



ДИАГНОСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С RF1_2k/1b С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЧИПА, ФУНКЦИОНИРУЮЩЕГО ПО ПРИНЦИПУ “МНОГО ЗОНДОВ/ОДИН СПОТ”

© 2022 г. В. А. Рябинин*, #, И. А. Акимов**, А. Н. Сняжков*, Н. П. Пичко*, М. К. Иванов**, ***

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

**АО “Вектор-Бест”, 630117 Новосибирск, Россия

***Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8/2

Поступила в редакцию 18.03.2021 г.

После доработки 10.04.2021 г.

Принята к публикации 19.04.2021 г.

Используемый в рутинной практике генотипический анализ, основанный только на одном локусе генома, не позволяет детектировать рекомбинантные формы вирусов с высокой степенью вариабельности генома в районе точки рекомбинации. На примере рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С нами показана возможность ее определения с использованием подхода “много зондов/один спот”. Анализ клинических образцов сыворотки крови показал, что данный подход дает возможность провести однозначное отнесение выявленного в этих образцах вируса гепатита С к субтипам 2k, 1b или их рекомбинанту RF1_2k/1b.

Ключевые слова: вирус гепатита С, рекомбинант RF1_2k/1b, “много зондов/один спот”, микрочип, РОС-диагностика

DOI: 10.31857/S0132342322010092

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в мире ~71 млн человек инфицировано вирусом гепатита С (ВГС). Ежегодно регистрируют ~2 млн новых случаев заражения, а от осложнений хронического гепатита С ежегодно умирают почти 400 тыс. человек [1]. С момента открытия ВГС его генетическое разнообразие ученые связывали лишь с высокой частотой возникновения мутаций, накапливаемых в геноме. Однако в 2002 г. в России впервые была обнаружена циркулирующая рекомбинантная форма ВГС, названная RF1_2k/1b [2]. Установлено, что данная форма возникла на территории бывшего СССР (по одним данным, в период с 1923 по 1956 гг. [3], а по другим – с 1957 по 1970 гг. [4]) в результате индивидуального рекомбинационного события. Все структурные гены этого ре-

комбинанта относятся к субтипу 2k, а неструктурные, начиная с точки рекомбинации и далее в направлении области 3'-UTR – к субтипу 1b. Циркулирующая рекомбинантная форма ВГС RF1_2k/1b была впоследствии обнаружена в Грузии, Узбекистане, Ирландии, Франции, Германии, Кипре, Израиле и Греции [5–9]. Правильное и своевременное выявление рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b – необходимое условие для назначения эффективной терапии [10–13].

Определение рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b, базирующееся только на анализе локусов 5'-UTR или *Core* генома ВГС, – недостаточно и требует либо внедрения двухлокусного анализа с добавлением в исследование неструктурных генов (например, *NS5b*), либо их секвенирования по методу Сэнгера [14–16]. Это подтверждается анализом образцов сыворотки крови пациентов (республика Башкортостан), инфицированных ВГС. При использовании коммерческих тест-систем ВГС, выявленный в этих образцах, был отнесен к генотипу 2. В действительности ~20% из них – рекомби-

Сокращения: ВГС – вирус гепатита С; МПОС – “много зондов/один спот” (many probes/one spot); UTR – нетранслируемая область (untranslated region).

Автор для связи (тел.: (3832) 363-51-73, эл. почта: ryabinin@niboch.nsc.ru).

нантная форма RF1_2k/1b [17]. Подобрать на район точки рекомбинации общий для всех изолятов олигонуклеотидный TaqMan-зонд для детекции рекомбинанта RF1_2k/1b методом ОТ-ПЦР в реальном времени не представляется возможным из-за высокой вариабельности этих последовательностей [17].

Ранее нами на примере типирования с применением микрочипов вируса гриппа А [18, 19], вируса оспы [20] и ряда урогенитальных инфекций [21] была показана эффективность использования подхода “многo зондов/один спот” (MPOS-подход). Сущность его заключается в том, что при одновременном наличии в пределах одного спота нескольких типизирующих зондов существенно повышается как специфичность, так и чувствительность метода. Это обусловлено связыванием анализируемой ДНК со всеми или большей частью зондов спота с высокой степенью кооперативности [20]. Мы предположили, что MPOS-подход на микрочипе или более простой в техническом отношении его вариант (например, биосенсор) позволит определить рекомбинантную форму ВГС RF1_2k/1b. Полагая, что выбрав два набора характерных зондов (один для 2к-области, а второй для 1b-области), можно определить, к какому субтипу относится анализируемый изолят – 2к, 1b или рекомбинанту RF1_2k/1b.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были использованы ампликоны, полученные ранее в результате ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием РНК, выделенной из образцов сыворотки крови пациентов, инфицированных вирусом гепатита С субтипов

