

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Останкова Ю.В.¹, Семёнов А.В.^{1,2,3}, Зуева Е.Б.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}***ВЫЯВЛЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В АРХАНГЕЛЬСКЕ**¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197101, г. Санкт-Петербург, Россия;²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия;³ФГБОУ ВО «Северо-Западный Государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Россия

Цель – оценить распространённость и охарактеризовать вирус гепатита В (ВГВ) среди ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии (АРВТ) в Архангельске. **Материал и методы.** В работе были использованы образцы плазмы крови 64 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ (вирусная нагрузка >50 МЕ/мл после 6 мес АРВТ или повышение вирусной нагрузки после первичного подавления репликации вируса). Для первичного выявления ВГВ экстракцию ДНК из плазмы крови осуществляли с использованием коммерческого набора «АмплиПрим Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Вирус выявляли методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). В дальнейшем использовали разработанную во ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методику, позволяющую выявлять ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке. **Результаты.** HBsAg-негативный (оккультный) ГВ был выявлен у 28 (43,8%) ВИЧ-инфицированных пациентов. Обнаружен только ВГВ генотипа D, при этом ВГВ субгенотипа D1 преобладал (39,3%) по сравнению с ВГВ субгенотипов D2 (32,1%) и D3 (28,6%). Серологические маркеры были обнаружены у 42,8% пациентов с выявленной ДНК ВГВ. Выявлены 2 изолята ВГВ с мутациями лекарственной устойчивости в гене полимеразы, приводящими к замещению аминокислот (L180M, M204V), связанному с развитием резистентности к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру. **Заключение.** Высокая распространённость оккультного (HBsAg-негативного) ВГВ среди ВИЧ-инфицированных пациентов свидетельствует о необходимости использования молекулярно-биологических методов диагностики как для идентификации ВГВ, так и для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВГВ перед началом антиретровирусной терапии ВИЧ.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В; генотип ВГВ; молекулярная эпидемиология; коинфекция ВИЧ + ВГВ.

Для цитирования: Останкова Ю.В., Семёнов А.В., Зуева Е.Б., Тотолян Арег А. Выявление и молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных пациентов в Архангельске. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3): 105-111.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-105-111>*Ostankova Yu.V.¹, Semenov A.V.^{1,2,3}, Zueva E.B.¹, Totolian Areg A.^{1,2}***IDENTIFICATION AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF THE HEPATITIS B VIRUS AMONG HIV-INFECTED PATIENTS IN ARKHANGELSK**¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation;²Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I.P. Pavlov, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation;³North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, 191015, Russian Federation

Aim. To estimate the prevalence and characterize the hepatitis B virus among HIV-infected patients with virological failure of antiretroviral therapy in Arkhangelsk. **Material and methods.** HBV markers determinations (HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBcor IgG, DNA HBV) were performed in isolates from blood plasma samples 64 HIV-infected patients with virological failure of antiretroviral therapy (viral load >50 IU / ml after 6 months of antiretroviral therapy or an increase in viral load after primary suppression of viral replication). For the detection of the hepatitis B virus, nucleic acids were isolated using the commercial kit «AmplePrime Ribo-prep». The virus presence analysis was performing by the polymerase chain reaction (PCR) method with hybridization-fluorescence detection in "real time" using the commercial set of «AmpliSens® HBV-FL». In the future, we used the method developed by the Saint-Petersburg Pasteur Institute, which allows detecting HBV in biological material with a low viral load. **Results.** HBsAg-negative (occult) HBV was detect in 28 (43.8%) HIV-infected patients. Only HBV genotype D was detected, and the HBV subgenotype D1 prevailed (39.3%) compared with the HBV subgenotype D2 (32.1%) and D3 (28.6%). Serological markers in 42.8% of patients with HBV DNA were founding. Two HBV isolates with drug resistance mutations in the polymerase gene, leaded to amino acid substitutions (L180M,

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 197101, г. Санкт-Петербург. E-mail: shenna1@yandex.ru

M204V) associated with the resistance development to lamivudine, entecavir, telbivudine and tenofovir were identifying. **Conclusion.** The occult (HBsAg-negative) HBV high prevalence among HIV-infected patients suggests the need to use molecular-biological diagnostic methods to identify HBV, as well as to analyze the HBV drug resistance mutation before starting antiretroviral therapy for HIV.

Keywords: chronic hepatitis B; HBV genotype; molecular epidemiology; coinfection HIV + HBV.

