Использование современных молекулярно-генетических методов в изучении генетического разнообразия штаммов гепатита В на территории г. Хабаровска

В.О. Котова¹ (adm@hniiem.ru), Л.А. Балахонцева¹,
Е.Ю. Сапега¹, О.Е. Троценко¹, Т.А. Зайцева²

¹ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора

²Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю

Резюме

Проведенный молекулярно-генетический анализ 28 образцов сыворотки/плазмы крови больных хроническим гепатитом В, проживающих на территории г. Хабаровска, показал преобладание генотипа D, доля которого среди обследованных составила 71,4%. Доля генотипов А и С составила 10,7 и 17,9% соответственно.

Ключевые слова: вирус гепатита В, генотип, субгенотип, субтип

Use of Modern molecular Genetic Methods to Study Genetic Diversity of Hepatitis B Strains on the Territory of Khabarovsk City

V.O. Kotova¹ (adm@hniiem.ru), L.A. Balahotseva¹, E. Yu. Saepaga¹, O.E. Trotsenko¹, T.A. Zaitseva²

¹Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Customer's Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²Territorial Service on Customer's Rights Protection and Human Well-Being Surveillance of Khabarovsk Region

Abstract

A molecular genetic analysis of 23 samples of blood serum/plasma taken from patients with chronic hepatitis B was performed. The dominant genotype among studied group was genotype D (71.4%); the rate of genotype A and genotype C was 10.7 and 17.9%, respectively.

Key words: viral hepatitis B, genotype, subgenotype, subtype

В настоящее время гепатит В (ГВ) продолжает сохранять свою актуальность и является одной из социально-значимых инфекций в Российской Федерации. В мире живет не менее 370 млн людей с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (ВГВ) [1]. Одним из ведущих аспектов проблемы ГВ – генетическая вариабельность возбудителя этого заболевания, которая обуславливает, в ряде случаев, недостаточную эффективность вакцинации, серологической диагностики, а также лечения противовирусными препаратами.

На территории Российской Федерации, несмотря на снижение заболеваемости острыми формами гепатита В, благодаря проведению иммунизации в рамках Национального приоритетного проекта в сфере здравоохранения продолжают регистрироваться стабильно высокие уровни заболеваемости впервые выявленными хроническими формами гепатита В (ХГВ). В 2014 году отмечалось незначительное (на 0,9%) снижение заболеваемости ХГВ (50,95 на 100 тыс. населения) по сравнению с 2013 годом (51,39 на 100 тыс. населения) и на 2,4% по сравнению с 2012 годом (52,22 на 100 тыс. населения). Однако с 2005 по 2014 год показатель заболеваемости ХГВ увеличился на 6,8% (с 47,5 до 50,9 на 100 тыс. населения) [2].

С 2010 по 2014 годы заболеваемость населения Хабаровского края острыми гепатитами колебалась: 7,6 на 100 тыс. населения в 2010 году, 11,4 – в 2011, 3,9 – в 2012 году, 6,5 – в 2013, 8,4 на 100 тыс. населения – в 2014 году. В этот же период число случаев острого гепатита В (ОГВ) ежегодно снижалось – с 2,1 на 100 тыс. населения в 2010 году до 0,34 – в 2014 году.

Хроническая форма гепатита В, в отличие от ОГВ, характеризуется более широкой распространенностью. Так, заболеваемость населения г. Хабаровска ХГВ в 2010 – 2014 годах (9,4 на 100 тыс. населения в 2014 г., 21,5 – в 2011 г.) в среднем более чем в 10 раз превышала таковую ОГВ.

Одновременно с этим, динамика заболеваемости ХГВ, как ОГВ имела тенденцию к снижению с 2010 по 2014 год.

Использование современных молекулярно-генетических методов исследования позволило получить новые данные о биологических особенностях возбудителя ВГВ. Активное изучение генетического разнообразия вируса гепатита В началось в конце 1980-х годов, после того, как была установлена структура генотипов А, В, С и D [3].

