

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ В ГЕНЕ ПОЛИМЕРАЗЫ, СРЕДИ ВГВ-ИНФИЦИРОВАННЫХ И ВГВ/ВИЧ-КОИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

УДК 616.36–002–074:577.2

Поступила 30.10.2012 г.



Т.В. Кожанова, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории этиологии, диагностики, эпидемиологии и профилактики гепатитов¹;

Л.Ю. Ильченко, д.м.н., профессор, руководитель отделения вирусных гепатитов¹;

О.В. Исаева, к.б.н., руководитель отдела секвенирования¹;

М.Н. Алексеева, д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней, фтизиатрии и дерматовенерологии²;

А.А. Сарыглар, главный врач³;

Н.И. Миронова, к.м.н., руководитель Гепатологического центра⁴;

Н.И. Громова, к.м.н., зав. кабинетом инфекционных заболеваний⁵;

М.Н. Цыкина, главный врач⁶;

Ю.П. Зубков, к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения вирусных гепатитов¹;

К.К. Кюрегян, к.б.н., руководитель лаборатории этиологии, диагностики, эпидемиологии и профилактики гепатитов¹;

М.И. Михайлов, д.м.н., профессор, директор¹

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН, Москва, 142782, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, 27 км Киевского шоссе;

²Медицинский институт Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, Якутск, Республика Саха (Якутия), 677016, ул. Ойунского, 27;

³Инфекционная больница, Кызыл, Республика Тыва, 667000, ул. Чехова, 65;

⁴Городская клиническая больница №2 им. В.И. Разумовского, Саратов, 410028, ул. Чернышевского, 141;

⁵Поликлиника №1 Управления делами Президента РФ, Москва, 119002, пер. Сивцев Вражек, 26/28;

⁶Тамбовский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Тамбов, 392000, ул. Б. Васильева, 1а

Цель исследования — изучить распространенность вариантов вируса гепатита В (ВГВ) с наличием мутаций в гене полимеразы среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов, ранее не получавших терапии аналогами нуклеоз(т)идов.

Материалы и методы. Исследованы образцы сывороток крови, полученные от 459 пациентов с ВГВ-моноинфекцией и от 590 ВИЧ-инфицированных пациентов (группа высокого риска инфицирования ВГВ), не получавших терапии аналогами нуклеоз(т)идов. Определение ДНК ВГВ выполняли методом ПЦР с праймерами к консервативному участку перекрывающихся генов S и P, кодирующих поверхностный белок и ДНК-полимеразу ВГВ соответственно. Секвенирование гена полимеразы ВГВ проводили для 241 изолята, выделенных от пациентов с ВГВ-инфекцией и для 30 — от пациентов с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией. Филогенетический анализ последовательностей ВГВ осуществляли с помощью программы Мега 4.0.

Результаты. У 7 из 241 обследованных пациентов (2,9%) с ВГВ-моноинфекцией в геноме вируса выявлены значимые аминокислотные замены: у 2 (0,8%) — мутация A181S, связанная с устойчивостью к адефовиру, у 4 (1,7%) — T184I, связанная с невосприимчивостью ВГВ к энтекавиру и у 1 (0,4%) — L199W, ассоциированная с развитием резистентности к телбивудину. Среди обследованных 30 пациентов с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией в 1 случае (3,3%) выявлена значимая аминокислотная замена в гене полимеразы ВГВ (в YMDD-мотиве — M204I), связанная с развитием невосприимчивости к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру. Общая частота выявления первичной лекарственной устойчивости ВГВ составила 6,2% среди ВГВ-инфицированных и 10% — среди ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов.

Заключение. Полученные данные о распространенности первичной лекарственной устойчивости ВГВ указывают на необходимость скрининга пациентов с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией до начала противовирусного лечения на мутации, ассоциированные с резистентностью к основным нуклеотидным/нуклеозидным аналогам, применяемым в терапии гепатита В.

Ключевые слова: вирусный гепатит В; аналоги нуклеоз(т)идов; лекарственная резистентность.

