

Вследствие того, что апробация алгоритма проводилась на клинических образцах, полученных от пациентов, входящих в семейные очаги инфицирования, возникшие от 5 до 22 лет назад, филогенетической информации, содержащейся в одном *Core*-фрагменте, оказалось недостаточной для того, чтобы выявить внутрисемейное инфицирование в ряде очагов (F15, F16 и F5), анализ фрагмента *P*-гена в отдельности не позволил надежно дифференцировать связанные случаи инфицирования от несвязанных. Филогенетический анализ соединения двух секвенированных фрагментов генома - *CP*-последовательности - подтвердил наличие внутрисемейного очага ВГВ для 15 из 17 исследуемых семей. Для двух семей F11 и F13 не было обнаружено филогенетического родства штаммов *HBV* в каждом из очагов, что не противоречит гипотезе о независимом заражении, исходя из данных анамнеза заболевших из этих семей.

Заключение: Для анализа эпидемиологической связи случаев ВГВ целесообразно секвенировать две переменные области генома возбудителя, содержащие единственную рамку считывания, кодирующую фрагменты *Core*- и *P*-белков. Филогенетический анализ для установления факта общего происхождения штаммов *HBV* необходимо проводить по соединению двух секвенированных фрагментов генома. Применение разработанной анализа эпидемиологической связи случаев ВГВ позволяет установить наличие филогенетического родства изолятов даже по прошествии значительного промежутка времени от момента предполагаемого инфицирования.

ФОРМИРОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРЕПАРАТАМ ГРУППЫ L-НУКЛЕОЗИДОВ ЗАВИСИТ ОТ ГЕНОТИПА ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Неверов А.Д.¹, Миронов П.В.², Иванов П.С.², Чуланов В.П.¹

¹ ФГУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

² Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Этиологическое лечение хронического гепатита В (ХГВ) основывается на применении следующих противовирусных препаратов (ПВП) - ламивудина (*LAM/ЗТС*), телбивудина (*LdT*), энтекавира (*ENV*), тенофовира (*TDF*) и адефовира (*ADV*), три из которых - *LAM/ЗТС*, *LdT* и *ENV* - относятся к группе L-нуклеозидов. В процессе лечения ХГВ могут возникать устойчивые к ПВП варианты вируса гепатита В (ВГВ). Лекарственная устойчивость обусловлена возник-

новением точечных мутаций в RT-домене гена полимеразы вируса. Различают основные (первичные) мутации устойчивости, снижающие чувствительность вируса к препарату, и, как правило, связанные со снижением репликативной способности вируса, и компенсаторные (вторичные) мутации, которые восстанавливают репликативную активность вируса. **Цель работы:** рассмотреть существование зависимости между генотипами ВГВ и формированием паттернов мутаций устойчивости к препаратам группы L-нуклеозидов, анализируя базы данных нуклеотидных последовательностей.

Материалы и методы. Последовательности ВГВ, которые более чем на 150 н.п. пересекаются с RT-доменом гена полимеразы, были получены из GenBank. Генотип каждой последовательности был определен филогенетическим анализом (phylip) относительно референс-последовательностей, относящихся к генотипам А-Н. Для поиска паттернов мутации на основании литературных данных были отобраны замены в 12 сайтах RT: L80VI, V173LG, L180M, A181VT, T184LS, S202G, M204VI, V207LIM, V214A, Q215SHP, N236T, M250IL. Из анализа были исключены последовательности, содержащие аллель дикого типа во всех перечисленных сайтах. Метод максимальной декомпозиции использовался для поиска паттернов мутаций. В качестве меры ассоциации замен, для каждой пары сайтов использовался критерий хи-квадрат. Для оценки значимости ассоциаций использовался точный критерий Фишера с поправкой Бонферони на множественное тестирование. Частоты паттернов вычислялись на множестве последовательностей, сходство которых было ниже 98,8%, для того, чтобы учесть перепредставленность в исходном множестве последовательностей с высокой степенью гомологии, полученных в результате клонирования ПЦР продукта или долговременного мониторинга одного пациента. Частоты паттернов вычислялись, при условии наличия замены в сайте rt204, являющемся сайтом возникновения первичной мутации к препаратам группы L-нуклеозидов.

Результаты. Мы разработали статистический метод поиска паттернов мутаций устойчивости вируса гепатита В. На основании списка мутаций, которые упоминаются в литературе, как ассоциированные с лекарственной устойчивостью ВГВ, метод позволяет выявить сочетания этих мутаций (паттерны), встречающихся совместно чаще, чем это можно было бы объяснить случайной моделью. Метод не использует информацию о применявшихся препаратах и позволяет анализировать последовательности ВГВ из публичных баз данных (GenBank). Нами было показано, что формирование паттернов мутаций устойчивости к препаратам группы L-нуклеозидов зависит от генотипа вируса гепатита В.

