

*На правах рукописи*

ОСТАНКОВА  
Юлия Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА  
ГЕПАТИТА В ПРИ HBsAg-ПОЗИТИВНОЙ И HBsAg-НЕГАТИВНОЙ  
(СКРЫТОЙ) ФОРМАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика

03.02.02 - вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России и Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научные руководители:**

**Тотолян Арег Артемович** - доктор медицинских наук, академик РАН, профессор

**Семенов Александр Владимирович** - доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Кюрегян Карен Каренович** - доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом изучения вирусных гепатитов научно-исследовательского центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Семененко Татьяна Анатольевна** - доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией неспецифической профилактики инфекционных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова».

Защита состоится «22» ноября 2018 года в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу:

197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Вирус гепатита В (ВГВ) - один из наиболее распространенных гепатотропных вирусов, способных вызывать как острое, так и хроническое течение заболевания. Хронизация ВГВ происходит у 90% детей, инфицированных при рождении, у 25%-50% детей, инфицированных в 1-5 лет, и у 1-5% людей, инфицированных в старшем детском и зрелом возрасте (Yim H.J. et al., 2006). При этом наличие поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) и его уровни в сыворотке крови являются основными маркерами, используемыми в диагностике и прогнозе ХВГВ, а также в оценке риска развития данных заболеваний (Chevaliez S. et al., 2012). В то же время, одной из форм естественного течения ХВГВ является скрытый или оккультный гепатит В (СкГВ), характеризующийся отсутствием HBsAg и крайне низким уровнем ДНК ВГВ в сыворотке крови (<200 МЕ ДНК ВГВ/мл) вплоть до невозможности обнаружения стандартными методами (Raimondo G. et al., 2008). Само определение СкГВ свидетельствует о том, что диагностика, ограниченная исследованием HBsAg, неэффективна, а инфицированные лица пополняют группу пациентов с гепатитом неустановленной этиологии. «Золотым стандартом» и практически единственным достоверным методом лабораторной диагностики СкГВ остается определение ДНК ВГВ в ткани печени методом высокочувствительной ПЦР с детекцией фрагментов всех генов ВГВ, с использованием праймеров к консервативным участкам этих генов (Raimondo G. et al., 2008). Однако в связи с тем, что данная методика требует инвазивного вмешательства, использовать ее для скрининга популяций или даже отдельных групп в большинстве случаев не представляется возможным. Таким образом, диагностика скрытого ГВ при неопределяемом уровне HBsAg и крайне низком уровне вирусной нагрузки в сыворотке крови неэффективна при использовании стандартных методов. Инфицированные лица не только пополняют группу пациентов с криптогенным гепатитом или получают осложнения при коинфекции, например, с ВИЧ или ВГС, но могут стать источником распространения ВГВ, будучи донорами крови (Dufour D.R., 2006; Mulrooney-Cousins P. M. et al., 2007).

ВГВ характеризуется высокой степенью генетической гетерогенности, при этом генотип ВГВ является предиктором клинического исхода инфекции и связан с ответом на терапию (Lin C.-L. et al., 2015; Pourkarim M.R. et al., 2014; Shi Y.-H., 2012). Особо следует отметить, что, несмотря на характерное географическое распределение генотипов и субгенотипов ВГВ и то, что введение в клиническую практику в промышленно развитых странах эффективной вакцины против ВГВ значительно снизило распространенность вируса, последние годы наблюдается тенденция к смещению распространенности тех или иных генотипов ВГВ в различных географических ареалах (Kramvis A. 2016; Nordor H. et al., 2004). Все чаще выявляются «чуждые» для тех или иных территорий субгенотипы ВГВ, происходящие из стран с высокой распространенностью гепатотропных вирусов и зависящие от иммиграционных волн. Одним из предполагаемых путей распространения вируса является трудовая миграция в другие государства и, в том числе, в Российскую Федерацию жителей стран Среднеазиатского региона, вошедших в десятку стран с наибольшей смертностью от вирусного цирроза (Mokdad A.A. et al., 2014). Тем не менее, крайне немногочисленными остаются исследования, посвященные молекулярно-генетическим особенностям ВГВ в странах Средней Азии, для которых показана высокая распространенность гепатотропных вирусов.

Несмотря на то, что некоторые работы показывают совпадение частот распространенности генотипов и субгенотипов скрытого ГВ с распределением генотипов ВГВ в том или ином регионе, также продемонстрирована характерность преобладания генотипа D для оккультного ГВ (Kim K.H. et al., 2014).

Представляется очевидной необходимость оценки молекулярно-эпидемиологической ситуации в регионах, сотрудничество с которыми активно развивается. При этом необходимо использовать методы, позволяющие выявлять и генотипировать ВГВ не только при HBsAg-

позитивной, но и при HBsAg-негативной форме заболевания, так как вакцинация защищает от клинической инфекции, но не может исключить серонегативную скрытую форму ХВГВ с возможностью реактивации.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Распространенность генетических вариантов ВГВ в различных географических регионах значима как для эпидемиологического надзора за патогеном, так и для клинической практики. В связи с чем выявление скрытой формы течения ВГВ и типирование обнаруженных изолятов, как и разработку метод, позволяющего идентифицировать и генотипировать ВГВ при низких вирусных нагрузках без серьезного инвазивного вмешательства, можно отнести к одной из первоочередных задач.

Однако соответствующих систематических исследований ВГВ при HBsAg-негативной и HBsAg-позитивной формах течения заболевания в России и странах Средней Азии не проводилось.

Данные о молекулярно-генетической характеристике ВГВ в обследованных в настоящей работе географических регионах имеются в отдельных публикациях (Даминова Т.В. и др., 2003; Елпаева Е.А. и др., 2015; Писарева М.М., 2007; Шевцов А.Б. и др., 2011; Заботина Е.Е., 2011; Чуланов В.П., 2013) и работах под руководством Нетесова С.В. (Баяндин Р.Б. и др., 2004; Баяндин Р.Б. и др., 2007; Кочнева Г.В. и др., 2005; Кочнева Г.В. и др., 2011; Цой Л.В., и др., 2009), Михайлова М.И. (Дадашева А.Э. и др., 2011), Эсауленко Е.В. (Елпаева Е.А. и др., 2009). Проблемой скрытой инфекции, вызванной вирусом гепатита В, и диагностики ВГВ, в том числе скрытой формы течения заболевания, в Российской Федерации занимались Ганина А.А. (Ганина А.А., 2007; Ганина А.А., 2009), Семененко Т.А. (Семененко Т.А. и др., 2015; Семененко Т.А. и др., 2016), Кюрегян К.К. (Кюрегян К.К. и др., 2015), исследователи под руководством Мукомолова С.Л. (Левакова И.А. и др., 2011), Михайлова М.И. (Ильченко Л.Ю., 2015; Кадырова А. А. и др., 2012; Морозов И.А. и др., 2012), а также другие (Подымов С.Д., 2012; Шахгильдян В.И. и др., 2003; Ющук Н.Д. и др., 2010; Ющук Н.Д. и др., 2012).

Однако значительно большее количество больных со скрытым ГВ, чем предполагалось ранее, недостаточное знакомство практикующих врачей с проблемой скрытого гепатита В, сложности при дифференциации гепатитов неясной этиологии, отсутствие руководств по идентификации скрытого гепатита В свидетельствуют о необходимости изучения указанной проблемы с целью разработки новых лабораторных подходов к выявлению пациентов со скрытой формой течения хронического вирусного гепатита В.

Все вышеизложенное и предопределило цель и задачи настоящего диссертационного исследования.

#### **Цель исследования**

Разработка молекулярно-биологического метода для диагностики, идентификации и характеристики генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующих на территории Российской Федерации и некоторых стран Средней Азии при HBsAg-позитивной и HBsAg-негативной формах хронического вирусного гепатита В.

#### **Задачи исследования**

1. Разработать метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке.
2. Оценить возможность использования разработанного метода в образцах с ВГВ редко встречающихся в РФ геновариантов.
3. Изучить значимость применения разработанного метода для диагностики вируса гепатита В и необходимость проведения скрининга донорской крови и пациентов из групп риска на вирус гепатита В с помощью молекулярно-генетических методов.
4. Проанализировать распространенность и дать характеристику геновариантов HBsAg-негативной (скрытой) формы течения ХВГВ у ВИЧ-инфицированных лиц и у HBsAg-негативных доноров крови.

5. Охарактеризовать генотипы/субгенотипы вируса гепатита В, распространенные на территории России, Казахстана, Киргизии, Узбекистана.

#### **Научная новизна**

Разработан и апробирован оригинальный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке на основе технологии двухэтапной ПЦР с применением на первом этапе асимметричной ПЦР с протяженными олигонуклеотидными праймерами, позволяющий идентифицировать и генотипировать вирус гепатита В у пациентов с HBsAg-негативной формой течения заболевания.

Впервые оценена распространенность и дана характеристика субгенотипического профиля ВГВ у HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологически неэффективной антиретровирусной терапией в Российской Федерации.

