

Научная сессия Белорусского государственного медицинского университета, секция
«Эпидемиология и микробиология»

Характеристика мутаций в геноме ВГВ и их клиническое значение

Д.б.н., Е.Л. Гасич, Е.С. Белякова, А.С. Гудель

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

Минск 25 декабря 2022



Гепатит В – потенциально опасная для жизни инфекция печени, вызываемая вирусом гепатита В (ВГВ).

Формы течения:

- острая;
- хроническая.

Пути передачи:

- перинатальный от матери ребенку;
- через контакт с кровью и другими биологическими жидкостями инфицированного человека (при половых контактах, порезах колюще-режущими инструментами в бытовых условиях и при медицинских манипуляциях)

Данные ВОЗ (2019 год):

порядка 296 млн человек живёт с хронической формой гепатита В;

ежегодно насчитывается около 1,5 млн новых случаев инфицирования ВГВ;

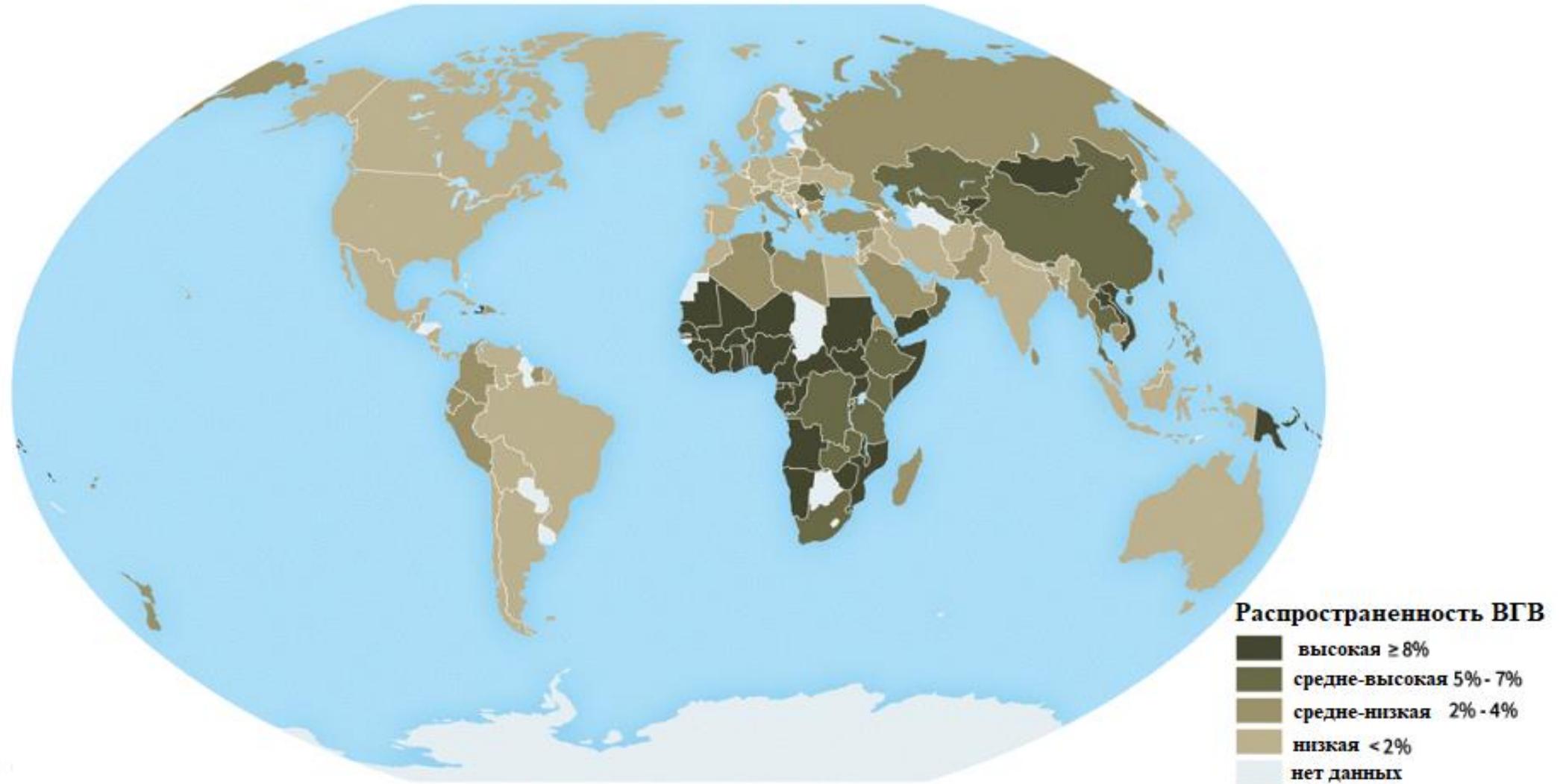
В 2019 году от гепатита В умерло 820 000 человек.