Первичная мутация M204I преобладает среди других возможных замен в сайте rt204, для генотипов В (57%), С (59%, $p < 0.05$) и D (61%, $p < 0.05$). Для генотипа А характерно преобладание замены M204V ($p < 0.05$). Пара мутаций L180M-M204V является наиболее распространенным паттерном для всех генотипов, при условии мутации в сайте rt204 (60% - генотип А, 39% - В, 37% - С, 35% - D и 88% - E). В большинстве случаев, мутация M204V присутствует в паре с L180M, при этом могут наблюдаться дополнительные мутации: L80V в генотипе В или V173L (генотипы С, D и E), а так же одна из мутаций, ассоциированная преимущественно с устойчивостью к энтекавиру: T184L, S202G для генотипа С и T184S для D (см. Табл.). В Таблице частоты паттернов вычислены по отношению к полному числу последовательностей, содержавших замены M204V и M204I, соответственно, в остальных сайтах - аминокислоты дикого типа. «Число последовательностей», указанное в Таблице, содержит число последовательностей в составе множества с максимальной гомологией - 98,8% (см. материалы и методы).

Таблица 1. Частоты паттернов вторичных мутаций устойчивости при наличии первичных мутаций в сайте rt204.

Паттерн мутации	Генотип ВГВ (число последовательностей)					
	A	B	C	D	E	F
	82	147	503	343	34	58
M204V	2/23=9 ± 12%	0/21=0%	3/99=3 ± 12%	1/31=3 ± 6%	1/8=13 ± 24%	0/2=0%
L180M-M204V	21/23=91 ± 12%	18/21=86 ± 16%	62/99=63 ± 10%	27/31=87 ± 12%	4/8=50 ± 36%	2/2=100 ± 0%
L80V-L180M-M204V	-	3/21=14 ± 16%	-	-	-	-
V173L-L180M-M204V	-	-	18/99=18 ± 8%	2/31=6 ± 8%	3/8=38 ± 34%	-
L180M-T184L-M204V	-	-	10/99=10 ± 6%	-	-	-
L180M-T184S-M204V	-	-	-	1/31=3% ± 6%	-	-
L180M-S202G-M204V	-	-	6/99=6 ± 4%	-	-	-
M204I	8/10=80 ± 26%	19/30=63 ± 18%	54/146=37 ± 8%	15/28=54 ± 18%	-	1/3=33 ± 54%
M204I-V207I	2/10=20 ± 26%	-	-	-	-	-
L80V-M204I	-	4/30=13 ± 12%	3/146=2 ± 2%	1/28=4 ± 8%	-	-

Продолжение табл. 1

Паттерн мутации	Генотип ВГВ (число последовательностей)					
	A	B	C	D	E	F
	82	147	503	343	34	58
L180M-M204I	-	-	19/146=13 ± 6%	3/28=11 ± 12%	-	2/3=67 ± 54%
L80I-L180M-M204I	-	-	19/146=13 ± 6%	3/28=11 ± 12%	-	-
M204I-M250L	-	-	3/146=2 ± 2%	-	-	-
V173L-M204I-M250L	-	-	1/146=1 ± 2%	-	-	-

Для генотипов А, В, С, D вируса гепатита В единичная мутация M204I встречается чаще, чем единичная мутация M204V. Генотипы С, D и E похожи между собой на основании частот паттернов вторичных мутаций, при наличии замены M204V. Генотипы С и D так же похожи, при условии наличия замены M204I. Для замены M204I характерны вторичные мутации, специфичные для разных генотипов: L80IV (генотипы В-D) и V207I (генотип А). Паттерны мутаций M204I-V207I для генотипа А и L80V-L180M-M204V для генотипа В встречаются достаточно часто (20% и 14%, соответственно) и характерны только для данных генотипов.

Заключение. Нами был разработан метод построения паттернов мутаций на основании статистики их совместного наблюдения. Был разработан метод нормировки, позволяющий сравнивать частоты паттернов. Обнаружено, что генотип ВГВ влияет на формирование паттернов мутаций, компенсирующих замены в сайте rt204.

ИЗУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТА ГЕНОТИПОВ С И D ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ВЫЯВЛЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ ЧУКОТСКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА (ЧАО)

Неверов А.Д.¹, Карандашова И.В.¹, Долгин В.А.¹, Браславская С.И.¹, Хабибуллина В.Е.², Чуланов В.П.¹

¹ ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

² Центр по профилактике и борьбе со СПИДом ЧАО, Анадырь.

Введение: На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей полного генома вирус гепатита В (HBV) подразделяют на 8 генотипов, обозначаемых латинскими буквами от А до H. Для каждого генотипа характерна определенная географическая и