25062.

12. Thornton A.C., Jose S., Bhegani S., Chadwick D., Dunn D., Gilson R., Main J., Nelson M., Rodger A., Taylor C., Youssef E., Leen C., Gompels M., Kegg S., Schwenk A., Sabin C. UK Collaborative HIV cohort (UK CHIC) steering committee. Hepatitis B, Hepatitis C, and mortality among HIV-positive individuals. *AIDS*. 2017; 31(18):2525–32. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001646.

13. Thompson A.J., McHutchison J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J. Viral. Hepat*. 2009; 16:377–87. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01124.x.

14. Welzel T.M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., Jacobson I., Zeuzem S., Agarwal K. Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *J. Hepatol*. 2017; 67(2):224–36. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.014.

15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7):1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.5.

16. Chamie G., Bonacini M., Bangsberg D.R., Stapleton J.T., Hall C., Overton E.T., Scherzer R., Tien P.C. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin. Infect. Dis*. 2007; 44:577–83. DOI: 10.1086/511038.

17. Gul A., Ali I., Gul N., Ahmed J. Amino acid mutations in NS5B protein among treatment-naive genotype 3a infectedpatients. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2019; 29(12):1149–52.

18. Asahina Y., Izumi N., Enomoto N., Uchihara M., Kurosaki M., Onuki Y., Nishimura Y., Ueda K., Tsuchiya K., Nakanishi H., Kitamura T., Miyake S. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2005; 43(4):623–29. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.05.032.

19. Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens. *Top. Antivir. Med*. 2017; 25(3):103–9.

20. Nelson D.R., Cooper J.N., Lalezari J.P., Lawitz E., Pockros P.J., Gitlin N. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology.* 2015; 61(4):1127–35. DOI: 10.1002/hep.27726.

21. Bagaglio S., Uberti-Foppa C., Messina E., Merli M., Hasson H., Andolina A., Galli A., Lazzarin A., Morsica G. Distribution of natural resistance to NS3 protease inhibitors in hepatitis C genotype 1a separated into clades 1 and 2 and in genotype 1b of HIV-infected patients. *Clin. Microbiol. Infect*. 2016; 22(4):386.e1-3. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.007.

22. Wu R., Geng D., Chi X., Wang X., Gao X., Xu H., Shi Y., Guan Y., Wang Y., Jin J., Ding Y., Niu J. Computational analysis of naturally occurring resistance-associated substitutions in genes NS3, NS5A, and NS5B among 86 subtypes of hepatitis C virus worldwide. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12:2987–3015. DOI: 10.2147/IDR.S218584.

23. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol*. 2004; 85(11):3173–88. DOI: 10.1099/vir.0.80401-0.

24. Paolucci S., Fiorina L., Mariani B., Gulminetti R., Novati S., Barbarini G., Bruno R., Baldanti F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol. J.* 2013; 10:355. DOI: 10.1186/1743-422X-10-355.

25. Suzuki F., Sezaki H., Akuta N., Suzuki Y., Seko Y., Kawamura Y., Hosaka T., Kobayashi M., Saito S., Arase Y., Ikeda K., Kobayashi M., Mineta R., Watahiki S., Miyakawa Y., Kumada H. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J. Clin. Virol.* 2012; 54(4):352–4. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.04.024.

26. Welsch C., Schweizer S., Shimakami T., Domingues F.S., Kim S., Lemon S.M., Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012; 56:1907–15. DOI: 10.1128/AAC.05184-11.

27. Fridell R.A., Wang C., Sun J.H., O'Boyle D.R., Nower P., Valera L., Qiu D., Roberts S., Huang X., Kienzle B., Bifano M., Nettles R.E., Gao M. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology.* 2011; 54(6):1924–35. DOI: 10.1002/hep.24594.

28. Kichatova V.S., Kyuregyan K.K., Soboleva N.V., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Isaguliants M.G., Mikhailov M.I. Frequency of interferon-resistance conferring substitutions in amino acid positions 70 and 91 of core protein of the Russian HCV 1b isolates analyzed in the T-cell epitopic context. *J. Immunol. Res*. 2018; 7:7685371. DOI: 10.1155/2018/7685371.

29. Tsui J.I., Ko S.C., Krupitsky E., Lioznov D., Chaisson C.E., Gnatienko N., Samet J.H. Insights on the Russian HCV Care Cascade: Minimal HCV Treatment for HIV/HCV co-infected PWID in St. Petersburg. Version 2. *Hepatol. Med. Policy*. 2016; 1:13. DOI: 10.1186/s41124-016-0020-x.