1b, 2к и рекомбинантом RF1_2k/1b [17]. Для расчета зондов были использованы олигонуклеотидные последовательности 47 ампликонов, отнесенных Акимовым с соавт. [17] к рекомбинанту RF1_2k/1b. Расчет и отбор зондов проводили с использованием компьютерной программы, созданной ранее для расчета зондов для типирования вируса гриппа А [22]. Протяженность зондов составляла 14 оснований, т.к. таковая оказалась оптимальной при использовании MPOS-подхода [20]. Вариабельность олигонуклеотидных последовательностей секвенированных ампликонов весьма высока, и найти даже небольшое число зондов, характерных для большинства изолятов, затруднительно [17]. Поэтому отбор проводили таким образом, чтобы зонд был характерен не менее чем для 15% ампликонов. В итоге для 2к-региона было отобрано 13 зондов, а для 1b-региона – 11 зондов. В табл. 1 приведены структуры зондов и их встречаемость в проанализированных ампликонах. На 3'-конце эти зонды содержали необходимый для иммобилизации аминоксильный линкер.

Для каждого из 47 рассмотренных ампликонов есть от 3 до 6 характерных последовательностей как для 1b-, так и для 2к-региона. Каждый из рассчитанных зондов содержится в 15–78% анализируемых последовательностей (табл. 1). Ниже в качестве примера приведена одна из последовательностей (Sample_14_Rec). Левее точки рекомбинации (отмечена подчеркиванием) серым выделены последовательности, характерные для субтипа 2к (пять последовательностей), правее – характерные для субтипа 1b (пять последовательностей).

Таблица 1. Типизирующие зонды и их встречаемость в проанализированных ампликонах

2к-зонды		1b-зонды	
последовательность (5'-3')	встречаемость, %	последовательность (5'-3')	встречаемость, %
GCTGTAAGACATCT	52	CTGCGGGACTGGGC	78
AGGTGGCAAGTACG	44	CCCGTCTCCGCCCG	22
TGCTGTAAGACATC	44	ACTGCGGGACTGGG	75
CAGGTGGCAAGTAC	48	GAAGGGCAGGGGTG	22
CAAGCTCTGTTGAG	70	CACTGCGGGACTGG	75
GCGCAAGCTCTGTT	74	TCTGACATGGAGAC	22
GACTGGCACCTACA	67	TCTGACATGGAGAC	75
GAGTGTCTGACAA	59	GGGAGGGAGATACT	22
TGCTAACCTTGGT	52	TACTCCCAACAGAC	75
GTCAGAGCGCAAGC	74	ACCGCGGCGTGTGG	26
GACTGGCACCTAC	66	GGGGAGGGAGATAG	66
CGTCAGAGCGCAAG	70		
CCTGACAAGAACGC	15		

TGTCCTGACAAGAACGCCATACTTCGTCAGAGCGCAAGCCCTGTTGAGGATATGTGCC
 GCTGTTAAACATCTCTCAGGTGGCAAGTACGCCAGATGATGCTGCTAACCCCTTGGTAA
 ATGGACTGGCACCTACATTTATGACCATCTCACTCCACTGCGGGACTGGGCTCACGTG
 GGCCTACGAGACCTTGCGGTGGCAGTCGAGCCTGTTGTCTTCTCTGACATGGAGACCA
 AGATCATCACCTGGGGGGCAGACACCGCGGCGTGTGGGGACRTCATCCTGGGCTTGCC
 CGTCTCCGCCCCAAGGGGGAGGGAGATACTTCTGGGCCCGGCCGATAGCTTTGAAGGG
 CAGGGGTGGCGGCTCCTTGCACSTATCACGGCTTACTCCCAACAGACGCGGGGTCTAC
 TTGGCTGCATCATCACTAGCCTCACAGGCC