Главной опасностью ВГВ является высокий риск летального исхода по причинам развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

В 2015 году ВОЗ было объявлено о начале программы ликвидации вирусного гепатита как такового к 2030 году. Республика Беларусь также присоединилась к этой программе.



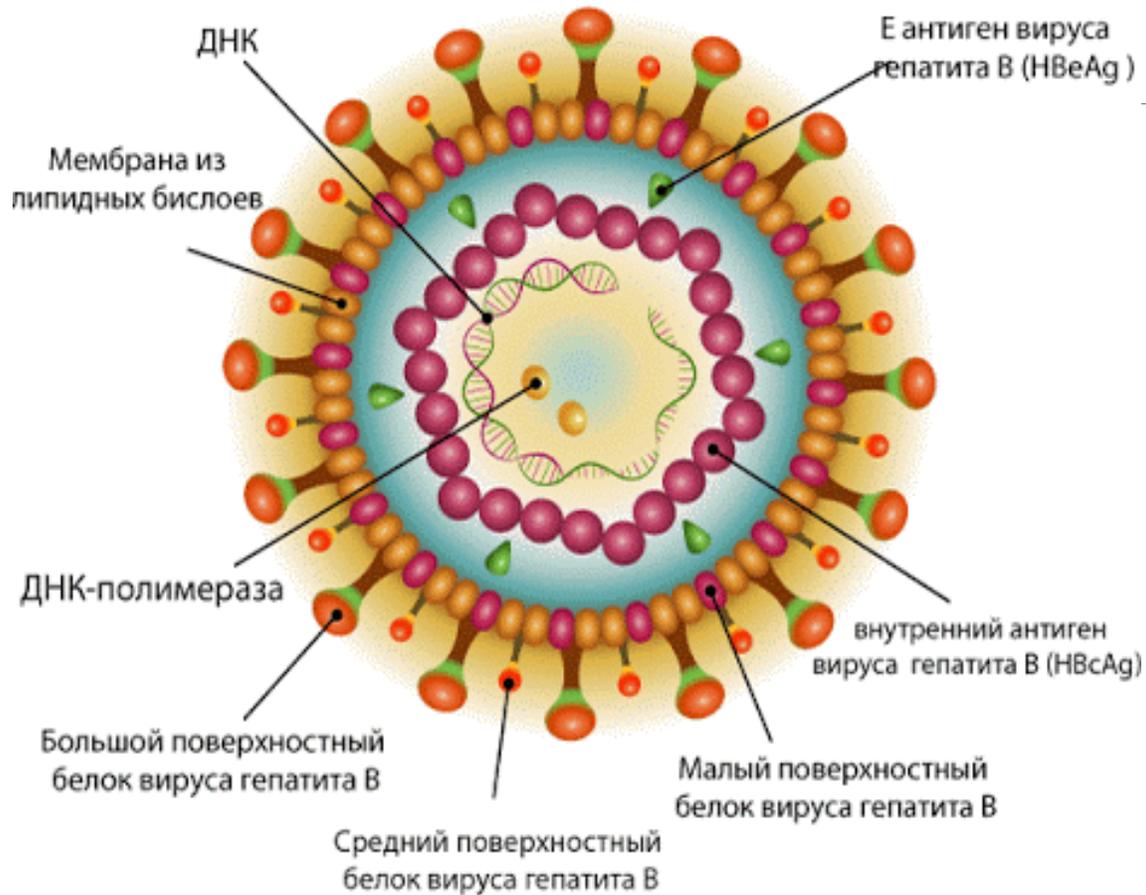
Распространенность вируса гепатита В



Source: Centers for Disease Control and Prevention. [CDC Yellow Book 2020](#): Health Information for International Travel. New York: Oxford University Press; 2019.



Структура вируса гепатита В



Геном ВГВ кодирует четыре ОРС и семь белков:

НВх (неструктурный регуляторный белок);

полимераза отвечает за репликацию генома, обладает активностью обратной транскриптазы;

белок кора, L-, M- и S-HBsAg – белки формирующие структуру вириона;

HBeAg.



