

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «ВЕКТОР-БЕСТ»

На правах рукописи

Безуглова Людмила Вячеславовна

**РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ТИПИРОВАНИЯ HBsAg НА
ОСНОВЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

1.5.6 - Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Нетёсов Сергей Викторович

Кольцово - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. ОТКРЫТИЕ HBsAg.....	13
1.2. ВИРУС ГЕПАТИТА В И ЕГО ГЕНОМ	17
1.3. ВИРУС ГЕПАТИТА D - САТЕЛЛИТНЫЙ ВИРУС ГЕПАТИТА В.....	20
1.4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ВГВ	22
1.5. ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ВГВ	22
1.6. ПАТОГЕНЕЗ ИНФЕКЦИИ ВГВ, СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ	24
1.7. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ (СУБТИПЫ HBsAg).....	28
1.8. ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBsAg	31
1.9. РАЗНООБРАЗИЕ ВГВ В МИРЕ И РОССИИ.....	33
1.10. ВЫЯВЛЕНИЕ HBsAg И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЕГО ХАРАКТЕРИСТИК.....	37
1.10.1. Эволюция методов изучения инфекции ВГВ (историческая справка)	37
1.10.2. Панели образцов сывороток крови человека, содержащие разные субтипы, мутантные варианты HBsAg, разные генотипы ВГВ	39
1.10.3. Современные наборы реагентов для выявления HBsAg.....	40
1.10.4. Методы определения генотипов ВГВ.....	43
1.10.5. Методы определения субтипов HBsAg	46
1.10.6. Заключение по методам определения генотипов ВГВ и субтипов HBsAg	47
1.11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1. МАТЕРИАЛЫ	49
2.1.1. Коллекция моноклональных антител против HBsAg (анти-HBs).....	49
2.1.2. Панели HBsAg-положительных образцов для отбора МАТ анти-HBs	49
2.1.3. Исследуемые образцы сывороток и плазм крови человека	50
2.2. МЕТОДЫ.....	51
2.2.1. Иммуноферментный анализ	51
2.2.2. Молекулярно-генетические методы	55
2.2.3. Описание методов статистического анализа.....	56
2.2.4. Дизайн апробации методики	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1. МНОЖЕСТВО ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	58

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВИРУСНОЙ ДНК	59
3.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBsAg/ ГЕНОТИПОВ ВГВ в HBsAg-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМ КРОВИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПО МЕТОДИКЕ DR. P.SWENSON	60
3.4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBsAg / ГЕНОТИПОВ ВГВ в HBsAg ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК И ПЛАЗМ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТ АНТИ-HBs АО «ВЕКТОР-БЕСТ»	64
3.4.1. Подбор МАТ для целей субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ	64
3.4.2. Подбор условий проведения ИФА	65
3.4.3. Определение генотипов ВГВ	71
3.4.4. Оценка воспроизводимости методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека	72
3.4.5. Заключение по разработке методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека	72
3.5. АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBsAg И ГЕНОТИПОВ ВГВ в HBsAg-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК И ПЛАЗМ КРОВИ в АО «ВЕКТОР-БЕСТ»	73
3.5.1. Результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека, полученные с помощью разработанной методики	73
3.5.2. Сопоставление полученных данных с результатами анализа геномных последовательностей вирусной ДНК выделенных изолятов	77
3.5.3. Сопоставление полученных данных с результатами субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ с использованием методики Dr. P.Swenson	80
3.5.4. Дискордантные результаты	81
3.5.5. Заключение по апробации разработанной методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека	87
3.6. ВАЛИДАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBsAg И ГЕНОТИПОВ ВГВ	90
3.6.1. Результаты определения генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД, в том числе в образцах с недетектируемым уровнем ДНК ВГВ	90
3.6.2. Оценка возможности применения разработанной методики субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток крови пациентов в клинической лабораторной практике	94
3.6.3. Оценка возможности применения разработанной методики субтипирования HBsAg в иммунобиологических препаратах рекомбинантного HBsAg	95

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ПАНЕЛЬ HBSAG+ ОБРАЗЦОВ «РАСШИРЕННАЯ»	120
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBSAG И ГЕНОТИПОВ ВГВ В HBSAG-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМ КРОВИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КОРЕННЫХ НАРОДНОСТЕЙ СИБИРИ, УСТАНОВЛЕННЫЕ ПО МЕТОДИКЕ DR. P.SWENSON	122
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТ АНТИ-HBS, ВЫПОЛНЕННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБРАЗЦОВ «БАЗОВОЙ» ВП, СОДЕРЖАЩИХ HBSAG РАЗНЫХ СУБТИПОВ	128
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ОТОБРАННЫЕ КАНДИДАТЫ МАТ АНТИ-HBS	129
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. РЕЗУЛЬТАТЫ СУБТИПИРОВАНИЯ HBSAG/ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВГВ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ, В HBSAG- ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМ КРОВИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КОРЕННЫХ НАРОДНОСТЕЙ ПЯТИ РЕГИОНОВ СИБИРИ	130
ПРИЛОЖЕНИЕ 6. РЕЗУЛЬТАТЫ СУБТИПИРОВАНИЯ HBSAG/ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВГВ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ, В HBSAG- ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХГВ ИЗ ТРЕХ РЕГИОНОВ РОССИИ	134
ПРИЛОЖЕНИЕ 7. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBSAG/ ГЕНОТИПОВ ВГВ В HBSAG-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМ КРОВИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КОРЕННЫХ НАРОДНОСТЕЙ ПЯТИ РЕГИОНОВ СИБИРИ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ТРЕХ МЕТОДИК: РАЗРАБОТАННАЯ МЕТОДИКА, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, МЕТОДИКА DR. P.SWENSON	138
ПРИЛОЖЕНИЕ 8. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBSAG/ ГЕНОТИПОВ ВГВ В HBSAG-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХГВ ИЗ ТРЕХ РЕГИОНОВ РОССИИ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ДВУХ МЕТОДИК: РАЗРАБОТАННАЯ МЕТОДИКА, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	144
ПРИЛОЖЕНИЕ 9. ИНСТРУКЦИЯ ПО ПОДБОРУ И ВЫПУСКУ КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBSAG И ГЕНОТИПОВ ВГВ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК И ПЛАЗМ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИХ HBSAG.....	149
ПРИЛОЖЕНИЕ 10. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБТИПОВ HBSAG И ГЕНОТИПОВ ВГВ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК И ПЛАЗМ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИХ HBSAG	150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЖ – асцитическая жидкость

АО – аминокислотный остаток

ВГВ – вирус гепатита В

ВГD – вирус гепатита D

ВИЭФ – встречный иммуноэлектрофорез

ВКО – внутренний контрольный образец

ВОЗ (WHO) – Всемирная организация здравоохранения (World Health Organization)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХА – иммунохроматографический анализ

ИХЛА – иммунохемилюминесцентный анализ

КВ – коэффициент вариации

К_{поз} – коэффициент позитивности

МАТ – моноклональные антитела

НЧС – нормальная человеческая сыворотка

ОКО – отрицательный контрольный образец

ОП – оптическая плотность

ОП_{крит} – критическое значение оптической плотности

ОП_{сыв} – оптическая плотность сыворотки

ПАТ – поликлональные антитела

ПКО – положительный контрольный образец

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПХ – пероксидаза хрена

РИФ – радиоиммунный метод фиксации

РК – раствор для разведения конъюгата

РОПГА – реакция обратной пассивной гемагглютинации

РПГ – реакция преципитации в геле

СБР – субстратный буферный раствор

СКПК – сыворотка крови плодов коровы

ТМБ – тетраметилбензидин

ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с твином

ХГВ – хронический гепатит В

ЭЛА – электролюминесцентный анализ

anti-HBs – антитела к HBsAg

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

hNTCP (human Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide) – натрий-таурохолат котранспортный полипептид человека

ICBS (International Consortium for Blood Safety) – международный консорциум по безопасности крови

NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) – национальный институт биологических стандартов и контроля

PEI (Paul-Ehrlich Institute) – институт Пауля-Эрлиха

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит В (ГВ) – инфекционное заболевание печени, протекающее в острой или хронической форме. Этиологическим агентом является вирус гепатита В (ВГВ), представитель рода *Orthohepadnavirus* семейства *Hepadnaviridae* (URL: <https://ictv.global/taxonomy>). По оценкам ВОЗ, в 2022 г. в мире насчитывалось 254 миллиона человек, живущих с хроническим гепатитом В (ХГВ); при этом ежегодно происходит около 1,2 миллиона новых случаев инфицирования; 1,1 миллиона человек умерли от гепатита В, главным образом вследствие цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК, первичного рака печени).

HBsAg – главный серологический маркер инфекции ВГВ. Различия в аминокислотной последовательности поверхностного белка ВГВ HBsAg позволили в свое время разбить все изоляты вируса на 9 антигенных субтипов: ауw1, ауw2, ауw3, ауw4, аур, адw2, адw4, адrq+, адrq- (Le Bouvier, 1971; Bancroft et al., 1972; Couroucé-Pauty et al., 1983). Описаны аминокислотные вариации, определяющие принадлежность к какому-либо из субтипов (Okamoto et al., 1987; Norder et al., 1992a; Purdy et al., 2007). В последние два десятилетия таксономическая классификация ВГВ, основанная на различиях в последовательностях геномных ДНК вирусных изолятов, позволяет выделить не менее 9 генотипов (обозначаемых А-І) (Norder et al., 2004; Schaefer et al., 2009; Kurbanov et al., 2010; Seeger et al., 2021). При этом тому или иному генотипу ВГВ могут соответствовать несколько субтипов HBsAg (Norder et al., 2004; Purdy et al., 2007).

Встречаемость генотипов ВГВ и субтипов HBsAg в разных географических регионах варьирует (Couroucé-Pauty et al., 1983; Norder et al., 2004; Kurbanov et al., 2010). В частности, среди городского населения России и стран ближнего зарубежья доминирует генотип D ВГВ (с субтипами HBsAg ауw2 и ауw3) – его доля, в среднем, составляет 80-85% от всех циркулирующих изолятов; также на этой территории иногда встречаются генотипы А ВГВ (субтип адw2) на уровне 10-15% и С (адrq+) – до 5% (сводные данные по работам Kato et al., 2002; Tallo et al., 2004; Sominskaya et al., 2005; Avazova et al., 2008; Tallo et al., 2008; Olinger et al., 2008; Чуланов, 2013). В разных областях России доминирование вариантов ВГВ имеет свои особенности: так, если в Самаре (Flodgren et al., 2000), Ямало-Ненецком Автономном округе (Мануйлов и др., 2005), Новосибирской области и Алтайском крае (Баяндин и др., 2004; Баяндин, 2007), Республике Алтай (Мануйлов и др., 2015) и Иркутской области (Мануйлов и др., 2010) генотип D является абсолютно доминирующим вариантом (98-100%), то, например, в Якутии (Tallo et al., 2008; Кузин и др., 2008; Чуланов, 2013; Семенов и др., 2016) высока встречаемость генотипа А (до 49,5%), а на Таймыре (Мануйлов и др., 2015) и Чукотке (Чуланов, 2013) – генотипа С ВГВ (18-24%). При этом указанные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ, циркулирующие на территории Российской Федерации, коррелируют друг с другом в следующих сочетаниях:

субтипы HBsAg ayw2 и ayw3 – генотип D, субтип adw2 – генотип A, субтип adrq+ – генотип C, что было показано (Чуланов, 2013) на выборке из 85 изолятов ВГВ.

Клиническое течение и исход ХГВ могут зависеть от генотипа ВГВ: ХГВ, вызванный вирусами генотипов C и D, имеет больший риск прогрессирования, а частота ремиссии после сероконверсии по HBeAg и спонтанной элиминации HBsAg ниже, чем при генотипе A ВГВ. Кроме того, при лечении препаратами пегилированного интерферона HBeAg-позитивных больных ХГВ наблюдается более высокая частота сероконверсии по HBeAg у пациентов с генотипом A, чем у пациентов с генотипами C и D (Ивашкин и др., 2014; Seeger et al., 2021).

