

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Акимов И.А.¹, Тимофеев Д.И.¹, Мавзютов А.Р.^{2,3}, Иванов М.К.¹

ВЫЯВЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ RF1_2K/1B ВИРУСА ГЕПАТИТА С В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹АО «Вектор-Бест», 630117, Новосибирск, Россия;

²ООО ИЦ «Лаборатория», 450075, Уфа, Россия;

³ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, Уфа, Россия

В мире около 70 млн человек инфицировано вирусом гепатита С (ВГС), и около 400 тыс. умирают ежегодно от осложнений хронического гепатита С. Ведение пациентов с хроническим гепатитом С может требовать генотипирования ВГС, поскольку эффективность некоторых широко применяемых противовирусных препаратов сильно зависит от вирусного генотипа и/или субтипа. Наиболее распространенная циркулирующая рекомбинантная форма ВГС, RF1_2k/1b, ошибочно классифицируется как генотип 2 многими коммерческими наборами для генотипирования ВГС, основанными на ОТ-ПЦР анализе 5'-нетранслируемой области генома вируса. Это приводит к неправильному лечению пациента, поскольку, принятые схемы лечения ВГС генотипа 2 неэффективны при инфицировании рекомбинантным вариантом RF1_2k/1b. В данной работе мы описали способ обнаружения РНК ВГС RF1_2k/1b в образцах крови методом ОТ-ПЦР анализа в реальном времени двух локусов вирусного генома (5'UTR и NS5b). Метод апробирован на 240 образцах сыворотки крови инфицированных ВГС пациентов, в которых генотип вируса был определен как 2 или микст-инфекция (2+1) или (2+3) двумя коммерческими наборами «РеалБест РНК ВГС-1/2/3» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) и «ОТ-Гепатоген-С генотип» (ООО «ДНК-Технология», Москва). Выявлено 50 (20,8%) случаев рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b, в том числе три смешанных инфекции: RF1_2k/1b + 1a, RF1_2k/1b + 3a, RF1_2k/1b + 1b. Во всех случаях правильность типирования ВГС предложенным методом подтверждена секвенированием по методу Сэнгера и филогенетическим анализом. Разработанный метод легко внедряем в клиническую практику и может использоваться в лабораториях, оборудованных для проведения ОТ-ПЦР анализа, чтобы правильно идентифицировать генотип RF1_2k/1b.

Ключевые слова: вирус гепатита С; рекомбинанты ВГС; RF1_2k/1b; ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Акимов И.А., Тимофеев Д.И., Мавзютов А.Р., Иванов М.К. Выявление циркулирующей рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С в сыворотке крови пациентов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 122-128. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-122-128>

Akimov I.A.¹, Timofeev D.I.¹, Mavzyutov A.R.^{2,3}, Ivanov M.K.¹

DETECTION OF CIRCULATING HCV RECOMBINANT FORM RF1_2K/1B IN BLOOD SERUM OF PATIENTS BY REAL-TIME RT-PCR

¹AO «Vector-Best», 630117, Novosibirsk, Russia;

²Research Center «Laboratory», 450075, Ufa, Russia;

³Bashkir State Medical University, 450008, Ufa, Russia

Globally, about 70 million people are infected with the hepatitis C virus (HCV), and about 400 thousand people die annually from chronic hepatitis C complications. The management of patients with chronic hepatitis C may require HCV genotyping, since the efficiency of some widely used antiviral drugs strongly depend on the viral genotype and/or subtype. The most prevalent HCV circulating recombinant form, RF1_2k/1b, is misclassified as genotype 2 by many commercial HCV genotyping kits, based on the RT-PCR analysis of the 5' untranslated region of the HCV genome. This leads to inappropriate patient treatment, since the accepted treatment schemes for HCV genotype 2 are ineffective for the RF1_2k/1b. Here we describe a method for detecting the RNA HCV RF1_2k/1b in blood samples by RT-PCR analysis of two regions in HCV genome (5'UTR and NS5b). The method was tested on 240 blood serum samples from HCV infected patients, in which HCV genotype was defined as 2 or mixed (2+1 or 2+3) by the two commercial genotyping kits "OT-Hepatogen-C genotype" ("DNA-Technology", Moscow) and "RealBest RNA HCV-1/2/3" ("Vector-Best", Novosibirsk). 50 (20.8%) RF1_2k/1b cases were revealed, including three mixed infections: RF1_2k/1b + 1a, RF1_2k/1b + 3a, RF1_2k/1b + 1b. In all cases, the accuracy of HCV typing by the proposed method was confirmed by Sanger sequencing and phylogenetic analysis. The method is easy to implement into clinical practice and may be used in clinical settings equipped for RT-PCR analysis to correctly identify the recombinant variant RF1_2k/1b.

