КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Рейнгардт Д. Э .[1], Останкова Ю.В. [1], Ануфриева Е.В. [1], Семенов А.В. [2], Тотолян А.А.[1,3]

СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ ЗНАЧИМЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГЕНАХ-МИШЕНЯХ НА БАЗЕ МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

[1]ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, 197191, Санкт-Петербург, Россия;
[2]ФБУН Федеральный НИИ вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия;
[3]ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия

Для оценки значимости влияния мутаций лекарственной устойчивости ВГС к препаратам прямого противовирусного действия (ППРД) среди пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) разработан метод, позволяющий определить наличие мутаций резистентности в генах NS5A, NS5B, NS3 методом ПЦР с последующим секвенированием. При разработке метода использованы образцы плазмы крови 193 пациентов с диагнозом ХГС, проживающих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Для определения клинически значимых нуклеотидных замен в регионах NS3, NS5A, NS5B ВГС использована разработанная методика на основе двухэтапной ПЦР, а именно: продукт амплификации кодируемых регионами белков NS3 область 3312- 4341 нт, NS5A область 6129- 6949 нт, NS5B область 8007- 8634 нт, получали методом «гнездовой» (nested) ПЦР с использованием на каждом этапе пары праймеров в зависимости от определенного ранее генотипа ВГС. Для определения наличия мутаций устойчивости использовано программное обеспечение «Geno2pheno HCV resistance". На основании анализа данных выявлено, что необходимая вирусная нагрузка для проведения секвенирующей реакции и получения нуклеотидной последовательности искомых фрагментов генома составляет 1,5x10^3 МЕ/мл и более. Разработанный способ позволяет идентифицировать наличие мутаций лекарственной резистентности вируса к противовирусным препаратам при наиболее распространенных в РФ субгенотипах ВГС (1, 2, 3) и может быть использован для определения стратегии лечения пациентов с ХГС и назначении повторного лечения при неуспехе первой линии терапии. Метод использован для оценки распространённости мутаций устойчивости ВГС среди некоторых уязвимых групп населения: пациенты с моноинфекцией ВГС и пациенты с коинфекцией ВИЧ/ВГС.

Ключевые слова: *хронический вирусный гепатит С; ВГС; мутации лекарственной устойчивости; метод идентификации; диагностика; ППРД*

Для цитирования: Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Ануфриева Е.В., Семёнов А.В., Тотолян Арег А. Способ детекции значимых нуклеотидных замен в генах-мишенях на базе методики выявления мутаций резистентности вируса гепатита С. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2024; 69 (4): 150-158. DOI: https:/doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-150-158

Для корреспонденции: *Останкова Юлия Владимировна*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. иммунологии, зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; e-mail: shenna1@yandex.ru

Финансирование. *Отраслевая НИР «Парентеральные вирусные гепатиты: скрытая форма хронических гепатитов В и С при моно- и коинфекции в популяции и в группах риска, а также в зависимости от генетического полиморфизма генов хозяина» № АААА-А21-121021600219-5.*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Поступила 08.02.2024
Принята к печати 25.02.2024
Опубликовано 26.03.2024

Reingardt D.E.[1], Ostankova Yu.V.[1], Anufrieva E.V.[1], Semenov A.V.[2], Totolian Areg A.[1,3]

TECHNIQUE FOR DETECTION SIGNIFICANT NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN TARGET GENES BASED ON THE METHODOLOGY FOR DETECTION HEPATITIS C VIRUS'ES RESISTANCE MUTATIONS

[1]Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

[2]Federal research institute of viral infections «Virom», 620030, Ekaterinburg, Russia;

[3]First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, 197022, St. Petersburg, Russia

To assess the significance of the impact of HCV drug resistance mutations on DAAs among patients with chronic hepatitis C (CHC), a method was developed to determine the presence of clinically significant nucleotide substitutions in the NS5A, NS5B, NS3 genes using PCR followed by sequencing. When developing the method, blood plasma samples were used from 193 patients diagnosed with

CHC living in St. Petersburg and the Leningrad region. To determine clinically significant nucleotide substitutions in the NS3, NS5A, NS5B regions of HCV, we used a developed method based on two-step PCR, namely: amplification product of proteins encoded by the regions, namely NS3 region 3312-4341 nt, NS5A region 6129-6949 nt, NS5B region 8007-8634 nt, was obtained by nested PCR using a pair of primers at each stage depending on from the previously determined HCV genotype. To determine the presence of significant nucleotide substitutions, the "Geno2pheno HCV resistance" software was used. Based on data analysis, it was revealed that the required viral load to carry out a sequencing reaction and obtain the nucleotide sequence of the desired genome fragments for determining MDR is 1.5x10^3 IU/ml or more. The developed method allows us to identify the presence of mutations of drug resistance of the virus to antiviral drugs in the most common HCV subgenotypes in the Russian Federation (1, 2 and 3) and can be used to determine the treatment strategy for patients with CHC and prescribe re-treatment if first-line therapy fails. This method was used to estimate the prevalence of HCV resistance mutations among certain vulnerable populations: patients with HCV monoinfection and patients with HIV/HCV coinfection.

Key words: chronic viral hepatitis C; HCV; drug resistance mutations; identification method, diagnostics; DAAs

For citation: Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Anufrieva E.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. Technique for detection significant nucleotide substitutions in target genes based on the methodology for detection hepatitis C virus'es resistance mutations. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2024; 69 (4): 150-158 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-150-158

For correspondence: *Ostankova Yu.V.,* PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Head at the Laboratory of Immunology and Virology HIV Infection; e-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Reingardt D.E., https://orcid.org/0000-0002-0931-102X;
Ostankova Yu.V., http://orcid.org/0000-0003-2270-8897;
Anufrieva E.V., https://orcid.org/0009-0002-1882-529X;
Semenov A.V., https://orcid.org/0000-0003-3223-8219;
Totolian Areg A., https://orcid.org/0000-0003-4571-8799.