For citation: Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Zueva E. B., Totolian Areg A. Identification and molecular-genetic characteristics of the hepatitis B virus among HIV-infected patients in Arkhangelsk. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 105-111. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-105-111>

For correspondence: Yulia V. Ostankova, PhD, Researcher at the Laboratory of Molecular Immunology Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu. V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Semenov A. V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Zueva E. B. <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 29 January 2019

Accepted 02 April 2019

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) является одним из наиболее распространённых гепатотропных вирусов, способных приводить как к острым, так и к хроническим заболеваниям печени [1, 2]. При коинфекции ВГВ с другими возбудителями вирусных гепатитов возможны несколько сценариев развития событий, связанных с реципрокным ингибированием вирусной репликации. Так, ещё в 1998 г. было показано, что репликация ДНК ВГВ подавляет репликацию РНК вируса гепатита С (ВГС) у пациентов с активным хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) и С (ХВГС), но утяжеляет гистологические поражения. У больных с коинфекцией ХВГВ + ХВГС достоверно более высокий риск развития цирроза печени по сравнению с больными ХВГС, при этом уровень РНК ВГС у первых был значительно ниже, а гистологические повреждения серьёзнее и не зависели от способа заражения и длительности заболевания ХВГВ [3].

ВИЧ-инфекцию и парентеральные вирусные гепатиты, наряду с социально значимым характером заболевания, связывают также общность механизмов и путей заражения [4, 5]. Около 10% ВИЧ-инфицированных людей в мире коинфицированы ВГВ. Распространённость коинфекции ВИЧ + ВГВ характеризуется географической вариабельностью и зависит, главным образом, от преобладающих путей заражения. Так, не менее 3 млн людей, коинфицированных ВИЧ + ВГВ, живут в Африке [6]. Хотя влияние ВГВ-инфекции на прогрессирование ВИЧ-инфекции, по-видимому, минимально, ВИЧ-инфекция заметно влияет на прогрессирование фиброза печени и, следовательно, может увеличивать риск развития гепатоцеллюлярной карциномы и цирроза, ускоряя развитие этих серьёзных осложнений у пациентов с коинфекцией [7]. Например, в Танзании была показана значительно более высокая частота развития фиброза и цирроза печени у ВИЧ-инфицированных пациентов с коинфекцией ВГВ по сравнению с пациентами без ВГВ [8]. Недавно проведённый метаанализ результатов работ, в которых исследовали общие показатели смертности, продемонстрировал увеличение смертности среди ВИЧ-инфицированных пациентов, которые были коинфицированы ВГВ как до, так и после начала высокоактивной антиретровирусной терапии (АРВТ) [9].

R. Rajbhandari и соавт. исследовали образцы ткани печени: 72 584 с ВГВ, 133 880 с ВИЧ и 8156 с коинфекцией ВГВ+ВИЧ. Было показано, что коинфекция ВГВ + ВИЧ связана с более высокой смертностью по сравнению с ВГВ-моноконфекцией, а наличие ВГВ наряду с циррозом печени или осложнением портальной гипертензии ассоциировано с 3-кратным повышением риска госпитальной смертности у пациентов с ВИЧ-инфекцией по сравнению с пациентами без этих осложнений [10].

Актуальность изучения клинико-патоморфологических особенностей одновременного протекания вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции обусловлена их эпидемиологическим ростом, в том числе среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) у которых ВГС и ВГВ нередко сочетаются друг с другом и (или) с ВИЧ-инфекцией [11]. Основным фактором риска заражения при парентеральном применении наркотических веществ является контаминация иглы или шприца кровью в случае группового использования инструмента или применения стерильного (одноразового) шприца, когда раствор наркотика забирают из общей ёмкости [12]. Кроме того, инфицирование препарата заражённой кровью возможно в процессе его кустарного производства. Помимо парентерального пути, заражение может происходить при половых контактах ПИН.

Особой формой естественного течения ХВГВ является occultный ВГВ (ОкГВ), характеризующийся наличием ДНК ВГВ в гепатоцитах при отсутствии HBsAg в периферической крови и крайне низкой вирусной нагрузкой, вплоть до невозможности обнаружения ДНК вируса в крови [13].