Key words: HCV; HCV recombinants; RF1_2k/1b; Real-Time PCR.

For citation: Akimov I.A., Timofeev D.I., Mavzyutov A.R., Ivanov M.K. Detection of circulating HCV recombinant form RF1_2k/1b in blood serum of patients by real-time RT-PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66 (2): 122-128 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-122-128>

For correspondence: Akimov Ivan Alekseevich, PhD, scientific researcher of the PCR laboratory of AO «Vector-Best»; e-mail: akimov@vector-best.ru

Information about authors:

Akimov I.A., <https://orcid.org/0000-0002-5299-6917>;

Timofeev D.I., <https://orcid.org/0000-0001-8615-5983>;

Mavzyutov A.R., <https://orcid.org/0000-0001-5943-1882>;

Ivanov M.K., <https://orcid.org/0000-0001-7503-2435>.

Acknowledgment. *The authors declare no external financing.*

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

Received 17.09.2020

Accepted 26.10.2020

Введение. В мире около 70 млн человек инфицировано вирусом гепатита С (ВГС). Ежегодно регистрируют около 2 млн новых случаев заражения. От осложнений хронического гепатита С (ХГС) ежегодно умирают 400 тыс. человек [1-3]. Разработанные схемы лечения больных ХГС значительно замедляют развитие заболевания, предупреждают возникновение цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы печени и, в итоге, снижают смертность [4, 5].

В настоящее время на основании филогенетического анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммы ВГС подразделяют на 7 основных генотипов, каждый из которых, в свою очередь, делят на субтипы [6, 7]. Установлено, что пациенты, инфицированные ВГС генотипов 1, 2 и 3, которые наиболее распространены в мире и в России, по-разному отвечают на противовирусную терапию [4, 8]. Поэтому определение генотипа ВГС может иметь важное значение при назначении терапии определёнными препаратами [5, 9]. Известно, что, инфицированные ВГС генотипов 2 или 3, лучше поддаются классической терапии пэгинтерфероном/рибавирином, быстрее и значительно чаще достигают устойчивого вирусологического ответа, чем зараженные генотипом 1 [8]. В этой связи для разных генотипов ВГС предписанные схемы лечения различаются по дозировкам и длительности терапии [4, 5]. На рынке также имеются препараты прямого противовирусного действия (ППВД), которые действуют непосредственно на белки ВГС, препятствуя его размножению, и обладают как генотип-специфичным, так и пангенотипным действием [10-12]. Они обладают более высокой эффективностью и меньшим побочным действием, чем комбинация пэгинтерферон/рибавирин [13]. При выборе оптимальной тактики лечения генотип-направленными препаратами прямого действия также необходимо определение генотипа вируса, а при инфицировании генотипом 1 – дополнительно определение субтипа (1a или 1b) [4, 5, 14, 15].

В течение многих лет после открытия ВГС в 1989 году, генетическое разнообразие вируса связывали с высокой частотой возникновения мутаций, накапливаемых в его геноме. А другой фундаментальный механизм изменчивости – рекомбинацию, происходящую между РНК ВГС различных генотипов, исключали, полагая, что такие варианты, если и образуются, то не являются жизнеспособными [16-19]. Однако, в Санкт-Петербурге впервые была обнаружена циркулирующая рекомбинантная форма ВГС, названная RF1_2k/1b [20]. Сформировалась она посредством гомологичной рекомбинации между геномами субтипов 2k и 1b. Сайт рекомбинации расположен в гене NS2 ВГС таким образом, что все его структурные гены относятся к субтипу 2k, а неструктурные – к 1b, наиболее трудно поддающемуся лече-

нию комбинацией пэгинтерферон/рибавирин [21, 22]. Данная рекомбинантная форма ВГС была впоследствии обнаружена в Грузии, Узбекистане, Ирландии, Франции, Германии, Кипре, Израиле и других странах [23-26]. Установлено, что этот вариант вируса возник на территории бывшего СССР в период с 1923 по 1956 г. [24, 25].