Все эти данные в совокупности с глобальной стратегией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по элиминации вирусного гепатита В диктуют необходимость более пристального внимания к обнаружению HBsAg, - с одной стороны, при этом и более доступных способов изучения специфических характеристик ВГВ, - с другой, в том числе возможность типирования ВГВ в рутинной клинической практике. В то же время в современных реалиях отечественной лабораторной диагностики имеется весьма ограниченный выбор средств для целей типирования ВГВ. Определение субтипа HBsAg и генотипа ВГВ выполняют путем определения нуклеотидной последовательности S-гена ВГВ с последующим проведением филогенетического анализа (Norder et al., 1992a.; Norder et al., 2004; Чуланов, 2013) и выведением аминокислотной последовательности HBsAg, определяющей субтип этого антигена (Okamoto et al., 1987; Norder et al., 1992a). Использование такого метода предусматривает специальную пробоподготовку и наличие дорогостоящего оборудования. Коммерческий набор для определения генотипа ВГВ «АмплиСенс® HBV-генотип-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва, Россия) (URL: <https://interlabservice.ru/catalog/reagenty/ptsr-diagnostics/virusnye-gepatity/amplisens-hbv-genotip-fl-genotipirovanie-virusa-gepatita-v.html>), позволяющий проводить генотипирование ВГВ (выявление генотипов A, B, C и D), также предусматривает определение генотипа путем работы с вирусной ДНК.

Очевидно, что если ДНК ВГВ не удастся выявить в крови пациента, то, определить генотип ВГВ молекулярно-генетическими методами невозможно, а такое нередко случается в практике. В то же время наличие HBsAg в данных образцах дает возможность изучать их характеристики с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с применением высокоспецифичных моноклональных антител (МАТ) (Usuda et al., 1986; Usuda et al., 1999). В частности, в более ранних исследованиях (Нетесова и др., 2001; Netesova et al., 2003; Нетесова и др., 2004) субтип HBsAg определяли по методике Dr. P.Swenson с использованием высокоспецифичных МАТ (Swenson et al., 1991). Благодаря данной методике в АО «Вектор-Бест» была создана коллекция образцов крови человека с разными субтипами HBsAg (ayw2, ayw3varA, ayw3varB, adw2, adrq+). Существуют также коммерческие наборы реагентов производства

Японии (Institute of Immunology Co. Ltd, Tokyo, Japan) для определения субтипа HBsAg (URL: <https://www.tokumen.co.jp/products/manual/en/ME-HBsAg-Subtype-EIA.pdf>) и генотипа ВГВ (URL: <https://www.tokumen.co.jp/products/manual/en/ME-IMMUNIS-HBV-Genotype-EIA.pdf>) в HBsAg-положительных образцах методом ИФА. При этом высокая стоимость данных наборов является существенным барьером для применения в российских лабораториях.

Целью данной работы являлась разработка и экспериментальное применение методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток/плазм крови человека, содержащих HBsAg, методом ИФА с применением высокоспецифичных МАТ против HBsAg (анти-HBs), полученных в АО «Вектор-Бест».

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Отобрать и охарактеризовать высокоспецифичные МАТ анти-HBs для определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ с использованием имеющейся коллекции образцов сывороток и плазм крови человека, содержащих HBsAg;
2. Разработать методику с применением отечественных МАТ в ИФА для субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека, содержащих HBsAg;
3. Определить субтипы HBsAg и генотипы ВГВ с помощью разработанной методики и с помощью альтернативной методики Dr. P.Swenson в ИФА в образцах сывороток и плазм крови, содержащих HBsAg, а также сопоставить результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ, полученных разными методами (с помощью разработанной методики, по методике Dr. P. Swenson и молекулярно-генетическими методами);
4. Провести валидацию разработанной методики типирования ВГВ в независимых исследованиях: для образцов пациентов с моноинфекцией ВГВ и сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД; в клинической лабораторной практике; в иммунологических препаратах на основе рекомбинантного антигена.

Научная новизна

Впервые в России разработана методика определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток/плазм крови человека, содержащих HBsAg, с применением отечественных МАТ, полученных, отобранных и охарактеризованных в АО «Вектор-Бест».

Показана высокая степень совпадения результатов определения субтипов HBsAg (88,4%) и генотипов ВГВ (98,9%) при сопоставлении результатов, полученных с помощью разработанной методики, с результатами молекулярно-генетических методов.

Показана высокая степень совпадения результатов определения субтипов HBsAg (95,6%) и генотипов ВГВ (98,2%), полученных с помощью двух методик, использующих МАТ в ИФА: разработанной нами и Dr. P.Swenson.

Показана возможность определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ с помощью разработанной методики в образцах сывороток и плазм крови пациентов с моноинфекцией ВГВ, в том числе с недетектируемой ДНК ВГВ, а также в образцах сывороток и плазм крови пациентов, инфицированных одновременно ВГВ и ВГД.

Показана возможность применения разработанной методики определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека в клинической лабораторной практике, а также в иммунобиологических препаратах на основе рекомбинантного HBsAg.

Теоретическая и практическая значимость работы

Обнаруженный в ходе данной работы образец с субтипом ауw4 был включен в состав Стандартной панели сывороток крови¹, содержащей разные субтипы и мутантные формы HBsAg вируса гепатита В АО «Вектор-Бест», предназначенной для оценки возможности коммерческих иммуноферментных наборов реагентов выявлять циркулирующие на территории РФ субтипы этого антигена.

Разработанная методика может служить хорошей альтернативой существующих на данный момент методов типирования вируса гепатита В, основанных на секвенировании генома вируса с последующим филогенетическим анализом. Практическая значимость работы состоит также в возможности применения разработанной методики определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в случаях, когда в образцах сывороток/плазм крови пациентов с инфекцией ВГВ невозможно определить генотип ВГВ молекулярно-генетическими методами, в том числе у пациентов с гепатитом D.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика с применением высокоспецифичных МАТ позволяет специфически различать 4 субтипа HBsAg (ауw2, ауw3, адw2, адrq+) и 3 генотипа ВГВ (А, С, D);
2. Показана высокая степень совпадения при сопоставлении результатов субтипирования HBsAg (88,4%) / генотипирования ВГВ (98,9%), полученных с применением разработанной методики и молекулярно-генетическими методами;

¹ D-0540 HBsAg-стандартная панель сывороток (ПУ № ФСР 2012/13718)

3. Показана высокая степень совпадения при сопоставлении результатов субтипирования HBsAg (95,6%) / генотипирования ВГВ (98,2%), полученных с применением разработанной методики и с помощью методики Dr. P.Swenson;
4. Разработанная методика с применением высокоспецифичных МАТ позволяет определять генотипы ВГВ в образцах сывороток и плазм крови больных с моноинфекцией ВГВ, а также с сочетанной инфекцией ВГВ + ВГД, в том числе при недетектируемом уровне ДНК ВГВ.

Личный вклад автора

Работа выполнена в АО «Вектор-Бест». Исследования, проведенные методом ИФА, и анализ полученных данных выполнены лично автором, включая отбор образцов сывороток/плазм крови человека, содержащих HBsAg и полученных от представителей коренных народностей пяти регионов Сибири, а также определение субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в этих образцах по методике и с реагентами Dr. P.Swenson. Автором отобраны МАТ анти-HBs для субтипирования HBsAg и разработана методика определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека; написаны инструкции по подготовке комплектов реагентов и по применению разработанной методики. Проведены испытания разработанной методики (апробация) на выборке HBsAg-положительных образцов сывороток и плазм крови, полученных от представителей коренного населения пяти регионов Сибири, а также пациентов с ХГВ трех других регионов России; полученные данные сопоставлены с результатами субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ по методике Dr. P.Swenson, а также с молекулярно-генетическим определением субтипов HBsAg и генотипов ВГВ выделенных изолятов. Обсуждение и анализ результатов, полученных во внешних организациях, по определению генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови больных с моноинфекцией ВГВ, а также с сочетанной инфекцией ВГВ + ВГД, в том числе при недетектируемом уровне ДНК ВГВ, возможности использования разработанных реагентов в клинической лабораторной практике, были проведены совместно с коллегами. Возможность применения разработанных реагентов с целью определения субтипов HBsAg применительно к иммунобиологическим препаратам рекомбинантного HBsAg выполнена автором.

Степень достоверности и апробация результатов

Положения и выводы являются научно обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. Результаты диссертационной работы были представлены на VI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2014), VIII Всероссийской научно-практической

конференции "Молекулярная диагностика-2014" с международным участием (Москва, 2014), XXIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лабораторная диагностика в современных реалиях» (Москва, 2019), XI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2019); V Юбилейном конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2019); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы» (Москва, 2019), XXV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лабораторная диагностика в современных реалиях» (Москва, 2020); XII Ежегодном Всероссийском интернет-конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: диагностика, лечение и профилактика» (Москва, 2020), XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы» (Москва, 2021), X Юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» (Москва, 2021), XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» (Москва, 2023).

Результаты работы отражены в 19 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых: 5 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 13 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 150 страницах текста, включает 20 таблиц, 11 рисунков, 10 приложений, и содержит список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, состоящий из 210 источников отечественных и зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Открытие HBsAg

Изучение возбудителя гепатита В берет свое начало в 1964 году, когда Барух Бламберг с соавторами при исследовании иммунологическими методами крови аборигенов Австралии обнаружил неизвестный до тех пор антиген, названный «австралийским» (Blumberg et al., 1965). Тот факт, что передача этого антигена не подчинялась законам менделевской генетики, и его выявление наблюдалось не сразу после рождения, а спустя какое-то время, а также несомненная связь между наличием антигена в крови и заболеваемостью гепатитом В, позволили предположить, что «австралийский антиген» является инфекционным агентом гепатита или его частью. В настоящее время «австралийский антиген» известен как HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) – поверхностный белок ВГВ. За открытие «австралийского антигена» Б. Бламберг в 1976 году был удостоен Нобелевской премии.

В 1970 году при электронно-микроскопическом исследовании сывороток крови, содержащих «австралийский антиген», в больших количествах были обнаружены сферические и тубулярные частицы, имевшие диаметр 22 нм, а также более крупные сферические частицы размером 42 нм, содержавшие внутренний нуклеокапсид (Dane et al., 1970). Последние были названы частицами Дейна по имени первооткрывателя. Вскоре было показано, что частицы Дейна являются цельными вирионами ВГВ, в то время как меньшие частицы образованы конгломератами HBsAg (Рисунок 1).

В 1971-72 годах были впервые описаны четыре серотипа (субтипа) HBsAg (Le Bouvier, 1971; Bancroft et al., 1972), что положило начало серологической классификации ВГВ. К 1983 году число открытых основных субтипов HBsAg достигло девяти (Couroucé-Pauty et al., 1983) и остается таковым до сих пор. Несмотря на то, что исследования HBsAg на молекулярном уровне продолжаются и по сей день, основные успехи в изучении нуклеотидных и выведенных аминокислотных последовательностей, соответствующих различным субтипам HBsAg, были достигнуты к 1992 году (Okamoto et al., 1989; Norder et al., 1992).

В 1978 году полный геном ВГВ был впервые клонирован в прокариотической векторной системе (Fritsch et al., 1978). Определение нуклеотидной последовательности полноразмерного генома ВГВ было завершено к 1979 году (Galibert et al., 1979). В 1988 году Х. Окамото (Н. Okamoto) с соавторами предложили использовать отличия в ДНК геномов ВГВ для создания генетической классификации изолятов данного патогена. К четырем генетическим группам (генотипам) ВГВ, выделенным этими авторами (Okamoto et al., 1988), в 1992 году добавилось еще две (Norder et al., 1992a), к 2002 году число выявленных генотипов ВГВ увеличилось до восьми (Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002), и на сегодняшний день расширилось до 10. В начале

21 века, в связи с накоплением новых данных, полученных при изучении филогенетическими методами большого числа полногеномных последовательностей ВГВ, появилась возможность расширить существовавшую генетическую классификацию, подразделив некоторые генотипы вируса на субгенотипы (Kramvis et al., 2002; Norder et al., 2003; Huy et al., 2004; Kimbi et al., 2004; Norder et al., 2004; Huy et al., 2006).

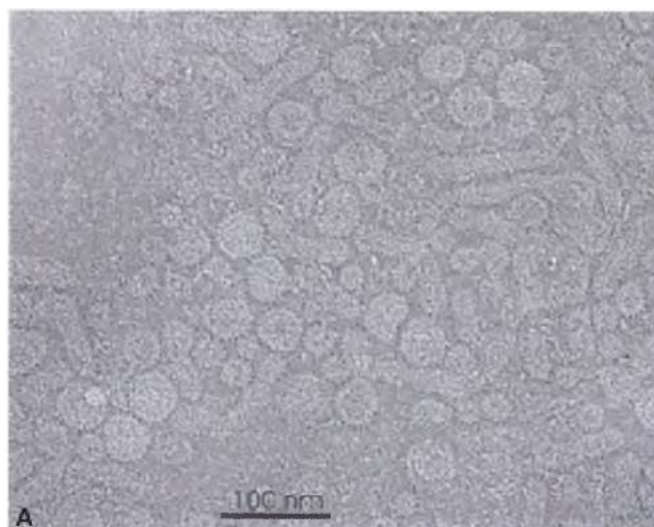


Рисунок 1. Криогенная электронная микроскопия вирусных частиц хронически инфицированных пациентов. А. Частица Дэйна 42 нм, сферические и тубулярные частицы HBsAg (Seitz et al., 2007).