Впервые оценена распространенность и охарактеризован субгенотипический профиль HBsAg-негативного ВГВ у доноров крови в г. Челябинск (РФ) и г. Астана (Республика Казахстан).

Впервые охарактеризован субгенотипический профиль изолятов ВГВ, циркулирующих на территориях Республик Казахстан, Кыргызстан, Узбекистан, Гвинейской Республики.

Получены новые данные о молекулярно-генетических особенностях изолятов ВГВ, циркулирующих на территории Российской Федерации.

Определены первичные нуклеотидные последовательности Pre-S1/Pre-S2/S региона ДНК ВГВ 546 изолятов, циркулирующих на территориях СЗФО (РФ), г. Челябинск (РФ), г. Астана (Республика Казахстан), некоторых регионов Республик Узбекистан и Кыргызстан, Гвинейской Республики, нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных GenBank.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость заключается в следующем:

оценена распространенность геновариантов ВГВ, циркулирующих на территории России, Казахстана, Узбекистана, Кыргызстана и Гвинейской Республики;

определена распространенность и субгенотипический профиль HBsAg-негативного ХВГВ среди доноров крови в г. Челябинск (РФ) и г. Астана (Республика Казахстан);

показано, что геноварианты ВГВ при HBsAg-негативной и HBsAg-позитивной формах заболевания филогенетически близки и отражают генетическое разнообразие изолятов вируса, циркулирующих в данном географическом регионе, однако некоторые варианты распространены повсеместно, а другие циркулируют в ограниченном регионе;

Практическая значимость заключается в следующем:

разработан и апробирован метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке;

разработанный метод позволяет: идентифицировать ДНК ВГВ с использованием ограниченного/малого объема биологического материала, идентифицировать и генотипировать вирус гепатита В у пациентов с HBsAg-негативной формой течения заболевания, определять не характерные для РФ генотипы и субгенотипы вируса гепатита В, в том числе при низкой вирусной нагрузке;

разработанный метод представляет собой совершенствование молекулярно-генетического метода клинической лабораторной диагностики вируса гепатита В и будет способствовать своевременному выявлению и идентификации ВГВ, установлению диагноза при заболеваниях печени у HBsAg-негативных пациентов с ХВГС, ВИЧ, а также при гепатите неясной этиологии, осуществлению лабораторного контроля за динамикой патологического процесса, эффективностью лечения заболевания;

показано, что применение разработанного метода выявления ДНК ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке среди доноров крови позволит снизить вероятность распространения вируса при гемотрансфузиях;

разработанный метод может быть положен в основу разработки и создания

диагностических тест-систем.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработан метод выявления ДНК вируса гепатита В в биологическом материале на основе двухэтапной полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием амплифицированных фрагментов четырех регионов вируса, с применением на первом этапе асимметричной ПЦР с протяженными олигонуклеотидными праймерами.

2. Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке, позволяет обнаружить ВГВ у пациентов с НВsAg-негативной (скрытой) формой течения заболевания как распространенных, так и редко встречающихся в РФ геновариантов с использованием ограниченного объема биологического материала.

3. НВsAg-негативный (скрытый) ВГВ при отсутствии серологических маркеров выявляется в группах риска, таких как ВИЧ-инфицированные лица, и у доноров крови в регионах со средней и высокой распространенностью вирусного гепатита В.

4. Охарактеризованные геноварианты ВГВ у пациентов с НВsAg-негативной (скрытой) формой хронического вирусного гепатита В филогенетически близки к геновариантам ВГВ при НВsAg-позитивной форме течения заболевания и отражают генетическое разнообразие изолятов вируса, циркулирующих в данном географическом регионе.

#### **Методология и методы исследования**

Исследовательская работа проводилась с соблюдением всех правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики. Теоретическая основа работы состояла в анализе фундаментальных и прикладных исследований. Для реализации цели и задач научной работы были применены стандартные биохимические, вирусологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы, а также разработан оригинальный метод на основе ПЦР для идентификации вируса при низкой вирусной нагрузке в биологическом материале с последующим секвенированием полученных фрагментов. Выполнен сбор и систематизация материалов исследования, проведен статистический анализ данных, позволяющий сделать обоснованные выводы.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов исследований, проведенных автором, обеспечена репрезентативным объемом выборок обследованных пациентов (всего 2336 человек), достаточным количеством выполненных наблюдений с использованием современных методов исследования и статистическим анализом данных, полученных в процессе проведения исследования (всего 14702 клинико-лабораторных исследования).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 26 конференциях, в том числе: международном симпозиуме сети институтов имени Пастера (Institute Pasteur International Network. Paving the way for Research on Global Health and One Health) (Париж, 2014 г.); международной конференции «Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней» (Москва, 2015 г.); XXI-я Всероссийской научно-практической конференции «Качество лабораторных исследований - условие безопасности пациентов» (Москва, 2016 г.); международном саммите по инфекционным заболеваниям в Вильнюсе (Vilnius International Summit on Communicable Diseases) (Вильнюс, 2016 г.); международной конференции «Toolkits for DNA vaccine design, an update» (Москва, 2016 г.); международном симпозиуме сети институтов имени Пастера (Institut Pasteur International Network Scientific Symposium «From basic science to biomarkers and tools in global health») (Париж, 2016 г.); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017» (Москва, 2017 г.); Международном конгрессе, посвященном проблемам печени (The International Liver Congress 2017 – 52nd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver) (Амстердам, 2017 г.); IV Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные

инфекционные заболевания» (Сочи, 2017 г.); X Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2018 г.); V конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Новосибирск, 2018).

#### **Реализация и внедрение результатов исследования**

Получен патент: Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР. Пат. 2633755 РФ. Патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». №2016144898; заявл. 15.11.2016; опубл. 17.10.2017, Бюл. изобр. №29 - 11 с.

В международную базу данных GenBank депонированы 168 нуклеотидных последовательностей под номерами: KM212957.1, KP143742.1-KP143744.1, KP165597.1-KP165605.1, KP184495.1-KP184499.1, KP202936.1-KP202945.1, P230541.1, KT962021-KT962025, KY210468-KY210499, KY210500-KY210529, KY242636.1.

Результаты настоящего исследования используются в лекциях, проводимых на кафедре клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» МЗ РФ и в учебном процессе кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ.

Разработанный метод выявления ДНК ВГВ используется в практической работе научно-методического центра по эпидемиологическому надзору за вирусными гепатитами, отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний, а также центральной клинико-диагностической лаборатории ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

#### **Личное участие автора**

Личное участие автора в проведенном исследовании состоит в самостоятельном планировании и проведении лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Автором разработан метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке. Автором написан текст диссертации и автореферата.

#### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертации опубликованы 42 печатных работы, в том числе 12 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 3 главы монографии.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 147 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего 175 источников, в том числе 40 отечественных и 135 зарубежных. Текст содержит 15 таблиц, 21 рисунок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

Материалом исследования служили биообразцы от 2336 человек без идентификационных данных пациентов, полученные в ходе выполнения плановых или рутинных исследований в медучреждениях (остатки плазмы крови и/или биопсийного материала), переданные для исследования по договорам о научном сотрудничестве. Характеристика групп обследованных лиц представлена в таблице 1, согласно предварительному диагнозу лечащих врачей и/или сопроводительному описанию соответствующих медучреждений, предоставивших биологический материал.

Таблица 1. Объем обследованного материала.

Характеристика групп	Кол-во человек
Образцы плазмы и биопсийного материала пациентов с диагнозом ХВГВ из СЗФО РФ	90
Образцы плазмы пациентов с диагнозом ОГВ из СЗФО РФ	75
Образцы плазмы и биопсийного материала пациентов с гепатитом различного генеза (ХВГВ, ХВГС, гепатит неясной этиологии) с выраженным фиброзом и циррозом печени из Республики Узбекистан	39
Образцы плазмы пациентов с диагнозом ХВГВ + D из Республики Кыргызстан	64
Образцы плазмы доноров крови с HBsAg (+) из Республики Казахстан	30
Образцы плазмы доноров крови с HBsAg (-) из Республики Казахстан	500
Образцы плазмы доноров крови с HBsAg (-) из г. Челябинск, РФ	505
Образцы плазмы HBsAg (-) ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологически неэффективной АРВТ из СЗФО РФ	264
Образцы плазмы лиц с впервые выявленной ВИЧ инфекцией из СЗФО РФ	65
Образцы плазмы от практически здоровых людей в рамках плановой диспансеризации сотрудников ОК РУСАЛ и членов их семей из Гвинейской Республики	704
<b>ВСЕГО</b>	<b>2336</b>

Постановка диагноза, клинический осмотр больных, УЗИ органов брюшной полости, общеклинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови, пункционная биопсия печени, эластометрия печени проводились врачами соответствующих лечебных учреждений. Критерии включения представлены в таблице 2.

Таблица 2. Критерии включения в обследуемые группы.