К настоящему времени описано 17 рекомбинантных форм ВГС [21, 26], 9 из которых зарегистрированы в международной таксономической классификации (https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/38/table-4-recombinant-rt-hcv-genomes). Кроме штаммов 2b/1a, 2b/1b и RF1_2k/1b, другие рекомбинанты ВГС были выявлены лишь однократно. Сегодня RF1_2k/1b – это единственный рекомбинантный вариант ВГС, широко распространенный в мире и имеющий эпидемиологическое значение [25].

Сейчас на российском рынке отсутствуют зарегистрированные тесты для выявления рекомбинантов ВГС. При использовании имеющихся наборов реагентов для генотипирования, рекомбинант RF1_2k/1b ошибочно определяется как генотип 2 [27]. Это представляет собой серьезную проблему, поскольку есть данные о том, что рекомендуемые схемы лечения зараженных генотипом 2 ВГС, малоэффективны для лиц, инфицированных RF1_2k/1b [28-33]. Вероятность ошибки при назначении курса терапии значительно возрастает в регионах, где этот вариант вируса имеет широкое распространение. Установлено, что в Грузии, где 7.7% взрослого населения заражено ВГС, 69 – 76% клинических образцов с ВГС, первоначально определяемых как генотип 2, в действительности являются RF1_2k/1b [27, 28, 34].

В настоящее время для выявления рекомбинантов ВГС используют секвенирование как минимум двух, удаленных друг от друга геномных локусов вируса (чаще всего 5'UTR и NS5b), и последующий филогенетический анализ [35-37]. Сложность проведения и высокая стоимость этого метода ограничивают его применение в клинической практике, для которой крайне необходима более простая и доступная методика определения геноварианта RF1_2k/1b, позволяющая анализировать достаточно большое количество клинических образцов.

Цель настоящего исследования – апробация метода выявления циркулирующей рекомбинантной формы RF1_2k/1b ВГС в сыворотке крови пациентов с помощью обратной транскрипции, совмещенной с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Материал и методы. В работе исследовали 240 образцов сыворотки крови больных, инфицированных ВГС. Первоначальный анализ, проведенный в ООО ИЦ «Лаборатория» (Уфа) с помощью набора реагентов «РеалБест РНК ВГС-1/2/3» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск), показал присутствие во всех пробах этой вы-

борки РНК ВГС генотипа 2, в том числе в двух образцах в сочетании с генотипом 1, а в одном – с генотипом 3. Все образцы были зашифрованы, архивированы и хранились при -70°C до проведения дополнительных исследований.

Выделение РНК ВГС из сыворотки крови для генотипирования методом ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с помощью набора «РеалБест экстракция 1000» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Дополнительное исследование образцов проводили в лаборатории ПЦР АО «Вектор-Бест» с использованием теста «ОТ-Гепатоген-С генотип» (ООО «ДНК-Технология», Москва), а трех проб с наличием более одного генотипа ВГС – также набора «АмплиСенс HCV-генотип-FL g1-6» (ООО «ИнтерЛаб-Сервис», Москва).

В предлагаемом методе определения геноварианта RF1_2k/1b каждый образец РНК исследовали с помощью ОТ-ПЦР-РВ одновременно в двух пробирках, содержащих лиофилизированные готовые реакционные смеси [38] (ГРС1, 2), которые позволяют выявлять участки генома ВГС, специфичные для генотипа 2 и субтипа 1b (табл. 1).

Подбор генотип-специфичных олигонуклеотидных праймеров и зондов (табл. 2) осуществляли так, чтобы они не формировали стабильных димеров между собой и с последовательностями нецелевых локусов. При их дизайне использовали нуклеотидные последовательности ВГС генотипа 2 и субтипа 1b, представленные в базах данных NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>) и Los Alamos National Laboratory (<https://hcv.lanl.gov>).

ОТ-ПЦР-РВ проводили с помощью термоциклера CFX96 (Bio-Rad, США) по протоколу: 45°C – 30 мин, 94°C – 1 мин; далее 50 циклов: 94°C – 10 сек, 60°C – 20 сек (измерение флуоресценции при 60°C). В каждую пробирку с ГРС вносили 50 мкл раствора выделенной РНК.