Параллельно с изучением молекулярной биологии ВГВ происходило активное развитие методов диагностики, лечения и профилактики ГВ. В начале 70-х годов прошлого века дополнительно к HBsAg были охарактеризованы другие серологические маркеры ВГВ, имеющие важное диагностическое значение. Это core-антиген (HBcAg) - белковый компонент, образующий нуклеокапсид вируса, и описанная для него сероконверсия HBcAg/anti-HBc (Almeida et al., 1971), а также HBeAg, являющийся процессируемым вариантом HBcAg, и его система сероконверсии HBeAg/anti-HBe (Magnius et al., 1972).

В 1975 году на основе фотометрического анализа очищенного белка HBsAg был предложен один из первых методов его количественного определения в крови (Gerlich, 1975). Развитие иммунологических методов, в частности, ИФА, в качестве диагностических, а также понимание динамики появления и исчезновения серологических маркеров гепатита В на различных стадиях болезни (Chau et al., 1983) позволило к началу 1990-х годов сформировать алгоритм серодиагностики ВГВ практически в том виде, в котором он существует и по сей день (Hoofnagle et al., 1991). Применение в диагностических целях методов молекулярной биологии и, главным образом, ПЦР, предложенной для ВГВ впервые в 1990 году (Kaneko et al., 1990), кардинальным образом расширило возможности диагностики данной инфекции. В последнее время, помимо метода ИФА, для выявления HBsAg широко используется

иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА) - метод иммуноанализа на основе ИФА, при котором меткой, то есть истинным “индикатором” аналитической реакции, является люминесцентная молекула. Данный анализ проводится в автоматических анализаторах за относительно непродолжительное время (18-40 минут), что обеспечивает, в совокупности с повсеместно внедряемыми лабораторными информационными системами, персонализированный подход к тестированию крови пациентов.

Неспецифическое противовирусное лечение ХГВ с использованием лейкоцитарных интерферонов было впервые предложено в 1976 году (Desmyter et al., 1976; Greenberg et al., 1976). Предпосылки для этиотропной терапии ВГВ, основанной на применении нуклеозидных аналогов, взаимодействующих с вирусной полимеразой, появились еще в 1991 году (Doong et al., 1991), но широкое применение в клинической практике препараты этого типа получили только с 1995 года (Dienstag et al., 1995), и в настоящий момент они широко используются в терапии гепатита В. В последнее время получены данные о разработке и внедрении в практику препарата булевиртид (Myrcludex B) - синтетического аналога липопептидного фрагмента большого белка внешней оболочки ВГВ, связанного на N-конце с миристиновой кислотой, необходимой для взаимодействия ВГВ с hNTCP (котранспортирующий таурохолат натрия полипептид человека) в качестве высокоаффинного рецептора гепатоцита хозяина для проникновения его внутрь клетки. Этот препарат действует как блокатор рецепторов, ингибируя вход вируса в клетку и последующие этапы его репликации. Способность препарата в очень низких концентрациях полностью предотвращать проникновение вируса показана *in vitro* и *in vivo* (Nkongolo et al., 2022). Помимо этого, начиная с 2014 года (Lin, 2014), активно изучается возможность применения метода CRISPR-Cas9 (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) для терапии инфекции ВГВ за счет ингибирования репликации вируса и даже инактивации cccDNA (covalently closed circular DNA, или ковалентно замкнутая кольцевая ДНК, кзкДНК) (Kostyushev et al., 2022; Kostyushev et al., 2023).

Несмотря на достигнутые успехи в лечении данной инфекции и разработку новых средств лечения, существующие схемы терапии отнюдь не обладают абсолютной эффективностью в отношении гепатита В. Более того, лечение ХГВ является практически «пожизненным». Поэтому признанным способом предотвращения распространения этой инфекции все так же остается профилактика заражения гепатитом В, и, в первую очередь, вакцинация против ВГВ.

Первая вакцина против ВГВ на основе очищенных антигенов вируса, полученных из донорской крови, появилась в конце 70-х годов 20 века (Francis et al., 1982; McLean et al., 1983). Коммерчески доступная вакцина против ВГВ, основанная на рекомбинантном HBsAg и отличающаяся большей эффективностью и безопасностью, впервые была разработана в США в

конце 1970-х гг. (Edman et al., 1981; Valenzuela et al., 1982). Именно в этой стране впервые началось внедрение программ вакцинации против гепатита В, охватывающих широкие слои населения: в 1982 году Центр по контролю над инфекционными заболеваниями (Centre for Disease Control and Prevention, CDC) рекомендовал вакцинацию лиц, входящих в основные группы риска в отношении передачи ВГВ (Davidson et al., 1986), в 1991 году началась вакцинация всех новорожденных, а начиная с 1995 года – всех подростков (Goldstein et al., 2002). В России первый приказ «О введении профилактических прививок против гепатита В» появился в 1996 году (приказ Минздравмедпрома РФ и Госкомсанэпиднадзора РФ №226/79 от 3 июня 1996 года), а всеобщая вакцинация новорожденных началась в 2001 году (приказ Министерства здравоохранения РФ № 229 от 27.06.2001); также в начале первого десятилетия XXI века в ряде регионов России стартовали программы по вакцинации подростков и работников медицинских учреждений, которые стали всероссийскими с 2005 года (см. Федеральный закон № 157-ФЗ от 17.09.1998 г. «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» с последующими изменениями до 2014 г., а также периодические приказы МЗ РФ «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»). В настоящее время на территории РФ зарегистрированы и широко применяются коммерческие вакцины против ВГВ как импортного, так и отечественного производства, среди них «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» (ЗАО НПК "Комбиотех", Москва), вакцина рекомбинантная дрожжевая «Регевак® В» (ЗАО «Биннофарм», Москва).

В 2016 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) поставила амбициозные цели в отношении элиминации гепатитов как угрозы общественному здоровью путем профилактических, диагностических и терапевтических мер с целевыми показателями к 2030 году (URL: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1259202/retrieve>):

- вакцинации против гепатита В (три дозы) детей грудного возраста – 90%;
- профилактики передачи вируса гепатита В (ВГВ) от матери ребенку – 90%;
- обеспечения безопасности донорской крови и инъекций - 100%;
- предоставления услуг тестирования и лечения (охват диагностикой 90% случаев, лечением - 80% пациентов с наличием показаний).

Безусловно, важным шагом в последнем направлении можно считать качественное (квалифицированное, полноценное) выявление HBsAg. Для этого необходимо понимание, какие средства и методы существуют для достижения этих целей.

1.2. Вирус гепатита В и его геном

ВГВ человека относится к роду *Orthohepadnavirus* семейства *Hepadnaviridae* порядка *Blutervirales* класса *Revtraviricetes* типа *Artverviricota* царства *Pararnavirae* сферы *Riboviria* (по данным ictv.global/taxonomy) и является его типичным представителем. Ближайшими его родственниками являются ВГВ обезьян, отдаленными – ВГВ некоторых грызунов и птиц. Полноценный вирион ВГВ сферической формы имеет внешний диаметр около 42 нм (Рисунки 1, 2). Внутренняя оболочка вируса имеет диаметр около 32 нм и состоит из 120 димеров корового белка HBcAg (от «hepatitis B core antigen»). Димеры формируют капсид икосаэдрической формы (Рисунок 2). Капсид покрыт липопротеиновой мембраной, состоящей из трех форм вирусного оболочечного белка HBsAg (от англ. «hepatitis B surface antigen»): L («large»), M («middle») и S («small»). L, M и S белки представлены в вирусной оболочке в соотношении примерно 1:1:4 (Heermann et al., 1984). Полноценный вирион включает геномную ДНК, липидный бислой и три вида структурных белков: поверхностный – HBsAg, коровый – HBcAg (или HBcoreAg) и вирусную полимеразу – Р-белок (от «polymerase»).

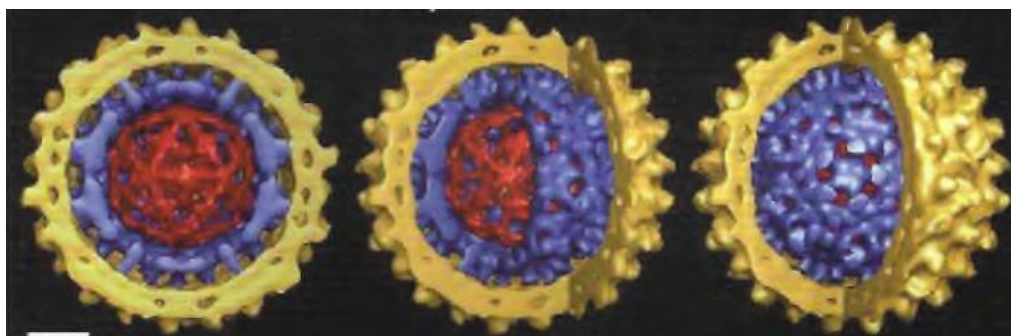


Рисунок 2. Модель вириона ВГВ (Dryden et al., 2006). ВГВ вирион с икосаэдрическим капсидом (обозначен синим цветом) и внешней оболочкой. Пояснения в тексте.

Размер генома ВГВ для большинства генетических вариантов вируса составляет 3221 п.н., однако описаны вариации размера геномной ДНК в пределах ± 200 п.н. за счет делеций и инсерций (Norder et al., 1994; Bowyer et al., 1997). Геном ВГВ представляет собой незавершенно-двухцепочечную кольцевую структуру (Рисунок 3). Длинная замкнутая «минус»-цепь содержит всю последовательность генов, достаточную для обеспечения структуры и жизнедеятельности вируса. Короткая «плюс»-цепь ДНК варьирует по длине и составляет только 50–80% от длины «минус»-цепи. Кольцевая структура генома получается благодаря спариванию комплементарных оснований нуклеотидов двух цепей на «липких» 5'-концах. «Минус»-цепь на 5'-конце ковалентно связана с молекулой Р-белка (Gerlich et al., 1980).

Белок гена X (размер 462 п.н.), располагающегося на «липких» концах генома и кодирующего 154 АО белка X, необходим для инициации и поддержания репликации вируса после заражения и является ключевым регулятором естественного процесса заражения (Lucifora, 2011).

Цикл репликации ВГВ можно представить следующей упрощенной схемой (Ganem et al., 2004) (Рисунок 4). После взаимодействия вируса с клеточными рецепторами, нуклеопротеиновый комплекс проникает в цитоплазму клетки. Здесь нуклеокапсид разрушается, и кольцевая молекула ДНК вируса с присоединенной к ней молекулой вирусной ДНК-полимеразы транспортируется в ядро клетки. В ядре с помощью ДНК-полимеразы вируса происходит достройка «плюс»-цепи и восстановление завершенной кольцевой структуры ДНК вируса. Затем клеточные ферменты синтезируют 4 основных типа транскриптов (длиной 0,7, 2,1, 2,4 и 3,5 kb) с «плюс»-цепи генома ВГВ. Все типы транскриптов выполняют роль мРНК при трансляции вирусных белков, а самый длинный из них содержит всю комплементарную последовательность «плюс»-цепи и называется прегеномной РНК (пгРНК). пгРНК в цитоплазме клетки присоединяет молекулу вирусной ДНК-полимеразы и вместе с молекулами С-белка образует прекапсид, в котором происходит обратная транскрипция пгРНК с образованием «минус»-цепи ДНК ВГВ. В дальнейшем пгРНК деградирует, синтезируется незавершенная «плюс»-цепь, капсид транспортируется в шероховатую эндоплазматическую сеть клетки и комплекс Гольджи, где с присоединением HBsAg формируется зрелый вирион, который выходит из клетки. Клетки, инфицированные ВГВ, начинают также в большом количестве продуцировать неинфекционные субвирусные частицы. В основном они представлены сферическими частицами размером 20-22 нм (Рисунок 1), которые высвобождаются в кровь из инфицированных гепатоцитов и могут достигать титра более 10^{12} в мл (Zoulim et al., 1992; Ning et al., 2011).

ВГВ при обычном цикле репликации не разрушает клетки печени. Цитолиз гепатоцитов при ГВ связывают с атакой эффекторных цитотоксических элементов иммунной системы организма хозяина на зараженные клетки (Nassal, 1999).