Хотя коинфекция ВГВ и ВИЧ – распространённое явление, посвящённые этой проблеме исследования с использованием прежде всего молекулярно-биологических, а не серологических маркеров, сравнительно немногочисленны [14]. Проведённое в Центральной Бразилии исследование с участием ВИЧ-инфицированных пациентов, не подвергавшихся лечению, включало обследование на серологические маркеры и ДНК ВГВ. В целом 25,1% пациентов имели какие-либо маркеры инфицирования ВГВ, связанного с возрастом старше 40 лет, историей употребления инъекционных наркотиков и гомосексуализмом, при этом распространённость HBsAg-негативного ОкГВ составила 3,8%. Кроме того, у пациенты с ОкГВ обнару-

жен значительно более высокий уровень анти-ВГС по сравнению с HBsAg-положительными пациентами [15]. Сходные результаты были показаны при оценке встречаемости ОжГВ у ВИЧ-инфицированных африканских мигрантов в Великобритании, где распространённость ОжГВ составила 4,5% [16] и в Колумбии, где коинфекция ВИЧ + ВГВ составила 12% у ВИЧ-инфицированных пациентов, из них 3,3% имели активную инфекцию ВГВ и 8,7% – ОжГВ, при этом анализ нуклеотидных последовательностей выявил субгенотип F3 у 93,8% больных и генотип А у 6,2% больных [17].

Несколько чаще ОжГВ встречается в Нигерии: у 11,2% ВИЧ-инфицированных HBsAg-негативных пациентов, в то время как РНК ВГС была обнаружена только у 1,6%, при этом вирусная нагрузка ВГВ преимущественно была <50 копий/мл [18]. Еще более высокая встречаемость ОжГВ у ВИЧ-инфицированных HBsAg-негативных пациентов показана в Мексике (49%), при этом была показана связь выявления оккультного ВГВ с высоким уровнем РНК ВИЧ [19].

Из вышесказанного следует, что, несмотря на высокую значимость исследований коинфекции ВИЧ и ОжГВ, работы по этой теме сравнительно немногочисленны и противоречивы, что связано, по всей видимости, с различными методами и маркерами, используемыми для обнаружения ОжГВ [20]. Очевидно, что при использовании более чувствительных методов, в том числе специфических модификаций полимеразной цепной реакции (ПЦР), частота встречаемости ОжГВ в группах риска будет выше, чем при использовании более распространенных, но значительно менее чувствительных серологических маркерах.

Цель данной работы – оценить распространённость и охарактеризовать вирус гепатита В среди HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ в Архангельске.

Материал и методы

В работе были использованы образцы плазмы крови 64 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ (вирусная нагрузка >50 МЕ/мл после 6 мес АРВТ или повышение вирусной нагрузки после первичного подавления репликации вируса).

Для первичного выявления ВГВ экстрагировали ДНК из плазмы крови с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Для всех образцов проводили предварительное концентрирование вируса ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 ч при 24000g, +4 °С. Выявление вируса проводили методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва).

В дальнейшем использовали разработанную во ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методику, позволяющую выявлять ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке [21]. При этом на первом этапе проводили асимметричную ПЦР с использованием протяженных олигонуклеотидов – 3 пмоль/л прямого и 30 пмоль/л обратного праймеров. На втором этапе для повышения чувствительности проводили вторую ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних (вложенных, гнездовых) праймеров для 4 регионов ВГВ (гены S, P,

C, X) – по 15 пмоль/л каждого. Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопрайма, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (рН 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл. В составе амплификационной смеси для первого этапа дополнительно увеличивали концентрацию MgCl₂ (7,5 ммоль/л), включали формамид и глицерин в количестве 4 и 6% от конечного объема, соответственно, а для второго этапа в смесь добавляли формамид и DMSO в количестве 4 и 10% конечного объема соответственно. Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при 95 °С в течение 5 мин устанавливали 30–40 циклов амплификации в режиме: 95 °С – 20–40 с, 55–65 °С – 20–30 с, 72 °С – 30–90 с; затем финальная элонгация при 72 °С – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1×TBE), окрашенном бромистым этидием.

Для ПЦР с последующим секвенированием использовали перекрывающиеся пары праймеров, совместно фланкирующие фрагмент протяженностью 1475 пар оснований, включающий рекомендованную для генотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S протяженностью 1169 пар оснований область 2848–3182 ... 1–835 нуклеотид, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) [22]. Для выявления мутаций лекарственной устойчивости проводили секвенирование полной нуклеотидной последовательности гена полимеразы (Pol).

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), в 3 повторях, на прямых и обратных праймерах. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок денатурировали в формамиде и помещали в генетический анализатор «ABI Prism 3500» (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [23]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей (Neighbor-joining), позволяющим оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции», для оценки достоверности построенных деревьев проведён бутстреп для 500 повторов.

Результаты

Возраст пациентов в группе исследования варьировал от 19 до 58 лет и составил в среднем 38,6±10,8 года. Количество мужчин в группе преобладало по сравнению с женщинами: 67,2 и 32,8% соответственно.

В нашем исследовании в группе HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов при использовании коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) ДНК ВГВ выявить не удалось. При использовании предложенного нами метода [21] ВГВ

был выявлен у 28 (43,8%) пациентов. При дальнейшем секвенировании образцов была показана их генетическая индивидуальность, подтверждённая несопадением нуклеотидных последовательностей, что дополнительно свидетельствовало об истинности выявленных случаев ОжГВ.