Характеристика групп	Критерии включения (и/или)
Больные гепатитом различного генеза	- верифицированный ОГВ, ХВГВ или ХВГВ+D / ХВГВ+С, - гепатит с различными вариантами патогенеза.
Пациенты без предварительного гепатологического диагноза	- наличие верифицированной ВИЧ-инфекции с неэффективной АРВТ, - наличие верифицированной впервые выявленной ВИЧ-инфекции.
HBsAg (-) доноры крови	- отсутствие каких-либо значимых для донорства крови заболеваний, - отрицательные результаты при анализе на ВИЧ, HBsAg, антитела к ВГС, антитела к ВГD IgG.

Продолжение таблицы 2.

Характеристика групп	Критерии включения (и/или)
Обследованные из Гвинейской Республики	- участие в плановой диспансеризации сотрудников ОК РУСАЛ и членов их семей, - отсутствие подозрения на болезнь, вызванную вирусом Эбола (БВВЭ), - отрицание пациентами инфицирования ВГВ в анамнезе.

В ходе работ был выполнен ряд клинико-лабораторных исследований (таблица 3).

Таблица 3. Объем клинико-лабораторных исследований.

Название исследования	Кол-во человек
Выявление HBsAg в периферической крови	2336
Выявление HBsIgG, анти-HBcor IgG в периферической крови	2336
Выявление антител к ВГС в крови	2336
Выявление анти-VGD IgG-антител	2336
Выявление ДНК ВГВ в периферической крови методом ПЦР с помощью коммерческого набора	2336
Определение вирусной нагрузки ДНК ВГВ методом ПЦР с помощью коммерческого набора	140
Выявление ДНК ВГВ методом ПЦР для обнаружения вируса при низкой вирусной нагрузке	2336
Секвенирование ВГВ	546
Всего исследований	14702

Для амплификации и секвенирования продукта использовали специфические праймеры (Синтол, Россия). Последовательность праймеров и флуоресцентных зондов брали из литературных источников, а также подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST согласно общепринятым рекомендациям.

Выявление ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР проводили методом «гнездовой» ПЦР с использованием на втором этапе нескольких пар праймеров, фланкирующих четыре региона генома вируса. В том числе фрагменты, включающие рекомендованный для гено- и субгенотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S область 2848-3182 . . . 1-835 нт., core регион область 1901-2452 нт., регион X область 1374-1838 нт., регион pol область 247-1280 нт., согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) (Brichler S. et al., 2013). Очищенный фрагмент с концентрацией 50-100 нг в зависимости от нуклеотидного состава анализируемого участка использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров в трех повторностях для каждой пары праймеров каждого образца. Для дополнительного контроля образцов использовали две аналитические системы с соответствующими реагентами. При анализе продукта секвенирующей реакции в генетическом анализаторе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter Inc., USA) использовали набор Genome Lab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., USA), согласно инструкции производителя. При анализе продукта секвенирующей реакции в генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США) использовали набор реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя.

Для достоверного типирования обнаруженных изолятов ВГВ проводили филогенетический анализ полученных последовательностей региона Pre-S1/Pre-S2/S в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank нуклеотидными

последовательностями соответствующего региона референсных образцов (Norder H. et al., 2004; Tallo T. et al., 2008). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW, для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа использовали метод присоединения соседей (Neighbor-joining), позволяющий оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции». Для оценки достоверности реконструированной топологии построенных филогенетических деревьев проводили бутстреп (bootstrap) анализ (500 повторностей).

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.), Statistica 8.0 (StatSoft Inc.). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности  $p < 0,05$ . В случае, если более чем две группы в парных сравнениях демонстрировали значимые различия одновременно, применяли апостериорную поправку на множественные сравнения по методу Бонферрони.

Для выявления корреляционных связей между двумя количественными параметрами использовали непараметрический метод ранговой корреляции по Спирмену с указанием коэффициента корреляции  $r$ . Для оценки значимости различий средних величин, рассчитанных для независимых групп пациентов, использовали  $t$ -критерий Стьюдента с указанием значения критерия  $t$  и числа степеней свободы  $f$ .

#### Результаты собственных исследований

Для выявления ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке был разработан способ обнаружения ДНК ВГВ на базе методики, предложенной в работе, посвященной передаче ВГВ от матери ребенку (Candotti D. et al., 2007). Недостаток метода, предложенного Candotti D. с соавторами заключается в необходимости большого объема плазмы крови для экстракции ДНК (500 мкл), а также в невозможности убедиться в полноценности генома вируса за счет секвенирования как минимум двух из четырех участков генома ВГВ, как это было рекомендовано на совещании посвященном скрытому ВГВ (Raimondo G. et al., 2008).

Согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводилась амплификация ДНК методом асимметричной ПЦР с использованием протяженных олигонуклеотидных праймеров с разной температурой плавления, комплементарных области наибольшего сходства геномов различных изолятов вируса гепатита В. Для повышения чувствительности проводилась вторая полимеразная цепная реакция с использованием продукта амплификации первой реакции и внутренних праймеров (таблица 4), соответствующих одному из четырех рекомендованных при диагностике СкГВ регионов генома ВГВ.

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для выявления ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР, а также для секвенирующей реакции.

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'--3'
HBV LongF1.1	CTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
HBV LongR1.1	CAGACCAATTTATGCCTACAGCCTCCTA
SF2	GGTCACCATATTCTTGGGAA
SR2	AATGGCACTAGTAAACTGAG
CF2	GCCTTAGAGTCTCCTGAGCA
CR2	GAGGGAGTTCTTCTTCTAGG
XF2	CCATACTGCGGAACTCCTAGC
XR2	CCCAAGGCACAGCTTGGAGG

Продолжение таблицы 4.

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'--3'
PF2	TCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC
PR2	AGTTCGCGCAGTATGGATCGG
HBV 3bF	AATCCAGATTGGGACTTCAA
HBV 4bR	CCTTGATAGTCCAGAAGAAC
HBV 9F	CGTCGCAGAAGATCTCAATC
HBV 10R	CCTGATGTGATGTTCTCCATG

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (рН 8,8), 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл. При этом в составе амплификационной смеси на каждом этапе было предложено неравномерное соотношение дезоксинуклеозидтрифосфатов и высокая концентрация MgCl<sub>2</sub>, на первом этапе в смеси присутствовали формамид и глицерин в количестве 4% и 6% от конечного объема соответственно, а на втором этапе формамид и DMSO в количестве 4% и 10% от конечного объема соответственно.

Аналитическую чувствительность метода проверяли методом поэтапного разведения. Были выбраны 10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГВ. Вирусную нагрузку предварительно измеряли с помощью стандартизированного набора для количественного определения ДНК ВГВ в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с помощью набора «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва).

Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГВ (чистой плазмой) следующим образом. Аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку Eppendorf объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл чистой плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и 100 мкл нового пула переносили в третью пробирку итд. до десятикратного последовательного разведения. После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из биологического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Полученные образцы ДНК амплифицировали, согласно предложенному методу.

Для определения уровня диагностической чувствительности разработанного метода относительно «референсных» коммерческих тест-систем был использован набор реагентов для качественного определения ДНК ВГВ в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), а также одна из наиболее чувствительных (аналитическая чувствительность 3,8 МЕ/мл) тест-систем HBV RG PCR Kit (Qiagen) с предварительной экстракцией анализируемой ДНК из различного объема биологического материала. В качестве анализируемого биологического материала использовали образцы и пулы образцов.

Чувствительность предложенного метода при использовании 100 мкл плазмы при стандартном методе экстракции НК с помощью коммерческого набора реагентов «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) составила 5 МЕ/мл.

Следует отметить, что в большинстве случаев, представленных в данной диссертационной работе, для экстракции ДНК использовали 200 мкл образца с предварительным концентрированием вируса ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 часа при 24000g, +4<sup>0</sup>С, что позволяло увеличить чувствительность метода.

Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке позволяет выявлять и генотипировать различные геноварианты ХВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира.

Так, выявленные геноварианты ВГВ в обследованной группе из Гвинейской Республики в целом характерны для Западной Африки, однако выявлены субгенотипы генотипа D, не типичные для данного региона, что, по всей видимости, является свидетельством независимых завозов вируса данных геновариантов в регион (таблица 5).

Таблица 5. Частота встречаемости геновариантов ВГВ в обследованной группе из Гвинейской Республики.

Субгенотип ВГВ	Встречаемость в обследованной выборке
ВГВ E	74,7%
ВГВ D1	7,4%
ВГВ D2	6,3%
ВГВ D3	7,1%
ВГВ A2	4,4%

При анализе распределения геновариантов вируса при ОГВ в СЗФО были выявлены субгенотипы ВГВ в следующих соотношениях: D2 – 53%, D3 – 19,7%, D1 – 7,6%, A2 – 15,2%, и три случая (4,5%) коинфекции (рисунок 1).