Генотипы ВГВ

Выделяют 10 генотипов вируса гепатита В: А, В, С, D, E, F, G, H, I и J.

Генотип вируса определяется консервативными участками в основном белке оболочки – S-белке, который обычно называют HBsAg. Различия между генотипами составляют более 8 %.

Генотип	Распространенность	Особенности
A	повсеместно, но чаще в Северной и Южной Америке, Западной Европе, Индии и Африке	эффективно излечивается терапевтическими методами с использованием интерферона
B	Азия, США (субтип В1 доминирует в Японии, В2 – Китай, Вьетнам, В3 ограничивается Индонезией, В4 представлен лишь во Вьетнаме, В5 - Филиппины)	коррелирует с повреждением печени (цирроз, ГЦК)
C	Азия, США (С1 – Китай, Япония, Корея, С2 – Юго-Восточная Азия, Китай, Бангладеш, С3 – Океания)	коррелирует с повреждением печени (цирроз, ГЦК)
D	Африка, Европа, Азия (D4 –Океания, D1-D4 – Африка, Европа, Азия)	делится на 8 субтипов (D1-D8)
E	преимущественно в Западной и Южной Африке	характеризуются низкой вариабельностью в последовательности нуклеотидов в геноме, по сравнению с другими генотипами
F	Центральная и Южная Америка, Аляска	два субтипа (F1 и F2)
G	спорадически встречается в различных частях света, в частности в Соединенных Штатах Америки и во Франции	характеризуются низкой вариабельностью в последовательности нуклеотидов в геноме, по сравнению с другими генотипами
H	Центральной и Южной Америке и Калифорнии в США	
I	единичные случаи	Получен в результате рекомбинации генотипов А, С, G
J	выявлен в Япония	



Распространение генотипов среди пациентов выборки в Республике Беларусь

Для анализа были отобраны образцы поступившие на исследование в лабораторию диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций в период с мая 2012г. по декабрь 2021г. Всего отобрано **626 образцов** сыворотки/плазмы крови от пациентов инфицированных ВГВ с достаточной вирусной нагрузкой (более 1000копий/мл)

Наиболее распространенным генотипом является генотип D – 494 (78,91±1,6%), затем A – 129 (20,61±1,6%), C – 3 (0,48±0,3%).

Распределение по субтипам:

A1 – 1 (0,16±0,2%)

A2 – 129 (20,61±1,6%)

C2 – 3 (0,48±0,3%)

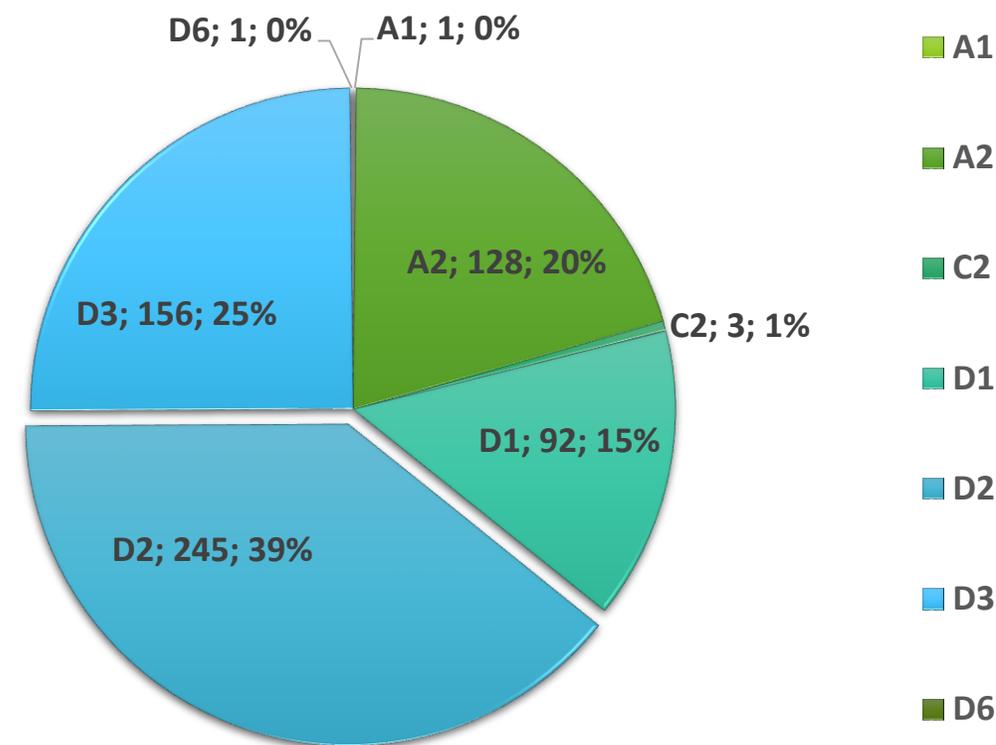
D1 – 92 (14,70±1,4%)