Таким образом, большинство (51,5%) из 64 ВИЧ-инфицированных пациентов имели коинфекцию ВИЧ + ВГВ, ВИЧ + ВГС или ВИЧ + ВГВ + ВГС. Среди них ВИЧ + ВГС и ВИЧ + ВГВ + ВГС выявлены у 15,2% больных, а ВИЧ+ВГВ – у 84,8%.

Серологические маркеры были обнаружены у 42,9% пациентов с выявленной ДНК ВГВ, при этом в 7,1% случаев обнаружены антитела HBs IgG, в 14,3% случаев – антитела HBsAg IgG и в 21,4% случаев – одновременно антитела HBs IgG и HBsAg IgG. Таким образом, у 57,2% ВИЧ-инфицированных пациентов с ОжГВ ВГВ не мог быть обнаружен серологическими методами. При анализе встречаемости ВГВ в группе в зависимости от пола показали, что заражение чаще происходит у мужчин (53,5%), чем у женщин (23,8%), при этом относительный риск инфицирования ВГВ у лиц мужского пола достоверно выше, чем у женщин (RR=1,479, доверительный интервал 1,053–2,076, $p=0,0328$).

Для всех пациентов была проведена оценка количества CD4+. Достоверных различий при сравнительном анализе количества CD4+-клеток между ВИЧ-инфицированными пациентами с ВГВ и без него не выявлено. При анализе количества CD4+ клеток в зависимости от субгенотипа вируса достоверных различий не выявлено.

Для всех выявленных образцов была получена нуклеотидная последовательность Pre-S1/Pre-S2/S региона удовлетворительного качества, пригодная для дальнейшего анализа. Для всех образцов были определены генотип и субгенотип вируса.

На основании филогенетического анализа показано, что в группе исследования представлен только ВГВ генотипа D. Преобладал ВГВ субгенотипа D1, его встречаемость 39,3%, в то время как встречаемость ВГВ субгенотипов D2 и D3 составила 32,1 и 28,6% соответственно. Филогенетические отношения между исследованными изолятами ОжГВ, полученными от HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ из Архангельска и референсными последовательностями из международной базы данных GenBank представлены на рисунке.

Внутригрупповой процент нуклеотидной идентичности среди ВИЧ-инфицированных пациентов с ВГВ субгенотипов D1, D2 и D3 составил $98,25 \pm 0,8$; $99,3 \pm 0,31$ и $98,79 \pm 0,24$ соответственно.

У обследованных выявили 2 изолята (7,1%) ВГВ с мутациями, описанными в литературе, как определяющие развитие лекарственной устойчивости к терапии нуклеотидными/нуклеозидными аналогами – замещение аминокислот в гене полимеразы ВГВ (L180M, M204V), связанное с развитием резистентности к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру.

Нуклеотидные последовательности полных геномов исследованных в данной работе изолятов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MK618418–MK618445.