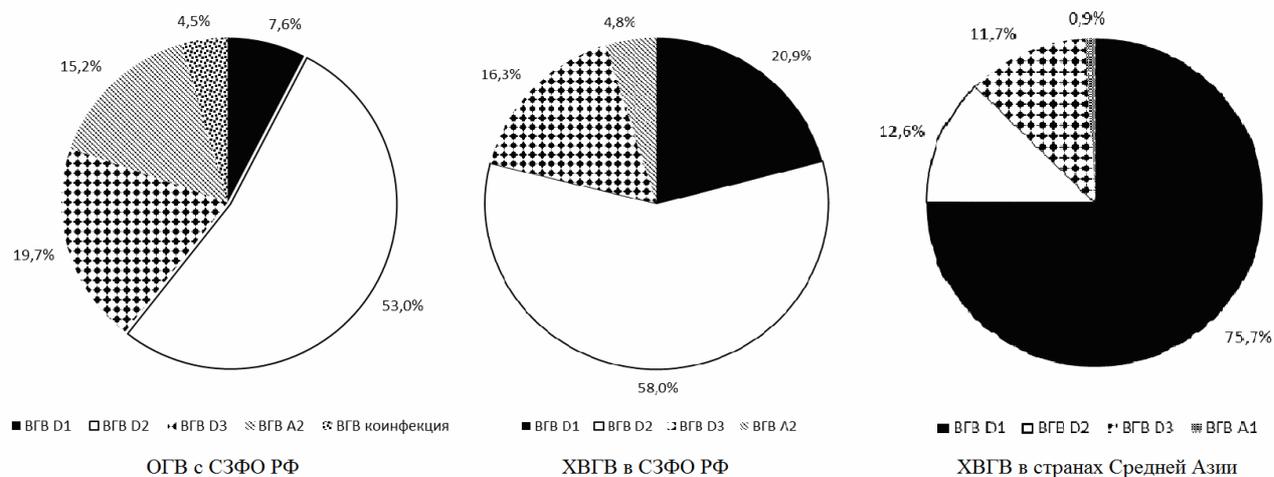


Рисунок 1. Распределение субгенотипов ВГВ среди больных при ОГВ и при ХВГВ в СЗФО РФ, а также при ХВГВ в Средней Азии.

Распределение субгенотипов ВГВ среди больных ХВГВ HBsAg(+) формы течения из Центрального и Северо-Западных Федеральных округов (D1 – 20,9%, D2 – 58%, D3 – 16,3%, A2 – 4,8%) незначительно отличалось от распределения среди пациентов с ОГВ (рисунок 1).

Выявленные среди пациентов с ХВГВ два нехарактерных для РФ геноварианта ВГВ D4 и A1 представляют собой случайные завозы изолятов.

При оценке распространенности геновариантов ВГВ среди пациентов с HBsAg(+) формой течения заболевания, проживающих в разных странах Средней Азии (Республики Узбекистан, Кыргызстан, Казахстан) с различными степенями проявления заболевания, субгенотипы ВГВ были представлены в следующих соотношениях: D1 – 75%, D2 – 12,5%, D3 – 11,7%, A1 – 0,9% (рисунок 1).

При сравнительном анализе распределения субгенотипов ВГВ в общей группе пациентов с HBsAg(+) ХВГВ в Средней Азии и в группах пациентов из Республик Узбекистан, Кыргызстан и Казахстан достоверных отличий выявлено не было -  $p=0,7257$ ,  $p=0,5946$ ,  $p=0,3335$ , соответственно. При сравнительном анализе распределения субгенотипов ВГВ в группах с моно- и коинфекцией достоверных отличий также выявлено не было ( $p=0,1239$ ). Как и было показано ранее, при коинфекции генотипический спектр ВГВ отражает наиболее распространенные генотипы, циркулирующие в конкретном географическом регионе мира. При этом даже характерный для региона ВГВ субгенотипа D1 имеет несколько независимых источников инфицирования. Высокое сходство изолятов с описанными в международной базе данных образцами из разных стран является, по всей видимости, подтверждением многочисленных независимых завозов вируса в изучаемые страны Средней Азии, в том числе в ходе крупных миграционных волн. В то же время определяются субкластеры, включающие изоляты только из одной страны (например, KYR31, KYR37, KYR1009, KYR1290 или KAZk6, KAZk9, KAZk10, KAZk24, KAZk28) и имеющие меньшее сходство с ранее депонированными в международную базу данных изолятами, что, вероятно, свидетельствует о независимой гомологичной эволюции ВГВ в каждом регионе.

Интересно отметить, что ветвь изолятов, соответствующая ВГВ D3, разделилась на два кластера. Мы предполагаем, что один из этих кластеров связан с заражением посредством употребления инъекционных наркотических веществ.

Среди HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологически неэффективной АРВТ при использовании коммерческих наборов ДНК ВГВ выявить не удалось, в то время как в группе лиц с первично выявленной ВИЧ-инфекцией ДНК ВГВ была выявлена у 3,07% пациентов. При использовании предложенного нами метода ВГВ в данных группах был выявлен в 33,7% и 10,76% случаях, соответственно. При сравнительном анализе встречаемости HBsAg-положительной и скрытой формы ХВГВ у пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ и у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологически неэффективной АРВТ в СЗФО РФ были показаны достоверные отличия ( $\chi^2=17,9$  при  $p=0,0001$ ,  $df=2$ ) (рисунок 2).

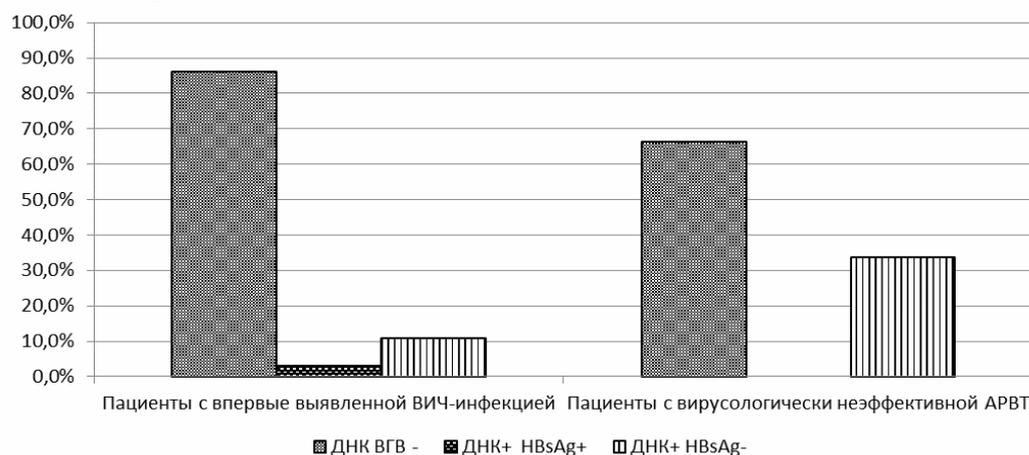


Рисунок 2. Частота встречаемости HBsAg-положительной и скрытой формы ГВ у пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ и у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологически неэффективной АРВТ в СЗФО РФ.

Достоверных различий при сравнительном анализе количества CD4+ клеток между ВИЧ-инфицированными пациентами с ВГВ и без ВГВ не обнаружено. Предполагаем, что уровень CD4+ клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов не зависит от инфицирования ВГВ или, по крайней мере, этот фактор не является единственно достаточным.

Заражение среди ВИЧ-инфицированных лиц чаще происходит у мужчин (38,6%), чем у женщин (26,4%), при этом относительный риск инфицирования ВГВ у лиц мужского пола достоверно выше, чем у женщин (RR=1,2, CI: 1,019-1,501, p=0,04).

При анализе распределения геновариантов ВГВ в группах пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ, у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологически неэффективной АРВТ, HBsAg-положительной формой ХВГВ и ОГВ в СЗФО РФ выявлены отличия (рисунок 3).

Распределение субгенотипов ВГВ достоверно отличалось между группами ВИЧ-инфицированных пациентов вирусологически неэффективной АРВТ с СкГВ и пациентов с ОГВ из СЗФО -  $\chi^2=36,344$  при  $p<0,0001$ ,  $df=4$ . Распределение субгенотипов ВГВ между группой ВИЧ-инфицированных пациентов и пациентов с HBsAg-положительной формой течения ХВГВ в СЗФО также достоверно отличалось -  $\chi^2=19,296$  при  $p=0,0007$ ,  $df=4$ . У пациентов с ВИЧ-инфекцией отсутствовал вариант ВГВ генотипа А, достоверно отличалась частота встречаемости ВГВ D1 у пациентов с ОкГВ (39,3%) с ХВГВ (20,9%) – RR=1,391, CI: 1,081-1,790,  $p=0,02$  и с ОГВ (7,6%) - RR=1,863, CI: 1,485-2,338,  $p<0,0001$ ), соответственно. Частота встречаемости ВГВ D3 у ВИЧ-инфицированных пациентов с СкГВ (30,4%) также достоверно отличалась от таковой у пациентов с HBsAg-положительной формой ХВГВ (16,3%) - RR=1,983, CI: 1,054-3,730,  $p=0,02$ .