Следует отметить, что данный набор зондов пригоден и для характеристики рекомбинантов, не использованных при расчете, а взятых из базы данных GenBank по рекомбинантам, выявленным не только в России, но и других странах: Узбекистане, Австрии, Ирландии, Кипре, Израиле, Греции и др. Например, изолят, описанный в 2011 г. на Кипре (GenBank: HQ537005.1), характеризуется пятью 2к-зондами и шестью 1б-зондами. Первый из обнаруженных рекомбинантов, выделенный в Санкт-Петербурге (Россия) в 2001 г. (GenBank: AY070215.1), определяется тремя и пятью зондами соответственно. Аналогичная картина наблюдается и для других изолятов рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b, представленных в базе данных NCBI. Поэтому можно полагать, что этот набор зондов может быть использован для выявления рекомбинантов ВГС RF1_2k/1b из других географических источников и в достаточной широком временном интервале. Для экспериментальной проверки рассчитанного набора зондов (табл. 1) был сформирован микрочип (рис. 1), в котором споты для определения генотипа 2к содержали все 13 зондов, относящихся к генотипу 2к, а споты для определения генотипа 1б – все 11 зондов, относящихся к генотипу 1б.

При гибридизации ампликона генотипа 1б наблюдается флуоресценция спотов, содержащих смесь зондов для определения этого генотипа (рис. 1б). Флуоресценция спотов, содержащих смесь зондов для определения генотипа 2к, невелика и близка к таковой для контроля неспецифического связывания и буферного раствора. Соотношение уровней флуоресценции спотов, соответствующих генотипам 1б и 2к, составляет ~93 : 1. Для других образцов это соотношение варьируется от 29 до 210 раз (среднее значение 90 для 18 образцов).

Вирус гепатита С субтипа 2к встречается существенно реже, и нам был доступен лишь один изолят. Следует отметить, что и в литературе, и в базе NCBI данных по нуклеотидным последовательностям гена NS2 для субтипа 2к гораздо меньше,

чем для субтипа 1б и рекомбинанта RF1_2k/1b. Чуб с соавт. [4] полагают, что это обусловлено приобретением рекомбинантом RF1_2k/1b неструктурной части генома, содержащей гены, кодирующие репликативный комплекс, от родительского субтипа 1б, что дало ему преимущество в распространении по сравнению с субтипом 2к. На рис. 1в приведена картина гибридизации для ампликона, полученного из изолята ВГС субтипа 2к. Соотношение уровней флуоресценции спотов, соответствующих субтипам 2к и 1б, составляет ~8 : 1.

Полученные результаты гибридизации по индивидуальным субтипам 1б и 2к показывают, что выбранные наборы олигонуклеотидных зондов позволяют проводить однозначное определение этих субтипов ВГС.

На рис. 1г приведена картина гибридизации ампликона ВГС рекомбинанта RF1_2k/1b (Sample_14_Rec). Значения флуоресценции типизирующих спотов на субтипы 1б и 2к близки, что позволяет провести однозначное отнесение этого изолята к рекомбинанту RF1_2k/1b. Для других рекомбинантных изолятов наблюдается аналогичная картина. Соотношение флуоресценции спотов, соответствующих генотипам 2к и 1б, варьируется от образца к образцу в интервале 0.56–1.44 (среднее значение 0.94 для 47 образцов) и определяется количеством зондов, комплементарных анализируемой последовательности, прочностью дуплекса, образованного этими зондами, и последовательностью ампликона, что отмечалось в работе Kostina et al. [20].

Таким образом, близкие по значению уровни флуоресценции спотов, содержащих смесь типизирующих зондов на субтипы 2к и 1б, указывают на наличие в анализируемом образце рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b. Если же уровни флуоресценции типизирующих спотов на субтипы 2к и 1б весьма существенно различаются, то ВГС относится либо к субтипу 2к, либо к субтипу 1б.

