

Генетическое разнообразие вируса гепатита С и распространенность мутаций резистентности к ингибиторам NS5A в Красноярском крае

Василий Е. Екушов¹, Алексей В. Тотменин¹, Людмила Г. Готфрид¹,
Максим Р. Халиков¹, Виталла-Виктория В. Миниханова², Сергей Е. Скударнов²,
Татьяна С. Остапова², Наталья М. Гашникова¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

²Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД, Красноярск, Россия

Контактное лицо

Василий Е. Екушов, младший научный сотрудник, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; 630559 Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, рп. Кольцово.
Тел. +79134706331
Email Trejid460297@gmail.com
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0465-1260>

Формат цитирования

Екушов В.Е., Тотменин А.В., Готфрид Л.Г., Халиков М.Р., Миниханова В.-В.В., Скударнов С.Е., Остапова Т.С., Гашникова Н.М. Генетическое разнообразие вируса гепатита С и распространенность мутаций резистентности к ингибиторам NS5A в Красноярском крае // Юг России: экология, развитие. 2024. Т.19, N 1. С. 47-59. DOI: 10.18470/1992-1098-2024-1-4

Получена 2 декабря 2023 г.
Прошла рецензирование 24 декабря 2023 г.
Принята 15 января 2024 г.

Резюме

Цель – исследовать молекулярно-генетические особенности популяции ВГС, циркулирующей среди ВИЧ-инфицированных жителей Красноярского края, включая анализ мутаций вируса, связанных с резистентностью к ингибиторам NS5A.

Из 94 образцов плазмы крови ВИЧ/ВГС-инфицированных жителей края выделена суммарная РНК, получены и расшифрованы нуклеотидные последовательности областей гена Core/E1 и гена NS5A, которые использовали для генотипирования и поиска мутаций резистентности.

В изученной выборке ВГС зарегистрирована циркуляция пяти субтипов вируса: 1b (47,9 %), 3a (37,2 %), 1a (10,6 %), 2a (3,2 %) и 2k (1,1 %). Филогенетический анализ ВГС выявил частичную кластеризацию внутри субтипов 1a и 3a по территориальному принципу. ВГС субтипа 1b, 2a и 2k группировались с другими ВГС, выделенными ранее в России, Армении и Кыргызстане. Среди исследованных ВГС не было найдено кластеров, общих для ВИЧ-инфицированных лиц с одним путем заражения. Среди пациентов, не имевших опыта приема ПППД, мутации резистентности ВГС в области NS5A для лиц, инфицированных вирусом субтипа 3a, были обнаружены у 42,3 % случаев, для инфицированных ВГС субтипа 1b – в 75,6 % случаев.

Выполненный анализ разнообразия и встречаемости мутаций лекарственной устойчивости ВГС к препаратам прямого противовирусного действия крайне важен для разработки тактики эффективного лечения ХГС. Высокий уровень распространенности полиморфных мутаций, влияющих на чувствительность к ПППД, указывает на актуальность внедрения анализа резистентности ВГС в клиническую практику.

Ключевые слова

ВГС, генотипы ВГС, резистентность ВГС, мутации лекарственной устойчивости, NS5A, ПППД, генетический полиморфизм.

Genetic diversity of hepatitis C virus and the prevalence of resistance mutations to NS5A inhibitors in the Krasnoyarsk region

Vasily E. Ekushov¹, Alexei V. Totmenin¹, Ludmila G. Gotfrid¹,
Maksim R. Halikov¹, Vitalla-Victoria V. Minikhanova², Sergey E. Skudarnov²,
Tatyana S. Ostapova² and Natalya M. Gashnikova¹

¹Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia

²Krasnoyarsk Regional Centre for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russia

Principal contact

Vasily E. Ekushov, Junior Researcher, Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology; Koltsovo, Novosibirsk, Novosibirskiy region, Russia 630559.

Tel. +79134706331

Email Trejid460297@gmail.com

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0465-1260>

How to cite this article

Ekushov V.E., Totmenin A.V., Gotfrid L.G., Halikov M.R., Minikhanova V.-V.V., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., Gashnikova N.M. Genetic diversity of hepatitis C virus and the prevalence of resistance mutations to NS5A inhibitors in the Krasnoyarsk region. *South of Russia: ecology, development*. 2024; 19(1):47-59. (In Russ.) DOI: 10.18470/1992-1098-2024-1-4

Received 2 December 2023

Revised 24 December 2023

Accepted 15 January 2024

Abstract

To research the molecular genetic characteristics of the HCV population circulating among HIV-infected residents of the Krasnoyarsk Territory, including analysis of resistance-associated mutations to NS5A inhibitors.

Total RNA was isolated from 94 blood plasma samples from HIV/HCV-infected residents of the region and the nucleotide sequences of the Core/E1 gene and NS5A gene regions were obtained and deciphered, which were used for genotyping and searching for resistance mutations.

In the HCV samples studied, the circulation of five virus subtypes was recorded: 1b (47,9 %), 3a (37,2 %), 1a (10,6 %), 2a (3,2 %) and 2k (1,1 %). Phylogenetic analysis of HCVs revealed partial clustering within subtypes 1a and 3a on a territorial basis. HCV subtypes 1b, 2a and 2k were grouped with other HCVs previously isolated in Russia, Armenia and Kyrgyzstan. Among the HCVs studied, no clusters were found that were common to HIV-infected individuals with the same route of infection. Among patients who had no experience of taking DAAs, HCV resistance mutations in the NS5A region were found in 42,3 % of cases for those infected with subtype 3a virus and in 75,6 % of cases for those infected with HCV subtype 1b.

The analysis of the diversity and occurrence of mutations of HCV drug resistance to direct antiviral drugs is extremely important for the development of tactics for effective treatment of CHC. The high prevalence of polymorphic mutations that affect sensitivity to DAAs indicates the relevance of introducing HCV resistance analysis into clinical practice.

Key Words

HCV, Hepatitis C subtypes, RASs, NS5A, DAAs, genetic polymorphism.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (ВГС) вызывает одно из наиболее распространённых заболеваний печени во всем мире. Вирусный гепатит С протекает как в острой, так и в хронической форме, может приводить к формированию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [1].

Вирус гепатита С принадлежит к роду *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*. Он имеет одноцепочечный несегментированный +РНК-геном длиной около 9600 нуклеотидов (нт) и одну длинную открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин из 3000 аминокислот с порядком генов С-Е1-Е2-р7-NS2-NS3-NS4А-NS4В-NS5А-NS5В. Структурными белками вируса являются Core (нуклеокапсид), Е1 и Е2 (гликопротеины оболочки). Белок р7 является ионным каналом. Области от NS2 до NS5 кодируют неструктурные белки; NS2 представляет собой трансмембранный белок; NS3 играет двойную роль: сериновой протеазы и РНК-хеликазы; NS4А является кофактором NS3; NS4В представляет собой мембраносвязанный белок; NS5А является компонентом репликазного комплекса, а NS5В – РНК-зависимой РНК-полимеразой [2; 3].

Активное распространение вирусного гепатита С и рост смертности среди людей от данного заболевания являлись результатом распространения ВГС в XX веке, связанным с инъекционными методами лечения, в том числе, с переливанием донорской крови до глобального скрининга банков крови по всему миру на наличие ВГС в донорской крови и с широким распространением инъекционных наркотиков [4]. По оценкам специалистов основными путями передачи ВГС остаются инъекционное употребление наркотиков и небезопасное медицинское обслуживание [5]. В группу риска инфицирования ВГС входят ВИЧ-инфицированные люди, которые имеют ослабленный иммунитет и, как следствие, повышенный шанс инфицироваться при незащищенном половом контакте, особенно среди мужчин, практикующих секс с мужчинами (МСМ). Различные исследования показали, что шанс заражения ВГС в шесть раз выше у людей, живущих с ВИЧ, чем у людей без ВИЧ-инфекции [6].