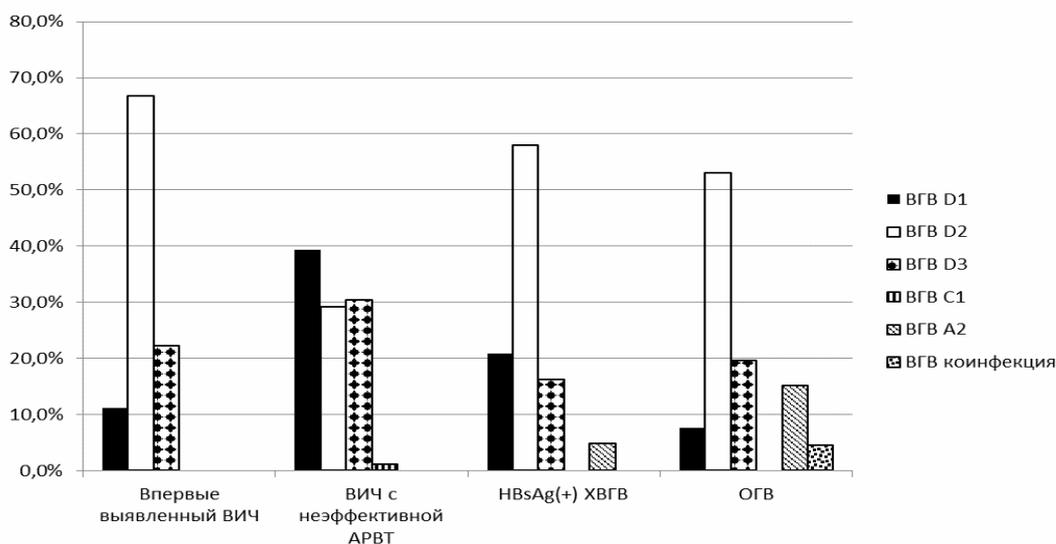


Рисунок 3. Распределение геновариантов ВГВ в группах пациентов с впервые выявленной инфекцией ВИЧ, у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологически неэффективной АРВТ, HBsAg-положительной формой ХВГВ и ОГВ в СЗФО РФ.

При сравнительном анализе распределения субгенотипов ВГВ в группе с СкГВ и при HBsAg-положительной форме течения заболевания у доноров в Республике Казахстан выявлены достоверные отличия -  $\chi^2=14,027$  при  $p=0,0072$ ,  $df=4$ . Частота встречаемости ВГВ D3 при СкГВ (31,9%) значительно превышала таковую у пациентов с HBsAg-положительной формой заболевания (7,4%). При этом относительный риск развития скрытой формы течения заболевания при ВГВ D3 достоверно выше (RR=1,572, CI: 1,179-2,096,  $p=0,0208$ ). Распределение субгенотипов ВГВ в группе HBsAg-негативных доноров крови отличалось от такового в общей группе пациентов с HBsAg-положительной формой течения заболевания из стран Средней Азии -  $\chi^2=17,132$  при  $p=0,0018$ ,  $df=4$  (рисунок 4). При этом относительный риск развития скрытой формы течения ХВГВ при ВГВ D3 также достоверно выше (RR=1,724, CI: 1,100-2,702,  $p=0,0441$ ).

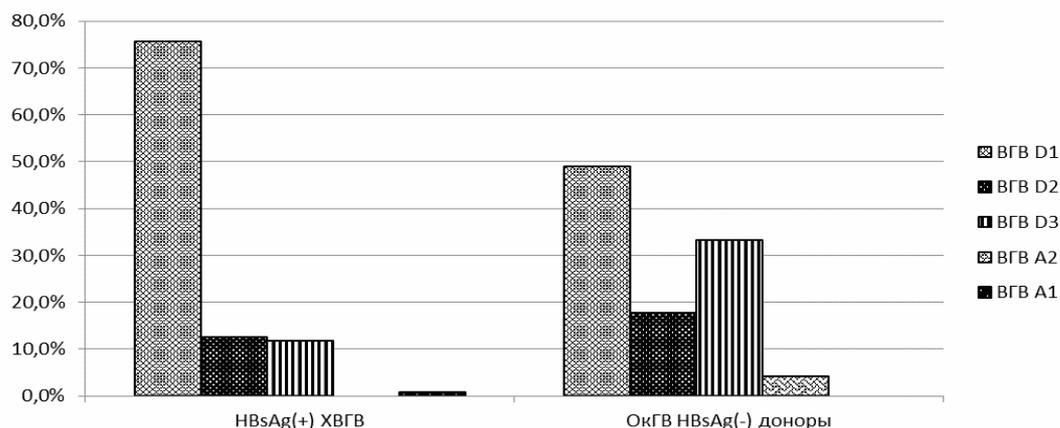


Рисунок 4. Распределение геновариантов ВГВ у пациентов с HBsAg-положительной формой ХВГВ и со СкГВ HBsAg(-) доноров крови из Средней Азии.

При сравнительном анализе распределения геновариантов ВГВ в группе HBsAg-негативных доноров г. Челябинска с СкГВ встречаемость субгенотипа D1 значительно выше, чем у больных ОГВ и несколько выше, чем в группах больных HBsAg-положительной формой ХВГВ и ВИЧ-инфицированных из СЗФО РФ. Распределение геновариантов ВГВ у HBsAg-негативных доноров в Челябинске незначительно отличается от такового в Астане –  $p=0,2398$ . При этом в группе HBsAg-негативных доноров из Казахстана невелико количество изолятов ВГВ D2, а в соответствующей группе из Челябинска изолятов ВГВ D2 не было обнаружено. Поскольку г. Челябинск географически удален от СЗФО и сравнительно приближен к Республике Казахстан, вышеуказанные результаты в целом могут являться дополнительным свидетельством изменения эпидемиологического профиля ВГВ в РФ за счет трудовой миграции из стран Средней Азии. Еще одной причиной отсутствия ВГВ субгенотипа D2 вкупе с высокой встречаемостью D3 в группе HBsAg-негативных доноров из Челябинска может быть особенность скрытой формы течения заболевания.

Разнообразие геновариантов ВГВ и смещение характерного для региона эпидемиологического профиля среди доноров крови имеет особое значение. Так, преобладание ВГВ D2 и D3 выявляли у пациентов, признававших рискованное сексуальное поведение, в то время как группа пациентов, утверждающих, что были инфицированы посредством хирургических операций или переливания крови, демонстрировала множество субгенотипов, это может объясняться тем, что пациенты, перенесшие операцию и переливание крови, были подвергнуты воздействию нескольких источников инфекции (Sarkar N. et. al., 2015).

Поскольку заражение ВГВ возможно при введении малых доз вируса, очевидна высокая значимость использования сложных молекулярных методов для выявления СкГВ у доноров, несмотря на крайне низкую вирусную нагрузку в данных образцах (Chazouillères O. et. al., 1994; Sagnelli C. et. al., 2016; Power J.P. et. al., 2010; Almeida R.P. et. al., 2006).

При оценке картины разнообразия ВГВ на материале всей обследованной группы становится очевидным близкое генетическое родство изолятов HBsAg(+) ХВГВ и СкГВ генотипа D, что свидетельствует о распространенности СкГВ в обследуемых регионах. Отметим, что изоляты СкГВ из Республики Казахстан и Республики Узбекистан при общем анализе распределяются как в субкластеры, изоляты которых относятся к разным странам, так и в те, которые демонстрируют варианты вируса, циркулирующие в ограниченном регионе.

Проведен сравнительный анализ распределения субгенотипов ВГВ при скрытой и HBsAg-положительной формах течения заболевания (рисунок 5).

У HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов в РФ мы обнаружили тенденцию к преобладанию субгенотипа D3 и предположили, что высокая встречаемость

ВГВ D3 связана с ВИЧ-инфекцией и непосредственной причиной является либо коинфицирование, либо путь инфицирования ВГВ. Однако выявление в группе из стран Средней Азии достоверно значимого преобладания ВГВ D3 у HBsAg-негативных доноров крови по сравнению с пациентами с HBsAg-положительной формой течения заболевания, а также высокая встречаемость этого субгенотипа у HBsAg-негативных доноров крови из Челябинска, заставляет предположить значимость именно скрытой формы течения в обнаружении высоких частот встречаемости этого субгенотипа среди пациентов со СкГВ. Таким образом, нельзя сказать, что выявленное нами тотальное преобладание ВГВ генотипа D у больных с СкГВ связано именно с формой течения заболевания или, напротив, с распределением генотипов ВГВ, однако высокая частота встречаемости данного генотипа наводит на мысль о возможности широкого распространения СкГВ в регионе.