30. Яшечкин Ю.И., Найденова Е.В., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А. Создание базы данных по характеристикам нуклеотидных последовательностей геномов штаммов возбудителей бактериальных и вирусных инфекций I–II групп патогенности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1:70–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-70-73

References

1. Petruzziello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol*. 2016; 22(34):7824–40. DOI: 10.3748/wjg.v22.i34.7824.

2. Mukomolov S.L., Levakova I.A. [Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999–2009]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2011; 1(3):255–62. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262.

3. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., Subramanian M.G., McHutchison J.G., Mo H., Svarovskaia E., Shafran S.D. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C Virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis*. 2018; 218(11):1722–9. DOI: 10.1093/infdis/jiy401.

4. 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(1):S45–57. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.

5. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015; 61(1):77–87. DOI: 10.1002/hep.27259.

6. Soboleva N.V., Carlsen A.A., Kozhanova T.V., Kichatova V.S., Klushkina V.V., Isaeva O.V., Ignatieva M.E., Romanenko V.V., Oorzhak N.D., Malinnikova E.Yu., Kuregyan K.K., Mikhailov M.I. [The prevalence of hepatitis C virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation]. *Zhurnal Infektologii [Infectology Journal]*. 2017; 9(2):56–64. DOI: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64

7. Asselah T., Boyer N., Saadoun D., Martinot-Peignoux M., Marcellin P. Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int*. 2016; 36(1):47–57. DOI: 10.1111/liv.13027.

8. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016–2021: towards ending viral hepatitis. 2016. (Cited 11 May 2020). [Internet]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf.

9. Salazar-Vizcaya L., Kouyos R.D., Metzner K.J., Caraballo Cortes K., Böni J., Shah C., Fehr J., Braun D.L., Bernasconi E., Mbunkah H.A., Hoffmann M., Labhardt N., Cavassini M., Rougemont M., Günthard H.F., Keiser O., Rauch A. Swiss HIV cohort study. Changing trends in international versus domestic HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men: a perspective for the direct-acting antiviral scale-up era. *J. Infect. Dis.* 2019; 220(1):91–9. DOI: 10.1093/infdis/jiz069.

10. Kouyos R.D., Rauch A., Böni J., Yerly S., Shah C., Aubert V., Klimkait T., Kovari H., Calmy A., Cavassini M., Battegay M., Vernazza P.L., Bernasconi E., Ledergerber B., Günthard H.F. Swiss HIV cohort study (SHCS). Clustering of HCV coinfections on HIV phylogeny indicates domestic and sexual transmission of HCV. *Int. J. Epidemiol*. 2014; 43(3):887–96. DOI: 10.1093/ije/dyt276.

11. Martin N.K., Boerekamps A., Hill A.M., Rijnders B.J.A. Is hepatitis C virus elimination possible among people living with HIV and what will it take to achieve it? *J. Int. AIDS Soc*. 2018; 2:e25062. DOI: 10.1002/jia2.25062.

12. Thornton A.C., Jose S., Bhegani S., Chadwick D., Dunn D., Gilson R., Main J., Nelson M., Rodger A., Taylor C., Youssef E., Leen C., Gompels M., Kegg S., Schwenk A., Sabin C. UK Collaborative HIV cohort (UK CHIC) steering committee. Hepatitis B, Hepatitis C, and mortality among HIV-positive individuals. *AIDS*. 2017; 31(18):2525–32. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001646.

13. Thompson A.J., McHutchison J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J. Viral. Hepat*. 2009; 16:377–87. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01124.x.

14. Welzel T.M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., Jacobson I., Zeuzem S., Agarwal K. Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *J. Hepatol*. 2017; 67(2):224–36. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.014.

15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7):1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.5.

16. Chamie G., Bonacini M., Bangsberg D.R., Stapleton J.T., Hall C., Overton E.T., Scherzer R., Tien P.C. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin. Infect. Dis*. 2007; 44:577–83. DOI: 10.1086/511038.

17. Gul A., Ali I., Gul N., Ahmed J. Amino acid mutations in NS5B protein among treatment-naive genotype 3a infectedpatients. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2019; 29(12):1149–52.

18. Asahina Y., Izumi N., Enomoto N., Uchihara M., Kurosaki M., Onuki Y., Nishimura Y., Ueda K., Tsuchiya K., Nakanishi H., Kitamura T., Miyake S. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2005; 43(4):623–29. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.05.032.

19. Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens. *Top. Antivir. Med*. 2017; 25(3):103–9.