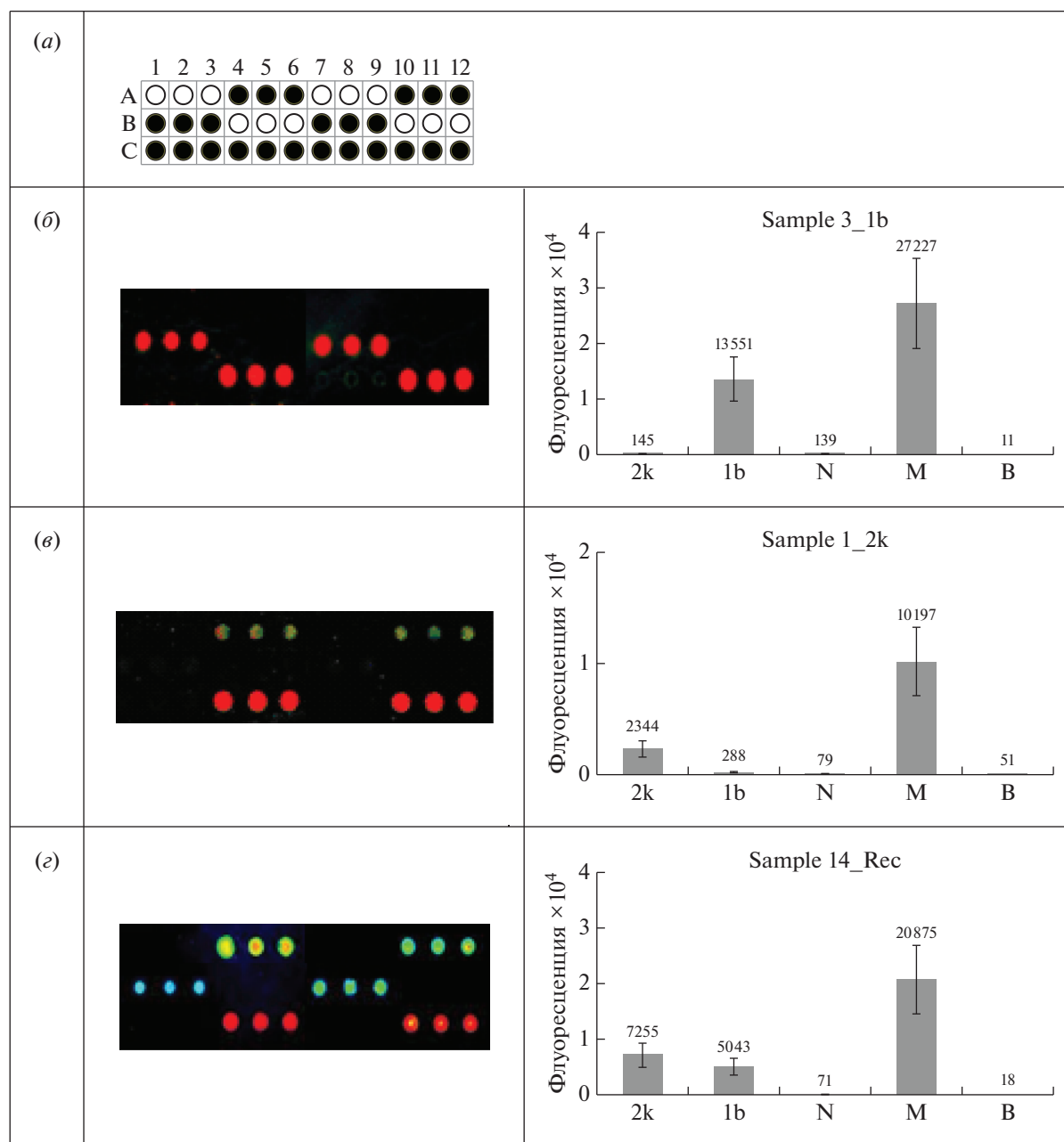


Рис. 1. (a) – Дизайн микрочипа: А4–А6, А10–А12 – смесь 2k-зондов (2k); В1–В3, В7–В9 – смесь 1b-зондов (1b); С1–С3, С7–С9 – 5'-AGAGAGAGAGAGAG-3' (контроль неспецифического связывания [23]) (N); С4–С6, С10–С12 – маркер ((dC)₃₀-биотин) (M); А1–А3, А7–А9, В4–В6, В10–В12 – буфер для печати (B); картина гибридизации ампликонов вируса гепатита С генотипа 1b (б); генотипа 2k (в) и рекомбинанта RF1_2k/1b (г).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотидные зонды были синтезированы в ИХБФМ СО РАН на автоматическом восьмиколоночном синтезаторе ASM-800 (ООО “Биосет”, Новосибирск) по стандартной методике с введением по 3'-концу олигонуклеотида С6-аминолинкера, необходимого для иммобилизации зондов. Печать микрочипов осуществляли на стеклянных эпокси-слайдах (Tekdon, США)

методом контактной печати на споттере Odissey Calligrapher (Bio-Rad, США) пином 360 мкм. При печати микрочипов смесевые споты содержали все 13 зондов, относящихся к генотипу 2k, и все 11 зондов, относящихся к генотипу 1b. Печать осуществляли по методике, описанной в работе Kostina et al. [20], с использованием эквимольных количеств зондов с одинаковой конечной суммарной концентрацией 80 нм/мл. Смесевые споты, а также споты буфера для печати, контро-