Косвенным подтверждением этого предположения может служить то, что изоляты ВГВ генотипа D, выделенные от пациентов с HBsAg(+) ХВГВ и генетически сходные с изолятами выделенными на территории СЗФО при ОГВ, циркулируют в различных регионах РФ. Мы считаем, что два основных фактора могут являться причиной высокого сходства выявленных вирусов. Во-первых, некоторые варианты вируса, вероятно, широко распространены и длительное время циркулируют на территории РФ, сходные по нуклеотидным последовательностям исследуемой области ВГВ обнаруживаются в различных регионах. Второй причиной может быть то, что СЗФО включает один из наиболее значимых мегаполисов в стране и является целью, или, по крайней мере, промежуточной точкой пути широкого потока туристической и трудовой миграции граждан страны и иностранцев. Сходную картину демонстрируют изоляты, полученные от пациентов со СкГВ, что свидетельствует об общности ВГВ, циркулирующего на данной территории, независимо от формы течения заболевания и наличия или отсутствия коинфекции.

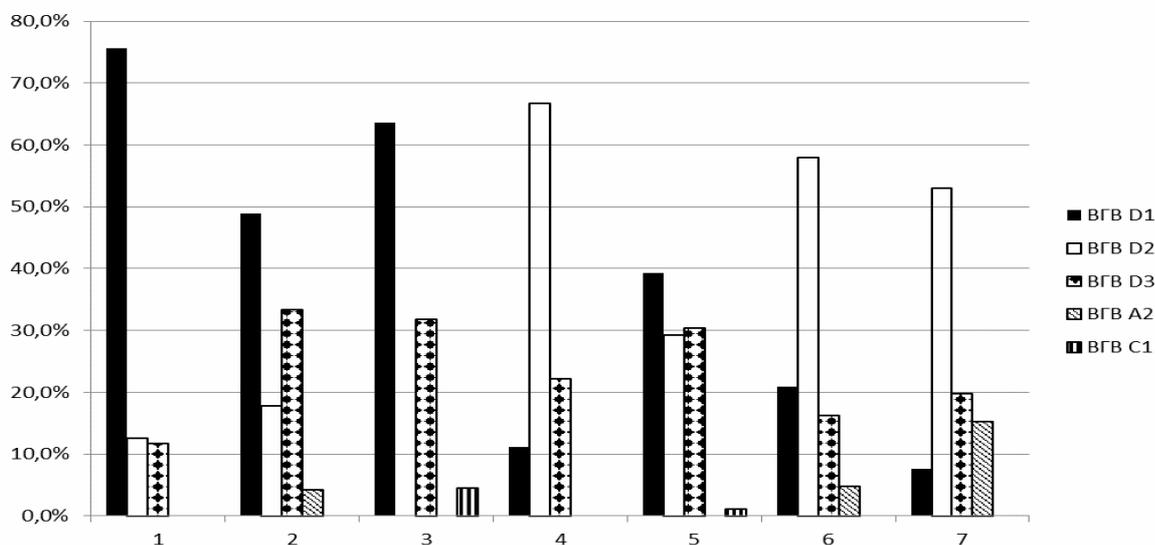


Рисунок 5. Распределение геновариантов ВГВ при скрытой и HBsAg-положительной формах течения заболевания в обследованных группах РФ и некоторых стран Евразийского Союза. Обозначены на рисунке обследованные группы: 1 - HBsAg(+) ХВГВ Средняя Азия, 2 - СкГВ HBsAg(-) доноры Астана, 3 - СкГВ HBsAg(-) доноры Челябинск, 4 - Впервые выявленный ВИЧ СЗФО, 5 - СкГВ HBsAg(-) ВИЧ с неэффективной АРВТ СЗФО, 6 - HBsAg(+) ХВГВ СЗФО, 7 - ОГВ СЗФО.

Таким образом, при оценке распределения субгенотипов ВГВ в группах больных со скрытым и HBsAg(+) течением заболевания из РФ и Средней Азии подтверждено характерное для регионов преобладания ВГВ субгенотипов D2 и D1, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют об общности ВГВ на территории Российской

Федерации и стран Средней Азии, а также о существовании изолятов, циркулирующих только в ограниченных ареалах, независимо от формы течения заболевания и наличия или отсутствия коинфекции. Наблюдается тенденция к изменению эпидемиологического профиля ВГВ в РФ за счет привнесения в регион геновариантов вируса, характерных для стран Средней Азии. Выявление изолятов, сходных по составу нуклеотидных последовательностей у пациентов из разных регионов может свидетельствовать как об общем источнике происхождения вирусов, так и о более поздних, относительно первичного инфицирования, эпидемиологических связях. Показано, что геноварианты ВГВ у пациентов со скрытой формой течения заболевания филогенетически близки с геновариантами ВГВ при HBsAg(+) форме течения заболевания и отражают генетическое разнообразие изолятов вируса, циркулирующих в данном географическом регионе, однако наблюдается тенденция к преобладанию ВГВ субгенотипа D3 при СкГВ.

Предложенная в данной работе методика является не заменой традиционных и апробированных методов, но их существенным и необходимым дополнением. Эффективность использования метода складывается из нескольких компонентов. Во-первых, предложенный метод позволяет диагностировать большее количество случаев ХВГВ по сравнению со стандартными серологическими и молекулярно-биологическими методами. Во-вторых, позволяет выявлять СкГВ как в группах повышенного риска инфицирования ВГВ (ВИЧ-инфицированные, пациенты с ХВГС, больные с гепатитом неясной этиологии и т.д.), так и в популяции, а также среди доноров крови без инвазивных вмешательств. Широкое применение генодиагностики и генотипирования позволит повысить уровень диагностики ВГВ при низкой вирусной нагрузке, в том числе при скрытой форме течения заболевания, и предоставит возможность более полного эпидемиологического слежения за распространенностью различных вариантов вируса на территории России и стран, с которыми РФ поддерживает тесные международные отношения.

## **ВЫВОДЫ**

1. Разработан и апробирован оригинальный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке, позволяющий: идентифицировать HBsAg-негативный (скрытый) ГВ в плазме крови, не прибегая к инвазивной диагностике; выявлять и генотипировать различные геноварианты ХВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ.

2. Показана возможность использования разработанного метода в образцах с ВГВ редко встречающихся в РФ геновариантов, что подтверждается обнаружением в Российской Федерации не характерных для данного географического региона субгенотипов ВГВ A1 и D4. С помощью разработанного метода охарактеризован генотипический профиль вариантов ВГВ, циркулирующих на территории г. Киндия Гвинейской Республики, частота встречаемости ВГВ генотипа E составила – 74,9%, генотипа D субгенотипа D1 – 7,4%, субгенотипа D2 – 6,3%, субгенотипа D3 – 7,1%, генотипа A субгенотипа A2 – 4,4%.

3. Показана значимость применения разработанного метода для диагностики ХВГВ, в том числе при ограниченном объеме биологического материала, при отсутствии в периферической крови обследуемых пациентов серологических маркеров, что подтверждается высокой встречаемостью скрытого ГВ в группах риска и среди доноров крови.

4. Частота встречаемости скрытого ГВ в группе HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологически неэффективной антиретровирусной терапией составила 33,7%, субгенотипы ВГВ представлены в следующих соотношениях: D1 – 39,3%, D2 – 29,2%, D3 – 30,4%, C1 – 1,1%.

5. Выявлена высокая частота встречаемости скрытого ГВ среди HBsAg-негативных доноров крови из г. Челябинск (РФ) и г. Астана (Республика Казахстан) – 4,28% и 9,4%, соответственно. Распределение геновариантов ВГВ у HBsAg(-) доноров в Челябинске и в

Астане составило: D1 – 22,73%, D3 – 72,73%, С – 4,54% и D1 – 46,8%, D2 – 17,05%, D3 – 31,9%, A2 - 4,25%, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности проведения скрининга донорской крови на скрытый ВГВ.

6. Определены частоты встречаемости геновариантов ВГВ в группах из РФ, Республик Узбекистан, Казахстан, Кыргызстан. Среди HBsAg-положительных больных из РФ преобладал субгенотип D2 (45%), у HBsAg-негативных больных встречаемость D2 - 29,2%. Среди HBsAg-положительных пациентов из стран Средней Азии преобладал субгенотип D1 (75%), у HBsAg-негативных больных встречаемость D1 - 46,8%. Среди HBsAg-негативных лиц повышена частота встречаемости субгенотипа D3: 30,4% и 72,73% в регионах РФ, 31,9% в странах Средней Азии. Эпидемиологический профиль ВГВ в РФ подвергается изменениям за счет привнесения в регион геновариантов вируса, характерных для стран Средней Азии. Генотипы вируса при скрытом ГВ отражают генетическое разнообразие изолятов, циркулирующих в соответствующих географических регионах, однако наблюдается тенденция к преобладанию ВГВ субгенотипа D3.