Разработка эффективных препаратов прямого противовирусного действия (ПППД) предоставила шанс не только снизить заболеваемость вирусным гепатитом С, но и добиться полной элиминации ВГС. В настоящее время золотым стандартом лечения гепатита С является безинтерфероновая комбинированная противовирусная терапия прямого противовирусного действия с рибавирином или без него. К трем основным классам препаратов ПППД, которые блокируют репликацию и посттрансляционный процессинг ВГС, относятся ингибиторы протеазы NS3/4А («previrs»), препятствующие протеолитическому процессингу полипротеина ВГС, блокируя сериновую протеазу NS3/4А; ингибиторы полимеразы NS5В («-buvirs»), воздействующие на репликацию вирусной РНК путем ингибирования РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), две подгруппы которых являются аналогами нуклеозидов/-тидов; ингибиторы NS5А («-asvirs»), влияющие на репликацию и сборку вируса, блокируя белок NS5А [7].

Терапия ПППД демонстрирует устойчивый вирусологический ответ, в среднем >90 %, по сравнению с 40–50 % устойчивого вирусологического ответа при использовании интерферона и рибавирина при инфекции ВГС генотипов 1 и 4, 60–70 % при

генотипах 5 и 6 и 80–90 % при генотипах 2 и 3. Доступность терапии ПППД расширяет возможность излечения от хронического гепатита С (ХГС) для различных групп пациентов, которые в эпоху интерферона не рассматривались для назначения терапии, например, пациенты с заболеваниями печени, аутоиммунными заболеваниями, почечной недостаточностью или пациенты после трансплантации органов [8].

МЛУ (мутации лекарственной устойчивости) ВГС, влияющие на чувствительность вируса к нуклеотидному ингибитору NS5В софосбувиру, не наблюдаются у лиц, ранее не получавших лечения, и встречаются достаточно редко у лиц с неэффективным лечением [9; 10]. Многие мутации, обеспечивающие устойчивость ВГС к ПППД, подавляют репликацию вируса, например S282T (NS5В) [9]. Следовательно, эти мутации не имеют клинического значения, поскольку они не изменяют общий эффект софосбувира, и поэтому тестирование на резистентность NS5В не рекомендуется в рутинном порядке для пациентов, которые ранее не получали лечение или проходили лечение в прошлом [11]. Связанные с резистентностью мутации в геноме вируса, влияющие на ингибиторы NS5А, имеют наибольшую клиническую значимость [11]. Ингибиторы NS5А действуют путем ингибирования гиперфосфорилирования, необходимого для репликации вируса [12]. Примерами препаратов класса ингибиторов NS5А являются ледипасвир, даклатавир, элбасвир, омбитасвир и велпатасвир [13].

Так как в России не существует коммерческого варианта теста для определения мутаций лекарственной устойчивости ВГС к ПППД, исследование резистентности ВГС проводятся для ограниченного выборка инфицированных лиц. Распространенность МЛУ в области NS5А ВГС может различаться в зависимости от географического региона как страны, так и мира [14; 15]. Основное бремя инфекции ВГС в России лежит на потребителях инъекционных наркотиков (ПИН) и людях с ослабленным иммунитетом (около 70 %) [16]. Передача ВГС среди ПИН и повторное инфицирование ВГС сильно осложняют процесс элиминации ВГС. Благодаря множественным реинфекциям циркулирующие среди ПИН варианты ВГС с МЛУ могут получать распространение и выходить за пределы данной группы риска.

В этой связи выполненное в рамках настоящей работы исследование молекулярно-генетических особенностей популяции ВГС, циркулирующей среди ВИЧ-инфицированных жителей Красноярского края, включая анализ разнообразия и встречаемости мутаций вируса к ингибиторам NS5А, является актуальным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использована коллекция образцов периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Красноярского края. Сбор 408 образцов и клинико-эпидемиологических данных пациентов проводился «Красноярским краевым Центром профилактики и борьбы со СПИД» в 2021–2023 гг. От каждого пациента было получено информированное согласие на участие в исследовании с гарантиями анонимного использования полученных данных в соответствии с требованиями этических норм России. Клинико-эпидемиологические данные

пациентов включали возраст пациента, его пол, вероятный путь заражения, наличие терапии, направленной против ВГС, схему терапии и ее продолжительность. РНК ВГС выделяли из плазмы крови с использованием набора "РИБО-золь-С (для первого этапа) и «РИБО-преп» (для второго этапа) («АмплиСенс», Россия) в рамках инструкции производителя. Для получения целевых фрагментов области Core/E1 (~1000 п.н.) ВГС и области, кодирующей ген NS5A (~1000 п.н.) ВГС, применялась двухстадийная ПЦР с вирус-специфическими праймерами. Первая ПЦР была совмещена с реакцией обратной транскрипции, для амплификации был использован набор БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (2х) производства «ООО Биолабмикс» (Россия) и набор лабораторных праймеров. Для второго раунда ПЦР использовался набор БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2х) производства «ООО Биолабмикс» и набор лабораторных праймеров. Последующее секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК ВГС выполняли с использованием набора реагентов «BigDye terminator™ v3.1.» на автоматическом секвенаторе 3130xl (Applied Biosystems, США). Расшифрованные фрагменты гена Core/E1 и NS5A собирались и сравнивались с референсными последовательностями ВГС в программе Sequencher 4.1 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI). Собранные фрагменты ВГС сопоставляли со стандартными последовательностями разных субтипов и рекомбинантных форм ВГС из международной базы данных (International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV) в программе MEGA11 и AliView [17; 18]. Множественное выравнивание проводилось при помощи сайта RIMD [19] с использованием алгоритма MAFFT version 7 со стандартными настройками. Для идентификации близкородственных штаммов ВГС полученные нуклеотидные последовательности анализировались в программе BLAST в сравнении с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для исследуемых последовательностей ВГС был проведен филогенетический анализ с использованием метода максимального правдоподобия. Филогенетическое дерево было построено при помощи ресурса IQTree v1.6.12. [20] с бутстрепом 1000 повторов на основе модели замещения GTR+I+G, для оценки топологии использовался анализ бутстрепов. Для анализа мутаций резистентности использовался сайт HCV-GLUE v.0.1.33 [21; 22].

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках изучения генетического разнообразия и резистентности ВИЧ-1 и ВГС был осуществлен сбор клинических образцов периферической крови 408 пациентов центра СПИД Красноярского края. Доля больных гепатитом С составили 53,2 % (n=217). Выборка пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС включала 30,9 % женщин и 69,1 % мужчин, средний возраст составил 41 год. О потреблении инъекционных наркотиков (ПИН) сообщили 71,0 % (n=154) пациентов, среди них 23,4 % (n=36) женщин и 76,6 % (n=118) мужчин, вид потребляемых наркотиков не был указан. Из пациентов с сочетанной инфекцией ВИЧ/ВГС была сформирована случайная выборка 94 человек для молекулярно-генетического исследования ВГС, которая включала 74,5 % ПИН (68,6 % мужчин и 31,4 % женщин), 23,4 % лиц, инфицированных ВИЧ при гетеросексуальных

контактах (63,6 % мужчин и 36,4 % женщин), в 2,1 % случаев путь заражения ВИЧ не был установлен.

Выполненный филогенетический анализ выявил среди исследованной выборки ВГС вирусы пяти субтипов: 1a – 10,6 % (n=10), 1b – 47,9 % (n=45), 2a – 3,2 % (n=3), 2k – 1,1 % (n=1) и 3a – 37,2 % (n=35) (рис. 1). В целом распределение ВГС по субтипам согласуется с данными других исследований, указывающих на доминирование ВГС 1b и 3a в популяции вирусов, циркулирующих на территориях России [23–26].