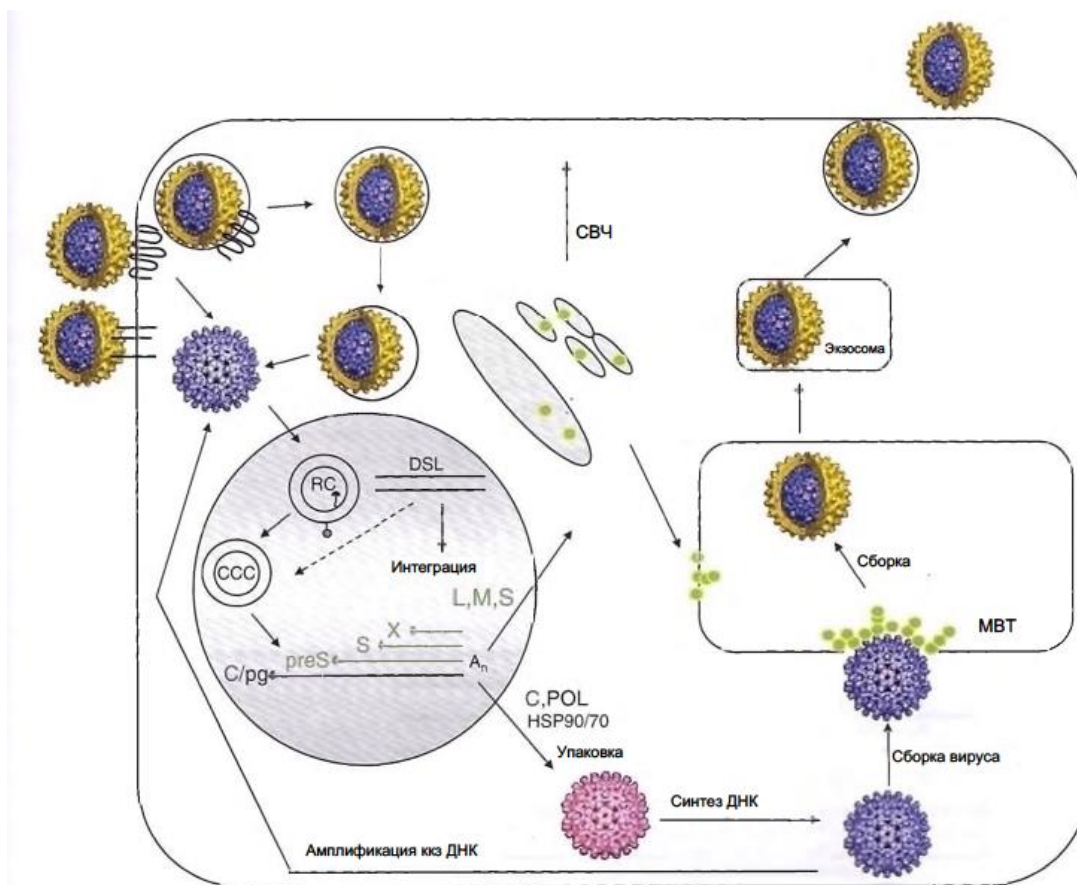


Рисунок 4. Схема репликации ВГВ. Поверхностные белки показаны желтым цветом, ДНК-содержащий капсид голубого цвета, РНК-содержащий капсид – красного цвета. МВТ – мультивезикулярные тельца, СВЧ – субвирусные частицы (адаптировано из Seeger et al., 2021).

1.3. Вирус гепатита D - сателлитный вирус гепатита В

В 1977 году группа ученых под руководством М. Rizzetto сообщила об обнаружении нового вирусного агента у пациентов с ХГВ (Rizzetto et al., 1977). Проведенные спустя три года эксперименты на шимпанзе позволили установить, что дельта-антиген гепатита (HDAg) является структурным компонентом трансмиссивного патогена, которому необходим ВГВ для обеспечения его жизненного цикла (Rizzetto et al., 1980a). Было показано, что вирусная частица состоит из белков оболочки ВГВ, окружающих структуру, подобную рибонуклеопротеину, содержащую HDAg и молекулу рибонуклеиновой кислоты РНК (Rizzetto et al., 1980b). Дельта-агент получил статус отдельного вируса в 1983 году под официальным названием вирус гепатита дельта (ВГД). В 80-х годах было установлено, что геномная РНК ВГД является одноцепочечной и кольцевой. ВГД был выделен в отдельный род *Deltavirus* (Mason et al., 2005). К середине 1990-х годов была установлена структура вириона ВГД и основные характеристики вирусного генома.

ВГД - представитель рода *Deltavirus* семейства *Kolmioviridae* сферы *Ribozyviria* (URL: ictv.global/taxonomy) - возбудитель хронического гепатита D, представляет собой один из

наименьших из известных вирусов человека и демонстрирует особые характеристики как в своей морфологии, так и в цикле репликации. ВГД – это сателлитный вирус ВГВ, так как для образования его вирусных частиц требуются белки оболочки ВГВ (HBsAg). Соответственно, инфекция ВГД устанавливается либо как суперинфекция ВГВ (присоединение гепатита D к уже имеющемуся гепатиту В), либо как коинфекция (одновременное заражение гепатитами В и D). Важно отметить, что вследствие одинакового строения оболочки оба вируса используют одни и те же клеточные рецепторы: гепарансульфат протеогликан (HSPG) в качестве низкоаффинного рецептора и котранспортирующий таурохолат натрия полипептид человека (hNTCP) в качестве высокоаффинного рецептора (Ni et al., 2014; Lempp et al., 2017). Вирусная частица ВГД состоит из нуклеокапсид, сформированного единственным собственным белком вируса, покрытого внешней оболочкой, состоящей из поверхностных белков ВГВ (L-, M- и S-HBsAg) (Taylor, 2006). Внутри нуклеокапсид находится геномная РНК ВГД длиной всего примерно 1700 нуклеотидов (Lai, 2005) (Рисунок 5).

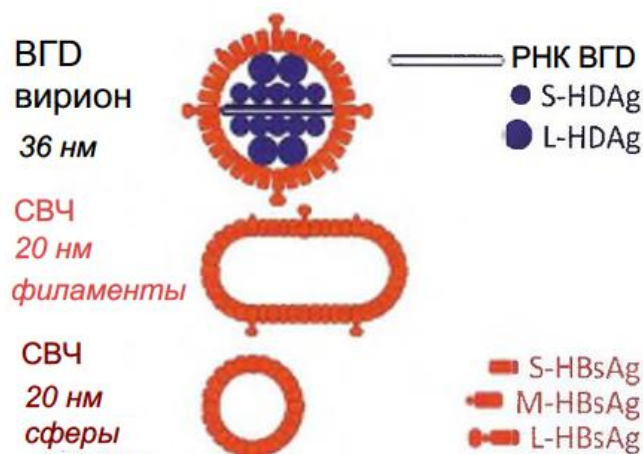


Рисунок 5. Схематическое изображение вириона ВГД и субвирусных частиц ВГВ. Вирион ВГД состоит из двух типов компонентов: вирусная оболочка, происходящая от ВГВ (показана красным цветом), включающая поверхностный белок S-, M-, L-HBsAg ВГВ и рибонуклеопротеин, ассоциированный с множественными копиями белков S- и L-HDAg, кодируемых ВГД. СВЧ – субвирусные частицы (адаптировано из Seeger et al., 2021).

В рамках данной работы важно понимание присутствия достаточно большого количества HBsAg у больных с вирусным гепатитом D в связи с особенностями строения внешней оболочки этого вируса. Heidrich и соавт. показали, что у пациентов с хроническим гепатитом D нередко отсутствует детектируемая ДНК ВГВ, что предположительно может свидетельствовать о подавлении ВГД репликации ВГВ (Heidrich et al., 2012), что, в свою очередь, проявляется в избыточном количестве HBsAg при недетектируемом уровне вирусной ДНК ВГВ. В связи с этим изучение генотипов ВГВ у больных с инфекцией ВГВ+D может быть затруднено.

Таким образом, имеется недостаточность информации о генотипе ВГВ у больных с ВГД, отчасти связанная с невозможностью исследования вируса классическими молекулярно-генетическими методами вследствие низкого уровня ДНК ВГВ; соответственно, отсутствует возможность установить зависимость (корреляцию) с исходом, прогнозом, тяжестью течения гепатита D у таких пациентов.

1.4. Генетическая классификация ВГВ

Определение первичной структуры ДНК геномов изолятов ВГВ внесло новый вклад в изучение природы этого патогена. Так, в 1988 году Х. Окамото с коллегами впервые выдвинули идею использования генетической вариабельности изолятов вируса для формирования системы классификации ВГВ, которая могла бы заменить (или дополнить) традиционную систему, базирующуюся на субтипах HBsAg. Проанализировав полные нуклеотидные последовательности геномов 18 изолятов ВГВ, ученые установили, что они формируют четыре кластера, маркированные как А, В, С и D, с расхождениями между нуклеотидными последовательностями геномов изолятов ВГВ из различных кластеров более 8% (Okamoto et al., 1988). Именно это 8%-ное различие в нуклеотидных последовательностях ДНК изолятов ВГВ впоследствии стало пороговым показателем для разделения изолятов на генетические группы, названные генотипами ВГВ (Norder et al., 2004; Kramvis et al., 2008).

Исследуя последовательности Р-гена ВГВ, Е. Орито и его коллеги в 1989 году достигли аналогичных результатов, также идентифицировав четыре генетические группы (Orito et al., 1989). В 1992 году Х. Нордер с коллегами при анализе последовательностей S-гена 122 изолятов ВГВ не только подтвердили заключения Окамото (1988), но и обнаружили две дополнительные, ранее неизвестные группы - Е и F (Norder et al., 1992a).

В 2000 г. вышла статья Stuyver L. с соавторами, в которой был описан генотип G (Stuyver et al., 2000). В 2002 г. другая группа исследователей обнаружила генотип H (Arauz-Ruiz et al., 2002). Позже были обнаружены и другие генотипы вируса: I (Tran et al., 2008) и J (Tatematsu et al., 2009).

Таким образом, в настоящее время известно 10 генотипов ВГВ, которые обозначаются прописными буквами латинского алфавита от А до J, которые, в свою очередь, подразделяются на субгенотипы ВГВ (их около 40), отличающиеся друг от друга последовательностями изолятов не менее 4% (Rajoriya et al., 2017).

1.5. Значимость определения генотипов ВГВ

Ряд современных исследований сосредоточен на выявлении взаимосвязи между генетическими вариантами ВГВ и клиническими проявлениями инфекции, включая характер течения патологии, исходы заболевания и эффективность терапевтических подходов в

зависимости от структурных особенностей вирусной ДНК. Данный литературный обзор представит краткий анализ наиболее значимых достижений в данной сфере (частично описанные в обзорах (Kao, 2011) и (Nakami et al., 2013)). Ввиду специфического характера инфекции основная масса клинических исследований по ВГВ проводилась на ограниченных популяциях пациентов, преимущественно наблюдавшихся в региональных медицинских центрах и принадлежащих к населению определенных географических зон. Это создает сложности в экстраполяции данных, полученных, к примеру, для популяций Юго-Восточной Азии с доминирующими генотипами В и С ВГВ, на европейские популяции, которые не только генетически отличаются от азиатских, но и преимущественно являются носителями генотипов А и D (Tanaka et al., 2007).

Касательно степени тяжести гепатита В установлено, что инфицирование ВГВ генотипа С характеризуется более агрессивным течением и может обуславливать более серьезные осложнения в сравнении с ВГВ генотипа В. Суммированные результаты исследований демонстрируют, что при заражении генотипом С сероконверсия HBeAg→anti-HBe наступает в более поздние сроки, спонтанное излечение (отсутствие хронизации) наблюдается реже (McMahon, 2009; Kao et al., 2010; Lin et al., 2011), а вероятность формирования ГЦК превышает таковую при инфекции вирусом генотипа В в среднем в 2,3 раза (Yang et al., 2008). При возникновении рака у больных, инфицированных ВГВ генотипа В, чаще развивается операбельная единая опухоль (в отличие от многоузелкового поражения печени) по сравнению с генотипом С (94% (Chen et al., 2004) и 86% (Lin et al., 2007) пациентов, соответственно). В регионах с одновременной циркуляцией ВГВ генотипов А, D и F (например, в Испании и на Аляске) выявлены сходные закономерности. Инфицирование генотипами D и F характеризуется более частой хронизацией и развитием серьезных осложнений в сравнении с генотипом А, включая повышенный риск возникновения ГЦК и летальных исходов от ВГВ-ассоциированных заболеваний печени (Sanchez-Tapias et al., 2002; Livingston et al., 2007).