Acknowledgment. *Branch research work «Parenteral viral hepatitis: occult form of chronic hepatitis B and C with mono- and coinfection in the population and in risk groups, as well as depending on the genetic polymorphism of the host's genes».*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 08.02.2024
Accepted 25.02.2024
Published 26.03.2024

Введение. Социальная значимость бремени вирусных гепатитов продолжает охватывать мировое население, являясь седьмой по значительности причиной смертности во всем мире. Заболевания, вызванные острыми гепатитами, осложнениями хронических форм, такие как цирроз и рак печени, по оценкам экспертов являются причиной смерти 1,4 миллионов человек в год [1]. Из этих смертей 48% случаев приходится на вирус гепатита С (ВГС) [2]. По данным Всемирной организации общественного здравоохранения, более 60 млн человек в мире страдают хроническим вирусным гепатитом С (ХГС), при этом ежегодный прирост заболеваемости составляет 1,5 млн человек. Отсутствие специфической вакцинопрофилактики осложняет надзор за инфицированием и распространением заболеваемости в целом [3].

ВГС может быть причиной как острой, так и хронической формы инфекции. В течение первых 6 месяцев после инфицирования, у 15-45% пациентов наблюдается спонтанная элиминация вируса, однако, в остальных случаях ВГС инфекция приобретает хроническое течение [4]. Острая стадия наступает через 2-12 недель после заражения (в среднем 7 нед), длится от 2 до 12 недель и характеризуется отсутствием специфических симптомов болезни. При отсутствии спонтанного излечения, инфекция перетекает в хроническую форму, которая характеризуется увеличением уровня аминотрансфераз, прогностическим развитием цирроза в 10-20% случаев в течение 20-30 лет [5]. Прогностическая частота развития цирроза возрастает до 41% при течении хронического вирусного гепатита С (ХГС) более 30 лет [6].

Распространённость ВГС инфекции неоднородна и детерминирована географическим регионом. Наибольший процент встречаемости (7,5%) ВГС описан для стран Восточной и Центральной Азии, Африки. Для России данный показатель составляет 0,45% и характеризуется наибольшей распространённостью в Центральном Федеральном округе [7]. В Российской Федерации ежегодно регистрируется более 40 тыс. случаев впервые выявленного ХГС. По данным Роспотребнадзора, в 2017 году зарегистрировано более 50 тыс. новых случаев, в 2018 году - 48 тыс., в 2019 году - 45 тысяч. Несмотря на отрицательную тенденцию первичной заболеваемости, общее число лиц с ХГС продолжает увеличиваться. По оценочным данным в России в настоящее время проживает около 5,8 миллионов лиц с диагнозом ХГС [8].

До 2011 года стандартом лечения ХГС являлась комбинация пегилированного интерферона и противовирусного препарата рибавирина в течение 24 или 48 недель, в зависимости от генотипа вируса [9]. Данная схема терапии отличалась высоким количеством нежелательных побочных явлений и отсутствием достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) - неопределяемая вирусная нагрузка, достигаемая во время терапии. У пациентов с ВГС генотипа 1 достижение УВО наблюдалось лишь в 55% случаев, а декомпенсированное состояние печени и почечная недостаточность вовсе являлась противопоказанием к лечению интерфероном [10].

Революцией в терапии ХГС стала разработка препаратов прямого противовирусного действия (ППРД), направленных на ключевые белки вируса - протеазу NS3, полимеразу NS5B, белок NS5A. Белок NS3 име-

ет две известные ферментативные активности: сериновую протеазу и геликазу. Большинство ППРД, нацеленных на этот белок, действуют как ингибиторы протеазы. Одним из основных механизмов действия этого класса ППРД является ингибирование протеолитического расщепления вирусных белков от NS3 до NS5B, что в конечном итоге подавляет репликацию вирусной РНК [11]. Белок NS5A состоит из α-спирали, которая связывается с мембраной клетки и тремя последовательными доменами (домен 1-3). Домены 1 и 2 важны для репликации вирусной РНК, домен 3 незаменим для сборки вируса. Ингибиторы NS5A ограничивают два разных этапа жизненного цикла HCV: формирование комплекса репликации и сборку вируса [12]. Белок NS5B представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу, ключевой фермент, непосредственно катализирующий синтез «+» и «-» цепи вирусных РНК. Ингибиторы NS5B белка ограничивают синтез белка вируса. На данный момент выделяют 4 группы ППРД, нацеленных на 3 вирусных неструктурных белка-мишени: ингибиторы NS3-протеазы, ингибиторы NS5A-репликативного комплекса, нуклеотидные и ненуклеотидные ингибиторы NS5B РНК-полимеразы [13].

По сравнению с терапией интерфероном, лечение ППРД значительно увеличило частоту достижения УВО (более 90%), сократило продолжительность курса (до 12 недель), снизило количество побочных явлений, режим приёма препарата стал более удобен для пациентов [14-16]. Для доли пациентов (около 5%) противовирусная терапия оказывается неэффективной, а именно: отсутствие достижения УВО, либо возникновение рецидива инфекции в виде обнаружения вируса в крови во время терапии [17]. Данные неудачи могут быть связаны с феноменом лекарственной устойчивости возбудителя к противовирусным препаратам. По некоторым данным, в 83% случаев неудачного исхода терапии обнаруживались одна или несколько мутаций лекарственной устойчивости (МЛУ) в участках генома, кодирующих белки-мишени для действия ППРД [18,19].