Единственный случай заражения вариантом ВГС субтипа 2k был зарегистрирован у мужчины 40 лет, ПИН. Этот вирус группировался с другими ВГС данного геноварианта, выделенными ранее в России. Три варианта ВГС субтипа 2a, выделенные в Красноярском крае, формировали филогенетическую ветвь генетически близких вирусов с вариантами из Республики Армения и Кыргызстана, коэффициент поддержки составил 92. В двух случаях субтип 2a ВГС был выделен у женщин, проживающих в Красноярске, инфицированных ВИЧ при гетеросексуальных контактах, и мужчины, сообщившем о потреблении инъекционных наркотиков, жителя Лесосибирска.

Семь образцов ВГС субтипа 1a из 10 найденных вирусов данного генотипа оставили общий филогенетический кластер генетически близких вирусов, который включал жителей Красноярска 36–40 лет, 1 женщина, инфицированная ВИЧ гетеросексуально, и 6 мужчин, 4 из которых ПИН. Один ВГС субтипа 1a, выделенный у женщины 36 лет, ПИН, достоверно группировался с вирусом, выделенным в Республике Армения в 2022 г., два других, не входящих в описанную для жителей Красноярска группу из 7 образцов ВГС субтипа 1a, были выделены у мужчин 24 и 36 лет, ПИН.

Филогенетический анализ 35 образцов, отнесенных по результатам генотипирования к субтипу 3a, показал, что 12 последовательностей из Красноярского края кластеризуются вместе с коэффициентом поддержки 96. Образцы из Красноярска располагаются на общих ветвях вместе с последовательностями из Республики Армения и Кыргызстана, а также с полученной в 1994 г. референсной последовательностью ВГС субтипа 3a из Японии. Для ВГС 1b, циркулирующих на изучаемой территории, отсутствовала кластеризация по каким-либо признакам, образцы на филогенетическом дереве распределились между другими ВГС, выделенными в России, Кыргызстане, Армении и Швейцарии.

Выполненный филогенетический анализ для ВГС, выделенных в Красноярском крае, выявил лишь некоторую кластеризацию вирусов субтипов 1a и 3a по территориальному принципу. Среди всех исследованных ВГС не было найдено кластеров, общих для ВИЧ-инфицированных лиц с одним путем заражения.

Так как наиболее клинически важные замены, связанные с устойчивостью ВГС к ПППД, происходят в неструктурном белке 5A (NS5A), актуальным является изучение как полиморфных мутаций в данной области генома, так и мутаций, возникающих и закрепляющихся в ответ на применение ингибиторов NS5A [11]. Ранее было показано, что эффект полиморфизмов в области NS5A зависит от генотипа и субтипа ВГС и оказывает наибольшее влияние на генотипы 1 и 3 [11].

Дополнительно для 77 образцов ВГС 1b и 3a были получены фрагменты гена NS5A с целью их

анализа на наличие мутаций, связанных с резистентностью к препаратам прямого противовирусного действия. Поиск клинически значимых МЛУ в NS5A ВГС осуществляли в соответствии с рекомен-

дациями Европейской ассоциации по изучению печени [27] и с перечнем мутаций, связанных с резистентностью, согласно сайту HCV-GLUE [21; 22].

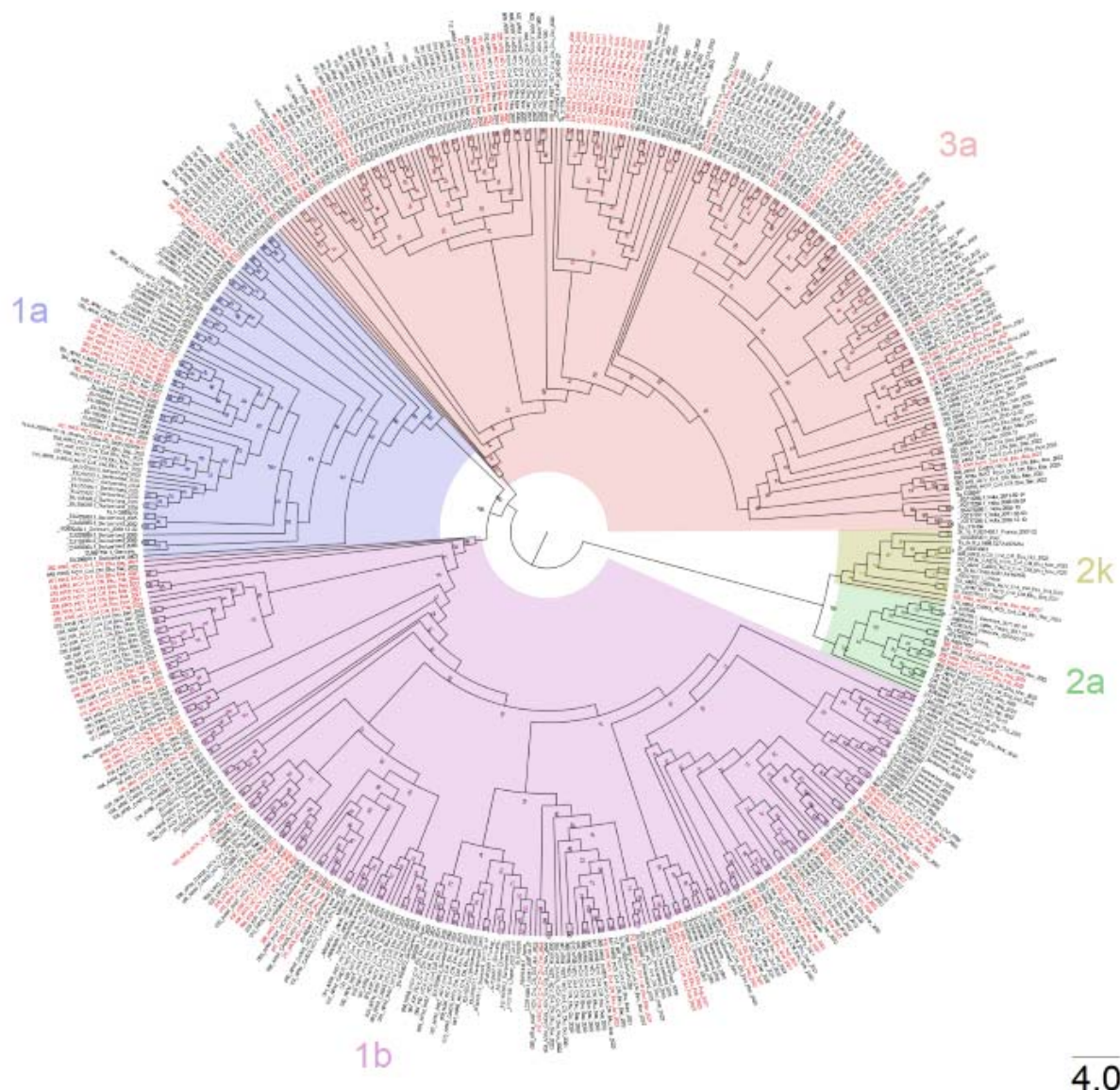


Рисунок 1. Филогенетическое дерево фрагмента гена Core/E1 ВГС

Проанализированные последовательности ВГС, выделенные от жителей Красноярского края, отмечены красным шрифтом; референсные последовательности ВГС обозначены черным шрифтом. Цветом выделены филогенетические кластеры отдельных геновариантов ВГС: 3a, 1b, 1a, 2k и 2a

Figure 1. Phylogenetic tree of HCV Core/E1 gene fragment

Analysed HCV sequences isolated from residents of the Krasnoyarsk Territory are marked in red; HCV reference sequences are indicated in black. Phylogenetic clusters of individual HCV genovariants are highlighted in colour: 3a, 1b, 1a, 2k and 2a

В исследуемую выборку пациентов вошли 32,5 % (n=25) женщин и 67,5 % (n=52) мужчин. Из 77 пациентов 13,0 % (n=10) получали противовирусную терапию, основанную на ПППД, в период с 2019 по 2023 гг.

Если при применении схемы, содержащей ингибитор NS5A, возникает неэффективность лечения, у большинства пациентов регистрируются замены, связанные с резистентностью в области NS5A (отмечено от 75 до 90 %) [10; 28; 29]. МЛУ в области NS5A достаточно хорошо закрепляются в геноме и практически не снижают репликативную способность

вируса. Показано, что такие мутации могут сохраняться в геноме ВГС не менее 2-х лет [28; 30].