Для контактов: Кожанова Татьяна Викторовна, тел. моб. +7 926-658-06-51; e-mail: vkozhanov@bk.ru

English

Circulation of Hepatitis B Virus Variants Carrying Mutations in Polymerase Gene among HBV-Infected and HBV/HIV-Coinfected Patients

T.V. Kozhanova, PhD, Senior Research Worker, the Laboratory of Hepatitis Etiology, Diagnostics, Epidemiology and Prevention¹;

L.Y. Ichenko, D.Med.Sc., Professor, Head of the Viral Hepatitis Unit¹;

O.V. Isaeva, PhD, Head of the Sequencing Unit¹;

M.N. Alekseeva, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Phthisiology and Dermatovenerology²;

A.A. Saryglar, Chief Doctor³;

N.I. Mironova, PhD, Head of Hepatology Centre⁴;

N.I. Gromova, PhD, Head of the Infectious Diseases Room⁵;

M.N. Tsykina, Chief Doctor⁶;

Y.P. Zubkov, PhD, Leading Research Worker, the Viral Hepatitis Unit¹;

K.K. Kyuregyan, PhD, Head of the Laboratory of Hepatitis Etiology, Diagnostics, Epidemiology and Prevention¹;

M.I. Mikhailov, D.Med.Sc., Professor, Director¹

¹Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis named after M.P. Chumakov, Russian Academy of Medical Sciences, 27 km of Kievskoye shosse, village of the Institute of Poliomyelitis, settlement Moskovsky, Moscow, Russian Federation, 142782;

²Medical Institute of Northeast Federal University named after M.K. Ammosov, Oiunsky St., 27, Yakutsk, the Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation, 677016;

³Infectious Hospital, Chekhov St., 65, Kyzyl, Republic of Tyva, Russian Federation, 667000;

⁴City Clinical Hospital No.2 named after V.I. Razumovsky, Chernyshevsky St., 141, Saratov, Russian Federation, 410028;

⁵Polyclinic No.1 of the Administrative Department of the President of the Russian Federation, per. Sivtsev Vrazhek, 26/28, Moscow, Russian Federation, 119002;

⁶Tambov Regional Centre for AIDS and Infectious Diseases Prevention and Control, B. Vasiliev St., 1a, Tambov, Russian Federation, 392000

The aim of the investigation was to study the prevalence of hepatitis B virus (HBV) variants with polymerase gene mutations among HBV-infected and HBV/HIV-coinfected patients previously received no nucleotide/nucleoside analogues therapy.

Materials and Methods. We studied the blood serum samples of 459 patients with HBV-monoinfection and 590 HIV-infected patients (a group with a high risk of HBV infection) who did not receive nucleotide/nucleoside analogues therapy. HBV DNA was determined by PCR method with primers to conservative part of overlapping S and P genes coding the surface protein and DNA-polymerase of HBV, respectively. HBV polymerase gene was sequenced for 241 isolates from HBV-infected patients, and 30 — from patients with HBV/HIV-coinfection. Phylogenetic analysis of HBV sequences was performed using Mega 4.0. program.

Results. The viral genome in 7 of 241 patients (2.9%) with HBV-monoinfection was found to have significant amino-acid replacements: in 2 patients (0.8%) — A181S mutation associated with adefovir-resistance, in 4 (1.7%) — T184I related to HBV entecavir-resistance, and in 1 (0.4%) — L199W associated with telbivudine-resistance development. Among 30 examined patients with HBV/HIV-coinfection, 1 patient (3.3%) was found to have significant amino-acid replacement in HBV polymerase gene (in YMDD-motif — M204I) associated with the development of resistance to lamivudine, entecavir, telbivudine and tenofovir. Overall detection rate of primary drug resistance of HBV was 6.2% among HBV-infected and 10% — among HBV/HIV-coinfected patients.

Conclusion. The obtained data on the prevalence of HBV primary drug resistance indicate the need for screening of patients with HBV/HIV-coinfection before starting the antiviral therapy. The patients are to be screened on mutations associated with resistance to the main nucleotide/nucleoside analogues used in hepatitis B therapy.

Key words: viral hepatitis B; nucleotide/nucleoside analogues; drug resistance.

Актуальность и сложность проблемы лечения вирусного гепатита В (ВГВ) обусловлена его повсеместным распространением среди различных групп населения, многообразием клинических форм и исходов (включая циррозы печени и гепатоцеллюлярную карциному), стабильно высокими показателями заболеваемости [1].