Возникновение резистентности вируса связано с наличием нуклеотидных замен, появляющихся рандомно в генах *NS3, NS5A, NS5B* ВГС при каждом цикле репликации. Такие замены называются заменами, связанными с устойчивостью (RAS - resistance associated substiution) [20]. Большинство подобных замен в геноме не нарушают фитнес (способность вируса выживать и размножаться в определённых условиях) дикого вируса в обычных условиях, но в условиях приёма ППРД мутантные штаммы имеют преимущество перед диким типом вируса. Ещё одной причиной отсутствия успеха терапии первой линии может являться заражение пациента вариантом вируса, ассоциированным с резистентностью (RAV - resistance associated variant). В данном случае идет речь о первичной резистентности к противовирусным препаратам, о чём может свидетельствовать отсутствие ответа на назначенную терапию в принципе [21].

Современная лабораторная диагностика не предусматривает выполнение анализа на резистентность ВГС к ППРД из-за отсутствия общепринятого метода на отечественном рынке. Целесообразность использования исследования для выявления терапевтически значимых нуклеотидных замен обоснована не только подбором альтернативной схемы лечения при вирусологическом прорыве, но и выбором оптимальной стартовой терапии.

Целью работы являлась возможность использования метода определения МЛУ ВГС к ППРД для оценки значимости данных мутаций среди пациентов с ХГС на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Материал и методы. Использованы образцы плазмы крови, полученные от 193 пациентов с подтверждённым ХГС, проживающих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Экстракцию РНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. Качественный анализ на наличие ВГС в плазме крови проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на коммерческом наборе «АмплиСенс® HCV-FL (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя.

Для оценки вирусной нагрузки образцов при анализе чувствительности разрабатываемого метода использована ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на коммерческом наборе «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя.

Для определения генотипа вируса использована ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на коммерческом наборе «АмплиСенс® HCV-генотип-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя.

Для образцов с подтверждённой вирусной нагрузкой выполнена реакция обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК с использованием набора «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. Далее проводили амплификацию целевых регионов *NS3, NS5A, NS5B* в два этапа для увеличения чувствительности и специфичности анализа (метод nested-ПЦР) с использованием генотип-специфичных олигонуклеотидов (табл. 1).

Для проведения специфической ПЦР отдельных генов ВГС использован следующий состав амплификационной смеси в общем виде: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ $MgCl_2$, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-HCl, (pH 8,8), 200 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объёма 30 мкл.

Разработан режим амплификации: денатурация при 95 ^{0}C в течение 5 минут, 30 циклов амплификации в режиме 95 ^{0}C - 20 секунд, 55-65 ^{0}C - 30 с, 72 ^{0}C - 90 секунд. Финальная элонгация при 72 ^{0}C - 5 минут.

Для амплификации продуктов ПЦР использованы специфические праймеры (Евроген, Россия), последовательность которых подобрана с помощью литературных источников, и разработана с применением программного инструмента для дизайна праймеров NCBI/Primer-BLAST согласно оптимальным алгоритмам (см. табл. 1).

Качество продуктов ПЦР оценивали методом электрофореза в геле, окрашенном бромистым этидием с использованием системы гель-документации и последующим анализом на предмет наличия фрагмента и его длины.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для получения целевых регионов, ассоциированных с МЛУ

Праймер	Нуклеотидная последовательность
Для всех генотипов	
HCV NS5B out F	5'-GTSTGGITRGACYTICTGGAACAC-3'
HCV NS5B out R	5'-RGIGCRGARTACCTRGTCATAGCCT-3'
HCV NS5B in F	5'-IACYATCATGGCITARAGYGAGGT-3'
HCV NS5B in R	5'-ACCTTGTCATAGCCTCGGTGAA-3'
Генотип 1a	
HCV NS3 out F	5'-CCRRATGGAGACCAAGTTCATYACGT-3'
HCV NS3 out R	5'-TCNGTDGTRTGGCACTCRTCACA-3'
HCV NS5A out F	5'-GTTGGGCCGGGCGAGG-3'
HCV NS5A out R	5'-CGCCCATCTCCTGCCTGCA-3'
HCV NS3 in F	5'-GCRTGYCGBGACATCATYAACGG-3'
HCV NS3 in R	5'-CAVCCRCCRTCRGCNACGAACTTG-3'
HCV NS5A in F	5'-TCCCCCACGCACTACGTG-3'
HCV NS5A in R	5'-GTGCAAGTGGCCTTGAGAG-3'
Генотип 1b	
HCV NS3 out F	5'-GAYATGGAGAYYAAGRTCATYACCTGG-3'
HCV NS3 out R	5'-TCAAGCCGTCTCCGCTTGG-3'
HCV NS5A out F	5'-TGGATGAACCGGCTGATAG-3'
HCV NS5A out R	5'-CCACAGGAGRTTGGCCTC-3'
HCV NS3 in F	5'-GCRGCRTGYGCGGACATCAT-3'
HCV NS3 in R	5'-CCARGACYGTGCCRATGCCCA-3'
HCV NS5A in F	5'-TCCCCCACGCACTAYGTG-3'
HCV NS5A in R	5'-CTRGCYGARGAGCTGGCC-3'
Генотип 2	
HCV NS3 out F	5'-CTCACMCCTATGTCGGAYTGGGC-3'
HCV NS3 out R	5'-CCATCGGCGAGRAATTTGCCATAYGGGGA-3'
HCV NS5A out F	5'-GCGGTCCAGTGGATGAACAG-3'
HCV NS5A out R	5'-ACTCRATCCGGGTCACRTC-3'
HCV NS3 in F	5'-ATGGAGAAGAACGTCATCGTCTGGGG-3'
HCV NS3 in R	5'-GTCCTAATGTTGGGATTGATGCCATGTGC-3'
HCV NS5A in F	5'-CACTACGTGRCRGAGTNTG-3'
HCV NS5A in R	5'-GCTGGCTYGCTGARGAGC-3'
Генотип 3a	
HCV NS3 out F	5'-GAYCACCTAGCRCCAATGCAACA-3'
HCV NS3 out R	5'-TAGGTGGARTAGGGCAGTTTRGCACCAGTTG-3'
HCV NS5A out F	5'-TGGATGAACAGGCTCATYGC-3'
HCV NS5A out R	5'-ATGTTRCTGCCCATCTCTTG-3'
HCV NS3 in F	5'-GCCACTGAACCTGTAATATTTAGTCCCATGG-3'
HCV NS3 in R	5'-GTGCGGTTCGCAGTGCGGA-3'
HCV NS5A in F	5'-GTYCCCGAGAGCGATGCYGC-3'
HCV NS5A in R	5'-AGTTGGCTGGRGACGAGCTYGC-3'