Из 4-х пациентов данного исследования, имевших опыт неэффективного лечения ПППД (табл. 1), инфицированных ВГС генотипа 1b, в трех случаях из 4-х была обнаружена лишь одна мутация F37L. Мутация F37L является полиморфной, то есть может встречаться и в «диком» варианте вируса гепатита С. Предполагается, что данный полиморфизм дает вирусу незначительную устойчивость к даклатасвиру [31], однако эта информация все еще остается спорной [31; 32].

Таблица 1. Разнообразие и распространенность выявленных мутаций в области гена NS5A ВГС субтипов 1b и 3a, связанных с развитием резистентности вируса среди пациентов, получавших ПППД

Table 1. Diversity and prevalence of mutations identified in the NS5A gene region of HCV subtypes 1b and 3a associated with the development of viral resistance among patients receiving DAAs

№	Субтип Subtype	Мутация Mutation	Уровень устойчивости Resilience level	ПППД DAAs	Схема терапии Treatment regimen	Начало терапии Start of therapy	Окончание терапии End of therapy
191	3a	-	-	-	Софосбувир+ Даклатасвир SOF+DCV	28.03.2022	20.06.2022
213	3a	-	-	-	Софосбувир+ Даклатасвир SOF+DCV	06.08.2021	28.10.2021
257	3a	A30S	Средний Medium	Даклатасвир DCV	Софосбувир+ Велпатасвир SOF+VEL	04.08.2021	27.12.2021
261	3a	A30S	Средний Medium	Даклатасвир DCV	Софосбувир SOF	14.02.2020	06.05.2020
		Y93H	Даклатасвир DCV				
			Высокий High	Пибрентасвир PIB Велпатасвир VEL			
			Средний Medium	Омбитасвир OBV Элбасвир EBR			
313	3a	A30K	Высокий High	Даклатасвир DCV Велпатасвир VEL	Софосбувир+ Даклатасвир SOF+DCV	08.11.2019	31.01.2020
			Средний Medium	Пибрентасвир PIB Элбасвир EBR			
331	3a	A30S	Средний Medium	Даклатасвир DCV	Глекапревир+ Пибрентасвир GLE+PIB	22.04.2022	17.06.2022
280	1b	F37L	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV	Софосбувир+ Нарлапревер+ Ритонавир SOF+NRL+RTV	03.09.2021	26.11.2021
305	1b	F37L	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV	Софосбувир SOF	25.10.2021	17.01.2022
458	1b	F37L	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV	Гразопревир+ Элбасвир GZR+EBR	08.02.2023	03.05.2023
226	1b	-	-	-	Софосбувир+ Даклатасвир+ Рибавирин+ Гразопревир+ Элбасвир SOF+DCV+RBV+GZR+EBR	23.07.2021	31.08.2021

Достоверно известно, что F37L является компенсаторной добавочной мутацией, которая усиливает связывание NS5A с 2',5'-олигоаденилатсинтетазой, что положительно влияет на репликацию вируса [33].

Для 6-ти пациентов с генотипом 3a ВГС, принимавших ПППД, в двух случаях не было найдено мутаций резистентности вируса. В двух случаях в области NS5A ВГС были найдены мутации A30S (определяет средний уровень устойчивости к

даклатасвиру), в одном случае – A30K (ответственная за высокий уровень устойчивости даклатасвиру, велпатасвиру и средний к пибрентасвиру и элбасвиру) [14; 34–38]. У ВГС одного пациента было зарегистрировано две МЛУ – Y93H (высокий уровень устойчивости вируса к даклатасвиру, пибрентасвиру, велпатасвиру и средний к омбитасвиру и элбасвиру) и A30S (средний и низкий уровень устойчивости вируса к даклатасвиру) [14; 39–43; 54].

Важно отметить, что основная доля обнаруженных мутаций приходилась на ВГС пациентов, не имевших опыта приема ПППД, согласно данным, полученным от врачей. Для 67 пациентов без терапии ПППД преобладал путь заражения ВИЧ при употреблении инъекционных наркотиков 75,7 % (n=53) на втором месте было инфицирование при гетеросексуальном контакте 21,4 % (n=13), для 2,9 % (n=2) путь инфицирования не был установлен.

Среди 41 человека, инфицированного ВГС 1b, мутации резистентности вируса в области NS5A были обнаружены у 75,6 % (n=31) пациентов (табл. 2).

Наиболее часто среди исследованных ВГС выявлялась полиморфная мутация F37L – в 67,5 % (n=27). Дополнительно в одном образце была найдена F/L37I 2,5 % (n=1). F/L37I – спорный полиморфизм ВГС, в большинстве источников говорится о незначительном влиянии данной замены на устойчивость ВГС к даклатасвиру или характеризуют ее как нейтральную [31–33].

На втором месте по встречаемости была полиморфная мутация Q54N, найденная в 22,5 % (n=9), в одном случае был зарегистрирован полиморфизм Q54Y 2,2 % (n=1). Обе замены придают вирусу низкий уровень устойчивости к даклатасвиру [44]. Сочетание мутаций Q54N/Y и F37L, определяющее средний уровень устойчивости ВГС к даклатасвиру, встречалось у 15,6 % (n=7) пациентов [31].

Третьей по распространенности мутацией стала R30Q – описана для 7,5 % (n=3), которую связывают с высоким уровнем устойчивости вируса к даклатасвиру [45], средним – к омбитасвиру [15], также сообщается о возможности развития резистентности вируса в отношении асунапревира [45; 46].

В одном случае (2,5 %) были найдены мутации L31I/V/M. L31I даёт высокий уровень устойчивости к ледипасвиру [10], а также средний к даклатасвиру и элбасвиру [45; 47]; МЛУ L31V, описанная в 5,0 % (n=2), связана с высоким уровнем устойчивости вируса к даклатасвиру, омбитасвиру, ледипасвиру [10; 15; 40] и средним к велпатаасвиру [41]; L31M – в 5,0 % (n=2), вызывающая высокий уровень устойчивости к даклатасвиру, элбасвиру и средний к омбитасвиру, велпатаасвиру, ледипасвиру [40; 45; 48]. Сочетание мутаций R30Q и L31M, дающее слабую устойчивость к даклатасвиру, встречалось у 4,4 % (n=2) пациентов [49].

В одном случае (2,5 %) ВГС одновременно имел мутацию Y93H (обуславливает высокий уровень устойчивости вируса к даклатасвиру, пибрентасфиру, ледипасвиру, велпатаасвиру и омбитасвиру) в сочетании с R30Q и Q54N [10; 15; 40; 43–45; 47; 50; 51].

Также единожды обнаружена мутация P58S (2,5 %), дающая вирусу средний уровень устойчивости к омбитасвиру и даклатасвиру (табл. 2) [15; 52].