Таблица 2. Праймеры, использованные для наработки ампликонов

Субтип вируса гепатита С	Последовательность праймера (5'-3')
1b	F: TCTTTGACATCACCAAACSTYUT F: ATCTTTGCCATCACCAAATYUT R: Биотин-TCGACCTGGTTTCYTGTCC R: Биотин-ССТСААССТGGTPTTTGTCC
2k	F: GTTTGACATAACCAAGTGGCT R: Биотин-GCCTGTTCTGTCTTGTGCG R: Биотин-GCTTGTCCGTCCTGTGCA R: Биотин-GCCTGTTCTGTCTTGTGCA
2k/1b	F: GTTTGACATAACCAAGTGGCT R: Биотин-TCGACCTGGTTTCYTGTCC

ля неспецифического связывания и маркера печатки в шести повторах (рис. 1).

В настоящей работе исследовали образцы сыворотки крови пациентов, инфицированных вирусом гепатита С, субтип которых был подтвержден секвенированием Акимовым с соавт. [17]. Всего было проанализировано 18 образцов ВГС субтипа 1b, 1 образец субтипа 2k и 47 образцов рекомбинанта RF1_2k/1b. Нарработку ампликонов для гибридизации проводили по методикам, описанным в работе Акимова с соавт. [17], с использованием праймеров, последовательности которых приведены в табл. 2. Для получения преимущественно одноцепочечной ДНК, содержащей биотиновую метку, проводили ПЦР в асимметричном режиме [20].

Процедура гибридизации ампликонов и обработки слайда конъюгатом стрептавидин-Су5, связывающимся с биотиновой меткой ампликона, была аналогична описанной в работе Kostina et al. [20]. После отмывки слайда флуоресценцию спотов регистрировали на сканере ScanArray Express 2.0 (PerkinElmer, США) при длине волны возбуждающего лазера 633 нм. Изображение анализировали с использованием программы ScanArray Express, входящей в математическое обеспечение сканера. Уровень флуоресценции определяли как среднее значение флуоресценции шести спотов микрочипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С нами изучена возможность использования подхода “много зондов/один спот” для ее выявления. Анализ клинических образцов сыворотки крови показал, что данный подход дает возможность провести

однозначное отнесение выявленного в этих образцах вируса гепатита С к субтипам 2k, 1b или их рекомбинанту RF1_2k/1b. Результаты, полученные с использованием микрочипов, при соответствующем техническом решении могут быть использованы для создания биосенсора для типирования различных субтипов вируса гепатита С.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hepatitis C. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
- Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O. // J. Virol. 2002. V. 76. P. 4034–4043. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.4034-4043.2002>
- Raghwani J., Thomas X.V., Koekkoek S.M., Schinkel J., Molenkamp R., van de Laar T.J., Takebe Y., Tanaka Y., Mizokami M., Rambaut A., Pybus O.G. // J. Virol. 2012. V. 86. P. 2212–2220. <https://doi.org/10.1128/JVI.06184-11>
- Чуб Е.В., Сиволобова Г.Ф., Немесов С.В., Кочнева Г.В. // Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2019. Т. 37. С. 64–75. <https://doi.org/10.17116/molgen20193702164>
- Morel V., Fournier C., Francois C., Brochot E., Helle F., Duverlie G., Castelain S. // J. Viral Hepat. 2011. V. 18. P. 77–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01367.x>
- Susser S., Dietz J., Schlevogt B., Zuckerman E., Barak M., Piazzolla V., Howe A., Hinrichsen H., Passmann S., Daniel R., Cornberg M., Mangia A., Zeuzem S., Sarrazin C. // J. Hepatol. 2017. V. 67. P. 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.027>
- Gonzalez-Candelas F., Lopez-Labrador FX., Bracho M.A. // Viruses. 2011. V. 3. P. 2006–2024. <https://doi.org/10.3390/v3102006>
- Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., Khan A., Sugauchi F., Kan N., Kurbanova-Khudayberganova D., Khikmatullaeva A., Musabaev E., Mizokami M. // Hepatol. Res. 2008. V. 38. P. 457–464. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00293.x>
- Kassela K., Karakasiliotis I., Kokkiou E., Souvalidou F., Mimidis P., Veleza S., Panopoulou M., Koskinas J., Mimidis K., Mavromara P. // Ann. Gastroenterol. 2019. V. 32. P. 88–92. <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0322>
- Hedskog C., Doehle B., Chodavarapu K., Gontcharova V., Crespo G.J., De Knegt R., Drenth J.P., McHutchison J.G., Brainard D., Stamm L.M., Miller M.D., Svarovskaia E.,