Примечание. Out – праймеры, используемые на первом этапе ПЦР, in – праймеры, используемые на 2-м этапе ПЦР.

Для определения мутаций резистентности в регионах *NS3, NS5A, NS5B* ВГС использована разработанная методика на основе двухэтапной ПЦР: продукт амплификации кодируемых регионами белков, а именно NS3 область 3312-4341 нт, NS5A область 6129-6949 нт, NS5B область 8007-8634 нт, получали методом «гнездовой» (nested) ПЦР с использованием на каждом этапе пары праймеров в зависимости от определённого ранее генотипа ВГС.

На первом этапе проводили ПЦР с использованием 10 пмоль/л прямого и 10 пмоль/л обратного праймеров HCV NS3 out (1a, 1b, 2, 3a), HCV NS5A out (1a, 1b, 2, 3a), HCV NS5B out (1a, 1b, 2, 3a) представленных в табл. 1. На втором этапе для повышения чувствительности проводили второй этап ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних праймеров для трёх регионов вируса - так же по 10 пмоль/л каждого.

Далее следовал этап очищения продуктов амплификации методом спиртового осаждения в присутствии ацетата натрия, для чего смесь из 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 0,125М EDTA и 1 мкл гликогена вносили в 20 мкл продукта амплификации и инкубировали при комнатной температуре в присутствии охлаждённого 96% этилового спирта 15 минут. Центрифугировали при 14 тыс. об/мин, 4 ^{0}C 15 минут, супернатант удаляли и дважды промывали осадок охлажденным 70% этиловым спиртом, повторяя процедуру центрифугирования

на холоде. Промытый осадок сушили.

Для анализа качества очищения продуктов амплификации осадок растворяли в 30 мкл ТЕ-буфера и визуализировали в агарозном геле. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на флюориметре Qubit 2.0 по стандартной методике, рекомендованной производителем.

Очищенный фрагмент с концентрацией 50-100 нг в зависимости от нуклеотидного состава анализируемого участка использован для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров для каждой пары праймеров второго этапа ПЦР для каждого образца.

Для постановки секвенирующей реакции использован набор реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя. Для этого готовили смесь следующего состава: матрица 0,2-8,0 мкл, праймер для секвенирования 3,0 мкл (концентрация 1,6 пмол/мкл), ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Kit 8 мкл, деионизированная вода до конечного объёма смеси 20 мкл. Секвенирующую реакцию проводили при условиях: устанавливали 25 циклов амплификации в режиме: 96 ^{0}C - 10 секунд, 50 ^{0}C - 5 с, 60 ^{0}C - 4 минуты. Продукты секвенирующей реакции очищали с использованием вышеприведенных методов, очищенный осадок растворяли в формамиде и помещали в генетический анализатор ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проведён с помощью программы NCBI Blast в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank нуклеотидными последовательностями референсных образцов. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проведено в программе MEGA версия 11, применяя алгоритм ClustalW [22]. Для определения МЛУ ВГС к ППП Д использовано ПО Geno2pheno HCV resistance [23].

Результаты. Для выявления МЛУ ВГС разработан способ детекции значимых нуклеотидных замен в генах-мишенях на базе методики выявления мутаций резистентности в регионах *NS3, NS5A, NS5B,* основанной на ПЦР, представленный в коммерческих наборах DeepChek® Assay-HCV NS3, DeepChek® Assay-HCV NS5A, DeepChek® Assay-HCV NS5B (RUO) (Люксембург). Принцип тестирования основан на секвенировании по Сенгеру предварительно полученных продуктов амплификации белков-мишеней. Данный метод позволяет выявить значимые нуклеотидые замены к ППП Д в трёх регионах ВГС 1-6 генотипов. Для образцов ВГС генотипа 2 необходимо использование другого набора реагентов DeepChek® Assay-HCV NS5A (GT2). Недостатком метода является отсутствие возможности выявления МЛУ одновременно во всех трёх генах-мишенях для генотипов 1, 2, 3.