Таблица 1

Фрагменты генома и генотипы ВГС, определяемые с помощью ГРС1, 2

Пробирка	Исследуемый участок гена	Определяемый генотип / субтип ВГС
ГРС1	5'UTR	2
ГРС2	NS5b	1b

Таблица 2

Праймеры и зонды*, использованные для детекции генотипа 2 и субтипа 1b ВГС

Наименование	Последовательность 5'→3'
5'UTR, тип 2	G2F CCCGGGAGAGCCATAGT G2R CAAGCACCCSTATCAGGCAGT
	G2P FAM-ACCCACTCTATGCCCGGCCATTTGGGC-GTGCC-BHQ1
NS5b, тип 1b	bF1 ACATGTTACTTGAAGCCWCT bF2 ACATGTTACTTGAAGCCTCT bF3 ACATGCTACTTGAAGCCTCT bR1 ATAGCCTCCGTGAAGACTCGTA bR2 GTCGTATTCTGGTTGGGGC bP1 R6G-AGGTCGTCTCCGCACACGAGCATC-BHQ1 bP2 R6G-AGGTCGTCTCCGTTACGAGCATC-BHQ1 bP3 R6G-AGGTCGTCTCCGCACACGAGCATT-BHQ1

Примечание. * FAM: 6-карбоксихлорофлуоресцеин; R6G: 6-карбоксихлорофлуоресцеин.

Ампликоны участков 5'UTR, NS2, NS5b генома ВГС для последующего секвенирования нарабатывали с помощью термоциклера T100 (Bio-Rad), методом одностадийной ОТ-ПЦР, используя, соответственно, пары праймеров: 5UTRF и 5UTRR (специфичные к 5'UTR всех генотипов ВГС), NS2F и NS2R (специфичные к рекомбинанту RF1_2k/1b ВГС), NS5bF1 и NS5bR1 (специфичные к NS5b всех генотипов ВГС), NS5bF2 и NS5bR2 (специфичные к NS5b субтипа 1b) (табл. 3).

ОТ-ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей по 0.25 мкМ прямого и обратного праймеров, лиофилизированный «мастер-микс» (АО «Вектор-Бест») и 10 мкл раствора выделенной РНК. Реакцию проводили по протоколу: 45°C – 30 мин, 94°C – 10 сек, 60°C – 15 сек, 72°C – 30 сек.

Секвенирование полученных продуктов амплификации по методу Сэнгера выполняли в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск), для интерпретации секвенограмм применяли программу Chromas 2.6.4 (<http://technelysium.com.au>). Для проб, в которых были обнаружены более одного генотипа ВГС, по гетерогенной секвенограмме выявляли одновременное наличие смеси двух разных последовательностей, на основании присутствующих мажорных и минорных пиков.

Дизайн олигонуклеотидов выполнен в программе OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Синтез олигонуклеотидов осуществлён в лаборатории химического синтеза АО «Вектор-Бест». Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы Unipro UGENE 35.0 (<http://ugene.net>). Филогенетический анализ выполняли методом «Neighbor-Joining» (NJ) в программе MEGA 6.06 (<http://megasoftware.net>). Гомологию последовательностей сравнивали с использованием сетевых on-line ресурсов: NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), NCBI Genotyping (<https://ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) и Los Alamos National Laboratory (https://hcv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html). Определение точки рекомбинации выполняли методом «BootScan» в программе RDP 4.95 (<http://web.cbio.ucl.ac.za>).

Результаты и обсуждение. В результате генотипирования образцов с помощью набора «ОТ-Гепатоген-С генотип» в 237 пробах был определен только генотип 2, так же как при первоначальном генотипировании с применением теста «РеалБест РНК ВГС-1/2/3». В пробах №8 и 42 кроме генотипа 2 ВГС были обнаружены, соответственно, субтипы 1a и 1b, а в №17 – генотип 3.

Таблица 3

Праймеры, применяемые для амплификации и секвенирования фрагментов генома ВГС

Наименование	Последовательность 5'→3'	Длина ампликона, п.н.
5UTRF	ACTCCCCTGTGAGGAACT	301
5UTRR	TGCACGGTCTACGAGACCT	
NS2F	GTTTGACATAACCAAGTGGCT	513
NS2R	TCGACCTGGTTCTTTGTCC	
NS5bF1	GAYACCCGYTGCTTTGACTC	380
NS5bR1	TAYCTGGTCATAGCCCTCCGT	
NS5bF2	GACTA- ATTCAAAGGGCAGAACT	280
NS5bR2	GTCGTATTCTGGTTGGGGC	