На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей полного генома ви-

руса гепатита В выделяют восемь основных генотипов ВГВ, обозначаемых буквами от А до Н которые имеют отличия в структуре генома не менее чем на 8% [4, 5]. Дальнейшее таксономическое дробление предусматривает деление генотипов на субгенотипы, имеющие более 4, но менее 8% различий в структуре генома [6]. Генотипы Е, G и Н не имеют субгенотипов.

Миграционная обстановка в Российской Федерации характеризуется постоянно возрастающим потоком различных категорий мигрантов, приезжающих в основном в крупные города, как из регионов страны, так и из-за рубежа. Постоянный мониторинг циркуляции генотипов вируса гепатита В на территории РФ позволит выявлять завозные случаи заболевания.

Цель работы – определить распространенность генотипов и субгенотипов ВГВ, циркулирующих на территории г. Хабаровска.

Материалы и методы

Было исследовано 28 образцов сыворотки/плазмы крови больных хроническим гепатитом В, проживающих на территории г. Хабаровска.

Выявление ДНК ВГВ с целью последующего генотипирования проводили методом двухступенчатой ПЦР с вложенными праймерами к участкам S и Р генома ВГВ. Для определения нуклеотидной последовательности анализируемых фрагментов вирусных геномов осуществляли прямое секвенирование ампликонов на ДНК-анализаторе модели 3500 (Applied Biosystems/Life Technologies, США).

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей делали с помощью программы MEGA 6.0. Поиск прототипных штаммов во всемирной базе генетических данных GenBank осуществлялся с помощью онлайн-программы BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Для расчета генетических расстояний между нуклеотидными последовательностями были использованы эволюционные модели Kimura, Tajima-Nei, Tamura-Nei [7]. Построение филогенетических деревьев проводилось с помощью методов: «Neighbour-joining» («присоединение соседей»), «Maximumlikelihood» («максимальное правдоподобие») и «Bootstrapanalysis» (статистическая оценка дерева, метод повторных выборок).

Результаты и обсуждение.

Проведенный филогенетический анализ части S-региона генома ВГВ показал, что на территории г. Хабаровска по-прежнему доминирующим остается D генотип, на который в настоящем исследовании приходилось 20 проб (71,4% всех случаев). Генотип А был выявлен в 3 (10,7%), С генотип – в 5 (17,9%) образцах.

На филограмме полученные нами штаммы ВГВ генотипа D и штаммы, полученные из GenBank, разделились на три отдельные монофилетические группы, отличающиеся между собой по субгенотипам: D1, D2 и D3 (рис. 1).

Внутри группы субгенотипа D2 штаммы образовали подгруппы по серотипам – две ауw3 и одна ауw4. В одну из подгрупп серотипа ауw3, кроме выделенных нами штаммов, вошли штаммы, изолированные с 2005 по 2009 год от больных гепатитом В из европейских стран и Колумбии, а другая представлена штаммами от больных ХГВ г. Хабаровска, и штаммами от больных из Новой Каледонии, Мадагаскара и России, зарегистрированными в 2001, 2002 и 2010 годах соответственно. Подгруппу серотипа ауw4 сформировали штаммы от больных ХГВ из г. Хабаровска, их возможными предшественниками были штаммы, изолированные в Италии в 2008 и 2012 годах. Два штамма совместно со штаммами из России (2005 г.) и Ирана (2012 г.) составили единую монофилетическую группу, относящуюся к субгенотипу D3 и серотипу ауw2.

На филогенетическом дереве один из типированных нами штаммов, принадлежавших к субгенотипу D1, образовал отдельную ветвь и генетически близких ему штаммов не выявлено.

Полученные нами штаммы ВГВ генотипа А имели большее генетическое сходство со штаммами субгенотипа А2 и серотипа адw2.

К генотипу С ВГВ были отнесены пять из типированных нами штаммов, которые в результате проведенного анализа оказались идентичными субгенотипу С2 и серотипу адrq+. На филогенетическом дереве три из них составили единую группу совместно со штаммами, выделенными в Китае в 2003, 2008, 2012 годах и Индонезии в 2009 году.