Аналитическую чувствительность разработанного метода проверяли путём поэтапного разведения. Определены 10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГС. Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГС (чистой плазмой) до десятикратного последовательного разведения (табл. 2).

После разведения осуществляли экстракцию РНК из каждого пула разведения каждого образца с помощью коммерческой тест-системы. После получения кДНК образцы амплифицировали, согласно предложенному методу. Результаты выявления вируса в пулах разведения представлены в табл. 3.

Таблица 2

Вирусная нагрузка использованных в оценке аналитической чувствительности образцов в разведениях

Образец	МЕ/мл образца	МЕ/мл пул 1	МЕ/мл пул 2	МЕ/мл пул 3	МЕ/мл пул 4	МЕ/мл пул 5	МЕ/мл пул 6	МЕ/мл пул 7	МЕ/мл пул 8	МЕ/мл пул 9
1	$32*10^7$	$16*10^7$	**$8,5*10^7$**	$4,2*10^7$	$2,1*10^7$	$1,2*10^6$	$5,3*10^6$	$3,1*10^6$	$1,6*10^6$	$7,8*10^5$
2	$65*10^6$	$32,5*10^6$	$16,3*10^6$	$8,2*10^6$	**$4,1*10^6$**	$2,1*10^6$	$1,1*10^6$	$5,2*10^5$	$2,6*10^5$	$1,3*10^5$
3	$13*10^6$	$6,8*10^6$	$3,4*10^6$	**$1,7*10^6$**	$8,5*10^5$	**$4,3*10^5$**	$2,2*10^5$	$11*10^4$	$5,5*10^4$	$2,8*10^4$
4	$37*10^5$	$18,5*10^5$	$9,3*10^5$	$4,7*10^5$	**$2,4*10^5$**	$1,2*10^5$	$6*10^4$	$3,1*10^4$	$2,5*10^4$	$1,3*10^4$
5	$12*10^5$	$6*10^5$	$3,1*10^5$	$2,6*10^5$	$13*10^4$	**$6,5*10^4$**	$3,3*10^4$	$1,7*10^4$	$8,5*10^3$	$4,3*10^3$
6	$41*10^4$	$20,5*10^4$	$10,3*10^4$	$5,1*10^4$	**$2,6*10^4$**	$1,3*10^4$	$6,5*10^3$	$3,3*10^3$	$1,6*10^3$	$8*10^2$
7	$22*10^4$	$11*10^4$	$5,5*10^4$	$2,8*10^4$	$1,4*10^4$	**$7*10^3$**	$3,5*10^3$	**$1,5*10^3$**	$9*10^2$	$4,5*10^2$
8	$74*10^3$	$37*10^3$	$18,5*10^3$	$9,3*10^3$	$4,6*10^3$	**$2*10^3$**	**$1,2*10^3$**	$6*10^2$	$3*10^2$	$1,5*10^2$
9	$12*10^3$	$6,1*10^3$	**$3*10^3$**	**$1,8*10^3$**	$7,5*10^2$	$3,8*10^2$	$2*10^2$	95	48	24
10	$11*10^2$	$5,5*10^2$	**$1,9*10^2$**	$1,2*10^2$	60	30	15	7,5	3,8	1,9

Примечание. Жирным шрифтом выделено - вирусную нагрузку в пулах анализировали выборочно.

На основании анализа данных выявлено, что необходимая вирусная нагрузка для проведения секвенирующей реакции и получения нуклеотидной последовательности искомых фрагментов генома для определения МЛУ составляет $1,5x10^3$ МЕ/мл и более.

Аналитическую специфичность метода проверяли методом «слепого» анализа пула предварительно охарактеризованных коммерческими тест-системами ВГС-позитивных и ВГС-негативных образцов плазмы крови, а так же исследованием образцов ДНК/кДНК вируса гепатита А, вируса гепатита D, вируса гепатита В, вируса гепатита Е, вируса гепатита G, вируса иммунодефицита человека, вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вируса герпеса 6 и 8 типов, парвовируса B_{19}, вируса клещевого энцефалита. Проанализированы 218 образцов плазмы крови условно-здоровых лиц, проживающих на территории Санкт-Петербурга, методом амплификации региона *NS5B*, что не требовало предварительного определения генотипа вируса. В обследованной группе кДНК ВГС выявлена в 7/7 случаев,

подтверждённых в дальнейшем прямым секвенированием фрагментов генома. В пулах, содержащих геномную ДНК/кДНК схожих по структуре вирусов, перечисленных выше, неспецифических реакций не выявлено. Сравнительный анализ специфичности метода выявления МЛУ ВГС к ППП показал его высокую специфичность.

Таблица 3

Выявление регионов NS3, NS5A, NS5B ВГС в пулах разведения в соответствии с таблицей 2

Образец	Без разведения	Пул 1	Пул 2	Пул 3	Пул 4	Пул 5	Пул 6	Пул 7	Пул 8	Пул 9
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. «+» - образец, визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле, «-» - образец, визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле. Для «+» образцов возможно дальнейшее секвенирование.

Генотипическую специфичность метода проверяли путём получения продуктов амплификации регионов *NS3, NS5A, NS5B* наиболее распространённых в РФ генотипов ВГС (1, 2, 3). Проведён «слепой» анализ, для чего пробирки с ВГС-негативными образцами объединяли с пробирками, содержащими ВГС-позитивную плазму крови больных с известными генотипами вируса, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Определены 10 образцов плазмы крови разных генотипов ВГС удовлетворительной вирусной нагрузки для дальнейшего секвенирования ($1{,}5x10^3$ МЕ/мл и более). Список образцов представлен в табл. 4.