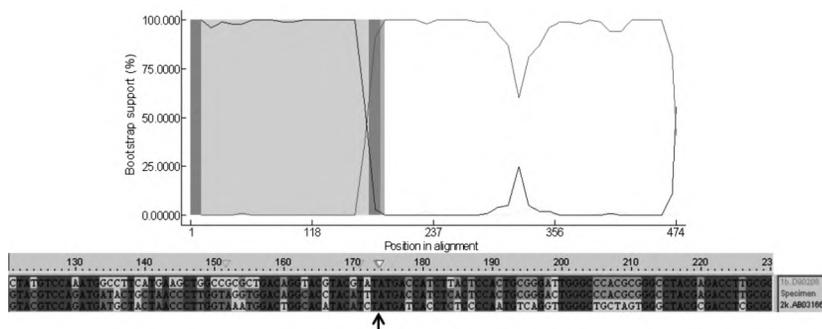


Рис. 3. Результат «BootScan» анализа рекомбинантных РНК по последовательности фрагмента NS2 на примере образца № 20 выполненный в программе RDP 4.95. Исходные генотипы представлены субтипами 2к (AB031663) и 1b (D902208). Стрелка указывает определённое программой место рекомбинации.

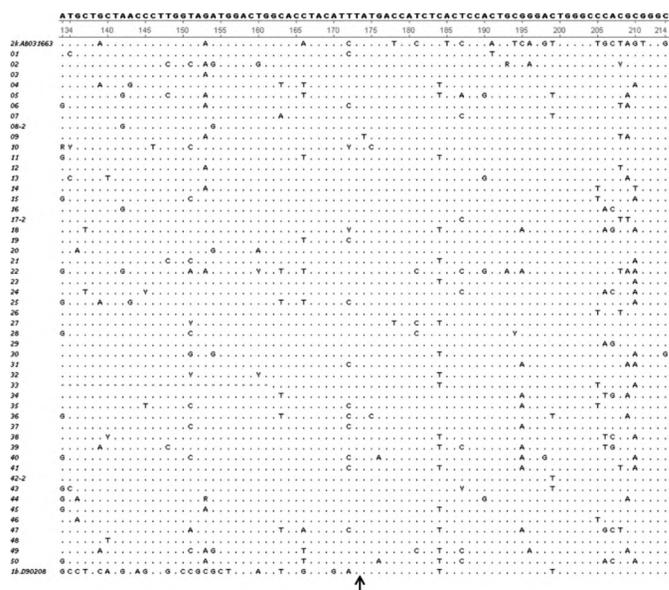


Рис. 4. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса NS2 в секвенированных образцах № 01 – 50. В качестве референсных использованы последовательности 2к.AB03166 и 1b.D90208 из базы данных NCBI. Место рекомбинации указано стрелкой.

В пробе №8 разработанным нами методом, в дополнение к результатам, полученным с помощью коммерческих тестов (табл. 4), определено наличие субтипа 1b (табл. 5). Секвенированием по методу Сэнгера установлено, что в этой пробе содержатся сразу две нуклеотидные последовательности локуса 5'UTR, соответствующие генотипу 1 (РНК №08-1) и 2 (РНК №08-2) (рис. 1, 5), а также последовательность участка гена NS5b, принадлежащая субтипу 1b (рис. 2А). Фрагмент гена NS2 соответствует геноварианту RF1_2k/1b (см.рис. 4). Секвенированием образца № 17 установлено, что в нем содержатся одновременно два участка 5'UTR области, соответствующие генотипам 3 (РНК №17-1) и 2 (РНК № 17-2) (рис. 1, 6), и последовательность участка гена NS5b, принадлежащая субтипу 1b (рис. 2А). Фрагмент NS2 соответствует рекомбинанту RF1_2k/1b (рис. 4).

Секвенированием образца № 17 установлено, что в нем содержатся одновременно два участка 5'UTR области, соответствующие генотипам 3 (РНК №17-1) и 2 (РНК № 17-2) (рис. 1, 6), и последовательность участка гена NS5b, принадлежащая субтипу 1b (рис. 2А). Фрагмент NS2 соответствует рекомбинанту RF1_2k/1b (рис. 4). В результате секвенирования участков последовательностей РНК ВГС, выделенной из образца № 42, обнаружены два фрагмента 5'UTR области, принадлежащие генотипу 1 (РНК №42-1) и генотипу 2 (РНК №42-2)

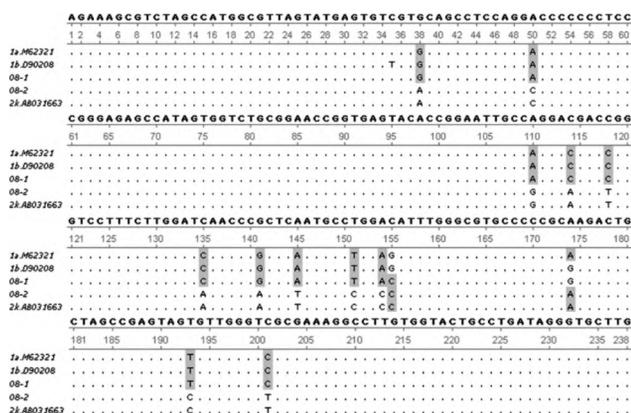


Рис. 5. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса 5'UTR в секвенированных РНК № 08-1, 08-2. В качестве референсных использованы последовательности 1a.M62321, 1b.090208 и 2k.AB03166 из базы данных NCBI.