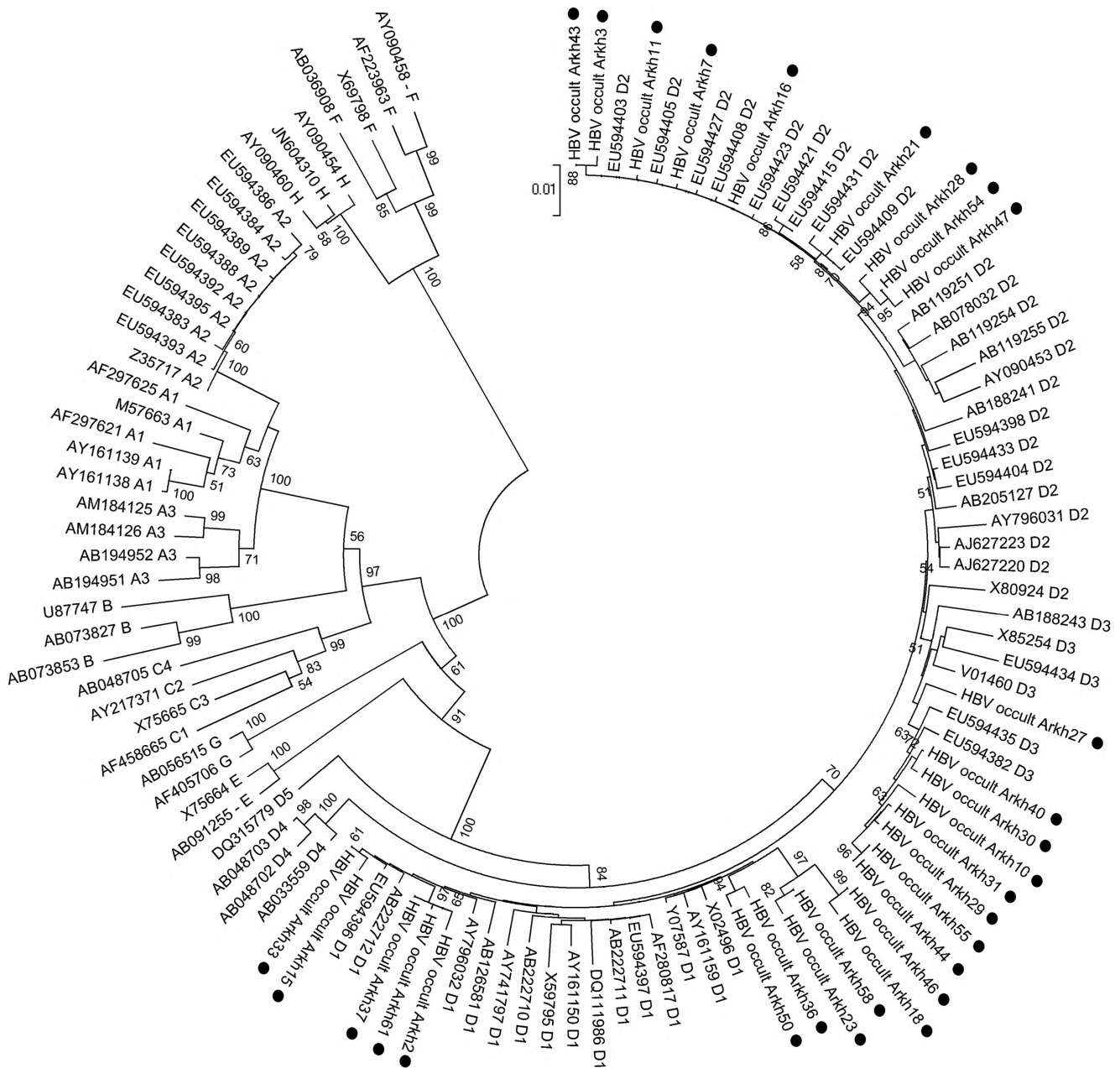
Обсуждение

Следует отметить, что полученные нами высокие показатели распространённости ОжГВ среди ВИЧ-

инфицированных пациентов сходны с данными из других стран. Так, частота коинфекции ВИЧ + ВГВ в Южной Африке составила 30%, в США – 34,7%, в Колумбии – 28,7–38,6%, в Бразилии 30–55,1%, во Франции – до 70% всех пациентов с ВИЧ-инфекцией. При этом распространённость моноинфекции ВГВ в некоторых из указанных регионов крайне невысока [17].

Вероятно, низкая встречаемость ВГВ в группах ВИЧ-инфицированных пациентов, описанных другими исследователями, связана с ограничениями стандартных методов обнаружения вируса. Однако не исключено, что более высокая распространённость ВГВ у включённых в наше исследование пациентов с вирусологически неэффективной АРВТ связана с большей длительностью инфицирования ВИЧ по сравнению с пациентами, обследованными в упомянутых работах. Впрочем, ранее было показано, что среди ВИЧ-инфицированных лиц, проходивших АРВТ, средний уровень вирусной нагрузки ВГВ выше у пациентов с подавленной РНК ВИЧ по сравнению с пациентами с высоким уровнем нагрузки ВИЧ [24], что согласуется с результатами нашей работы, свидетельствующими о высокой распространённости ВГВ с низкой вирусной нагрузкой среди ВИЧ-инфицированных людей с вирусологически неэффективной АРВТ.