Персистенция вирусного генома в инфицированных гепатоцитах и высокий показатель спонтанных мутаций являются основой для селекции мутантных вариантов вируса гепатита В, приводящих к формированию

лекарственной устойчивости к ингибиторам обратной транскриптазы. Установлено, что мутации в геноме ВГВ, связанные с лекарственной резистентностью, могут спонтанно возникать до начала проведения противовирусной терапии ингибиторами обратной транскриптазы [2]. Такое явление называется первичной лекарственной устойчивостью ВГВ [3].

Раннее определение вариантов ВГВ с мутациями в гене полимеразы (Р-ген), ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости, имеет важное клиничес-

кое значение прежде всего для предупреждения обострения заболевания. Для пациентов с высоким риском прогрессирования ВГВ, особенно с коинфекцией ВГВ/ВИЧ, наиболее значимо раннее выявление таких вариантов ВГВ как до начала терапии нуклеоз(т)идными аналогами, так и в процессе лечения, когда вирусная нагрузка может быть очень низкой и/или мутантные варианты ВГВ присутствуют в общей вирусной популяции в меньшей доле [4].

Сведения о вариантах вируса гепатита В, несущих мутации в гене полимеразы среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов, мало численны, что обуславливает актуальность изучения циркуляции лекарственно-устойчивых вариантов ВГВ у пациентов, ранее не получавших терапии против ВГВ.

Цель исследования — изучить распространенность вариантов ВГВ с наличием мутаций в гене полимеразы среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов, ранее не получавших терапии аналогами нуклеоз(т)идов.

Материалы и методы. Исследованы образцы сывороток крови, полученные от 459 пациентов с ВГВ-моноинфекцией и от 590 ВИЧ-инфицированных пациентов (группа высокого риска инфицирования ВГВ), не получавших терапии аналогами нуклеоз(т)идов, из регионов РФ, различающихся уровнями заболеваемости ВГВ, т.е. с разной степенью интенсивности циркуляции ВГВ среди населения (табл. 1).

От всех пациентов получено информированное согласие на проведение исследования.

Серологические маркеры инфицирования ВГВ (HBsAg и анти-HBc) определяли с использованием следующих иммуноферментных тест-систем в соответствии с инструкцией производителя: «ДС-ИФА-HBsAg-0,01», «ДС-ИФА-HBsAg-0,01-подтверждающая» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия) — для подтверждения в реакции нейтрализации позитивных результатов выявления HBsAg, «ДС-анти-HBc» (НПО «Диагностические системы», Россия).

Во всех образцах сыворотки крови, положительных по анти-HBc и HBsAg, определяли ДНК ВГВ в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение нуклеиновых кислот из образцов сыворотки крови проводили методом экстракции с помощью фенол-хлороформа с применением набора для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови (ООО НПФ «ЛИТЕХ»).

Определение ДНК ВГВ проводили в ПЦР с праймерами к консервативному участку перекрывающихся генов S и P, кодирующих поверхностный белок и ДНК-полимеразу ВГВ соответственно. Чувствительность выявления ДНК ВГВ в данной реакции составляла не менее 100 копий/мл по результатам тестирования серии предельных разведений образцов с известной концентрацией ДНК ВГВ. Условия для обоих раундов ПЦР были следующими: 94°C — 2 мин, затем 35 циклов: денатурация при 94°C — 45 с, отжиг при 55°C — 45 с и удлинение цепи при 72°C — 1 мин 30 с. Полученный в ходе ПЦР продукт величиной 713 пар нуклеотидов определяли методом электрофореза в агарозном геле (1,5%) в трис-боратном буфере (ТВЕ).

Для образцов, положительных по ДНК ВГВ в ПЦР, определяли последовательность домена обратной транскриптазы ДНК-полимеразы ВГВ с целью выявления возможных мутаций в этом участке. Продукт амплификации с праймерами к консервативному участку перекрывающихся генов S и P величиной 713 пар нуклеотидов вырезали из геля и выделяли из агарозы с помощью набора QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Германия). Секвенирование проводили с использованием набора GenomeLab Methods Development kit (Beckman Coulter, Англия) в анализаторе CEQ 8800 (Beckman Coulter, Англия). Полученные последовательности сравнивали с референсными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank (США), которые соответствовали «дикому типу» ВГВ и мутантным формам с подтвержденной лекарственной устойчивостью к пяти нуклеоз(т)идным аналогам, применяемым в настоящее время для терапии ВГВ-инфекции: ламивудину, адефовиру, энтекавиру, тенофовиру, телбивудину. Филогенетический анализ последовательностей ВГВ проводили с помощью программы Mega 4.0.