D2 – 245 (39,14±2,0%)

D3 – 156 (24,92±1,7%)

D6 – 1 (0,16±0,2%)

Распространение субтипов ВГВ среди пациентов выборки в РБ



Клинически значимые мутации в геноме ВГВ

Влияет на вирусный клиренс
мутации в эпитопах в
положениях 10-48 или
58-100

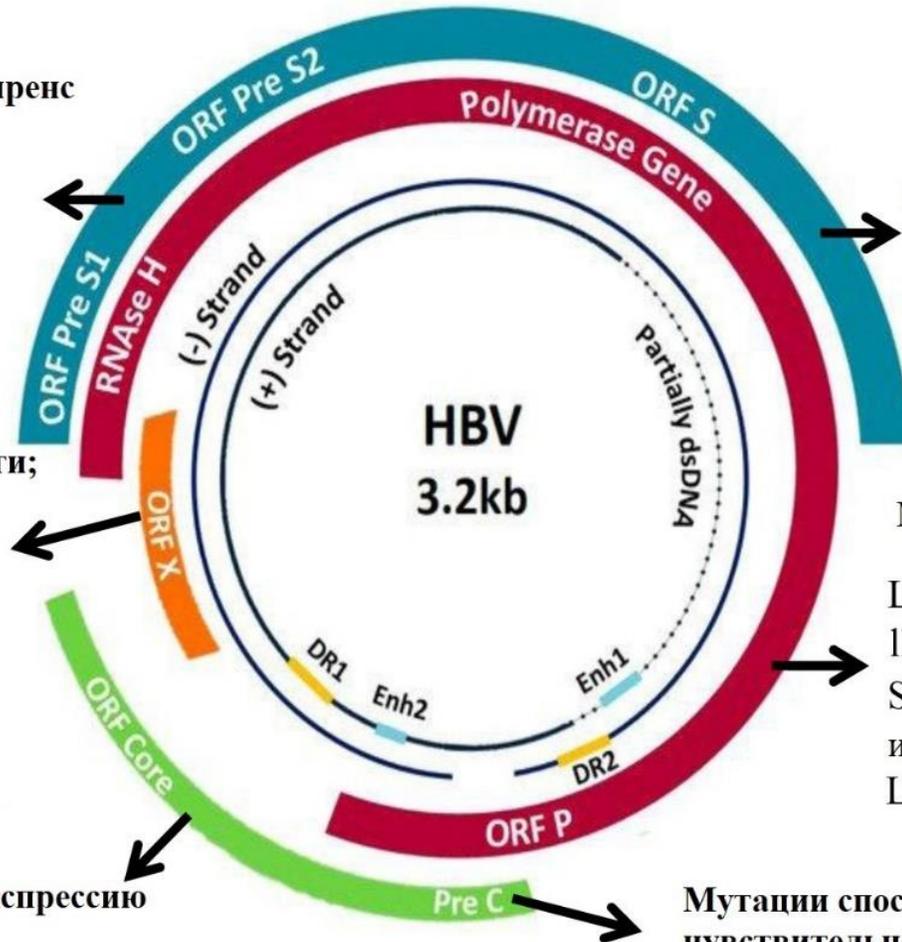
Потеря транс-активности;
инфицирование без
классических
серологических маркеров

делеция 1770-1777
и др.

Онкогенез: С1653Т,
Т1753V и др.

Мутации снижающие экспрессию
НВеАg

BCP: трансверсия А на Т в 1762
транзиция G на А в 1764



Вакцин-ускользающие мутации
мутации в петле-III
замена Gly на Arg в аа 145

Мутации лекарственной
устойчивости

Leu-568 на Val, Ser-561 на Thr,
Ile-511 на Val, Ala-548 на Val,
Ser-567 на Ala, Ala-570 на Thr
или Val 521 на Leu и
Leu-528 на Met

Мутации способствующие потере
чувствительности к интерферону
G на А в 1896, мутации в 1817-1819,
1874-1876, 1895-1897



Мутации S-гена

HBsAg содержит основной В-клеточный эпитоп, является поверхностным антигеном, на который нацелены антитела, присутствующие у вакцинированных людей, и антитела, связывающиеся с HBsAg в серологических иммуноанализах.