Таблица 2. Разнообразие и распространенность выявленных мутаций в области гена NS5A ВГС субтипов 1b и 3a, связанных с развитием резистентности вируса к ПППД у наивных пациентов

Table 2. Diversity and prevalence of mutations identified in the NS5A gene region of HCV subtypes 1b and 3a associated with the development of viral resistance to DAAs in naïve patients

Мутация Mutation	% (n)	Уровень устойчивости Resilience level	ПППД DAAs
Субтип 1b / Subtype 1b			
R30Q	7,3 % (3)	Высокий High	Даклатасвир DCV
		Средний Medium	Омбитасвир OBV
L31I	2,4 % (1)	Высокий High	Ледипасвир LDV
		Средний Medium	Даклатасвир DCV
			Элбасвир EBR
L31V	4,9 % (2)	Высокий High	Даклатасвир DCV
			Омбитасвир OBV
		Средний Medium	Ледипасвир LDV
			Велпатаасвир VEL
L31M	4,9 % (2)	Высокий High	Даклатасвир DCV
			Элбасвир EBR
		Средний Medium	Омбитасвир OBV
			Велпатаасвир VEL
			Ледипасвир LDV

F37L	67,5 % (27)	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV
F37I	2,4 % (1)	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV
Q54H	22,5 % (9)	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV
Q54Y	2,4 % (1)	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV
P58S	2,4 % (1)	Средний Medium	Омбитасвир OBV
			Даклатасвир DCV
			Даклатасвир DCV
Y93H	2,4 % (1)	Высокий High	PIB
			Ледипасвир LDV
			Велпатасвир VEL
			Омбитасвир OBV
			Субтип 3а / Subtype 3a
A30S	34,6 % (9)	Средний Medium	Даклатасвир DCV
A30V	3,8 % (1)	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV
S/T62L	3,8 % (1)	Средний/низкий Medium/low	Даклатасвир DCV
Y93H	3,8 % (1)	Высокий High	Даклатасвир DCV
			Пибрентасвир PIB
			Велпатасвир VEL
		Средний Medium	Омбитасвир OBV
			Элбасвир EBR

Мутации резистентности ВГС в области NS5A для субтипа 3а среди 29 пациентов, не имеющих опыта приемаПППД, были обнаружены в 41,4 % (n=12).

Наибольшую распространенность получили мутации в тридцатом кодоне: A30S – в 37,5 % (n=9) и A30V – в 4,2 % (n=1), которые придают ВГС средний и низкий уровень устойчивости к даклатасвиру [14; 40; 39]. Основная мутация Y93H дважды встречалась в комбинациях с A30V и с A30S (по 4,2%), что обуславливает высокий уровень устойчивости вируса к даклатасвиру, пибрентасвиру, велпатавиру [14; 41; 42; 44; 53; 54] и средний – к омбитасвиру и элбасвиру [42; 43]. В одном случае была обнаружена мутация S/T62L 4,2 % (n=1), дающая ВГС слабую устойчивость к даклатасвиру [14].

Результаты настоящего исследования согласуются с данными ряда авторов, описывающих незначительное распространение МЛУ, существенно снижающих восприимчивость ВГС кПППД в позициях аминокислот L31 и Y93 у ВГС субтипа 1b, а для субтипа 3а – МЛУ A30K и Y93H среди пациентов без опыта приемаПППД [14; 55], в том числе, для лиц с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС из других регионов России [24; 56; 57].

Результаты выполненных исследований ВГС соответствуют общемировым данным как для субтипа 3а, так и для субтипа 1b ВГС [11; 14; 55; 57; 58]. О большой распространенности мутаций ВГС в области NS5A для субтипа 1b (69,4 %) по сравнению с субтипом 3а (30,6 %) сообщалось в работах, посвященных изучению резистентности на основе анализа доступных депонированных в GenBank последовательностей ВГС [59].

Противовирусные препараты прямого действия открыли совершенно новую эру в терапии против ВГС. В России начато внедрение программы лечения ХГСПППД как у пациентов с ВГС-моноинфекцией, так и у ВИЧ/ВГС-инфицированных лиц. При этом для многих регионов страны отсутствуют данные по распространению первичной резистентности вируса кПППД, не выполняется анализ наличия мутаций в геноме ВГС, связанных со снижением чувствительности кПППД в случаях неэффективной терапии. В то же времяПППД доступны для самостоятельного приобретения, что влечет за собой бесконтрольный прием этих препаратов. Поэтому клинически значимая резистентность ВГС к противовирусным препаратам до начала лечения, возможно, будет увеличиваться в случае их широкого использования.

В Красноярском крае до настоящего времени не проводилось молекулярно-генетических исследований ВГС, поэтому полученные данные являются первым описанием особенностей популяции циркулирующих ВГС. Представленная работа проводилась в рамках мероприятий, направленных на снижение распространения ВГС среди ВИЧ-инфицированных жителей Красноярского края. Выполненный анализ разнообразия и встречаемости мутаций лекарственной устойчивости ВГС к препаратам прямого противовирусного действия крайне важен как для выбора индивидуальной терапии и достижения уверенного вирусологического ответа инфицированных ВГС лиц, так и накопления данных для разработки тактики по элиминации ВГС. В этой связи особую актуальность при разработке долгосрочной стратегии эффективного лечения ХГС приобретает исследование ВГС на наличие МЛУ, в том числе, полиморфных мутаций, до начала назначения терапии препаратами прямого противовирусного действия.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследование проведено в рамках реализации распоряжения Правительства Российской Федерации от 02.04.2022 № 735-п.

ACKNOWLEDGMENT

The study was conducted in the framework of the Order of the Government of the Russian Federation dated 02 April 2022 No. 735-p.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Bertino G., et al. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment // *World journal of hepatology*. 2016. V. 8. N 2. P. 92. DOI: 10.4254/wjh.v8.i2.92
- Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins // *World journal of gastroenterology: WJG*. 2007. V. 13. N 17. P. 2406. DOI: 10.3748/wjg.v13.i17.2406
- Schulze zur Wiesch J., et al. The proteins of the Hepatitis C virus: Their features and interactions with intracellular protein phosphorylation // *Archives of virology*. 2003. V. 148. P. 1247–1267. DOI: 10.1007/s00705-003-0115-8
- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on // *Journal of General Virology*. 2004. V. 85. N 11. P. 3173–3188. DOI: 10.1099/vir.0.80401-0
- Correction Naghavi M., et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 // *The Lancet*. 2015. V. 38. N 9963. P. 117–171. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2
- Thursz M., Fontanet A. HCV transmission in industrialized countries and resource-constrained areas // *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2014. V. 11. N 1. P. 28–35. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.179
- Pawlotsky J.M., Chevaliez S., McHutchison J.G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies // *Gastroenterology*. 2007. V. 132. N 5. P. 1979–1998. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.116
- Hassany M., Elsharkawy A. HCV treatment failure in the Era of DAAs // *INTECH open science*. 2017. P. 117–129. DOI: 10.5772/67149
- Svarovskaia E.S., et al. Infrequent development of resistance in genotype 1–6 hepatitis C virus–infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials // *Clinical Infectious Diseases*. 2014. V. 59. N 12. P. 1666–1674. DOI: 10.1093/cid/ciu697
- Wyles D., et al. Post-treatment resistance analysis of hepatitis C virus from phase II and III clinical trials of ledipasvir/sofosbuvir // *Journal of hepatology*. 2017. V. 66. N 4. P. 703–710. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.11.022
- Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens // *Topics in antiviral medicine*. 2017. V. 25. N 3. P. 103. PMID: 28820725
- Pawlotsky J.M. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C // *Journal of hepatology*. 2013. V. 59. N 2. P. 375–382. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.03.030
- Jimmerson L.C. The clinical pharmacology of ribavirin: intracellular effects on endogenous nucleotides and hemolytic anemia: diss. University of Colorado Denver, Anschutz Medical Campus. 2016.
- Hernandez D., et al. Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors // *Journal of Clinical Virology*. 2013. V. 57. N 1. P. 13–18. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.12.020
- Krishnan P., et al. Analysis of hepatitis C virus genotype 1b resistance variants in Japanese patients treated with paritaprevir-ritonavir and ombitasvir // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016. V. 60. N 2. P. 1106–1113. DOI: 10.1128/aac.02606-15
- Trickey A., et al. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection: web annex 4: modelling analyses // *World Health Organization*. 2018. N. WHO/CDS/HIV/18.38.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 // *Molecular biology and evolution*. 2021. V. 38. N 7. P. 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120
- Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. N 22. P. 3276–3278. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu531
- Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // *Briefings in bioinformatics*. 2019. V. 20. N 4. P. 1160–1166. DOI: 10.1093/bib/bbx108
- von Haeseler A., et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Molecular Biology and Evolution*. 2014. V. 32. Iss. 1. P. 268–274. DOI: 10.1093/molbev/msu300
- Singer J.B., et al. GLUE: a flexible software system for virus sequence data // *BMC bioinformatics*. 2018. V. 19. P. 1–18. DOI: 10.1186/s12859-018-2459-9
- Singer J.B., et al. Interpreting viral deep sequencing data with GLUE // *Viruses*. 2019. V. 11. N 4. P. 323. DOI: 10.3390/v11040323
- Кашникова А.Д. и др. Молекулярно-генетический мониторинг как компонент эпидемиологического надзора за гепатитом С // *Здоровье населения и среда обитания*. 2022. Т. 30. N 11. С. 76–81. DOI: 10.35627/2219-5238/2022-30-11-76-81
- Кочнева Г.В. и др. О возможности искоренения гепатита С в России // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021. Т. 39. N 1. С. 31–41. DOI: 10.17116/molgen20213901131
- Базыкина Е.А. и др. Оценка эпидемиологических особенностей ВИЧ-инфекции и генотипического разнообразия вируса гепатита С у ВИЧ-инфицированных граждан в субъектах Дальневосточного федерального