Таблица 4

Образцы для определения генотипической специфичности метода

№ образца	Генотип ВГС
1	1a
2	1b
3	3a
4	2
5	1a
6	1b
7	3a
8	2
9	1b
10	3a

На основании анализа полученных данных выявлено, что для определения нуклеотидных последовательностей региона *NS5B* достаточно двух неспецифических для всех генотипов пар олигонуклеотидных праймеров. Для определения нуклеотидных последовательностей регионов *NS3, NS5A* разных генотипов, напротив, необходимо использование набора праймеров, специфичных для каждого отдельного генотипа.

В качестве примера оценки чувствительности на гель-электрофорезе на рисунке представлена фотография электрофореза продуктов амплификации второго этапа региона NS3 последовательных разведений образца № 7, вирусная нагрузка $22*10^4$ МЕ/мл. Остальные регионы выглядят аналогично представленному на рисунке.

Продукты амплификации седьмого разведения (предположительно около 1500 МЕ/мл) видны слабо, однако концентрации продукта достаточно для проведения секвенирующей реакции и получения нуклеотидных последовательностей искомых фрагментов генома.

Негатив фотографии электрофореграммы продуктов амплификации второго этапа ПЦР региона NS3 (последовательное разведение образца № 7, вирусная нагрузка $22*10^4$ МЕ/мл.)

Обсуждение. Для оптимизации терапии ВГС использование методов генотипирования и поиска мутаций лекарственной устойчивости, основанных на одном участке генома, представляется нецелесообразным. В настоящий момент известны не все аминокислотные замены, приводящие к фармакорезистентности к определённым группам препаратов, но данные о таких мутациях накапливаются, новые идентифицированные варианты пополняют список значимых замен.

Связано это с тем, что, хотя высокая генетическая гетерогенность характерна для всех РНК-вирусов, включая ВГС, вопрос о часто встречающихся полиморфных вариантах, которые потенциально могут быть причиной снижения чувствительности или полной устойчивости к некоторым препаратам, до конца не изучен. Оценка гетерогенности нуклеотидных последовательностей фрагментов генома ВГС играет важную роль даже в тех случаях, когда МЛУ не выявлены, так как важен анализ природных полиморфных паттернов, потенциально способных оказаться МЛУ. В связи с появлением новых препаратов и новых схем лечения нельзя исключить, что частые замены, ранее не идентифицированные как связанные с устойчивостью, окажутся таковыми. Но и статистика результатов лечения ПППД продолжает обновляться. Вполне возможно, что снижение ответа или отсутствие ответа на существующие лекарства может быть связано с такими полиморфными вариантами. Замены, представляющие собой естественный полиморфизм для одного генотипа вируса, могут быть мутациями лекарственной устойчивости для другого генотипа. В связи с чем даже для назначения пангенотипических препаратов необходимо определение генотипа вируса, чтобы исключить наличие мутаций, которые потенциально могут вызвать снижение терапевтической эффективности у пациентов с данным генотипом. Способ взаимодействия этих мутаций с уже известными полиморфными вариантами, связанными с устойчивостью, может быть сложным. Теоретически возможно, что комбинации мутаций/полиморфизма могут обеспечить новый вариант резистентности, усилить существующую устойчивость или, напротив, повысить эффективность противовирусных препаратов. Некоторые полиморфные варианты на самом деле могут оказаться клинически значимыми, привести к будущей вирусной резистентности под влиянием терапии или других факторов, однако для понимания этого необходим постоянный мониторинг и сбор информации.

Описанный способ помогает решить эту проблему, способствуя совершенствованию мониторинга за ВГС-инфекцией. Использование метода позволило выявить мутации лекарственной устойчивости ВГС среди уязвимых групп пациентов, в том числе среди больных ХГС с прорывом заболевания на терапии ПППД и среди ВИЧ-инфицированных лиц. Среди больных ХГС, не получивших эффективного результата при лечении ПППД, МЛУ определены в 87% случаев. Выявленные нуклеотидные замены вели к устойчивости в отношении, по крайней мере одного из препаратов, входящих в схему терапии. Определены мутации резистентности к другим ингибиторам, которые могут быть использованы в качестве терапии резерва [19]. Использование представленного метода позволило определить высокий уровень распространённости устойчивости к противовирусным препаратам среди пациентов, раннее не принимавших ПППД (12%). Большинство клинически значимых замен обнаружены в регионе *NS3* вируса, попадающего в область интересов специалистов значительно реже, чем NS5B. Обнаружены мутации, связанные с устойчивостью к рибавирину, что является актуальной проблемой, так как из-за высокой стоимости и иных факторов, терапия ПППД не всегда доступна пациентам с ХГС [24].

Отдельного внимания заслуживает группа ВИЧ-инфицированных лиц, нередко коинфицированных ВГС. Среди коинфицированных ВГС лиц с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии, мутации лекарственной устойчивости ВГС определили у 16,6% пациентов – обнаруживали по крайней мере одну мутацию, связанную с устойчивостью к терапии ПППД, в каком-либо из трёх целевых регионов ВГС. У некоторых пациентов обнаружены мутации одновременно в двух регионах и даже во всех трёх регионах. У нескольких пациентов выявлена фармакорезистентность к препаратам, обусловленная наличием сразу двух мутаций в одном регионе, причём такая ситуация показана как в регионе NS3, так и в регионе NS5A. Ещё выше оказалась встречаемость МЛУ ВГС у лиц с впервые выявленной инфекцией ВИЧ, не получавших ранее терапии ни против ВИЧ, ни против ВГС. У 25% пациентов этой группы обнаружены замены, связанные с резистентностью. Мутации среди ВГС генотипа 1a представляли собой замены C316Y и N444D, среди ВГС генотипа 1b выявлены замены C316N, C451S, S556N/G. У пациентов с ВГС 3a выявлены образцы с мутацией D310N, которая не является в прямом смысле слова МЛУ, но ассоциирована с неблагоприятным прогнозом заболевания [21]. Это представляет собой дополнительное свидетельство необходимости обратить пристальное внимание на полиморфизм регионов *NS3, NS5A, NS5B* генома ВГС не только в целях поиска мутаций фармакорезистентности, но и для анализа возможной клинической значимости аминокислотных замен.