7. Внутригрупповой процент нуклеотидной идентичности субгенотипов D1, D2 и D3 составил  $98,1 \pm 0,9\%$ ,  $99 \pm 0,2\%$ ,  $98,8 \pm 0,5\%$  у HBsAg-положительных пациентов из РФ,  $98,6 \pm 0,7\%$ ,  $98,6 \pm 0,7\%$  и  $98,7 \pm 0,6\%$  у пациентов из Средней Азии, что практически не отличается от результатов полученных для HBsAg-негативных лиц из соответствующих регионов. Геноварианты ВГВ, выявленные при HBsAg-негативной (скрытой) форме ХВГВ, филогенетически близки с геновариантами ВГВ при HBsAg-положительной форме течения заболевания.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Лечащим врачам, врачам-инфекционистам и врачам клинической лабораторной диагностики рекомендуется для выявления скрытого ГВ с целью достоверной идентификации причин заболевания и возможного планирования дальнейшей терапии у ВИЧ-инфицированных лиц, пациентов с ХВГС, с гепатитом неясной этиологии и в других группах риска применять разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке.

2. Специалистам по трансфузиологии для совершенствования контроля за качеством донорской крови рекомендуется применять разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке.

3. Врачам-эпидемиологам для выявления редких субгенотипов ВГВ, не характерных для территории РФ и/или не идентифицируемых генотипической ПЦР с помощью коммерческих наборов реагентов рекомендуется применение прямого секвенирования вируса.

### **ПЕРСПЕКТИВА ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Разработанный метод позволяет выявлять вирус гепатита В при низкой вирусной нагрузке, что даст возможность проводить скринирование доноров крови, выявлять патоген при коинфекциях с вирусом иммунодефицита человека и вирусом гепатита С, а также при гепатитах неясной этиологии. В качестве перспектив разработки темы можно рассматривать дальнейшую апробацию метода в рамках скрининга на вирус гепатита В. Дальнейшее изучение темы является перспективным направлением для оценки распространенности и анализа геновариантов вируса гепатита В у доноров крови, в группах риска, в популяции с большей точностью, чем используемый в настоящее время анализ на встречаемость вируса гепатита В, основанный на выявлении HBsAg.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований:**

1. Семенов, А.В. Количественное определение HBsAg в сыворотке крови и кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В в ткани печени как маркеры активности хронического вирусного гепатита В / А. В. Семенов, И. А. Власова, **Ю.В. Останкова**, А.А. Тотолян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. - №1.- С. 55-61.
2. Белопольская, М. А., Эффективность назначения телбивудина в третьем триместре беременности для предупреждения вертикальной передачи вирусного гепатита В / М. А. Белопольская, С. Л. Фирсов, **Ю.В. Останкова**, А. В. Семенов, О.В. Калинина // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 105-107.
3. Габдрахманов, И.А. Взаимосвязи вирусологических и морфологических показателей в фазах иммунного контроля и реактивации у больных хроническим гепатитом В / И.А. Габдрахманов, А. В. Семенов, **Ю. В. Останкова**, К.В. Козлов, К.В. Жданов, Д.А. Гусев, В.С. Сукачев, Д.М. Шахманов, С.С. Жабров, А.С.Перемышленко, Ю.И. Буланьков, А.М. Иванов, А. А. Тотолян // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7, № 4. - С. 37-43.
4. Семенов, А. В. К вопросу о молекулярной эпидемиологии гепатита В в Республике Саха (Якутия) / А. В. Семенов, **Ю. В. Останкова**, В. В. Герасимова, М.А. Бичурина, С.Л. Мукомолов, А.В. Козлов, А.А. Тотолян // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 57-65.
5. Семенов, А. В. Особенности молекулярной эпидемиологии сочетанной инфекции ВГВ/ВГД в Кыргызстане / А. В. Семенов, **Ю. В. Останкова**, К. А. Ногойбаева, К.Т. Касымбекова, И. Н. Лаврентьева, С. Т. Тобокалова, А. А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т.6, №2 – С.141-150.
6. **Останкова, Ю. В.** Молекулярно-биологические маркеры гепатита В у пациентов с фиброзом/циррозом печени в Узбекистане / Ю. В. Останкова, А. В. Семенов, Х. Н. Файзуллаев, Е. И. Казакова, А. В. Козлов, Э. И. Мусабаев, А. А. Тотолян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2016. – № 5. - С. 34-43.
7. Семенов, А. В. Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ как маркер распространенности оккультного гепатита В у пациентов с ВГВ, ВГД и ВГС инфекцией в Узбекистане / А. В. Семенов, **Ю. В. Останкова**, Х. Н. Файзуллаев, Е. И. Казакова, А. В. Козлов, Э. И. Мусабаев, А. А. Тотолян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2016. – № 5. - С. 43-49.
8. **Останкова, Ю.В.** Генетические варианты вируса гепатита В у первичных доноров в г. Астана, Казахстан / Ю. В. Останкова, А. В. Семенов, Ж. К. Буркитбаев, Т.Н. Савчук, А. А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. - 2016. - Т. 6, № 4. - С. 359–366.
9. Габдрахманов, И.А. Скрытая («оккультная») HBV-инфекция (клинический случай) / И.А. Габдрахманов, К.В. Козлов, К.В. Жданов, Д.А. Гусев, А.В. Семенов, **Ю.В. Останкова**, В.С. Сукачев, Д.М. Шахманов, С.С. Жабров, И.М. Юркаев, Г.А. Жанарстанова, Т.М. Зубик, К.С. Иванов, Ю.И. Ляшенко // Журнал инфектологии. - 2017. - Т. 9. № 1. - С. 107-109.
10. **Ostankova, Yu. V.** Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan / Yu. V. Ostankova, A. V. Semenov, Z.K. Burkitbayev, T. N. Savchuk, A. A. Totolian // Russian Journal of Infection and Immunity. – 2017.- v.7(4). – p.383-392.
11. Белопольская, М.А. Распространенность и генетические варианты вирусного гепатита В у беременных женщин / М.А. Белопольская, В.Ю. Аврутин, **Ю.В. Останкова**, М.И. Дмитриева, Е.А. Рукояткина, А.В. Дмитриев, О.В. Калинина. // Вич-Инфекция и Иммуносупрессии. - 2017. - Т.9, № 4. - с. 55-64.
12. Пат. 2633755 Российская Федерация, МПК G01N 33/50 C12Q 1/70. Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной

нагрузке на основе двухэтапной пцр / **Останкова Ю.В.**, Семенов А.В., Тотолян Арег А.; патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». - №2016144898; заявл. 15.11.2016; опубл. 17.10.2017, Бюл. изобр. №29 - 11 с.

#### **Главы в монографии:**

13. **Останкова, Ю.В.** Распространенность маркеров вируса гепатита В среди пациентов Российско-Гвинейского госпиталя г.Киндия Гвинейской Республики / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, Е.В. Эсауленко, М.В. Понятишина, И.В. Хамитова, В.А. Сафронов, А.А. Крицкий, С. Бумбали, М.С. Барри, М.Й. Буаро, А.А. Тотолян // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / под ред. А.Ю. Поповой. - СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. - 288 с.: ил.

14. Попова, А.Ю. Распределение генотипов вируса гепатита В среди пациентов Российско-Гвинейского госпиталя г.Киндия Гвинейской Республики / А.Ю. Попова, А.В. Семенов, **Ю.В. Останкова**, Е.В. Найденкова, С.А. Щербакова, С. Бумбали, М.С. Барри, М.Й. Буаро, А.А. Тотолян // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / под ред. А.Ю. Поповой. - СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. - 288 с.: ил.

15. Семенов, А.В. Эпидемиология гепатита В в странах Африканского континента / А.В. Семенов, **Ю.В. Останкова**, Е.В. Эсауленко, М.В. Понятишина, С. Бумбали, М.С. Барри, М.Й. Буаро, А.А. Тотолян // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / под ред. А.Ю. Поповой. - СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. - 288 с.: ил.

#### **Тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов:**

16. Останкова, Ю.В. Молекулярно-эпидемиологические особенности вируса гепатита В (ВГВ) в республике Якутия / Ю. В. Останкова, А. В. Семенов, С. Л. Мукомолов, В.В. Герасимова // VI Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины»: Материалы – Ставрополь. - 2014. – С.59.

17. Ostankova, Y. Molecular epidemiology of HBV in the Republic of Yakutia / Y. Ostankova, A. Semenov, S. Mukomolov, V. Gerasimova, N. Lyubimova // Institute Pasteur International Network. Paving the way for Research on Global Health and One Health. Paris, September 10-13, 2014. – Paris. – 2014. – P. 101.

18. Семенов, А. В. Молекулярная эпидемиология гепатита D в Кыргызстане / А. В. Семенов, Ю. В. Останкова, А.А Тотолян, К.А. Ногойбаева // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: Материалы международной конференции / Под ред. докт. мед. наук, профессора А. Ю. Поповой, академика РАН, докт. мед. наук, профессора В.В. Кутырева. – Москва, 2015. – С. 345-346.

19. Belopolskaya, M. Snapshot on HBV population heterogeneity in pregnant women chronically infected by HBV / M. Belopolskaya, Ju. Ostankova, A. Yakovlev, A. Dmitriev, O. Kalinina // Vilnius International Summit on Communicable Diseases, Vilnius, 26 June – 1 July, 2016. - p.17.