Проведенный нами филогенетический анализ штаммов вируса гепатита В, циркулирующих среди больных ХГВ, проживающих в г. Хабаровске, показал генетическое их разнообразие по генотипам, субгенотипам и серотипам. Наиболее распространен генотип ВГВ – генотип D, представленный тремя субгенотипами D1, D2, D3. Генотипы А и С представлены только субгенотипами А2 и С2. Полученные в г. Хабаровске данные о генотипах ВГВ и его субгенотипах соответствуют другим исследованиям, проведенным ранее на территории РФ [8, 9].

Выводы

1. Установлено, что в г. Хабаровске циркулируют изоляты трех генотипов ВГВ: А, С и D, при этом доминирующим является генотип D, который представлен тремя субгенотипами D1, D2, D3. Доля генотипа D – 71,4%, генотипов А и С – 10,7 и 17,9% соответственно.
2. Использование молекулярно-генетических методов исследования в системе эпидемиологического надзора за гепатитом В позволит повысить качество эпидемиологической диагностики при обследовании эпидемических очагов за счет более точного установления связи случаев заболевания, идентификации источника возбудителя инфекции, определения путей и факторов передачи, а также выявить завозные случаи заболевания.

Рисунок 1.
Филогенетическое дерево изолятов ВГВ от больных ХГВ г.Хабаровска

Примечание: Исследуемые в работе штаммы выделены жирным шрифтом

Литература

1. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J. Hepatol, 2012; 57 (1):167 – 185.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015: 113.
3. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosowignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J. Gen. Virol. 1988; 83 (20): 10538 – 10547.
4. Kramvis A., Kew M., Francois G. Hepatitis B virus genotypes. Vaccine, 2005; 23: 2409 – 2423.
5. Miykawa A., Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. Intervirology, 2003; 46: 329 – 338.
6. Norder H., Courouze A.-M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K., Robertson B.H. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology, 2004; 47 (6): 280 – 309.
7. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. molecular biology and evolution, 2013; 30: 2725 – 2729.
8. Неверов А.Д., Карандашова И.В., Лебедева Е.Б., Браславская С.И., Якупова Ф.М., Чуланов В.П. Разработка алгоритма анализа эпидемиологической связи случаев вирусного гепатита В (ВГВ) с использованием молекулярно-биологических методов. Молекулярная диагностика. 2014; 1: 257 – 260.
9. Неверов А.Д., Карандашова И.В., Долгин В.А., Михайловская Г.В., Пименов Н.Н., Браславская и др.. Генетическое разнообразие вируса гепатита В на территории Российской Федерации. Молекулярная диагностика. 2014; 1: 269 – 273.

References

1. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J. Hepatol., 2012; 57 (1):167 – 185.
2. On the state sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2014: State Report. Moscow: Federal Service for Supervision on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2015: 113 (in Russian).
3. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosowignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J. Gen. Virol, 1988; 83 (20): 10538 – 10547.
4. Kramvis A., Kew M., Francois G. Hepatitis B virus genotypes. Vaccine, 2005; 23: 2409–2423.
5. Miykawa A., Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. Intervirology, 2003; 46: 329 – 338.
6. Norder H., Courouze A.-M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology, 2004; 47 (6): 280 – 309.
7. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. molecular biology and evolution, 2013; 30: 2725 – 2729.
8. Neverov A.D., Karandashova I.V., Lebedeva E.B., Braslavskaja S.I., Jakupova F.M., Chulanov V.P. Development of an epidemiological link analysis algorithm of cases of hepatitis B (HBV), using molecular biological techniques. Molecular Diagnostics. 2010; 1: 257 – 260 (in Russian).
9. Neverov A.D., Karandashova I.V., Dolgin V.A., Mihajlovskaja G.V., Pimenov N.N., Braslavskaja S.I. et al. The genetic diversity of hepatitis B virus in the territory of the Russian Federation. Molecular Diagnostics 2010; 1: 269 – 273 (in Russian).