Хотя метод разработан с использованием в качестве базовых образцов штаммов ВГС, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области, применение его в качестве основы возможно и при исследовании образцов в других регионах. Метод позволил генотипировать изоляты ВГС, полученные от условно здоровых жителей Социалистической Республики Вьетнам [25].

Заключение. Разработанный способ выявления мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С к препаратам прямого противовирусного действия на основе технологии ПЦР позволяет определить резистентность вируса к новым препаратам в уязвимых группах населения, оценить гетерогенность анализируемых регионов вируса. Метод может быть использован перед назначением терапии ХГС, во время терапии при вирусологическом прорыве для определения оптимизированной стратегии первичного или повторного лечения.

ЛИТЕРАТУРА (ПП.1-3, 6, 9-13, 17-18, 22-25 СМ. REFERENCES)

4. 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.
5. Ивашкин В.Т., Чуланов В.П., Мамонова Н.А., Маевская М.В., Жаркова М.С., Тихонов И.Н и др. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Национального научного общества инфекционистов по диагностике и лечению хронического вирусного

гепатита С. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2023; 33(1):84-124. DOI: 10.22416/1382-4376-2023-33-1-84-124.
7. Хорькова Е.В., Лялина Л.В., Микаилова О.М., Ковеленов А.Ю., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э. и др. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за хроническими вирусными гепатитами В, С, D и гепатоцеллюлярной карциномой на региональном уровне. *Здоровье населения и среда обитания.* 2021; 29(8):76-84. DOI: 10.35627/2219-5238/2021-29-8-76-84.
8. Михайлов М.И., Ющук Н.Д., Малинникова Е.Ю. Кюрегян К.К., Исаева О.В., Знойко О.О. и др. Вирусные гепатиты – проблема общественного здоровья в Российской Федерации. *ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучение. Вестник высшей школы организации и управления здравоохранением.* 2018; 2(12): 20-9. DOI: 10.24411/2411-8621-2018-12002.
14. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата велпатасвир. Электронный ресурс. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=c9275dea-5954-42ea-97c1-cd9ae05ccfbe&t. (Дата обращения 01.02.2024).
15. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата даклатасвир. Электронный ресурс. ttp://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=de1dd06c-e526-4e30-b8d8-794c2ade02f9&t. (Дата обращения 01.02.2024).
16. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция к медицинскому применению препарата воксилапревир. Электронный ресурс. ttp://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=de1dd06c-e526-4e30-b8d8-794c2ade02f9&t (Дата обращения 01.02.2024).
19. Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Лялина Л.В., Ануфриева Е.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С среди пациентов с рецидивом заболевания на терапии препаратами прямого противовирусного действия. *ВИЧ инфекция и иммуносупрессии*. 2023; 15(4):86-93. DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93.
20. Кичатова В.С., Кюрегян К.К. Современный взгляд на резистентность к препаратам прямого противовирусного действия при лечении вирусного гепатита С. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8(2):64-71. DOI: 10.24411/2305-3496-2019-12009.
21. Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Boumbaly и др. 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.