- Mo H. // *Hepatology*. 2015. V. 61. P. 471–480.
<https://doi.org/10.1002/hep.27361>
11. Karchava M., Chkharishvili N., Sharvadze L., Abutidze A., Dvali N., Gatsrelia L., Dzigua L., Bolokadze N., Dolmazashvili E., Kotorashvili A., Imnadze P., Gamkrelidze A., Tsertsvadze T. // *Hepatology*. 2018. V. 48. P. 36–44.
<https://doi.org/10.1111/hepr.12890>
 12. Peiffer K.H., Kuhnhehn L., Stelzl E., Dietz J., Susser S., Tal A.O., Finkelmeier F., Zuckerman E., Cornberg M., Barak M., Piazzolla V., Mangia A., Zeuzem S., Kessler H.H., Vermehren J., Sarrazin C. // *J. Clin. Microbiol.* 2019. V. 57. P. e00060-19.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00060-19>
 13. Mourez T., Decroos A., Gorla O., Montialoux H., De Oliveira F., Larrat S., Plantier J.-S., Riachi G. // *J. Med. Virol.* 2018. V. 90. P. 994–997.
<https://doi.org/10.1002/jmv.25035>
 14. Schuermans W., Orlent H., Desombere I., Descheemaeker P., Van V.H., Geerts A., Verhelst X., Marijke Reynders M., Padalko E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. P. 1384.
<https://doi.org/10.3390/ijms17091384>
 15. De Keukeleire S., Descheemaeker P., Reynders M. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015. V. 82. P. 201–202.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.001>
 16. De Keukeleire S., Descheemaeker P., Reynders M. // *Int. J. Infect. Dis.* 2015. V. 41. P. 1–2.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.10.010>
 17. Акимов И.А., Тимофеев Д.И., Мавзютов А.Р., Иванов М.К. // *Клин. лаб. диагностика*. 2021. Т. 66. С. 122–128.
<https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-122-128>
 18. Костина Е.В., Рябинин В.А., Максакова Г.А., Синяков А.Н. // *Биоорг. химия*. 2012. Т. 38. С. 676–682. [Kostina E.V., Ryabinin V.A., Maksakova G.A., Sinyakov A.N. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2012. V. 38. P. 599–604.]
<https://doi.org/10.1134/s1068162012060052>
 19. Рябинин В.А., Костина Е.В., Синяков А.Н. // *Биоорг. химия*. 2013. Т. 39. С. 378–380. [Ryabinin V.A., Kostina E.V., Sinyakov A.N. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. P. 338–340.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162013030126>
 20. Kostina E.V., Sinyakov A.N., Ryabinin V.A. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 5817–5823.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1190-8>
 21. Kostina E.V., Sinyakov A.N., Ryabinin V.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 842–844.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060244>
 22. Ryabinin V.A., Kostina E.V., Maksakova G.A., Neverov A.A., Chumakov K.M., Sinyakov A.N. // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e17529.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017529>
 23. Franke-Whittle I.H., Klammer S.H., Insam H. // *J. Microbiol. Methods*. 2005. V. 62. P. 37–56.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.008>

Hepatitis C Virus RF1_2k/1b Chimeras and a “Many Probes/One Spot” Approach to Their Identification

V. A. Ryabinin*, #, I. A. Akimov**, A. N. Sinyakov*, N. P. Pichko*, and M. K. Ivanov**, ***

#Phone: +7 (3832) 363-51-73; e-mail: ryabinin@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Vector-Best, PO Box 492, Novosibirsk, 630117 Russia

***Institute of Molecular and Cellular Biology, prosp. Akad. Lavrentieva 8/2, Novosibirsk, 630090 Russia

The routinely used genotyping procedure, which is based on only one genomic locus, does not allow to identify recombinant strains of viruses that have high genome variability in the region of a recombination point. Using recombinant strain RF1_2k/1b of hepatitis C virus as an example, we demonstrated the feasibility of its identification via a many probes/one spot approach. The proposed scheme was employed for subtyping of hepatitis C virus clinical samples of blood serum and was found to enable unambiguous assignment of these isolates to subtype 2k or 1b or their recombinant RF1_2k/1b.

Keywords: hepatitis C virus, RF1_2k/1b chimera, many probes/one spot, microarray, point-of-care diagnostics