Различия в патогенном потенциале вариантов ВГВ обусловлены неодинаковой репликативной активностью и уровнем синтеза вирусных протеинов у разных генотипов. Установлено, что генотип С характеризуется ускоренным репликативным циклом (Sugiyama M., 2006; Liu et al., 2009) и повышенной продукцией HBeAg относительно генотипа В, что обеспечивает интенсивное накопление вирионов и вирусных белков в гепатоцитах. Высокая вирусная нагрузка повышает восприимчивость инфицированных клеток печени к воздействию иммунной системы, что и определяет степень тяжести заболевания (Kao, 2011).

Разные генетические варианты ВГВ обладают различной устойчивостью к противовирусной терапии. Так, устойчивый ответ к интерферонотерапии в течение 6-12 месяцев

чаще развивается при инфекции генотипами А и В по сравнению с генотипами С и D (Kao et al., 2000; Erhardt et al., 2005; Buster et al., 2008; Marcellin et al., 2009). Что касается специфической терапии с использованием нуклеозидных аналогов, например, ламивудина, то ВГВ всех генотипов поддается такому лечению практически одинаково хорошо на ранних стадиях терапии (Wiegand et al., 2008), однако вирусы генотипов В и D чаще образуют мутации лекарственной устойчивости (Marcellin et al., 2008; Hsieh et al., 2009; Tan et al., 2012). Рекомендуемые в настоящее время препараты нуклеозидных аналогов такие как тенофовир и энтекавир (Guidelines for the prevention, diagnosis, care and treatment for people with chronic hepatitis B infection. WHO, 2024. URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376353/9789240090903-eng.pdf?sequence=1>) достаточно хорошо себя зарекомендовали и практически не приводят к мутациям лекарственной устойчивости.

Таким образом, определение генотипов ВГВ, помимо получения фундаментальных знаний, имеет значение, в первую очередь, для прогнозирования тяжести течения заболевания, хронизации и клинического исхода (Tanaka et al., 2007; Kao, 2011).

1.6. Патогенез инфекции ВГВ, серологические маркеры

По окончании инкубационного периода (продолжительностью 2-4 месяца у взрослых) наступает острая стадия болезни (острый гепатит В, ОГВ). Клинические проявления могут варьировать от легких до тяжелых форм - от 65 до 80% зараженных лиц переболевают без выраженной симптоматики, в то время как у других наблюдаются характерные признаки: желтушность кожи и склер, повышение температуры тела, диспепсические расстройства. Летальность при манифестных формах ОГВ варьирует в пределах 3-10%, что соответствует уровню смертности от других острых гепатитов, включая неинфекционного происхождения (Аммосов, 2006). В редких случаях в острой фазе возникает фульминантная форма ГВ (крайне тяжелое течение острого заболевания с летальностью 80-100%) (Fagan et al., 1990). Острая стадия может закончиться полным излечением и формированием иммунитета к повторному заражению.

О переходе инфекции в хроническую форму свидетельствует обнаружение HBsAg в организме на протяжении полугода и более (хронический гепатит В, ХГВ). Вероятность хронизации определяется несколькими факторами, ключевым из которых является возрастная категория пациента. У новорожденных, заразившихся при рождении, данный показатель достигает 90%, у детей младше 5 лет составляет 20-50% (Shapiro, 1993); в более старших возрастных группах ХГВ формируется в 5-10% случаев (Hyams, 1995). В дальнейшем при хронической форме инфекции у 20% пациентов формируется цирроз печени, а среди больных циррозом в 30% случаев впоследствии диагностируется ГЦК. Как следствие, ежегодная

смертность в мире составляет приблизительно 700 тысяч человек от цирроза и 300 тысяч от ГЦК, возникающей вслед за циррозом (Thomas, 1993).

С клинической позиции, различные этапы ОГВ и ХГВ отличаются возникновением и исчезновением в крови пациента серологических индикаторов гепатита В - продуктов S и C генов ВГВ, специфических антител к ним, вирусной ДНК, а также ряда биохимических показателей, в частности, аланинаминотрансферазы (АЛТ) и билирубина (поступают в кровь при цитолизе гепатоцитов), и их соотношением (Рисунок 6). Краткая характеристика серологических индикаторов ВГВ приведена ниже (по данным Hollinger, 2001).

HBsAg представляет собой один из самых ранних (в хронологическом порядке обнаружения в крови зараженного) маркеров ОГВ. Он определяется за 2-4 недели до возникновения первых клинических симптомов болезни, его уровень достигает максимума в острую фазу заболевания, после чего постепенно уменьшается до неопределяемых наборами реагентов значений в течение 4-6 месяцев. HBsAg служит основным и наиболее широко применяемым маркером для выявления вируса и диагностики данной инфекции. При этом исчезновение ранее регистрируемого HBsAg из крови не всегда означает полную элиминацию возбудителя из организма и выздоровление. У подобных пациентов в крови порой продолжает определяться ДНК ВГВ на протяжении продолжительного времени, что характеризует их возможную инфекционную опасность (Morales-Romero et al., 2014). Как отмечалось ранее, HBsAg представлен в трех вариантах (L-, M- и S-HBsAg), которые присутствуют в вирусной оболочке в пропорции приблизительно 1:1:4 (Рисунок 7).

Антитела к HBsAg (anti-HBs) возникают после исчезновения HBsAg, причем иногда через значительный временной интервал (до полугода). Данный период именуется периодом «корового окна», поскольку в это время в сыворотке пациента определяются anti-HBs при отсутствии HBsAg и anti-HBs. Обнаружение anti-HBs является подтверждением перенесенного гепатита В либо следствием проведенной вакцинации против ВГВ, если таковая выполнялась. Минимальная концентрация anti-HBs, являющаяся протективной, считается равной 10 мМЕ/мл. Антитела к HBsAg могут определяться пожизненно. В отдельных случаях в течение нескольких лет после перенесенного ОГВ может наблюдаться постепенное уменьшение уровня anti-HBs до значений, недоступных для выявления наиболее чувствительными наборами реагентов.

Антитела к HBcAg (anti-HBc). Anti-HBc класса М (IgM) возникают с момента проявления симптоматики, исчезают приблизительно через 5-6 месяцев, одновременно с появлением anti-HBc IgG. Anti-HBc IgM позволяют дифференцировать ОГВ от ХГВ.

HBeAg. Этот антиген не выявляется в структуре полноценных вирусных частиц, но определяется в крови на начальных этапах ОГВ. Выявление данного маркера обычно свидетельствует о высокой репликативной активности ВГВ.

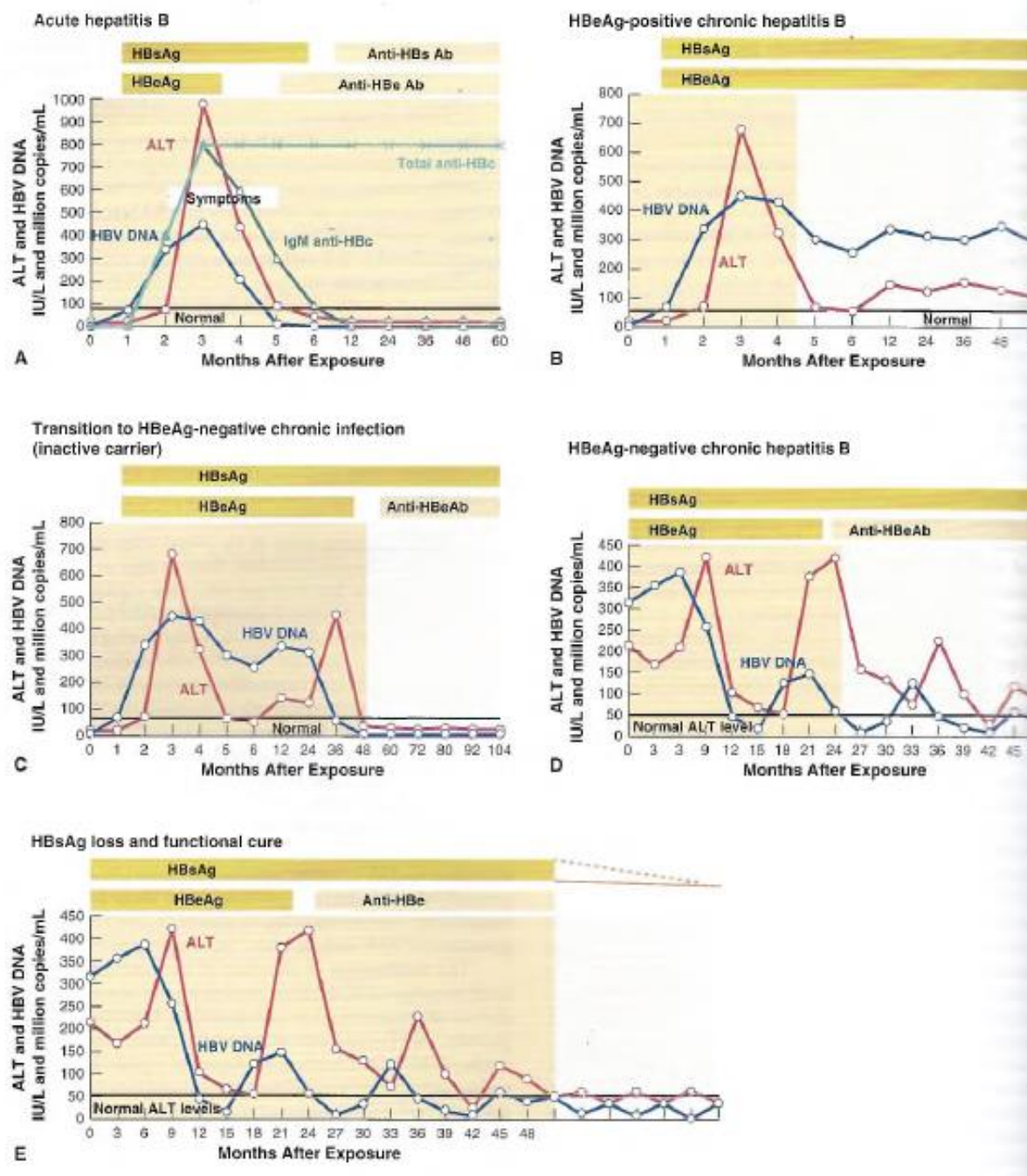


Рисунок 6. Серологические профили инфекции ВГВ (цит. по Seeger Ch. et al., 2021).

А. Острый гепатит В

В. HBeAg-положительный хронический гепатит В

С. Переход в HBeAg-отрицательную хроническую инфекцию (неактивное носительство)

Д. HBeAg-отрицательный хронический гепатит В

Е. Потеря HBsAg и функциональное излечение

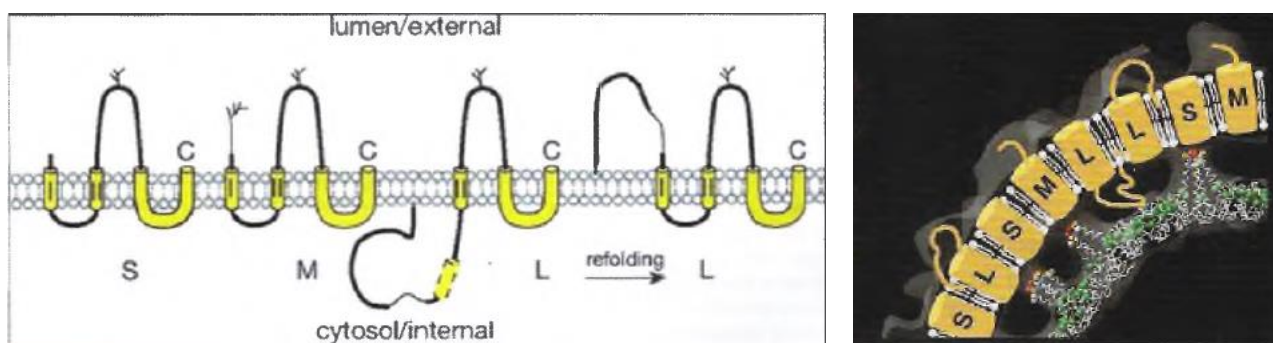


Рисунок 7. Предположительная мембранная топология поверхностных белков ВГВ (цит. по Seeger et al., 2021). Ориентация трансмембранных доменов идентична у S-, M- и рефолдированного L- белков. Слева показан внешний гидрофильный домен S между аминокислотами 99 и 168: детерминанта «а» и сайт гликозилирования (разветвленная структура) у аспарагина 146. Все белки имеют общий гидрофобный С-концевой домен, встроенный в мембраны. М- белок несет второй сайт гликозилирования на своем N-концевом участке (показано тонкой линией). В отличие от рефолдированного продукта L (e-preS), в первичном продукте L (i-PreS) трансмембранный домен локализован в цитозоле, где N-конец прикрепляется к мембране путем модификации с помощью миристиновой кислоты.