- округа // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20. N 5. С. 79–88. DOI: 10.31631/2073-3046-2021-20-5-79-88
26. Котова В.О. и др. Генетическое разнообразие вируса гепатита С среди населения Нанайского района Хабаровского края // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11. N 1. С. 148–156. DOI: 10.15789/2220-7619-GDO-1265
27. Pawlowsky J.M., et al. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018 // Journal of hepatology. 2018. V. 69. N 2. P. 461–511. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.026
28. Lahser F., et al. Interim analysis of a 3-year follow-up study of NS5A and NS3 resistance-associated substitutions after treatment with grazoprevir-containing regimens in participants with chronic HCV infection // Antiviral therapy. 2018. V. 23. N 7. P. 593–603. DOI: 10.3851/IMP3253
29. Krishnan P., et al. O057: Long-term follow-up of treatment-emergent resistance-associated variants in NS3, NS5A and NS5B with paritaprevir/r-, ombitasvir- and dasabuvir-based regimens // Journal of hepatology. 2015. V. 62. P. S220. DOI: 10.1016/S0168-8278(15)30071-4
30. Wyles D., et al. Long-term persistence of HCV NS5A resistance-associated substitutions after treatment with the HCV NS5A inhibitor, ledipasvir, without sofosbuvir // Antiviral therapy. 2018. V. 23. N 3. P. 229–238. DOI: 10.3851/IMP3181
31. Mawatari S., et al. New resistance-associated substitutions and failure of dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir // Journal of gastroenterology. 2017. V. 52. P. 855–867. DOI: 10.1007/s00535-016-1303-0
32. Lopez Luis B.A., et al. Baseline hepatitis C virus NS5A resistance-associated polymorphisms in patients with and without human immunodeficiency virus coinfection in Mexico // Microbial Drug Resistance. 2021. V. 27. N 9. P. 1195–1202. DOI: 10.1089/mdr.2020.0436
33. Seronello S., et al. Ethanol and reactive species increase basal sequence heterogeneity of hepatitis C virus and produce variants with reduced susceptibility to antivirals // PLoS One. 2011. V. 6. N 11. Article id: e27436. DOI: 10.1371/journal.pone.0027436
34. Wyles D.L., et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV in patients coinfecting with HIV-1 // New England Journal of Medicine. 2015. V. 373. N 8. P. 714–725. DOI: 10.1056/NEJMoa1503153
35. Nelson D.R., et al. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study // Hepatology. 2015. V. 61. N 4. P. 1127–1135. DOI: 10.1002/hep.27726
36. Liu R., et al. Susceptibilities of genotype 1a, 1b, and 3 hepatitis C virus variants to the NS5A inhibitor elbasvir // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015. V. 59. N 11. P. 6922–6929. DOI: 10.1128/aac.01390-15
37. Poordad F., et al. High antiviral activity of NS 5A inhibitor ABT-530 with paritaprevir/ritonavir and ribavirin against hepatitis C virus genotype 3 infection // Liver International. 2016. V. 36. N 8. P. 1125–1132. DOI: 10.1111/liv.13067
38. Hezode C., et al. Resistance analysis in patients with genotype 1–6 HCV infection treated with sofosbuvir/velpatasvir in the phase III studies // Journal of hepatology. 2018. V. 68. N 5. P. 895–903. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.11.032
39. Cabral B.C.A., et al. Frequency distribution of HCV resistance-associated variants in infected patients treated with direct-acting antivirals // International Journal of Infectious Diseases. 2022. V. 115. P. 171–177. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.12.320
40. Zeuzem S., et al. Daclatasvir plus simeprevir with or without ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection // Journal of hepatology. 2016. V. 64. N 2. P. 292–300. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.09.024
41. Curry M.P., et al. Sofosbuvir and velpatasvir for HCV in patients with decompensated cirrhosis // New England Journal of Medicine. 2015. V. 373. N 27. P. 2618–2628. DOI: 10.1056/NEJMoa1512614
42. Gottwein J.M., et al. Efficacy of NS5A inhibitors against hepatitis C virus genotypes 1–7 and escape variants // Gastroenterology. 2018. V. 154. N 5. P. 1435–1448. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.12.015
43. Krishnan P., et al. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015. V. 59. N 2. P. 979–987. DOI: 10.1128/aac.04226-14
44. Nakamoto S., et al. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations // World journal of gastroenterology: WJG. 2014. V. 20. N 11. P. 2902. DOI: 10.3748/wjg.v20.i11.2902
45. Uchida Y., et al. Development of rare resistance-associated variants that are extremely tolerant against NS5A inhibitors during daclatasvir/asunaprevir therapy by a two-hit mechanism // Hepatology Research. 2016. V. 46. N 12. P. 1234–1246. DOI: 10.1111/hepr.12673
46. Uchida Y., et al. “Reversi-type virologic failure” involved in the development of non-structural protein 5A resistance-associated variants (RAVs) in patients with genotype 1b hepatitis C carrying no signature RAVs at baseline // Hepatology Research. 2017. V. 47. N 13. P. 1397–1407. DOI: 10.1111/hepr.12882
47. Kwo P., et al. Effectiveness of elbasvir and grazoprevir combination, with or without ribavirin, for treatment-experienced patients with chronic hepatitis C infection // Gastroenterology. 2017. V. 152. N 1. P. 164–175. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.045
48. Fourati S., et al. Viral kinetics analysis and virological characterization of treatment failures in patients with chronic hepatitis C treated with sofosbuvir and an NS 5A inhibitor // Alimentary pharmacology & therapeutics. 2018. V. 47. N 5. P. 665–673. DOI: 10.1111/apt.14478
49. Pelosi L.A., et al. Effect on hepatitis C virus replication of combinations of direct-acting antivirals, including NS5A inhibitor daclatasvir // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012. V. 56. N 10. P. 5230–5239. DOI: 10.1128/aac.01209-12
50. Kumada H., et al. The combination of elbasvir and grazoprevir for the treatment of chronic HCV infection in Japanese patients: a randomized phase II/III study // Journal of gastroenterology. 2017. V. 52. P. 520–533. DOI: 10.1007/s00535-016-1285-y
51. Kozuka R., et al. The presence of multiple NS 5A RAS s is associated with the outcome of sofosbuvir and ledipasvir therapy in NS 5A inhibitor-naïve patients with chronic HCV genotype 1b infection in a real-world cohort // Journal of Viral Hepatitis. 2018. V. 25. N 5. P. 535–542. DOI: 10.1111/jvh.12850
52. Kao J.H., et al. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for chronic hepatitis C virus (HCV) genotype 1b infection: a sub-analysis in Asian patients from the HALLMARK DUAL study // Liver International. 2016. V. 36. N 10. P. 1433–1441. DOI: 10.1111/liv.13128

53. Dietz J., et al. Consideration of viral resistance for optimization of direct antiviral therapy of hepatitis C virus genotype 1-infected patients // *PloS one*. 2015. V. 10. N 8. Article id: e0134395. DOI: 10.1371/journal.pone.0134395