REFERENCES

1. Van Nguyen D., Van Nguyen C., Bonsall D., Ngo T.T., Carrique-Mas J., Pham A.H. et al. Detection and Characterization of Homologues of Human Hepatitis Viruses and Pegiviruses in Rodents and Bats in Vietnam. *Viruses*. 2018; 10(3):102. DOI: 10.3390/v10030102.
2. Sinn D.H., Cho E.J., Kim J.H., Kim D.Y., Kim Y.J., Choi M.S. Current status and strategies for viral hepatitis control in Korea. *Clin. Mol. Hepatol.* 2017; 23(3):189-95. DOI: 10.3350/cmh.2017.0033.
3. Global Hepatitis Report. World Health Organization. - 2023. Web resource: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c (date of the application: 01.02.2024).
4. Mukomolov S.L., Levakova I.A. Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the russian federation in 1999-2009. *Infektsiya i immunitet*. 2011; 1(3):255-62. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262. (in Russian)
5. Ivashkin V.T., Chulanov V.P., Mamonova N.A., Maevskaya M.V., Zharkova M.S., Tikhonov I.N. et al. Clinical Practice Guidelines of the Russian Society for the Study of the Liver, the Russian Gastroenterological Association, the National Scientific Society of Infectious Disease Specialists for the Diagnosis and Treatment of Chronic Hepatitis C. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2023; 33(1):84-124. DOI: 10.22416/1382-4376-2023-33-1-84-124. (in Russian)
6. Forns X., García-Retortillo M., Serrano T., Feliu A., Suarez F., de la Mata M. et al. Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Journal of Hepatology.* 2003; 39:389-96. DOI: 10.1016/s0168-8278(03)00310-6.
7. Khorkova E.V., Lyalina L.V., Mikailova O.M., Kovelenov A.Yu., Ostankova Yu.V., Valutite D.E. et al. Current issues of epidemiological surveillance of chronic viral hepatitis B, C, D and hepatocellular carcinoma at the regional level. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2021; 29(8):76-84. DOI: 10.35627/2219-5238/2021-29-8-76-84. (in Russian)
8. Mikhaylov M.I., Yushchuk N.D., Malinnikova E. Yu., Kyuregyan K.K., Isaeva O.V., Znoyko O.O. et al. Viral hepatitis and public problem health problem in the Russian Federation. *ORGZDRAV: novosti, mneniya, obuchenie. Vestnik vysshej shkoly organizatsii i upravleniya zdravookhraneniem.* 2018; 2(12):20-9. DOI: 10.24411/2411-8621-2018-12002. (in Russian)
9. Zeuzem S., Hultcrantz R., Bourliere M. Goeser T., Marcellin P., Sanchez-Tapias J.,et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *Journal of hepatology*. 2004; 40: 993-9. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.02.007.
10. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R. Smith C., Marinos G., Gonçales F.L. Jr. et. al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The new England journal of medicine*. 2002; 47:975-82. DOI: 10.1056/NEJMoa020047.
11. Rossetti B., Paglicci L., Di Maio V.C. Cassol C., Barbaliscia S., Paolucci S. et. al. Prevalence of resistance-associated substitutions to NS3, NS5A and NS5B inhibitors at DAA-failure in hepatitis C virus in Italy from 2015 to 2019. *Le infezioni in medicina*.2021; 29(2):242-51. PMID: 34061790.
12. Campos Fernandes G.R., Ward J., Chen S., Bittar C., Rodrigues J.P., Martineli A. L. C. et al. A novel substitution in NS5A enhances the resistance of hepatitis C virus genotype 3 to daclatasvir. *Journal General Virology.* 2021; 102(1): 1-7. DOI: 10.1099/jgv.0.001496.
13. Younas S., Sumrin A., Hussain N., Bilal M. Identification of NS5B resistance against Sofosbuvir in hepatitis C virus genotype 3a, naive and treated patients. *Journal of microbiology.* 2022; 133(5):2826-34. DOI: 10.1111/jam.15754.
14. State register of medicines. Instructions for medical use of the medicine velpatasvir. [Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv. Instruktsiya k meditsinskomu primeneniyu preparata velpatasvir]. Web resource: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=c9275dea-5954-42ea-97c1-cd9ae05ccfbe&t (date of the application 01.02.2024). (in Russian)
15. State register of medicines. Instructions for medical use of the medicine daclatasvir. [Gosudarstvennyj reestr lekarstvennykh sredstv. Instruktsija k meditsinskomu primeneniyu preparata daclatasvir]. Web resource ttp://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=de1dd06c-e526-4e30-b8d8-794c2ade02f9&t (date of the application 01.02.2024). (in Russian)
16. State register of medicines. Instructions for medical use of the medicine voxilaprevir. [Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv. Instruktsiya k meditsinskomu primeneniyu preparata voxilaprevir]. Web resource. ttp://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=de1dd06c-e526-4e30-b8d8-794c2ade02f9&t (date of the application 01.02.2024). (in Russian)
17. Jordan Feld J. Resistance testing: Interpretation and incorporation into HCV treatment algorithms. *Clinical Liver Disease*. 2017; 9(5):115-20. DOI: 10.1002/cld.631.
18. Moraes L.N., Grotto R.M., Valente G.T., Sampaio H., Magro A.J., Fogaça L. et. al. A novel molecular mechanism to explain mutations of the HCV protease associated with resistance against covalently bound inhibitors. *Virus Research*. 2019; 274: 168-72. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.197778.
19. Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Lyalina L.V., Anufrieva E.V., Semenov A.V., Totolian A. A. Distribution of hepatitis C virus drug resistance mutations among patients with recurrence of the disease during therapy with direct antiviral drugs. *VICh infektsiya i immunosupressii*. 2023; 15(4):86-93. DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93. (in Russian)
20. Kichatova V.S., Kuregyan K.K. Modern view on resistance to direct antiviral drugs in the treatment of viral hepatitis C: analytical review. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2019; 8(2): 64-71. DOI: 10.24411/2305-3496-2019-12009. (in Russian)

21. Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Zueva E.B., Serikova E.N., Shchemelev A.N., Boumbaly S. et al. Primary HCV Drug Resistance Mutations in Patients with Newly Diagnosed HIV Infection. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2020; (3):97-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-97-105. (in Russian)
22. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol*. 2021; 38(7): 3022-7. DOI: 10.1093/molbev/msab120.
23. Kalaghatgi P., Sikorski A.M., Knops E., Rupp D., Sierra S., Heger E. et al. Geno2pheno[HCV] - A Web-based interpretation system to support hepatitis C treatment decisions in the Era of direct-acting antiviral agents. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0155869. Web resource: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0155869 (date of the application: 04.02.2024).
24. Valutite D., Ostankova Y., Semenov A., Lyalina L., Totolian A. Distribution of primary resistance mutations in Saint Petersburg in patients with chronic hepatitis C. *Diagnostics*. 2022; 12(5):1054-67. DOI:10.3390/diagnostics12051054.
25. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Serikova E. N., Shemelev A. N., Valutite D.E. et al. The prevalence of hepatitis B and C virus's markers among conditionally healthy residents of the Socialist Republic of Vietnam (Southern Vietnam). *Infektsiya i immunitet*. 2021; 11(6):1131-40. DOI: 10.15789/2220-7619-TPO-1793. (in Russian)