Анти-НВе. Формирование anti-НВе совместно с элиминацией HBsAg и HBeAg свидетельствует о снижении вирусной репликации и начале выздоровления. Приблизительно у трети пациентов anti-НВе обнаруживаются не более 6 месяцев.

О хронизации гепатита В говорят при отсутствии сероконверсии HBsAg – anti-HBs через полгода после обнаружения HBsAg, то есть не формируются защитные антитела против HBsAg. HBsAg, anti-HBc остаются в крови на прежних уровнях в течение многих лет с постепенным снижением титров. При ХГВ сероконверсия HBeAg – anti-HBe происходит значительно позднее, чем при ОГВ (через год и более от момента заражения). ХГВ с постоянным разрушением гепатоцитов при длительном течении может привести к циррозу и ГЦК. Хронический процесс протекает в виде продолжительных ремиссий, которые сменяются периодическими длительными обострениями воспаления печени с проявлениями астеновегетативного синдрома и гепатоцеллюлярной недостаточности.

Важным показателем при ХГВ является оценка степени инфекционности крови, для этого проводят тестирование на такие маркеры как HBeAg, anti-HBe и ДНК ВГВ. HBeAg-положительные пациенты характеризуются высоким содержанием инфекционных вирусных частиц в крови в отличие от anti-HBe-положительных пациентов, в крови которых количество вирусных частиц существенно меньше. В 1 мл HBeAg-положительной крови присутствует до 10^8 вирионов ВГВ. У anti-HBe-положительных носителей в 1 мл крови содержится менее 100 инфекционных вирионов. HBeAg-положительные пациенты представляют наиболее вероятный источник передачи ВГВ половым, гемоперкутанным и перинатальным путями. Инфекционность крови HBsAg-положительных лиц, у которых произошла сероконверсия HBeAg- anti-HBe, существенно меньше.

Обнаружение HBeAg у HBsAg-позитивных беременных означает, что их будущие дети находятся под большим риском заражения ВГВ (до 80%), тогда как у беременных с anti-HBe частота инфицирования ВГВ будущего потомства не превышает 10% (Аммосов, 2006; Hollinger et al., 2001).

1.7. Серологическая классификация (субтипы HBsAg)

Первоначально для вируса гепатита В была создана система классификации, базирующаяся на серологических характеристиках HBsAg (серологическая классификация). Различные изоляты вируса демонстрируют вариабельность в строении HBsAg и других вирусных антигенов, что обусловлено специфическими аминокислотными заменами. В 1971 году Ле Бувье впервые охарактеризовал две антигенные субдетерминанты HBsAg, обозначенные как «d» и «у», которые являются взаимоисключающими (Le Bouvier, 1971). Впоследствии У. Банкрофт и его коллеги идентифицировали еще две взаимоисключающие субдетерминанты – «w» и «r» (Bancroft et al., 1972). Данные исследователи определили, что существующие на тот период четыре серотипа ВГВ, получившие название субтипов HBsAg, формируются за счет сочетания детерминантных пар d/y и w/r с общей для всех серотипов детерминантой «а». Таким образом были выделены субтипы adw, ayw, adr, ayr. Различия между парами d/y и w/r обусловлены аминокислотными заменами в позициях АО 122 и 160 (Рисунок 8, Таблица 1) (Okamoto et al., 1987a; Okamoto et al., 1987b; Norder et al., 1990).

На сегодняшний день, благодаря изучению нескольких минорных субдетерминант, которые определяются различиями в АО, расположенных в позициях 127, 134, 140, 143, 144, 145, 158, 159, 161, 168, 177 и 178 в составе HBsAg (Okamoto et al., 1989; Norder et al., 1992a; Norder et al., 1992b), установлено девять основных субтипов HBsAg – ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq- и ряд их вариантов.

Таблица 1. Некоторые аминокислотные остатки, определяющие специфические детерминанты HBsAg (согласно Norder et al., 1992a)

Позиция АО и кодона в S-гене	Кодоны	АО	Детерминанта
122	AAA, AAG	Lys	d
	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Arg	y
127	CCT, CCC, CCA, CCG	Pro	w1/w2
	ACT, ACC, ACA, ACG	Thr	w3
	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG, ATT, ATC, ATA	Leu/Ile	w4
134	TAT, TAC	Tyr	w2/w3
	TTT, TTC	Phe	w1/w4, r
140	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	Ser	w4
	ACT, ACC, ACA, ACG	Thr	w1/w2/w3, r
143	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	Ser	w2
	ACT, ACC, ACA, ACG	Thr	w1/w3/w4, r
158	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG	Leu	w4q-
	TTT, TTC	Phe	все остальные
159	GCT, GCC, GCA, GCG	Ala	w1/w2, rq ⁺
	GGT, GGC, GGA, GGG	Gly	w3/w4
	GTT, GTC, GTA, GTG	Val	r/rq-
160	AAA, AAG	Lys	w
	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Arg	r
161	TAT, TAC	Tyr	w1/w2, w4q-
	TTT, TTC	Phe	w2/w3/w4, r

1.8. Значимость определения субтипов HBsAg

Исследования разнообразия вируса гепатита В, как и другие области биологических наук, направлены на решение двух типов задач. Первая группа включает фундаментальные научные вопросы: изучение происхождения вируса, процессов его эволюционного развития и особенностей распространения среди людей. Вторая группа задач имеет прикладное значение для медицинской практики. К наиболее важным прикладным направлениям относятся: улучшение методов диагностики и средств иммунной профилактики, использование данных о генетических характеристиках вируса в клинической работе для оптимизации терапевтических подходов, определения прогноза течения и исходов болезни, а также для эпидемиологических расследований путей передачи ВГВ.

Наиболее массовым средством скрининга для выявления инфекции и диагностики ВГВ в мире является ИФА. Производители коммерческих наборов используют для этих целей как поликлональные антитела к HBsAg, так и моноклональные – в комбинации, обеспечивающей высокую специфичность и чувствительность к разным субтипам HBsAg одновременно. Выбор комбинации антител напрямую связан с наличием национальных стандартов, которые, в свою очередь, являются ориентиром для изготовителей наборов реагентов. В РФ таким ориентиром является изготавливаемая в АО «Вектор-Бест» HBsAg-стандартная панель сывороток (ПУ № ФСР 2012/13718), состоящая из 24 образцов, содержащих разные субтипы и мутантные формы HBsAg, в трех концентрациях: 0,1, 0,05 и менее 0,05 МЕ/мл (субтипы HBsAg ayw2, ayw3varA, ayw3varB, adw2, adr^q+, а также HBsAg с мутациями в S-гене, оказывающими влияние на связывание HBsAg с нейтрализующими антителами). Для включения HBsAg-положительного образца в состав HBsAg-стандартной панели сывороток необходимо прежде установить субтип HBsAg или ключевую аминокислотную замену в белке. Методологические возможности определения субтиповой принадлежности поверхностного белка вируса и выявления мутаций в геноме ВГВ будут рассмотрены в другой главе.

Описаны варианты HBsAg, способные избегать детекции при иммуноферментном анализе, проводимом с использованием наборов разных изготовителей. Такие варианты характеризуются модификациями в детерминанте «а» HBsAg, которая локализуется между 124 и 147 АО HBsAg и образует гидрофильную «петлю» этого белка, направленную наружу вириона и обладающую выраженными иммуногенными свойствами (по обзорам Hollinger et al., 2001; Кузин и др., 2013) (Рисунки 7, 8). Однако накопленная информация о нуклеотидных заменах в S-гене у ускользающих от детекции вариантов ВГВ и не затрагивающих «а»-детерминанту свидетельствует о целесообразности рассмотрения более обширного участка HBsAg (АО 100-160) - так называемый «главный гидрофильный регион» (MHR, от англ. «main hydrophilic region»)

(цит. по Кузин и др., 2013). В настоящее время ускользающие варианты ВГВ условно можно разделить на: способные ускользать от иммунитета, индуцированного вакцинацией («вакцинное ускользание»), не определяемые иммуноферментными наборами реагентов («диагностическое ускользание») и не отвечающие на лечение традиционными препаратами («терапевтическое ускользание») (там же). Вероятно, «дикие» (неиндуцированные терапией) мутанты ВГВ с различными дефектами HBsAg, затрудняющими их иммунодиагностику, постоянно возникают в вирусной популяции ВГВ. В работе (Баженов и др., 2007) исследовали 2510 образцов, полученных от больных ХГВ и содержащих заведомо определяемый (высокий) уровень HBsAg, при помощи диагностических наборов реагентов разных изготовителей. При этом были обнаружены дискордантные результаты для 19 (0,76%) образцов при исследовании их в разных наборах (то есть при исследовании одним набором в них было показано наличие HBsAg, другим – отсутствие). После секвенирования последовательностей S-гена соответствующих изолятов ВГВ было обнаружено, что они представлены тремя типами мутантов с заменами АО (по сравнению с «диким» типом): G145R (Gly¹⁴⁵ → Arg¹⁴⁵), S143L (Ser¹⁴³ → Leu¹⁴³), T143M (Thr¹⁴³ → Met¹⁴³). В дальнейшем было показано (Баженов и др., 2008), что из семи доступных на момент исследования на российском рынке диагностических ИФА-наборов различных изготовителей только два были способны обнаруживать таких мутантов. При этом мутантов с заменой G145R, встречаемость которого в европейской части России составляет 0,12% (по данным Баженова и др., 2007), не смог обнаружить ни один набор, использующий для этого моноклональные антитела. Результаты аналогичной работы, выполненной в Испании, свидетельствуют о том, что доля изолятов с атипичными формами HBsAg, не обнаруживаемыми стандартными ИФА-наборами, достигает 4,5% (Echevarria et al., 2005).

Помимо описанного выше эффекта, замена незаряженного остатка глицина в положении 145, характерного для большинства известных изолятов ВГВ, на остаток заряженного аргинина или глутаминовой кислоты может приводить к явлению «иммунологического бегства» ВГВ (в англоязычной литературе «immune escape», «вакцинное ускользание») (Carman et al., 1990; Fujii et al., 1992). Данный феномен выражается в отсутствии заметного уменьшения концентрации HBsAg в крови инфицированного вместе с присутствием антител к HBsAg несмотря на то, что последние могут вырабатываться иммунной системой хозяина в значительных количествах. Выражались опасения, что изоляты, подобные описанным (включая G145R), возможно, способны распространяться в иммунизированных группах населения (Cooreman et al., 2001). В настоящее время, помимо упомянутого выше, описаны также другие варианты мутаций «вакцинного бегства», например, T116N, P120S/E, I/T126A/N/I/S, Q129H/R, M133L, K141E, P142S, D144A/E, G145A (Lazarevic, 2014). Тем не менее, можно сделать осторожное предположение, что прогнозы, связанные с распространением и закреплением в популяции

мутаций вакцинного бегства, хоть и не лишены опасений, но на данный момент не подтверждаются. Так, в работе (Кюрегян, 2012) ложно отрицательные результаты образцов, содержащих HBsAg, при использовании наборов разных изготовителей, чаще были связаны не с наличием мутаций «вакцинного бегства» в «а»-детерминанте гена, кодирующего S-область белка, а с низким уровнем вирусной репликации и продукции HBsAg, что не позволило некоторым наборам выявить эти образцы как положительные. В другой работе (Asadi Mobarkhan et al., 2023) было показано, что причиной продолжающейся циркуляции вируса, несмотря на 20-летнюю массовую вакцинацию, могут быть пробелы в вакцинации, а не эволюция вируса.

Актуальным является также вопрос об эффективности применения вакцин, содержащих один субтип HBsAg, на территориях, эндемичных по другим серовариантам ВГВ. Опубликованные в настоящее время научные данные свидетельствуют о том, что вакцинные препараты против гепатита В, содержащие HBsAg серотипа ad-, обеспечивают хорошую, но не оптимальную защиту в отношении гетерологичных серотипов вируса. Сделан вывод о приоритетности использования вакцин, содержащих актуальный для данной территории серотип HBsAg (Чуланов и др., 2017).

Существенным доводом в пользу изучения серологического разнообразия HBsAg является способность наборов реагентов выявлять все представленные на территории субтипы и мутантные варианты HBsAg для того, чтобы обеспечить качественную диагностику этой инфекции и скрининг (доноров, беременных и т.д.), в соответствии со стратегией ВОЗ на пути к элиминации вирусных гепатитов.