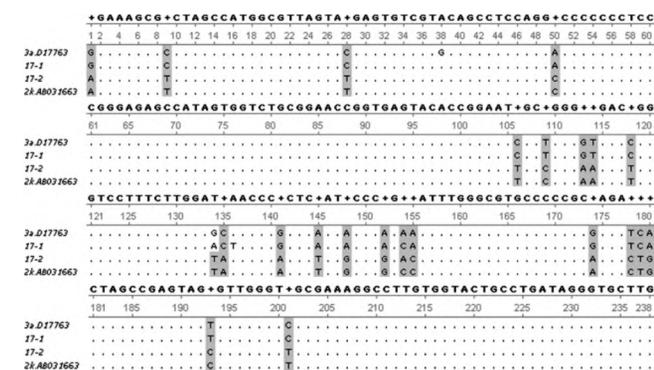


Рис. 6. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса 5'UTR в секвенированных РНК № 17-1, 17-2. В качестве референсных использованы последовательности 3a.D17763 и 2к.AB03166 из базы данных NCBI.

(рис. 1, 7). Участок гена NS5b соответствует субтипу 1b (см. рис. 2, б), а фрагмент NS2 – геноварианту RF1_2k/1b (см. рис. 4).

Исходя из полученных результатов, 50 из 240 исследованных образцов сыворотки крови содержат рекомбинантную форму RF1_2k/1b ВГС (см. рис. 3, 4), структура которой соответствует имеющимся литературным данным [20, 39].

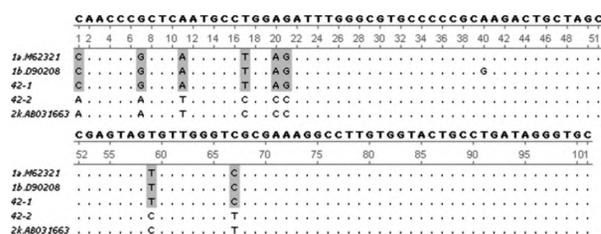


Рис. 7. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей локуса 5'UTR в секвенированных РНК № 42-1, 42-2. В качестве референсных использованы последовательности 1a.M62321, 1b.090208 и 2k.AB03166 из базы данных NCBI.

Сопоставление результатов секвенирования с данными, полученными методом ОТ-ПЦР-РВ, указывает на наличие в образце №8 РНК ВГС субтипа 1a (РНК № 08-1) и рекомбинанта RF1_2k/1b (РНК № 08-2). Полученные результаты также свидетельствуют, что в пробе №17 содержатся одновременно субтип 3a (РНК № 17-1) и RF1_2k/1b ВГС (РНК № 17-2). Совокупность данных, полученных по образцу №42 доказывает, что он содержит как субтип 1b (РНК № 42-1), так и геновариант RF1_2k/1b ВГС (РНК № 42-2).

Заключение. Таким образом, в настоящей работе предложен и апробирован метод обнаружения циркулирующей рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С с использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Апробация метода, проведенная на 240 образцах сыворотки крови пациентов, инфицированных ВГС, отнесенных при анализе с помощью двух коммерческих наборов реагентов к генотипу 2, показала, что в 50 (20,8%) из этих проб содержится рекомбинант RF1_2k/1b. Разработанный нами метод достаточно прост в исполнении и может применяться в лабораториях, оснащенных оборудованием для проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени, с целью выявления РНК геноварианта RF1_2k/1b, а также дифференцирования рекомбинанта от генотипа 2 ВГС, что необходимо для проведения адекватной и успешной терапии инфицированных пациентов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 8-11, 13, 14, 16-26, 28, 29, 33-37, 39 см. REFERENCES)