Выявление среди ВИЧ-инфицированных пациентов почти исключительно ВГВ генотипа D в противоположность ранее показанному распространению в Российской Федерации не только генотипа D, но также A и C, имеет, вероятно, несколько причин. ВГВ генотипа D способен вызывать более серьёзные заболевания, в том числе коррелирует с более тяжёлыми заболеваниями печени, и более высоким уровнем лекарственной устойчивости по сравнению с другими генотипами вируса [25], что может быть связано с его распространённостью именно в группе пациентов с вирусологически неэффективной АРВТ. При этом известно, что, как и для ВГВ D3, для ВГВ субгенотипа D1, преобладающего в данной группе, характерны более низкая вирусная нагрузка, низкий уровень репликации и низкий уровень HBsAg в периферической крови по сравнению с генотипом A, а также ранняя сероконверсия HBeAg. Это может затруднять своевременное выявление вируса у пациентов и, в свою очередь, приводить к развитию более тяжёлого заболевания печени [26]. Для ВИЧ-инфицированных людей, получающих АРВТ, это особенно актуально, поскольку увеличение продолжительности жизни, а также восстановление иммунитета, может привести к иммуноопосредованному повреждению печени и повышению уровня ферментов печени. В свою очередь, высокие уровни аланинаминотрансферазы в сыворотке крови, в том числе на верхней границе нормы, являются предиктором развития хронического заболевания печени, повышенной заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой и связанной с ней смертности [27]. При низкой вирусной нагрузке ВГВ и, соответственно, незнании о наличии у получающего терапию ВИЧ-инфицированного пациента ВГВ, это может быть оценено как токсическое повреждение печени, связанное с АРВТ. Так, известно о случаях тяжёлой реактивации ВГВ после прерывания АРВТ у HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов, свидетельствующих о способности ВГВ непрерывно развиваться даже при скрытой форме течения заболевания [28]. Мы предполагаем, что существенную роль при этом может играть обладающий гепатопатогенным по-



Филогенетическое дерево исследованных изолятов ВГВ, выделенных от HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии, проживающих на территории Архангельска, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями.

● – изоляты, секвенированные в данной работе.

тенциалом не выявленный своевременно скрытый ВГВ, так как существуют данные об увеличении смертности среди ВИЧ-инфицированных пациентов с коинфекцией ВГВ, независимо от того, произошло ли заражение до начала АРВТ, или после неё [9].

Многие обследованные нами ВИЧ-инфицированные пациенты с ОжВВ принадлежали к активным или бывшим ПИН, или являлись половыми партнерами активных или бывших ПИН. В связи с вышесказанным особое внимание следует уделять социальному поведению ВИЧ-инфицированных лиц, особенности которого у ПИН и их партнеров, как известно, могут влиять на рас-

пространённость инфекции и на распределение генотипов в данной группе риска.

На филогенетическом дереве выделяются несколько тесных кластеров, изоляты которых получены преимущественно от мужчин, при этом более чем для половины из них в анамнестических данных указана принадлежность к активным или бывшим ПИН. Таким образом, очевидно, что главную роль в кластеризации играет не столько географическая общность, сколько пути передачи инфекции. Дополнительным подтверждением этого предположения является низкая представленность в группе пациентов с характерным для региона субгенотипом D2, а также высо-

кая встречаемость в группе ВГВ субгенотипа D3, ассоциированного с парентеральным инфицированием, особенно среди ПИН [29], при этом чётко разделяющегося на упомянутый выше специфический кластер близкородственных изолятов и последовательности ВГВ, находящиеся на различных филогенетических отрезках, не имеющих близкого генетического родства. Таким образом, в целом ВГВ распространялся не за счёт значимых эпидемиологических сетей с конкретными единичными прародителями, а преимущественно независимыми путями посредством гетеросексуальных контактов, что подтверждается отсутствием крупных кластеров. Рискованное поведение среди ВИЧ-инфицированных лиц в основном связано с употреблением наркотиков и незащищенными половыми контактами с нерегулярными партнерами.

Эффективная противовирусная терапия снижает репликацию вируса и риск прогрессирования ВГВ [30]. Основные успехи в лечении ХВГВ были достигнуты в последнее десятилетие, благодаря разработке нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы активных против ВГВ, таких как L-нуклеозиды (ламивудин и телбивудин), алкилфосфонаты (адефовир дипивоксил) и тенофовир (диспроксилфумарат) или D-циклопентаны (энтекавир) [31]. Неадекватное подавление репликации ВГВ противовирусными препаратами может привести к развитию устойчивых мутаций в консервативной области гена полимеразы [32]. Некоторые составляющие элементы АРВТ, применяемой у ВИЧ-инфицированных пациентов, могут стать причиной повышенной устойчивости к лекарственным препаратам не только ВИЧ, но и ВГВ, что особенно актуально при наличии ОкГВ, не идентифицируемого стандартными методами.

Среди обследованных нами пациентов только в 2 (7,1%) случаях были выявлены мутации лекарственной устойчивости. Выявленные мутации (L180M, M204V) относятся к наиболее распространённым среди проходивших АРВТ пациентов в европейском многоцентровом исследовании [33]. Вероятнее всего, обнаруженные мутации устойчивости были вызваны перекрёстной резистентностью к ламивудину, поскольку это единственный ВГВ-активный препарат в АРВТ первого и второго ряда у ВИЧ-инфицированных пациентов в группе исследования.