1.9. Разнообразие ВГВ в мире и России

Распространенность генетических вариантов ВГВ нередко используется как эпидемиологический маркер определенного географического региона. Наблюдаемая в настоящее время частота встречаемости данных вариантов в различных областях мира, по всей видимости, обусловлена миграционными процессами населения и/или иными историческими факторами (Simmonds, 2001; Norder et al., 2004). Географическое распределение генетических и серологических вариантов ВГВ, безусловно, претерпевает крайне медленные изменения. Исследования по определению частоты встречаемости вариантов ВГВ в различных регионах мира стартовали непосредственно после идентификации субтипов (1971 г.) и генотипов ВГВ (1988 г.) и ведутся по настоящее время. При этом крайне редко встречаются территории, где выявляется исключительно один вариант вируса: как правило, в определенной географической области можно идентифицировать один-два доминирующих генотипа и ряд минорных, включая завозные (Norder et al., 2004). При соотнесении субтипов HBsAg и генотипов вируса оказалось,

что одному генотипу ВГВ может соответствовать несколько субтипов (Magnius et al., 1995; Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002; Norder et al., 2004).

Генотип А (субтипы adw2, ayw2) имеет наибольшее распространение в государствах Западной Европы, Северной Америки (Norder et al., 1993) и Африканского континента (Bowyer et al., 1997). В частности, при исследовании 320 HBsAg-положительных доноров из Соединенных Штатов генотип А был выявлен в 44,7% образцов, В – 9,7%, С – 18,4%, D или Е – 25,9% (используемая исследователями методика не давала возможность четко дифференцировать данные генотипы), F – 1,2% (Moriya et al., 2002). При анализе 258 изолятов ВГВ, полученных от испанских пациентов с ХГВ, генотип А был установлен в 52% случаев, также были идентифицированы генотипы D (35%) и F (7%) (Sanchez-Tapias et al., 2002).

Генотипы В (субтипы ayw1, adw2) и С (субтипы adr, ayr, adw2, ayw3) типичны для жителей Восточной и Юго-Восточной Азии (Okamoto et al., 1988; Kidd-Ljunggren et al., 2002), при этом пропорция данных генотипов варьирует в разных странах региона. В Китайской Народной Республике, где генотип С в общем доминирует над прочими генотипами, частота выявления изолятов генотипа В возрастает в направлении с запада на восток. Например, в Тибете (Западный Китай), представляющем высокоэндемичную территорию по носительству HBsAg (19,1%), у всех изученных изолятов был установлен генотип С (Zhao et al., 2001). При обследовании населения Гуанси-Чжуанского Автономного Района, расположенного на юго-востоке Китая, было выявлено следующее распределение генотипов: С – 72,7% изолятов, В – 21,7%, А – 3,7%, D – 1,2% (Ge et al., 2003). В Харбине (Северо-Восточный Китай) генотип С был установлен для 53,8% изолятов, В – 44,7% (Ding et al., 2003). На острове Тайвань преобладающим оказался генотип В (68–83,7% изолятов); генотип С определялся в 14,8–32%, F – 0,4%, генотипы В и С одновременно – 1,1% изолятов (Kao et al., 2002a; Kao et al., 2002b). Частота встречаемости субтипов HBsAg в Китае также неравномерна: в северных регионах страны преобладает субтип adr (78%), в южных – adw (76%) (Sung et al., 1977).

В Японии среди населения острова Окинава и города Фукуока отмечалось доминирование разных генотипов. На Окинаве 86,9% изолятов принадлежали к генотипу В, 13,1% – С; в Фукуоке 5,2% изолятов относились к генотипу В и 94,2% – С (Furusyo et al., 2002).

При обследовании пациентов с ОГВ и ХГВ в Токио была обнаружена различная частота встречаемости генотипов для данных категорий больных. Так, генотип А был установлен для 22,8% изолятов, полученных от пациентов с ОГВ и для 1,9% изолятов, полученных от больных ХГВ, генотип В – для 14,0% и 9,4% изолятов соответственно, С – 43,9% и 87,7%, D – 1,8% и 0,2%, F – 1,8% и 0,2% (Kobayashi et al., 2002). Именно с широким распространением ВГВ генотипа С некоторые исследователи связывают высокую степень хронизации ГВ среди населения Восточной и Юго-Восточной Азии (Kao et al., 2002b).

В Таиланде доминирует генотип С, частота его обнаружения составляет 54,4%, в то время как генотипа В – 23,5%, А – 22,1%, при этом для 45,6% всех изолятов был установлен субтип *adw2*, а 54,4% – *adr* (Theamboonlers et al., 1998). Изоляты генотипа С также с высокой частотой выявляются среди коренных жителей южных тихоокеанских островов (Norder et al., 2004), являющихся высокоэндемичной зоной по распространенности ВГВ (Gust, 1984). При этом изоляты ВГВ, циркулирующие среди населения данных островов, значительно чаще имеют субтип *adrq*, чем изоляты генотипа С, выявляемые в государствах Юго-Восточной Азии (Norder et al., 1993).

Генотип D ВГВ с субтипами *ayw2* и *ayw3* характеризуется самым обширным глобальным распространением среди всех генотипов ВГВ. Этот генотип доминирует на территории южно- и восточноевропейских государств, в средиземноморском регионе и северной части Африки (Madalinski et al., 1977; Norder et al., 1993; Borchani-Chabchoub et al., 2000; Sanchez-Tapias et al., 2002), на территории Индии (Kidd-Ljunggren et al., 2002; Gandhe et al., 2003), в ближневосточных регионах, Пакистане, Монголии (Norder et al., 2004; Kurbanov et al., 2010), а также на территории России и постсоветских государств (см. ниже). В Тунисе все проанализированные вирусные изоляты принадлежали к генотипу D с субтипом *ayw2* (Borchani-Chabchoub et al., 2000). При анализе образцов от пациентов с острой и хронической формами гепатита В в Индии генотип D с субтипами *ayw2* или *ayw3* был выявлен в 92% образцов, генотип А с субтипом *adw2* составил 8%, причем все изоляты генотипа А были получены исключительно от пациентов с хронической формой заболевания (Gandhe et al., 2003). Идентичное распределение генотипов было зафиксировано при обследовании коренного населения Андаманских и Никобарских островов (Arankalle et al., 2003). В Швеции, отличающейся крайне низким уровнем эндемичности ВГВ-инфекции, генотип D был идентифицирован в половине изолятов ВГВ от пациентов с ОГВ (Lindh et al., 2000).

Генотип E с субтипом *ayw4* встречается практически исключительно в западноафриканских странах и частично в Южной Африке (Norder et al., 1994). В Нигерии, представляющей высокоэндемичную территорию по ВГВ-инфекции, все изученные вирусные изоляты принадлежали к генотипу E с субтипом *ayw4* (Odemuyiwa et al., 2001). При анализе изолятов ВГВ от населения Кот-д'Ивуара генотип E составил 87,4% случаев, генотип А – 6,3%, генотип D – 6,3% (Suzuki et al., 2003).

Генотип F с субтипами *ayw4* и *adw4* выявляется и доминирует исключительно на территории южно- и центральноамериканских стран (Norder et al., 1993; Arauz-Ruiz et al., 1997; Mbayed et al., 1998). Среди венесуэльского населения африканского происхождения изоляты генотипа F встречаются в 50% случаев наравне с генотипом А, однако в общей популяции Венесуэлы частота обнаружения изолятов ВГВ генотипа F значительно превышает этот

показатель (Quintero et al., 2002). При исследовании мексиканских изолятов ВГВ генотип F с субтипом adw4 составил 66,6% случаев, генотип A с субтипом adw2 - 20%, генотип D с субтипом ауw3 - 6,6%, генотип G с субтипом adw2 - 6,6% (Sanchez et al., 2002).

Генотип G был впервые идентифицирован одновременно на территории Франции и США (Stuyver et al., 2000). Несколько изолятов генотипа H были обнаружены в Никарагуа, Калифорнии и Мексике (Arauz-Ruiz et al., 2002), а также в Японии и Таиланде (Kumagai et al., 2007; Yamada et al., 2014).

Исследования генетического разнообразия ВГВ систематически проводятся в России и соседних государствах. В одном из ранних исследований, охватившем несколько стран Восточной Европы, было установлено доминирование субтипов группы ауw на территории СССР, а также в Румынии, Югославии и Болгарии (частота встречаемости составила 87,5%, 82,8%, 79% и 71,5% соответственно). При этом в Польше и Венгрии преобладал субтип adw (80,7% и 72,2% соответственно) (Madalinski et al., 1977). Исследования советских ученых того же периода выявили следующее распределение: в европейской части страны субтип ау HBsAg обнаруживался в 78% образцов, субтип ad – в 22%; на Урале соотношение составило 88% (ау) и 12% (ad); в Западной и Восточной Сибири – 96% (ау) и 4% (ad); в Средней Азии 100% образцов содержали субтип ау; на Дальнем Востоке субтип ау выявлялся в 89% случаев, ad – в 11% (Гранникова и др., 1977). При анализе образцов доноров из Москвы, Горького (Нижний Новгород), Владимира и Кирова субтип ау HBsAg был определен в 96,6% случаев, ad – в 3,4% (Михайлов и др., 1984). Преобладание субтипов HBsAg ауw2 и ауw3 с незначительным присутствием субтипа adw2 в различных регионах России (данные субтипы типичны для генотипов D и A ВГВ) многократно подтверждалось в последующих исследованиях (Нетесова и др., 2004; Баженов и др., 2007; Tallo et al., 2008; Чуланов, 2013; Мануйлов и др., 2015).

В целом по Российской Федерации доминирующим является генотип D: его доля составляет 85% среди изолятов ВГВ из Москвы (Abe et al., 2004), 100% изолятов из Самары (Flodgren et al., 2000), 98% изолятов из Новосибирской области и Барнаула (Баяндин и др., 2004; Кочнева и др., 2005; Баяндин и др., 2007). Доминирование генотипа D характерно также для Белоруссии (до 89% изолятов ВГВ) (Olinger et al., 2008), Эстонии (81% изолятов ВГВ) (Tallo et al., 2004), Узбекистана (от 69% до 87% изолятов ВГВ) (Kato et al., 2002; Avazova et al., 2008), Таджикистана (94% изолятов ВГВ) (Khan et al., 2008).

На территории бывшего Советского Союза распространены и другие генотипы ВГВ. Частота встречаемости генотипа A (субтип adw2) достигает 10% в западных областях, например, Москве (Abe et al., 2004), Белоруссии (Olinger et al., 2008), составляет 18,5% в Эстонии (Tallo et al., 2004), а в Кабардино-Балкарии и Республике Саха (Якутия) достигает 39,4% и 49,5% соответственно (Чуланов, 2013). Генотип C (субтип adrq+) выявляется в восточных регионах

страны, в частности, на Чукотке (24%) (там же), в Республике Саха (Якутия) (12-50%) (там же; Лобзин и др., 2004; Кузин и др., 2008), на Таймыре (Мануйлов и др., 2015).

В целом, несмотря на изменения в пропорциях отдельных вариантов, спектр типов ВГВ, циркулирующих в одних и тех же регионах, остается практически неизменным на протяжении 10 и даже 20 лет наблюдений на фоне сокращения вирусной популяции, что было показано в работе Мануйлова с соавторами (Мануйлов и др., 2025) для пяти регионов России.

Подводя итоги, можно обозначить присутствие определенных вариантов вируса гепатита В на территории РФ: это субтипы HBsAg ayw2, ayw3, adw2, adr_q+ и генотипы ВГВ А, С, D.

Как уже было отмечено ранее, между генотипами ВГВ и субтипами HBsAg существуют определенные связи. На территории России встречаются следующие сочетания субтипов HBsAg/генотипов ВГВ: ayw2/D, ayw3/D, adw2/A, adr_q+ /C (Чуланов, 2013). Для качественной диагностики и скрининга инфекции ВГВ для целей безопасности донорской крови используемые наборы реагентов должны выявлять все циркулирующие варианты HBsAg, генотипы ВГВ и его мутантные формы.

1.10. Выявление HBsAg и методы изучения его характеристик

1.10.1. Эволюция методов изучения инфекции ВГВ (историческая справка)

Наличие инфекции ВГВ подтверждается присутствием в крови или печени больного HBsAg или вирусной ДНК. Методы обнаружения HBsAg основаны на взаимодействии антиген-антитело, то есть являются иммунологическими.

Впервые детекция HBsAg была проведена при помощи реакции преципитации в геле (РПГ) (Blumberg et al., 1965), обладающей чувствительностью в 2000 нг/мл. Несмотря на низкую чувствительность, метод РПГ сыграл существенную роль в изучении ГВ.

Важным этапом совершенствования лабораторной диагностики ГВ стало внедрение в клиническую практику и службу переливания крови метода встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) и реакции обратной пассивной гемагглютинации (РОПГА). Обладая соответственно чувствительностью выявления HBsAg в 400 и 20 нг/мл, эти методы дали возможность обнаружить и отстранить от сдачи крови основное количество бессимптомных носителей HBsAg (Михайлов, 2002).