1. Ерёмин Ф. В. Современные классификация и номенклатура вируса гепатита С. Подходы к терапии и профилактике. *Здравоохранение*. 2015; 12: 40-8.
2. Мязин Р.Г., Емельянов Д.Н., Свириденко О.Ю., Стаценко И.Ю., Сергеев В.С. Современные стратегии лечения вирусного гепатита С при использовании ингибиторов протеазы и полимеразы. *Лекарственный вестник*. 2015. 58 (9): 26-32.
3. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С. М.: Минздрав России; 2017.
4. Дементьева Н.Е., Калинина О.В., Знойко О.О., Беляков Н.А., Жебрун А.Б. Циркулирующая рекомбинантная форма вируса гепатита С RF2k/1b: проблемы диагностики и терапии. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2016; 8(1): 42-52.
5. Николаева Л.И., Сапронов Г.В., Колотвин А.В., Самохвалов Е.И., Лейбман Е.А., Самоходская Л.М. Гепатит С при инфицировании рекомбинантной формой вируса RF2k/1b: течение и терапия. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(3): 9-15.

6. Юшук Н.Д., Знойко О.О., Дудина К.Р., Козина А.Н., Калинина О.В. Эффективность противовирусной терапии у больных хроническим гепатитом С, инфицированных вирусами гепатита С рекомбинантных вариантов. *Терапевтический архив*. 2016; 88(6): 101-5.
7. Знойко О.О., Дудина К.Р., Козина А.Н., Шутько С.А., Огарев В.В., Калинина О.В. и др. Диагностическая тактика и рекомендации по лечению больных хроническим гепатитом С, инфицированных генотипом 2 ВГС. *Лечащий врач*. 2016; 16(2): 1-8.
8. Ведерников В.Е., Иванов М.К., Трухина А.В., Кандрюшин Е.В. Два новых диагностических набора: «РеалБест РНК ВГС» и «РеалБест РНК ВГС-генотип». *Новости «Вектор-Бест»*. 2009; 52(2): 2-8.

REFERENCES

1. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009; 29(s1): 74-81.
2. Mohd H.K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013; 57(4): 1333-42.
3. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Casciapuoti 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; 34(22): 7824-40.
4. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C. *J. Hepatol*. 2018; 69(2): 461-511.
5. American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatitis C Guidance 2019 Update. *Hepatology*. 2020; 71(2): 686-721.
6. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014; 59(1): 318-27.
7. Eremin F. V. Modern classification and nomenclature of hepatitis C virus. Approaches to a therapy and prevention. *Zdravookhranenie*. 2015; 12: 40-8. (in Russian)
8. Palumbo E. Pegylated interferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. *Ther. Adv. Chronic Dis*. 2011; 2(1): 39-45.
9. Maughan A., Ogbuagu O. Pegylated interferon alpha 2a for the treatment of hepatitis C virus infection. *Expert Opin Drug Metab. Toxicol*. 2018; 14(2): 219-27.
10. Shahid I., AlMalki W.H., Hassan S., Hafeez M.H. Real-world challenges for hepatitis C virus medications: a critical overview. *Crit Rev Microbiol*. 2018; 44(2): 143-60.
11. Spengler U. Direct antiviral agents (DAAs) – a new age in the treatment of hepatitis C virus Infection. *Pharmacol Ther*. 2018; 183:118-26.
12. Myazin R.G., Emel'yanov D.N., Sviridenko O.Yu., Statsenko I.Yu., Sergeev V.S. Modern strategies for the treatment of viral hepatitis C using protease and polymerase inhibitors. *Lekarstvennyy vestnik*. 2015. 58 (9): 26-32. (in Russian)
13. Seifert L.L., Perumpail R.B., Ahmed A. Update on hepatitis C: Direct-acting antivirals. *World J. Hepatol*. 2015; 7(28): 2829-33.
14. Wyles D.L., Gutierrez J.A. Importance of HCV genotype 1 subtypes for drug resistance and response to therapy. *J. Viral. Hepat*. 2014; 21(4): 229-40.
15. Recommendations for the diagnosis and treatment of adult patients with hepatitis C. Moscow: *Minzdrav Rossii*; 2017. (in Russian)
16. Yun Z., Lara C., Johansson B., Lorenzana de Rivera I., Sonnerborg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J. Med. Virol*. 1996; 49(3): 155-60.
17. Simmonds P., Smith D.B., McOmish F., Yap P.L., Kolberg J., Urdea M.S. et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J. Gen. Virol*. 1994; 75 (5): 1053-61.
18. Viazov S., Widell A., Nordenfelt E. Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event. *Infection*. 2000; 28(1): 21-5.
19. Smith D.B., Simmonds P. Review: molecular epidemiology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol Hepatol*. 1997; 12(7): 522-7.

20. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J. Virol.* 2002; 76(8): 4034-43.
21. Gonzalez-Candelas F., Lopez-Labrador F.X., Bracho M.A. Recombination in hepatitis C virus. *Viruses.* 2011; 3(10): 2006-24.
22. Kalinina O., Norder H., Magnius L.O. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(7): 1853-7.
23. Morel V., Fournier C., Francois C., Brochot E., Helle F., Duverlie G. et al. Genetic recombination of the hepatitis C virus: clinical implications. *J. Viral Hepat.* 2011; 18(2): 77-83.
24. Raghvani J., Thomas X.V., Koekkoek S.M., Schinkel J., Molenkamp R., van de Laar T.J. et al. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. *J. Virol.* 2012; 86(4): 2212-20.
25. Susser S., Dietz J., Schlevogt B., Zuckerman E., Barak M., Piazzolla V. et al. Origin, prevalence and response to therapy of hepatitis C virus genotype 2k/1b chimeras. *J. Hepatol.* 2017; 67(4): 680-6.
26. Galli A., Bukh J. Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 2014; 22(6): 354-64.
27. Dement'eva N.E., Kalinina O.V., Znoyko O.O., Belyakov N.A., Zhebrun A.B. Circulating recombinant form RF2k/1b of hepatitis C virus: problems of diagnosis and therapy. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2016; 8(1): 42-52. (in Russian)
28. Karchava M., Chkhartishvili N., Sharvadze L., Abutidze A., Dvali N., Gatsrelia L. et al. Impact of hepatitis C virus recombinant form RF1_2k/1b on treatment outcomes within the Georgian national hepatitis C elimination program. *Hepatol. Res.* 2018; 48(1): 36-44.
29. Hedskog C., Doehle B., Chodavarapu K., Gontcharova V., Crespo G.J., De K.R. et al. Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. *Hepatology.* 2015; 61(2): 471-80.
30. Nikolaeva L.I., Saponov G.V., Kolotvin A.V., Samokhvalov E.I., Leybman E.A., Samokhodskaya L.M. Hepatitis C upon infection with the recombinant form RF2k/1b of the virus: course and therapy. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2014; 19(3): 9-15. (in Russian)
31. Yushchuk N.D., Znoyko O.O., Dudina K.R., Kozina A.N., Kalinina O.V. Efficiency of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C infected with recombinant variants hepatitis C viruses. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2016; 88(6): 101-5. (in Russian)
32. Znoyko O.O., Dudina K.R., Kozina A.N., Shut'ko S.A., Ogarev V.V., Kalinina O.V. et al. Diagnostic tactics and recommendations for the treatment of patients with chronic hepatitis C infected with HCV genotype 2. *Lechashchiy vrach.* 2016; 16(2): 1-8. (in Russian)
33. Mourez T., Decroos A., Gorla O., Montialoux H., De O.F., Larrat S. et al. Misidentification of recombinant hepatitis C virus leading to treatment failure with direct acting antivirals. *J. Med. Virol.* 2018; 90(5): 994-7.
34. Zakalashvili M., Zarkua J., Weizenegger M., Bartel J., Raabe M., Zangurashvili L. et al. Identification of hepatitis C virus 2k/1b intergenotypic recombinants in Georgia. *Liver Int.* 2018; 38(3): 451-7.
35. Schuermans W., Orlent H., Desombere I., Descheemaeker P., Van V.H., Geerts A. et al. Heads or Tails: Genotyping of Hepatitis C Virus Concerning the 2k/1b Circulating Recombinant Form. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(9): 1384.
36. De K.S., Descheemaeker P., Reynders M. Potential risk of misclassification HCV 2k/1b strains as HCV 2a/2c using VERSANT HCV Genotype 2.0 assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 82(3): 201-2.
37. De K.S., Descheemaeker P., Reynders M. Diagnosis of hepatitis C virus genotype 2k/1b needs NS5B sequencing. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 41: 1-2.
38. Vedernikov V.E., Ivanov M.K., Trukhina A.V., Kandrushin E.V. Two new diagnostic kits: "RealBest HCV RNA" and "RealBest HCV RNA genotype". *Novosti "Vektor-Best".* 2009; 52(2): 2-8. (in Russian)
39. Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., Khan A., Sugauchi F., Kan N. et al. Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatol. Res.* 2008; 38(5): 457-64.

Поступила 17.09.20
Принята к печати 26.10.20