Результаты и обсуждение. При обследовании 459 больных с ВГВ-инфекцией ДНК ВГВ выявлена у 241 пациента с наличием анти-HBc и HBsAg. У 7 из 241 обследованных пациентов (2,9%) с ВГВ-моноинфекцией в геноме вируса обнаружены значимые аминокислотные замены (мутации, описанные в литературе как обуславливающие развитие лекарственной устойчивости к терапии нуклеоз(т)идными аналогами) и у 8 (3,3%) — потенциально значимые (замены в тех же значимых позициях гена полимеразы, но не описанные еще в литературе). Ни в одном случае в данной группе пациентов нами не выявлены значимые аминокислотные замены в YMDD-мотиве ВГВ, являющиеся наиболее распространенными мутациями и связанные с развитием устойчивости к широкому спектру ингибиторов обратной транскриптазы (ламивудин, энтекавир, телбивудин и тенофовир). Однако при анализе нуклеотидных последовательностей гена полимеразы ВГВ среди ВГВ-моноинфицированных пациентов отмечены мутации, связанные с развитием первичной лекарственной резистентности к другим аналогам нуклеоз(т)идов. Спектр аминокислотных замен и частота их выявления приведены в табл. 2.

Помимо описанных аминокислотных замен у пациентов с ВГВ-моноинфекцией обнаружены и потенциально

Таблица 1

Обследованные пациенты с ВГВ

Регионы РФ	Количество пациентов (n=459)	Интенсивность циркуляции ВГВ (эндемичность)
Республика Саха (Якутия)	58	Высокая
Республика Тыва	137	Высокая
Саратовская область	49	Средняя
Московская область	100	Низкая
Тамбовская область	115	Низкая

Таблица 2

Значимые аминокислотные замены в гене полимеразы ВГВ (n=241)

Результаты выявления мутаций в гене полимеразы ВГВ		Лекарственные препараты
Аминокислотные замены	n/%	
A181S	2/0,8	Адефовир
T184I	4/1,7	Энтекавир
L199W	1/0,4	Телбивудин

значимые мутации. У ВГВ-моноинфицированных пациентов в одном случае (0,4%) в геноме ВГВ определили замену треонина на пролин в положении 184 (T184P). При этом в литературе в данном положении Р-гена ВГВ описаны замены треонина на изолейцин, лейцин, аденин и серин, которые обуславливают формирование резистентности к терапии энтекавиром [5, 6].

У 3 пациентов из 241 (1,2%) с ВГВ-моноинфекцией в геноме ВГВ выявлена потенциально значимая замена метионина на лейцин в позиции 204, локализованная в YMDD-мотиве гена полимеразы, который является определяющим в развитии лекарственной устойчивости к терапии нуклеоз(т)идными аналогами. Однако в литературе описаны другие замены в положении 204 (M204I/V/S), связанные с развитием невосприимчивости к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру [7, 8].

В гене полимеразы ВГВ выявлены еще 3 потенциально значимых аминокислотных замены: в 1 случае (0,4%) — замена серина на фенилаланин в положении 213 (S213F), у 2-го пациента (0,4%) — замена лейцина на серин в положении 179 (L179S) и у 3-го пациента (0,4%) — замена лейцина на пролин в положении 82 (L82P).

В литературе [9, 10] в положении 82, 213 и 179 описаны другие аминокислотные замены (S213T, L179P, L82M), ассоциированные с развитием лекарственной устойчивости при терапии ламивудином. Нами были выявлены потенциально значимые мутации, т.е. аминокислотные замены, в тех позициях, в которых, по литературным данным, мутации приводят к развитию лекарственной устойчивости, однако заменяющиеся аминокислотные остатки в отмеченных нами случаях отличались от выявленных другими авторами.

Общая частота выявления первичной лекарственной устойчивости ВГВ к терапии аналогами нуклеоз(т)идов составила 6,2%.