Таким образом ряд мутаций «а» детерминанты гидрофильной области (MHR), которая является основной мишенью ответов нейтрализации В-клеток, вызывает конформационные изменения детерминанты, что в свою очередь влияет на антигенность HBsAg, что может обеспечить ложноотрицательные результаты в серологических исследованиях.

Аминокислотная замена G145R является основной, вызванной вакциной, иммунной мутацией.

Мутации в «а» детерминанте T116N, P120S/E, I/T126A / N / I / S, Q129H / R, M133L, K141E/P142S, D144A / E и др. могут привести к критической неудаче при обнаружении вируса при обычном скрининге. Такие мутации называют ускользающими – escape мутациями.

Наконец, также делеции в S-области могут влиять на экспрессию, синтез и секрецию HBsAg.

Эти мутации в HBsAg могут привести к критической неудаче при обнаружении вируса при обычном скрининге.

В **80 (12,78 ±1,3%)** из **626** проанализированных последовательностей обнаружены escape мутации HBsAg

Мутация	Частота встречаемости
A128V	57 (71,25±5,1%)
D144E	2 (2,5±1,7%)
P120PT	6 (7,50±2,9%)
M133MT	6 (7,50±2,9%)
F134FL	2 (2,5±1,7%)
R122K	5 (6,25±2,7%)
T131N	2 (2,5±1,7%)
T126I	4 (5±2,4%)
Y134N	7 (8,75±3,2%)
Более 1 мутации	11 (13,75±3,9%)



Мутации Р-ген

Мутации лекарственной устойчивости подразделяются на: **а). основные** (первичные) – мутации, снижающие чувствительность к противовирусному лекарственному средству; **б). компенсаторные** (вторичные) – мутации, которые компенсируют функциональные дефекты активности полимеразы, связанные с появлением первичной мутации.

Например, мутации rtM204I / V (домен С), rtL180M (домен В) и rtA181T / V (домен В) придают устойчивость к ламивудину и телбивудину. Аминокислотная замена M204I/V часто ассоциируются с компенсаторными мутациями в других доменах, такими как rtL80V/I, 58 rtI169T, 59 rtV173L, rtL180M, rtT184S / G, rtS202I и rtQ215S, которые усиливают репликацию вируса. Другими предполагаемыми компенсаторными мутациями являются rtV84M, rt214, rtL217P, rtL229M, rtI233V и rtN238H.

Также определены мутации связанные устойчивостью к адефовиру (ADF), энтерокавиру, тенофовиру (*in vitro* у пациентов с коинфекцией ВИЧ-ВГВ).

Кроме того отмечается перекрестная резистентность, так Распространенные мутации, которые придают устойчивость к ламивудину и телбивудину (например, rtM204V/I, rtL180M) обуславливают перекрестную резистентность к другим L-нуклеозидам и снижают чувствительность к энтерокавиру, но не к адефовиру или тенофовиру.

Как у L-нуклеозидов (LMV и LdT), так и у алкилфосфонатов (ADV и TDF) встречается мутация rtA181T/V, что делает её маркером множественной лекарственной устойчивости.

В **26 (4,5±0,8%)** из **626** проанализированных последовательностей обнаружены мутации резистентности к противовирусным препаратам

Препарат	Мутация	Частота
Адефовир (ADV)	I233V	6 (23,08±8,3%)
Ламивудин	204I	12(46,15±9,8%)
	80I	7 (26,92±8,7%)
Энтековир	T184I	1(3,85±3,8%)
Ламивудин/ Энтекавир/ Телбивудин/	L180M	9 (34,62±9,3%)
	M204V	8 (30,77±9,1%)



Мутации X-гена

Белок X (HВх) гена принимает участие в многочисленных процессах, в том числе обладает способностью активировать и/или деактивировать как вирусные, так и клеточные промоторы посредством прямого взаимодействия с ядерными факторами транскрипции или посредством цитоплазматической трансдукции сигнала, **оказывая влияние на широкий спектр клеточных процессов, включая клеточный цикл, пролиферацию клеток и апоптоз.**

В нескольких исследованиях сообщалось о гепатоканцерогенном действии HВх.