Заключение

Высокая распространённость ОкГВ среди ВИЧ-инфицированных пациентов является серьёзной проблемой, поскольку повышает риск возможных осложнений при ВИЧ-инфекции, таких как острая печёночная недостаточность, цирроз, гепатоцеллюлярная карцинома. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости использования молекулярно-биологических методов диагностики для идентификации ВГВ, а также для анализа на мутации лекарственной устойчивости ВГВ перед началом антиретровирусной терапии ВИЧ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3, 5-10, 15-20, 22-33 см. REFERENCES)

2. 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: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-3-255-262>

4. Покровский В.В. Развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2007; (1): 10-5.
11. Шахгильдян В.И., Кравченко А.В., Пархоменко Ю.Г., Тишкевич О.А., Серова В.В., Груздев Б.М. Поражения печени при вторичных заболеваниях у больных ВИЧ-инфекцией. *Терапевтический архив*. 2002; 74(11): 40-3.
12. Шерстюк Б.В., Пиголкин Ю.И. Актуальные проблемы морфологической диагностики соматических нарушений при наркоманиях. *Судебно-медицинская экспертиза*. 1999; 42(2): 29-32.
13. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Тотолян Арег А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 383-92. Doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-383-392>
14. Кожанова Т.В., Ильченко Л.Ю., Исаева О.В., Алексеева М.Н., Сарыглар А.А., Миронова А.И. и др. Циркуляция вариантов вируса гепатита В, несущих мутации в гене полимеразы, среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов. *Современные технологии в медицине*. 2013; 5(2): 60-4.
21. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР. Патент РФ №2633755; 2017.

REFERENCES

1. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015; 386(10003): 1546-55. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
2. 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: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-3-255-262> (in Russian)
3. Zarski J.P., Bohn B., Bastie A., Pawlotsky J.M., Baud M., Bost-Bezeaux F., et al. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J. Hepatol*. 1998; 28(1): 27-33. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(98\)80198-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(98)80198-0)
4. Pokrovskiy V.V. The development of the HIV epidemic in Russia. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2007; (1): 10-5. (in Russian)
5. Alberti A., Pontisso P., Chemello L., Fattovich G., Benvegnù L., Belussi F., et al. The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *J. Hepatol*. 2005; 22(1 Suppl.): 38-41.
6. Modi A.A., Feld J.J. Viral hepatitis and HIV in Africa. *AIDS Rev*. 2007; 9(1): 25-39.
7. Soriano V., Puoti M., Bonacini M., Brook G., Cargnel A., Rockstroh J., et al. Care of patients with chronic hepatitis B and HIV co-infection: recommendations from an HIV-HBV international panel. *AIDS*. 2005; 19(3): 221-40. Doi: <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000163948.62176.e7>
8. Ramirez-Mena A., Glass T.R., Winter A., Kimera N., Ntamatungiro A., Hatz C., et al. Prevalence and Outcomes of Hepatitis B Coinfection and Associated Liver Disease Among Antiretroviral Therapy-Naive Individuals in a Rural Tanzanian Human Immunodeficiency Virus Cohort. *Open Forum Infect. Dis*. 2016; 3(3): ofw162. Doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw162>
9. Nikolopoulos G.K., Paraskevis D., Hatzitheodorou E., Moschidis Z., Sypsa V., Zavitsanos X., et al. Impact of hepatitis B virus infection on the Progression of AIDS and mortality in HIV-infected individuals: a cohort study and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis*. 2009; 48(12): 1763-71. Doi: <https://doi.org/10.1086/599110>
10. Rajbhandari R., Jun T., Khalili H., Chung R.T., Ananthkrishnan A.N. HBV/HIV coinfection is associated with poorer outcomes in hospitalized patients with HBV or HIV. *J. Viral. Hepat*. 2016; 23(10): 820-9. Doi: <https://doi.org/10.1111/jvh.12555>
11. Shakhgil'dyan V.I., Kravchenko A.V., Parkhomenko Yu.G., Tishkevich O.A., Serova V.V., Gruzdev B.M. Liver lesions in secondary diseases in patients with HIV infection. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2002; 74(11): 40-3. (in Russian)
12. Sherstyuk B.V., Pigolkin Yu.I. Actual problems of morphological diagnosis of somatic disorders in drug addiction. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 1999; 42(2): 29-32. (in Russian)

13. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbaev Zh.K., Savchuk T.N., Totolyan Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(4): 383-92. Doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-383-392> (in Russian)
14. Kozhanova T.V., Il'chenko L.Yu., Isaeva O.V., Alekseeva M.N., Saryglar A.A., Mironova N.I., et al. Circulation of hepatitis B virus variants carrying mutations in the polymerase gene among HBV-infected and HBV / HIV-coinfected patients. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2013; 5(2): 60-4. (in Russian)
15. Oliveira M.P., Lemes P.S., Matos M.A., Del-Rios N.H., Carneiro M.A., Silva A.M., et al. Overt and occult hepatitis B virus infection among treatment-naïve HIV-infected patients in Brazil. *J. Med. Virol.* 2016; 88(7): 1222-9. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.24462>
16. Chadwick D., Doyle T., Ellis S., Price D., Abbas I., Valappil M., et al. Occult hepatitis B virus coinfection in HIV-positive African migrants to the UK: a point prevalence study. *HIV Med.* 2014; 15(3): 189-92. Doi: <https://doi.org/10.1111/hiv.12093>
17. Bautista-Amorochó H., Castellanos-Dominguez Y.Z., Rodríguez-Villamizar L.A., Velandia-Cruz S.A., Becerra-Pena J.A., Farfan-García A.E. Epidemiology, risk factors and genotypes of HBV in HIV-infected patients in the northeast region of Colombia: high prevalence of occult hepatitis B and F3 subgenotype dominance. *PLoS One*. 2014; 9(12): e114272. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114272>
18. Opaleye O.O., Oluremi A.S., Atiba A.B., Adewumi M.O., Mabayoje O.V., Donbraye E., et al. Occult Hepatitis B Virus Infection among HIV Positive Patients in Nigeria. *J. Trop. Med.* 2014; 2014: 796121. Doi: <https://doi.org/10.1155/2014/796121>
19. Alvarez-Munoz M.T., Maldonado-Rodríguez A., Rojas-Montes O., Torres-Ibarra R., Gutierrez-Escolano F., Vazquez-Rosales G., et al. Occult hepatitis B virus infection among Mexican human immunodeficiency virus-1-infected patients. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(37): 13530-7. Doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i37.13530>
20. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2007; 46(1): 160-70. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.007>
21. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolyan Areg A. A method for detecting hepatitis B virus in biological material with a low viral load based on a two-stage PCR. Patent RF №2633755; 2017. (in Russian)
22. Brichtler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P., et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 10): 2318-29. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.055459-0>
23. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
24. Archampong T.N., Boyce C.L., Lartey M., Sagoe K.W., Obo-Akwa A., Kenu E., et al. HBV genotypes and drug resistance mutations in antiretroviral treatment-naïve and treatment-experienced HBV-HIV-coinfected patients. *Antivir. Ther.* 2017; 22(1): 13-20. Doi: <https://doi.org/10.3851/IMP3055>
25. Khedive A., Sane'i-Moghaddam I., Alavian S.M., Saberfar E., Norouzi M., Judaki M., et al. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutations are rare but clustered in immune epitopes in chronic carriers from Sistan-Baluchestan Province, Iran. *Arch. Iran. Med.* 2013; 16(7): 385-9. Doi: <https://doi.org/10.13167/AIM.005>
26. Ozaras R., Inanc B.I., Yemisen M., Tabak F. Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2015; 39(1): 28-37. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.06.005>
27. Chen J.D., Yang H.I., Iloeje U.H., You S.L., Lu S.N., Wang L.Y. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology*. 2010; 138(5): 1747-54. Doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.042>
28. Costantini A., Marinelli K., Biagioni G., Monachetti A., Ferreri M.L., Butini L., et al. Molecular analysis of hepatitis B virus (HBV) in an HIV co-infected patient with reactivation of occult HBV infection following discontinuation of lamivudine-including antiretroviral therapy. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 310. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-310>
29. Maddalena D.C., Giambelli C., Tanzi E., Colzani D., Schiavini M., Milazzo L., et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology*. 2007; 365(1): 113-24. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.015>
30. Hafkin J.S., Osborn M.K., Localio A.R., Amorosa V.K., Kostman J.R., Stern J.J., et al. Incidence and risk factors for incomplete HBV DNA suppression in HIV/HBV-co-infected patients initiating tenofovir-based therapy. *J. Viral. Hepat.* 2014; 21(4): 288-96. Doi: <https://doi.org/10.1111/jvh.12142>
31. Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? *Liver Int.* 2011; 31(1): 111-6. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02399.x>
32. Harrison T.J. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Semin. Liver Dis.* 2006; 26(2): 87-96. Doi: <https://doi.org/10.1055/s-2006-939754>
33. Hermans L.E., Svicher V., Pas S.D., et al. Combined Analysis of the Prevalence of Drug-Resistant Hepatitis B Virus in Antiviral Therapy-Experienced Patients in Europe (CAPRE). *J. Infect. Dis.* 2016; 213(1): 39-48. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv363>

Поступила 29.01.19

Принята в печать 02.04.19