20. Semenov, A. Prevalence of occult hepatitis B markers amongst Russian HIV-infected patients and blood donors from Central Asia. / A. Semenov, Y. Ostankova, E. Musabaev, Z. Burkitbaev, S. Abdrakhmanova, A. Totolian, M. Churina // Institute Pasteur International Network Scientific Symposium, Paris, 29 November - 2 December, 2016. – Paris. – 2016. - P. 64.

21. Manuylov, V.A. Genetic and serological diversity of Hepatitis B virus in Siberia, Russia / V.A. Manuylov, I.V. Karandashova, A.A. Karlsen, S.V. Netesov, H. Norder, Yu.V. Ostankova, A.V. Semenov, T. Tallo // International conference "Toolkits for DNA vaccine design, an update". Moscow, November 17-21, 2016. - Abstract book. - P. 55-56.

22. Останкова, Ю.В. Распространенность молекулярно-биологических маркеров вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической

неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, М.А. Чурина, А.А. Тотолян // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2016. - Т. 8. № 4. - С. 89-90.

23. Эсауленко, Е.В. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика острого гепатита В в Северо-Западном Федеральном Округе / Е.В. Эсауленко, М.В. Понятишина, М.В. Алексеева, А.В. Семенов, Ю.В. Останкова, Н.В. Иванова // В книге: Материалы IX Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием 2017. - С. 329.

24. Останкова, Ю. В. Распространенность молекулярно-биологических маркеров вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ / Ю. В. Останкова, А. В. Семенов, М. А. Чурина, А.А. Тотолян // IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Молекулярная диагностика - 2017", 18-20 апреля 2017 г., Москва. - Материалы конференции. - Т.1. - с.69-70.

25. Мануйлов, В.А. Генетическое разнообразие вируса гепатита В и оценка времени его эволюции в Сибири / В.А. Мануйлов, И.В. Карандашова, А.А. Карлсен, С.В. Нетесов, Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, Т. Tallo, В.П. Чуланов // IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017», 18-20 апреля 2017 г., Москва. Материалы конференции. – 2017. – Т. 1. - С. 40-41.

26. Gabdrakhmanov, I. Relationship between HBsAg, HBV DNA, covalently closed circular DNA and fibrosis stage in chronic HBV (HBeAg-negative) patients / I. Gabdrakhmanov, K. Zhdanov, K. Kozlov, A. Semenov, V. Sukachev, J. Ostantkova, A. Gvozdetskiy, S. Zhabrov, E. Kudelka // The International Liver Congress™ 2017 – 52nd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver April 19–23, 2017, Amsterdam, the Netherlands - Journal of Hepatology 2017. - vol. 66, № 1. - P. S487.

27. Власик, Р.А. Иммунологические аспекты ВИЧ-инфицированных лиц при коинфекции с вирусом гепатита В / Р.А. Власик, Ю.В. Останкова, А.В. Семенов // Медицинская иммунология. Материалы XVI Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе Дни иммунологии в Санкт-Петербурге. - 2017. - т.19. - с.149.

28. Останкова, Ю.В. Генотипирование оккультного гепатита В у ВИЧ-инфицированных пациентов / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, А.А. Тотолян // Медицинская иммунология. Материалы XVI Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе Дни иммунологии в Санкт-Петербурге. - 2017. - т.19. Специальный выпуск. - с.154.

29. Останкова, Ю.В. Распространенность оккультного гепатита В у ВИЧ-инфицированных женщин с вирусологически неэффективной антиретровирусной терапией / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, М.А. Чурина, А.А. Тотолян // Материалы международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Женщины и ВИЧ". - СПб. - Изд-во "Человек и его здоровье". - 2017. - стр. 310.

30. Останкова, Ю.В. Распространенность оккультного вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии в Архангельской области / Ю.В. Останкова, М.А. Чурина, А.В. Семенов, А.А. Тотолян // Проблемы медицинской микологии. - 2017. - т.9, №2. - с.115.

31. Останкова, Ю.В. Проблемы лабораторной диагностики оккультного гепатита В / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов // Материалы IV Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием "Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания". 1-4 ноября 2017г. - Сочи. - с. 170-171.

32. Понятишина, М.В. Результаты изучения генетической вариабельности вируса гепатита в субъектах Северо-Западного Федерального Округа / М.В. Понятишина, Е.Н. Прийма, М.В. Алексеева, А.В. Семенов, Ю.В. Останкова, Е.В. Эсауленко // Материалы IV Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным

участием "Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания". 1-4 ноября 2017г. - Сочи. - с. 188-189.

33. Останкова, Ю. В. Выявление оккультного гепатита В при низкой вирусной нагрузке в периферической крови HBsAg-негативных доноров крови / Ю. В. Останкова, А. В. Семенов // Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября 2017 года. - с.310-311.

34. Эсауленко, Е.В. Особенности распространения генотипов вируса гепатита В в субъектах Северо-Западного Федерального Округа / Е.В. Эсауленко, М.В. Понятишина, М.В. Алексеева, А.В. Семенов, Ю.В. Останкова // Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября - 2017 года. - с.55-56.

35. Останкова, Ю.В. Выявление редких геновариантов вируса гепатита В в СЗФО РФ / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, Д.А. Зуева // Материалы III межрегионального форума специалистов "Актуальные вопросы инфекционной патологии" совместно с заседанием профильной комиссии министерства здравоохранения российской федерации, по специальности "инфекционные болезни". СПб, 25-26 апреля 2018. - Москва: ООО "Пре100 принт". - 2018. - 116с. - с. 77-78.

36. Власик, Р.А. Распространенность оккультного гепатита В среди HBsAg-негативных доноров крови города Челябинск / Р.А. Власик, Ю.В. Останкова, Д.Э. Валутите, А.В. Семенов // Материалы 91-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Мечниковские чтения - 2018". СПб. 26 апреля, 2018. - с.178.

37. Останкова, Ю.В. Особенности распространения генотипов вируса гепатита В при HBsAg- и HBsAg+ ХВГВ в Республике Казахстан / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, Д.А. Зуева, Ж. К. Буркитбаев, Т. Н. Савчук, А.А. Тотолян // Журнал Инфектологии. Материалы V конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Новосибирск. 16-18 мая, 2018. - т.10, №2, прил.1. - с.81-82.

38. Семенов, А.В. Генетическое разнообразие вируса гепатита В в Республике Кыргызстан / А.В. Семенов, Ю.В. Останкова, Д.А. Зуева, К.А. Ногойбаева, К.Т. Касымбекова, С.Т. Тобокалова // Журнал Инфектологии. Материалы V конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Новосибирск. 16-18 мая, 2018. - т.10, №2, прил.1. - с.96-97.

39. Останкова, Ю.В. Применение молекулярно-биологических методов для выявления вируса гепатита В у доноров крови в г. Челябинск / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, Е. Б. Зуева, Д.Э. Валутите, Р.А. Власик, Д. А. Зуева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Микробиология: от микроскопа до геномного анализа». СПб. 17-18 мая, 2018.

40. Останкова, Ю.В. Идентификация и типирование вируса гепатита В у детей и подростков в Гвинейской Республике / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, И.В. Хамитова, Е.В. Эсауленко // Материалы конгресса с международным участием "Здоровые дети - будущее страны". Детская медицина Северо-Запада. - 2018. - т.7, №1. - с.246-247.

41. Останкова, Ю.В. Молекулярно-эпидемиологические особенности HBsAg-негативного вируса гепатита В у доноров крови г. Челябинск / Ю. В. Останкова, А. В. Семенов, Е. Б. Зуева, Д. А. Зуева // Сборник материалов Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика» 24-25 мая 2018 года, г. Москва. - с.57.

42. Семенов, А.В. Распространенность маркеров и генетическая вариабельность вируса гепатита В у лиц с впервые выявленным вирусом иммунодефицита человека / А.В. Семенов, Ю.В. Останкова, Зыонг Дык Чонг, Р.А. Власик, Д.А. Зуева // Сборник материалов Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика» 24-25 мая 2018 года, г. Москва. - стр.70.

**Список используемых сокращений**

АРВТ – антиретровирусная терапия

ВГ – вирусный гепатит

ВГВ – вирус гепатита В

ВГD – вирус гепатита D

ВГС – вирус гепатита С

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГВ – гепатит В

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХЛА - иммунохемилюминесцентный

Ккз ДНК – кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК

НК – нуклеиновая кислота

Нт – нуклеотид

ОГВ – острый гепатит В

СкГВ – скрытый (HBsAg-негативный) гепатит В

П.о. – пары оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ХВГ – хронический вирусный гепатит

ХВГВ – хронический вирусный гепатит В

ХВГС – хронический вирусный гепатит С

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

GAPDH - глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа

HBsAg – hepatitis B surface antigen (поверхностный антиген вируса гепатита В)

HBcAg – hepatitis B core antigen (коровый антиген вируса гепатита В)

HBеAg – hepatitis B envelope antigen (оболочечный антиген вируса гепатита В)