Рядом исследований установлено, что большинство HВх, обнаруженных в тканях пациентов с **циррозом печени**, имеют мутации, которые могут изменять функцию HВх.

Мутанты HВх, несущие как точечные мутации, так и делеции, особенно укороченные С-терминалы, часто обнаруживаются у пациентов с **ГЦК**.

Таким образом, делается вывод, что HВх играет решающую роль в патогенезе и прогрессировании осложнений, связанных с ВГВ.

Влияние	Мутации
Мутации влияющие на тяжесть течения заболевания, скорость прогрессирования	A1762T/G1764A в области кодирующей базально-ядерный промотор (BCP) G1386A/C (V5M/L) C1653T (H94Y) T1753V (I127V), а также делеция либо вставка в С-терминальном участке HВх
Связаны с острым течением заболевания печени, включая гепатоцеллюлярную карциному	T1753V (I127L,T,N,S) C1653T (H94Y) мутации в области энхансера II / BCP A1383C, G1386A/C (V5M/L) C1485T (P38S)
Связаны с возникновением оккультных форм ВГВ	X8Del



Результаты исследований по X-участку генома вируса гепатита В полученные в лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций

Методом секвенирования было проведено исследование **55 образцов сыворотки/плазмы крови** от пациентов с подтвержденной ВГВ инфекцией по X-участку генома вируса гепатита В.

В результате было выявлено **88 вариантов нуклеотидных замен**.

При этом **для ряда мутаций отмечается зависимость от генотипа**, так нуклеотидные замены С1510Т, А1545С, G1613А, А1635Т, С1677Т, Т1740С, G1514А, G1514Т, С1475Т, С1472Т, Т1463G характерны в большей степени для **D генотипа**.

Такие нуклеотидные замены, как А1545Т, А1575Т, С1605Т, С1631Т, Т1638С, А1634G, Т1674С, Т1675А, Т1718G, А1702С, А1726G, Т1739С, G1513А, G1436С, G1409Т, С1392А характерны для генотипа А, а именно А2 субтипа ВГВ, при этом в образцах с генотипом D данные нуклеотидные замены были обнаружены в единичных случаях.



Мутации pre-core и core региона

Pre-Core / Core регион кодирует два белка: структурный, HBeAg, который образует нуклеокапсид и секреторным белок HbeAg, который является маркером репликации ВГВ.

Мутации Pre-Core / Core областях вызывают HBeAg-негативный хронический гепатит В с присутствием анти-HBe, при котором продолжается репликация инфекции, при этом ДНК ВГВ можно обнаружить (> 2000 МЕ / мл).

Ложноотрицательные тесты на HBeAg обусловлены мутациями промотора базального ядра и преядерного региона, которые модулируют секрецию HBeAg во время транскрипции и останавливают продукцию HBeAg. Мутации **A1762T** и **G1764A**, обуславливают уменьшение синтеза мРНК пре-core региона. В исследованиях было показано, что эти две мутации **приводят к снижению секреции HBeAg и играют значительную роль в гепато-канцерогенезе.**

Кроме того, наибольший риск развития ГЦК зависит от генотипа (в основном генотип С), а также от присутствия мутаций базального ядерного промотора A1762T и G1764A и мутации пре-core региона **G1896A**. В дополнение к мутациям A1762T и G1764A были найдены другие мутации: T1753C и C1766T. Некоторые из этих мутаций (T1753C, A1762T и 1764A), вместе с A1752G, A1846T, G1896A и G1899A, значительно коррелируют с HBeAg сероконверсией.



Выводы

- 1). В РБ проводится молекулярно-генетический скрининг генетической variability ВГВ. Установлено преобладание D генотип ($78,91 \pm 1,6\%$) представленного главным образом D2 субтипом ($39,14 \pm 2,0\%$) ВГВ.
- 2). При анализе мутаций S-гена выявлены единичные мутации, которые приводят к ускользанию от иммунного ответа и получению ложноотрицательных результатов при серологических анализах. Установлено, что мутация A128V встречается наиболее часто ($71,25 \pm 5,1\%$) и является полиморфизмом D2 субтипа ВГВ.
- 3). Уровень резистентности к противовирусным препаратам составляет в среднем $4,5 \pm 0,8\%$, чаще всего устанавливается резистентность к ламивудину.
- 4). Установлена взаимосвязь мутаций Pre-Core/Core региона и X-гена генома ВГВ влияющая на прогрессирование осложнений вызываемых ВГВ (ЦП и ГЦК).



Спасибо за внимание!