При обследовании 590 пациентов с ВИЧ-инфекцией ДНК ВГВ выявлена у 30 человек. Среди них в одном случае (3,3%) установлена значимая аминокислотная замена в гене полимеразы ВГВ — мутация в YMDD-мотиве гена полимеразы ВГВ — M204I, связанная с развитием невосприимчивости к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру.

В этой группе пациентов с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией в гене полимеразы ВГВ были также выявлены и потенциально значимые мутации (6,7%; 2/30): L179S и V214Y.

В 1 случае из 30 (3,3%) наблюдалась замена лейцина на серин в положении 179 (L179S). M.W. Li с соавт. [11] описали в положении 179 замену лейцина на пролин (L179P), ассоциированную с развитием лекарственной устойчивости при терапии хронического ВГВ ламивудином. У одного пациента с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией в гене полимеразы ВГВ обнаружена замена валина на тирозин в положении 214 (V214Y). В этом положении гена полимеразы ВГВ V. Soriano [12] описана замена валина на аланин (V214A), связанная с развитием лекарственной устойчивости к адефовиру. В нашем исследовании выявленные мутации могут быть новыми и решающими для развития лекарственной устойчивости. Однако данное предположение требует детального изучения фенотипического проявления при инфицировании вариантами ВГВ, несущих эти аминокислотные изменения в геноме.

С учетом всех выявленных в данном исследовании как значимых, так и потенциально значимых мутаций в гене полимеразы ВГВ, связанных с развитием резистентности, частота первичной лекарственной устойчивости в группе пациентов с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией составила 10,0% (3/30).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали циркуляцию вариантов ВГВ, несущих мутации в гене полимеразы, среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов. Значительная доля лиц изначально имеет резистентность к тому или иному противовирусному препарату.

Заключение. С целью снижения частоты развития лекарственной резистентности у ВГВ-инфицированных пациентов и пациентов с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией необходимо проводить мониторинг больных с использованием высокочувствительных и высокоспецифичных методов для выявления мутантных вариантов ВГВ до начала терапии ингибиторами обратной транскриптазы с целью планирования оптимальных схем введения препаратов и контроля в процессе ее применения.

Литература/References

1. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М: ФГОУ «ВУНМЦ Росздрава»; 2003. Shakhgil'dyan I.V., Mikhaylov M.I., Onishchenko G.G. *Parenteral'nye virusnye gepatity (epidemiologiya, diagnostika, profilaktika)* [Parenteral viral hepatitis (epidemiology, diagnosis, prevention)]. Moscow: FGOU «VUNMTs Rozdrava»; 2003.
2. Colonna R., Rose R., Baldick C. Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 1656–1665.
3. Younger M., Bathgate A. Review article: nucleoside analogues for the treatment of chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1211–1230.
4. Hie-Won H., Dixon J. A review of the one-year incidence of resistance to lamivudine in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology Int* 2008; 2: 440–456.
5. Bozdayi A., Eyigun C., Turkyilmaz A. et al. A novel pattern (sW195a) in surface gene of HBV DNA due to YSDD (L180M plus M204S) mutation selected during lamivudine therapy and successful treatment with adefovir dipivoxil. *J Clin Virol* 2004; 31: 76–77.
6. Guenther S., Mark N., Thomas L., et al. Combination of tenofovir and lamivudine versus tenofovir after lamivudine failure for therapy of hepatitis B in HIV-coinfection. *AIDS* 2006; 20: 1951–1954.

7. Bozdayi A.M., Uzunalimog Ö., Türkyilmaz A.R., et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003; 10: 256–265.
8. Carman W.F. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1997; 4: 11–20.
9. Chaudhuri V., Tayal R., Nayak B., et al. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterol* 2004; 127: 1356–1371.
10. Margeridon-Thermet S., Shulman S., Ahmed A., et al. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-Treated patients and NRTI-naive patients. *J Infect Dis* 2009; 199: 1275–1285.
11. Li M.W., How W., Liu K.Z. Character of HBV (hepatitis B virus) polymerase gene rtM204V/I and rtL180M mutation in patients with lamivudine resistance. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 6: 664–667.
12. Soriano V., Sheldon J., Ramos B. Confronting chronic hepatitis B virus infection in HIV: new diagnostic tools and more weapons. *AIDS* 2006; 20: 451–453.