54. Kwo P.Y., et al. Glecaprevir and pibrentasvir yield high response rates in patients with HCV genotype 1–6 without cirrhosis // *Journal of hepatology*. 2017. V. 67. N 2. P. 263–271. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.039

55. Zeuzem S., et al. NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: prevalence and effect on treatment outcome // *Journal of hepatology*. 2017. V. 66. N 5. P. 910–918. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.01.007

56. Рейнгардт Д.Э. и др. Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С среди пациентов с рецидивом заболевания на терапии препаратами прямого противовирусного действия // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2024. Т. 15. N 4. С. 86–93. DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93

57. Кичатова В.С. и др. Лекарственно-резистентные варианты ВГС субтипа 1b, циркулирующие на территории Российской Федерации: анализ аминокислотных мутаций в белках NS5a и core // Журнал инфектологии. 2018. Т. 10. N 4. С. 30–36. DOI: 10.22625/2072-6732-2018-10-4-30-36

58. Bartels D.J., et al. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment // *Journal of virology*. 2013. V. 87. N 3. P. 1544–1553. DOI: 10.1128/jvi.02294-12

59. Chen Z., et al. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data // *Scientific reports*. 2016. V. 6. N 1. Article id: 20310. DOI: 10.1038/srep20310

REFERENCES

1. Bertino G., et al. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. *World journal of hepatology*, 2016, vol. 8, no. 2, p. 92. DOI: 10.4254/wjh.v8.i2.92

2. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2007, vol. 13, no. 17, p. 2406. DOI: 10.3748/wjg.v13.i17.2406

3. Schulze zur Wiesch J., et al. The proteins of the Hepatitis C virus: Their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. *Archives of virology*, 2003, vol. 148, pp. 1247–1267. DOI: 10.1007/s00705-003-0115-8

4. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus–15 years on. *Journal of General Virology*, 2004, vol. 85, no. 11, pp. 3173–3188. DOI: 10.1099/vir.0.80401-0

5. Correction Naghavi M. et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 2015, vol. 385, no. 9963, pp. 117–171. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2

6. Thursz M., Fontanet A. HCV transmission in industrialized countries and resource-constrained areas. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2014, vol. 11, no. 1, pp. 28–35. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.179

7. Pawlotsky J.M., Chevaliez S., McHutchison J.G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*, 2007, vol. 132, no. 5, pp. 1979–1998. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.116

8. Hassany M., Elsharkawy A. HCV treatment failure in the Era of DAAs. *INTECH open science*, 2017, pp. 117–129. DOI: 10.5772/67149

9. Svarovskaia E.S., et al. Infrequent development of resistance in genotype 1–6 hepatitis C virus–infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. *Clinical Infectious Diseases*, 2014, vol. 59, no. 12, pp. 1666–1674. DOI: 10.1093/cid/ciu697

10. Wyles D., et al. Post-treatment resistance analysis of hepatitis C virus from phase II and III clinical trials of ledipasvir/sofosbuvir. *Journal of hepatology*, 2017, vol. 66, no. 4, pp. 703–710. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.11.022

11. Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens. *Topics in antiviral medicine*. 2017, vol. 25, no. 3, p. 103. PMID: 28820725

12. Pawlotsky J.M. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *Journal of hepatology*, 2013, vol. 59, no. 2, pp. 375–382. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.03.030

13. Jimmerson L. C. The clinical pharmacology of ribavirin: intracellular effects on endogenous nucleotides and hemolytic anemia: diss. University of Colorado Denver, Anschutz Medical Campus, 2016.

14. Hernandez D., et al. Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. *Journal of Clinical Virology*, 2013, vol. 57, no. 1, pp. 13–18. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.12.020

15. Krishnan P., et al. Analysis of hepatitis C virus genotype 1b resistance variants in Japanese patients treated with paritaprevir-ritonavir and ombitasvir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2016, vol. 60, no. 2, pp. 1106–1113. DOI: 10.1128/aac.02606-15

16. Trickey A., et al. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection: web annex 4: modelling analyses. World Health Organization. 2018, no. WHO/CDS/HIV/18.38.

17. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 2021, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120

18. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 22, pp. 3276–3278. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu531

19. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 2019, vol. 20, no. 4, pp. 1160–1166. DOI: 10.1093/bib/bbx108

20. von Haeseler A., et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, vol. 32, iss. 1, pp. 268–274. DOI: 10.1093/molbev/msu300

21. Singer J.B., et al. GLUE: a flexible software system for virus sequence data. *BMC bioinformatics*, 2018, vol. 19, pp. 1–18. DOI: 10.1186/s12859-018-2459-9

22. Singer J.B., et al. Interpreting viral deep sequencing data with GLUE. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 4, p. 323. DOI: 10.3390/v11040323

23. Kashnikova A.D., et al. Genetic monitoring as a component of hepatitis C surveillance. *The Russian journal Public Health and Life Environment*, 2022, vol. 30, no. 11, pp. 76–81. (In Russian) DOI: 10.35627/2219-5238/2022-30-11-76-81

24. Kochneva G.V., et al. On the possibility of eradicating hepatitis C in Russia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2021, vol. 39, no. 1, pp. 31–41. (In Russian) DOI: 10.17116/molgen20213901131