20. Nelson D.R., Cooper J.N., Lalezari J.P., Lawitz E., Pockros P.J., Gitlin N. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology.* 2015; 61(4):1127–35. DOI: 10.1002/hep.27726.

21. Bagaglio S., Uberti-Foppa C., Messina E., Merli M., Hasson H., Andolina A., Galli A., Lazzarin A., Morsica G. Distribution of natural resistance to NS3 protease inhibitors in hepatitis C genotype 1a separated into clades 1 and 2 and in genotype 1b of HIV-infected patients. *Clin. Microbiol. Infect*. 2016; 22(4):386.e1-3. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.007.

22. Wu R., Geng D., Chi X., Wang X., Gao X., Xu H., Shi Y., Guan Y., Wang Y., Jin J., Ding Y., Niu J. Computational analysis of naturally occurring resistance-associated substitutions in genes NS3, NS5A, and NS5B among 86 subtypes of hepatitis C virus worldwide. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12:2987–3015. DOI: 10.2147/IDR.S218584.

23. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol*. 2004; 85(11):3173–88. DOI: 10.1099/vir.0.80401-0.

24. Paolucci S., Fiorina L., Mariani B., Gulminetti R., Novati S., Barbarini G., Bruno R., Baldanti F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol. J.* 2013; 10:355. DOI: 10.1186/1743-422X-10-355.

25. Suzuki F., Sezaki H., Akuta N., Suzuki Y., Seko Y., Kawamura Y., Hosaka T., Kobayashi M., Saito S., Arase Y., Ikeda K., Kobayashi M., Mineta R., Watahiki S., Miyakawa Y., Kumada H. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J. Clin. Virol.* 2012; 54(4):352–4. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.04.024.

26. Welsch C., Schweizer S., Shimakami T., Domingues F.S., Kim S., Lemon S.M., Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012; 56:1907–15. DOI: 10.1128/AAC.05184-11.

27. Fridell R.A., Wang C., Sun J.H., O'Boyle D.R., Nower P., Valera L., Qiu D., Roberts S., Huang X., Kienzle B., Bifano M., Nettles R.E., Gao M. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology.* 2011; 54(6):1924–35. DOI: 10.1002/hep.24594.

28. Kichatova V.S., Kyuregyan K.K., Soboleva N.V., Karlsen A.A., Isaeva O.V., Isaguliants M.G., Mikhailov M.I. Frequency of interferon-resistance conferring substitutions in amino acid positions 70 and 91 of core protein of the Russian HCV 1b isolates analyzed in the T-cell epitopic context. *J. Immunol. Res*. 2018; 7:7685371. DOI: 10.1155/2018/7685371.

29. Tsui J.I., Ko S.C., Krupitsky E., Lioznov D., Chaisson C.E., Gnatienko N., Samet J.H. Insights on the Russian HCV Care Cascade: Minimal HCV Treatment for HIV/HCV co-infected PWID in St. Petersburg. Version 2. *Hepatol. Med. Policy*. 2016; 1:13. DOI: 10.1186/s41124-016-0020-x.

30. Yashechkin Yu.I., Naydenova E.V., Bugorkova T.V., Shcherbakova S.A. Setting-up of the database on the nucleotide sequences of the genomes of the strains of bacterial and viral infections agents of the I–II pathogenicity groups. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (1):70–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-70-73.

Authors:

Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemelev A.N. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Boumbaly S. Research Institute of Applied Biology; Kindia, Republic of Guinea. Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée/International Research Center on Tropical Infections in the Republic of Guinea; Nzerekare, Republic of Guinea. E-mail: drboumbaly@yahoo.fr.

Balde T.A.L. Research Institute of Applied Biology. Kindia, Republic of Guinea. E-mail: thiernoamadoulabe.balde@gmail.com.

Semenov A.V. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 14, Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation; e-mail: pasteur@pasteurorg.ru. Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I.P. Pavlov; Saint Petersburg, Russian Federation. North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov; Saint Petersburg, Russian Federation.

Об авторах:

Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Boumbaly S. Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи; Гвинейская Республика, Киндия. Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинее; Гвинейская Республика, Нзерекаре. E-mail: drboumbaly@yahoo.fr.

Balde T.A.L. Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи. Гвинейская Республика, Киндия. E-mail: thiernoamadoulabe.balde@gmail.com.

Семенов А.В. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера; Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14; e-mail: pasteur@pasteurorg.ru. Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; Российская Федерация, Санкт-Петербург. Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова. Российская Федерация, Санкт-Петербург.