25. Bazykina E.A., et al. Distribution of Hepatitis C Virus among People Living with HIV in Constituent Entities of the Far Eastern Federal District. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2021, vol. 20, no. 5, pp. 79–88. (In Russian) DOI: 10.31631/2073-3046-2021-20-5-79-88
26. Kotova V.O., et al. Genetic diversity of hepatitis C virus in Nanaian region, Khabarovsk territory. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 148–156. (In Russian) DOI: 10.15789/2220-7619-GDO-1265
27. Pawlotsky J.M., et al. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *Journal of hepatology*, 2018, vol. 69, no. 2, pp. 461–511. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.026
28. Lahser F., et al. Interim analysis of a 3-year follow-up study of NS5A and NS3 resistance-associated substitutions after treatment with grazoprevir-containing regimens in participants with chronic HCV infection. *Antiviral therapy*, 2018, vol. 23, no. 7, pp. 593–603. DOI: 10.3851/IMP3253
29. Krishnan P., et al. O057: Long-term follow-up of treatment-emergent resistance-associated variants in NS3, NS5A and NS5B with paritaprevir/r-, ombitasvir- and dasabuvir-based regimens. *Journal of hepatology*, 2015, vol. 62, p. S220. DOI: 10.1016/S0168-8278(15)30071-4
30. Wyles D., et al. Long-term persistence of HCV NS5A resistance-associated substitutions after treatment with the HCV NS5A inhibitor, ledipasvir, without sofosbuvir. *Antiviral therapy*, 2018, vol. 23, no. 3, pp. 229–238. DOI: 10.3851/IMP3181
31. Mawatari S., et al. New resistance-associated substitutions and failure of dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir. *Journal of gastroenterology*, 2017, vol. 52, pp. 855–867. DOI: 10.1007/s00535-016-1303-0
32. Lopez Luis B.A., et al. Baseline hepatitis C virus NS5A resistance-associated polymorphisms in patients with and without human immunodeficiency virus coinfection in Mexico. *Microbial Drug Resistance*, 2021, vol. 27, no. 9, pp. 1195–1202. DOI: 10.1089/mdr.2020.0436
33. Seronello S., et al. Ethanol and reactive species increase basal sequence heterogeneity of hepatitis C virus and produce variants with reduced susceptibility to antivirals. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 11, article id: e27436. DOI: 10.1371/journal.pone.0027436
34. Wyles D.L., et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV in patients coinfecting with HIV-1. *New England Journal of Medicine*, 2015, vol. 373, no. 8, pp. 714–725. DOI: 10.1056/NEJMoa1503153
35. Nelson D.R., et al. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology*, 2015, vol. 61, no. 4, pp. 1127–1135. DOI: 10.1002/hep.27726
36. Liu R., et al. Susceptibilities of genotype 1a, 1b, and 3 hepatitis C virus variants to the NS5A inhibitor elbasvir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2015, vol. 59, no. 11, pp. 6922–6929. DOI: 10.1128/aac.01390-15
37. Poordad F., et al. High antiviral activity of NS 5A inhibitor ABT-530 with paritaprevir/ritonavir and ribavirin against hepatitis C virus genotype 3 infection. *Liver International*, 2016, vol. 36, no. 8, pp. 1125–1132. DOI: 10.1111/liv.13067
38. Hezode C., et al. Resistance analysis in patients with genotype 1–6 HCV infection treated with sofosbuvir/velpatasvir in the phase III studies. *Journal of hepatology*, 2018, vol. 68, no. 5, pp. 895–903. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.11.032
39. Cabral B.C.A., et al. Frequency distribution of HCV resistance-associated variants in infected patients treated with direct-acting antivirals. *International Journal of Infectious Diseases*, 2022, vol. 115, pp. 171–177. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.12.320
40. Zeuzem S., et al. Daclatasvir plus simeprevir with or without ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *Journal of hepatology*, 2016, vol. 64, no. 2, pp. 292–300. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.09.024
41. Curry M.P., et al. Sofosbuvir and velpatasvir for HCV in patients with decompensated cirrhosis. *New England Journal of Medicine*, 2015, vol. 373, no. 27, pp. 2618–2628. DOI: 10.1056/NEJMoa1512614
42. Gottwein J.M., et al. Efficacy of NS5A inhibitors against hepatitis C virus genotypes 1–7 and escape variants. *Gastroenterology*, 2018, vol. 154, no. 5, pp. 1435–1448. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.12.015
43. Krishnan P., et al. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2015, vol. 59, no. 2, pp. 979–987. DOI: 10.1128/aac.04226-14
44. Nakamoto S., et al. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014, vol. 20, no. 11, p. 2902. DOI: 10.3748/wjg.v20.i11.2902
45. Uchida Y., et al. Development of rare resistance-associated variants that are extremely tolerant against NS5A inhibitors during daclatasvir/asunaprevir therapy by a two-hit mechanism. *Hepatology Research*, 2016, vol. 46, no. 12, pp. 1234–1246. DOI: 10.1111/hepr.12673
46. Uchida Y., et al. “Reversi-type virologic failure” involved in the development of non-structural protein 5A resistance-associated variants (RAVs) in patients with genotype 1b hepatitis C carrying no signature RAVs at baseline. *Hepatology Research*, 2017, vol. 47, no. 13, pp. 1397–1407. DOI: 10.1111/hepr.12882
47. Kwo P., et al. Effectiveness of elbasvir and grazoprevir combination, with or without ribavirin, for treatment-experienced patients with chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*, 2017, vol. 152, no. 1, pp. 164–175. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.045
48. Fourati S., et al. Viral kinetics analysis and virological characterization of treatment failures in patients with chronic hepatitis C treated with sofosbuvir and an NS 5A inhibitor. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2018, vol. 47, no. 5, pp. 665–673. DOI: 10.1111/apt.14478
49. Pelosi L.A., et al. Effect on hepatitis C virus replication of combinations of direct-acting antivirals, including NS5A inhibitor daclatasvir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, vol. 56, no. 10, pp. 5230–5239. DOI: 10.1128/aac.01209-12
50. Kumada H., et al. The combination of elbasvir and grazoprevir for the treatment of chronic HCV infection in Japanese patients: a randomized phase II/III study. *Journal of gastroenterology*, 2017, vol. 52, pp. 520–533. DOI: 10.1007/s00535-016-1285-y
51. Kozuka R., et al. The presence of multiple NS 5A RAS s is associated with the outcome of sofosbuvir and ledipasvir therapy in NS 5A inhibitor-naïve patients with chronic HCV genotype 1b infection in a real-world cohort. *Journal of Viral Hepatitis*, 2018, vol. 25, no. 5, pp. 535–542. DOI: 10.1111/jvh.12850

52. Kao J.H., et al. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for chronic hepatitis C virus (HCV) genotype 1b infection: a sub-analysis in Asian patients from the HALLMARK DUAL study. *Liver International*, 2016, vol. 36, no. 10, pp. 1433–1441. DOI: 10.1111/liv.13128
53. Dietz J., et al. Consideration of viral resistance for optimization of direct antiviral therapy of hepatitis C virus genotype 1-infected patients. *PloS one*, 2015, vol. 10, no. 8, article id: e0134395. DOI: 10.1371/journal.pone.0134395
54. Kwo P.Y., et al. Glecaprevir and pibrentasvir yield high response rates in patients with HCV genotype 1–6 without cirrhosis. *Journal of hepatology*, 2017, vol. 67, no. 2, pp. 263–271. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.039
55. Zeuzem S., et al. NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: prevalence and effect on treatment outcome. *Journal of hepatology*, 2017, vol. 66, no. 5, pp. 910–918. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.01.007
56. Reingardt D.E., et al. Distribution of hepatitis C virus drug resistance mutations among patients with recurrence of the disease during therapy with direct antiviral drugs. *HIV Infection and Immunosuppressive*, 2024, vol. 15, no. 4, pp. 86–93. (In Russian) DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93
57. Kichatova V.S., et al. Drug resistant variants of hepatitis C virus genotype 1b in Russia: analysis of aminoacid substitutions in NS5a and core proteins. *Journal Infectology*, 2018, vol. 10, no. 4, pp. 30–36. (In Russian) DOI: 10.22625/2072-6732-2018-10-4-30-36
58. Bartels D.J., et al. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment. *Journal of virology*, 2013, vol. 87, no. 3, pp. 1544–1553. DOI: 10.1128/jvi.02294-12
59. Chen Z., et al. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, no. 1, article id: 20310. DOI: 10.1038/srep20310

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Василий Е. Екушов и Наталья М. Гашникова составили концепцию исследования. Сергей Е. Скударнов, Виталла-Виктория В. Миниханова и Татьяна С. Остапова собрали эпидемиологические данные и оказали помощь в сборе образцов. Василий Е. Екушов, Алексей В. Тотменин, Максим Р. Халиков и Людмила Г. Готфрид выполнили генотипирование ВГС, провели анализ эпидемиологических данных, выполнили филогенетический анализ. Василий Е. Екушов и Наталья М. Гашникова провели анализ мутаций резистентности ВГС. Наталья М. Гашникова руководила проектом. Все авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Vasily E. Ekushov and Natalya M. Gashnikova composed the research concept. Sergey E. Skudarnov, Vitalla-Victoria V. Minikhanova and Tatyana S. Ostapova collected epidemiological data and assisted with sample collection. Vasily E. Ekushov, Alexei V. Totmenin, Maksim R. Halikov and Ludmila G. Gotfrid performed HIV genotyping, analysed epidemiological data and performed phylogenetic analysis. Vasily E. Ekushov and Natalya M. Gashnikova analysed HCV resistance mutations. Natalya M. Gashnikova supervised the project and prepared the article. All authors are equally participated in the writing of the manuscript and are responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Василий Е. Екушов / Vasily E. Ekushov <https://orcid.org/0000-0002-0465-1260>
Алексей В. Тотменин / Alexei V. Totmenin <https://orcid.org/0000-0002-7418-4872>
Людмила Г. Готфрид / Ludmila G. Gotfrid <https://orcid.org/0000-0001-5896-8231>
Максим Р. Халиков / Maksim R. Halikov <https://orcid.org/0009-0007-1765-1909>
Виталла-Виктория В. Миниханова / Vitalla-Victoria V. Minikhanova <https://orcid.org/0009-0008-7258-3619>
Сергей Е. Скударнов / Sergey E. Skudarnov <https://orcid.org/0009-0001-3265-1778>
Татьяна С. Остапова / Tatyana S. Ostapova <https://orcid.org/0009-0007-4193-6680>
Наталья М. Гашникова / Natalya M. Gashnikova <https://orcid.org/0000-0002-0891-0880>