Следующим, принципиально новым, направлением в лабораторной диагностике гепатита В стало применение твердофазного иммуноанализа, основанного на определении комплекса HBsAg-анти-HBs за счет метки антительного компонента реакции. В начале 1970-х годов для выявления HBsAg использовали РИФ (радиоиммунный метод фиксации), который был связан с использованием радиоактивных изотопов и требовал соблюдения правил радиационной безопасности.

Позже был разработан ИФА, более чувствительный и быстрый в сравнении с РИФ; наличие меченных ферментом антител, связавшихся в комплекс «антиген-антитело» определялось при помощи соответствующего субстрата. Данный метод широко используется в лабораторной медицине для диагностики гепатита В и по сей день, позволяя выявлять HBsAg с пределом детекции порядка 0,01-0,05 нг/мл.

Одним из направлений лабораторной диагностики являлась разработка тестов, позволяющих получить информацию о наличии или отсутствии маркера, в том числе HBsAg, в течение нескольких минут (так называемые «быстрые» («экспресс») методы детекции HBsAg). Метод иммунохроматографии (ИХА) основан на взаимодействии тестируемого антигена с анти-HBs, прочно сорбированных на нитроцеллюлозной мембране. Образовавшийся комплекс обнаруживали при помощи антисыворотки против HBsAg, меченной коллоидным золотом. Этот метод быстрый, простой в использовании, но по чувствительности уступает ИФА.

Помимо установления самого факта наличия HBsAg, возможно количественное определение данного серологического маркера. Такой подход реализуется в том же ИФА-формате, только с включением калибраторов в состав набора, относительно которых в дальнейшем проводят расчет концентрации HBsAg в исследуемой пробе. Количественный показатель уровня HBsAg (в МЕ/мл или нг/мл) в сыворотке или плазме крови человека имеет значение, например, для оценки прогноза эффективности терапии против гепатита В пегилированными интерферонами (Mousari et al., 2009).

Широкое распространение в последнее время завоевал метод иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА), основанный на ИФА, при котором меткой, то есть «индикатором» аналитической реакции, является люминесцентная молекула. Среди причин, по которым метод ИХЛА набрал популярность в клинической лабораторной практике XXI века, можно считать простоту и удобство использования, автоматизацию исследований, продолжительность проведения анализа (десятки минут), высокие показатели диагностической и аналитической чувствительности и специфичности, возможность индивидуального тестирования в режиме произвольного доступа (random-access).

Для получения комплексной картины при диагностике гепатита В определяют весь спектр серологических маркеров (HBsAg, anti-HBs, anti-HBcore, HBeAg, anti-HBe) в сыворотке или плазме крови пациента методом ИФА или ИХЛА; кроме того, определение ДНК ВГВ методом ПЦР безусловно имеет существенное значение, но в рамках заданной темы наибольшее внимание посвящено выявлению HBsAg и изучению именно его характеристик.

Сообщалось также о специфических МАТ (HBsAgGi) (Novel antibody specific for HBV DNA virus HB surface antigen glycan isomer (HBsAgGi). URL: https://medglycosci.com/pdf/2022/Leaflet%20for%20HBsAgGi%20Ab_ELISA-v1.pdf) к О-

гликозилированному участку preS2 М-формы HBsAg, которая преимущественно экспрессируется именно ДНК-содержащей вирусной частицей, и не синтезируется на субвирусных и пустых частицах. Таким образом, выявление HBsAg с помощью этих специфических МАТ HBsAgGi позволяет косвенно оценивать количество инфекционных частиц ВГВ в формате ИФА. Стоит отметить, такие предложения носят пока единичный характер и актуальны для генотипа С ВГВ (Wagatsuma et al., 2018).

Наборы реагентов, направленные на выявление HBsAg, используют для скрининговых исследований, в том числе для проверки безопасности переливания сыворотки и плазмы крови доноров реципиентам, а также в диагностических целях. За последние примерно полвека методы для выявления HBsAg претерпели существенные изменения по своей способности обнаруживать минимальные количества антигена: от 2000 нг/мл в РПГ до 0,01 нг/мл в ИФА и ИХЛА, то есть на несколько порядков.

Однако помимо таких требований как необходимость выявления минимальных количеств HBsAg («предел обнаружения»), набор реагентов должен демонстрировать высокую диагностическую чувствительность, то есть способность выявлять антиген у пациентов с разными формами данного заболевания, в том числе выявлять все субтипы и мутантные формы этого белка, а также все известные генотипы ВГВ.

1.10.2. Панели образцов сывороток крови человека, содержащие разные субтипы, мутантные варианты HBsAg, разные генотипы ВГВ

Потенциал наборов реагентов для выявления всех присутствующих вариантов HBsAg ВГВ возможно определить с помощью специальных исследований, которые проводятся, как правило, независимыми организациями, с помощью специальных стандартов, контрольных материалов, контрольных и стандартных панелей, а также на репрезентативных выборках образцов сывороток и плазм крови человека.

В связи с этим следует упомянуть панель образцов плазм человека разных генотипов ВГВ института Пауля-Эрлиха (Paul-Ehrlich-Institut, Ланген, Германия), предназначенную для наборов, выявляющих HBsAg (1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Hepatitis B Surface Antigen Assays PEI code 6100/09, Version 3, 13th Nov 2017). В ее состав входят образцы, представляющие субгенотипы A1, A2, B2, C2, D1, D2, D3, E, F2 и H. Данная панель образцов предназначена для контроля и/или валидации анализов, проводимых на выявление HBsAg. Каждый из ВГВ-положительных образцов плазмы содержит приблизительно 100 МЕ/мл HBsAg, оцененного на основе хемилюминесцентного иммуноанализа Abbott ARCHITECT Quantitative против второго Международного стандарта HBsAg (WHO Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A, code number: 00/588).

В АО «Вектор-Бест» в течение чуть более двух десятилетий существует HBsAg-стандартная панель сывороток (D-0540), состоящая из 24 образцов сыворотки крови человека и содержащая 8 вариантов HBsAg, каждый из которых представлен в трех концентрациях (в частности, в состав HBsAg-стандартной панели сывороток шестой серии вошли образцы с субтипами ауw2, ауw3 (variant A, variant B), адw2, адrq+ и несколько мутантных вариантов HBsAg, в том числе с мутацией «вакцинного бегства» G145R).

Высокие требования, предъявляемые к наборам реагентов для выявления HBsAg, оправданно объяснимы. С одной стороны, для любого исследователя (а также, безусловно, врача-клинициста, исследователя, врача-лаборанта и пациента) важно не пропустить маркер при наличии инфекции в исследуемом образце (важны так называемые предел обнаружения и диагностическая чувствительность); с другой стороны, не менее важной характеристикой является специфичность (диагностическая и аналитическая) как способность набора выдать отрицательный результат при отсутствии заболевания. Наборы реагентов для выявления HBsAg относят к медицинским изделиям для диагностики *in vitro* 3 класса риска – с высокой степенью индивидуального риска и/или высокой степенью риска для общественного здоровья.

В конечном счете, как для пациента, так и для исследователя, важна истина, а также уверенность в надежности полученных результатов.

1.10.3. Современные наборы реагентов для выявления HBsAg

В современных наборах реагентов для выявления HBsAg изготовители используют несколько основных методов (все на основе взаимодействия антиген-антитело). Их можно объединить в группы: «быстрые тесты», или иммунохроматографические (ИХА), иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА), электролюминесцентный анализ (ЭЛА), являющийся модификацией ИХЛА. Каждый из этих форматов имеет свои сильные и слабые стороны. ВОЗ допускает использование «быстрых тестов» в тех случаях, когда другие форматы исследований не доступны, обеспечивая, таким образом, возможность и увеличение охвата тестирования на HBsAg (Guidelines on hepatitis B and C testing. WHO, 2017. URL: <https://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/9789241549981-eng.pdf>). Ниже приведен краткий перечень тестов.

«Быстрые тесты» (или экспресс-тесты) примечательны тем, что присутствие HBsAg в концентрации 5 нг/мл и выше может быть обнаружено с их помощью в течение 10 минут и не требуют специального оборудования. Среди «быстрых тестов» встречаются также тесты для «совместного» определения, например, HBsAg/HCV Ab (CTK Biotech San Diego County, California United States) (URL: <https://ctkbiotech.com/product/hbsag-hcv-ab-rapid-test/>).

Наборы в формате ИФА массово применяются в мире, проводятся как в ручном формате, так и в автоматических ИФА-анализаторах открытого или закрытого типа, существуют как отечественного, так и импортного производства, являются наиболее распространенным форматом проведения анализов для выявления HBsAg на территории РФ. Привлекает доступность этих тестов: высокая чувствительность и специфичность, относительно непродолжительное время определения (обычно 1-2 часа), широкий спектр определяемых маркеров.

Наборы в формате ИХЛА (а также ЭЛА) также имеют достаточно широкое применение на территории РФ, эти анализы проводят исключительно в анализаторах закрытого типа; последнее время появились новые изготовители ИХЛА-наборов и новые автоматические платформы. Тесты хемилюминесцентного формата имеют определенные преимущества, среди которых наиболее важными являются: достаточно короткое время проведения анализа (десятки минут), полная автоматизация, широкий аналитический диапазон значений, формат «random-access» (случайный доступ); все это при сохранении высоких (таких же, как в ИФА) параметров чувствительности и специфичности.

Стоит отметить, что современные наборы, как правило, направлены на выявление HBsAg ВГВ в минимальных количествах. При этом порой незаслуженно остается в стороне другая ключевая составляющая – определение HBsAg разных субтипов и генотипов ВГВ, а также мутантных вариантов. Группой исследователей Международного консорциума по безопасности крови (ICBS) в Центре при Институте Пауля Эрлиха (PEI) в Лангене, Германия, была проведена кропотливая работа, в которой сравнивали 70 наборов для выявления HBsAg ВГВ со всего мира, из них 51 набор для выявления в формате ИФА/ИХЛА и 19 экспресс-тестов. Авторами было показано, что только 17 из этих 70 наборов продемонстрировали лучшие параметры чувствительности и специфичности по совокупным показателям (Scheiblaue et al., 2010). В число этих 17 наборов вошел набор «Вектогеп В-HBs-антиген» производства АО «Вектор-Бест».

Диагностическую чувствительность оценивали с помощью клинической панели ICBS, состоящей из 146 HBsAg-положительных образцов. Панель включала большинство генотипов ВГВ и субтипов HBsAg, то есть была репрезентативной и отражала географическое разнообразие ВГВ в мире. Среди них: 32 образца генотипа А (субтипы adw2, ayw1, adw4, ayw2), 30 образцов генотипа В (субтипы adw2, ayw1), 11 образцов генотипа С (субтипы adw2, adr), 30 образцов генотипа D (субтипы ayw2, ayw3, ayw4, adw2), 30 образцов генотипа Е (субтип ayw4) и 13 образцов генотипа F (субтип adw4).

Другая панель ICBS HBsAg – количественная – состояла из 8 образцов с разными комбинациями генотипов ВГВ и субтипов HBsAg: А/adw2 (Иордания); В/ayw1 (Вьетнам); В/adw2 (Вьетнам); С/adr (Вьетнам); D/ayw2 (Тунис); D/ayw3 (Бразилия); Е/ayw4 (Кот-д'Ивуар); F/adw4

(Бразилия). Количественное определение концентрации HBsAg проводилось в наборе «Architect HBsAg quantitative» (Abbott GmbH & Co. KG) относительно второго Международного стандарта HBsAg ВОЗ (code number: 00/588).

Стандарт HBsAg Института Пауля Эрлиха (PEI) был включен в исследование в качестве независимого эталонного препарата HBsAg, с его помощью готовили серийные разведения в эмбриональной сыворотке телят для определения предела обнаружения HBsAg испытываемыми наборами.

Отрицательная панель состояла из 200 образцов, полученных из Американского Красного Креста (округ Колумбия, США).

Оценка диагностической чувствительности, проведенная с помощью клинической панели ICBS HBsAg, показала, что в 18 наборах для ИФА/ИХЛА все 146 образцов были выявлены как положительные, в других 33 наборах были выявлены ложноотрицательные результаты (для 1 - 4 образцов), а для 19 экспресс-тестов было получено по 2 – 8 ложноотрицательных результатов. Ложноотрицательные результаты чаще получали для одних и тех же пяти образцов клинической панели, в том числе в некоторых наборах, которые продемонстрировали способность выявлять необходимый предел обнаружения HBsAg, оцененный с помощью стандарта института Пауля-Эрлиха. Эти пять образцов содержали замены: M133L (концентрация HBsAg 0,21 МЕ/мл), P105R (концентрация HBsAg 0,22 МЕ/мл), T131I (концентрация HBsAg 0,36 МЕ/мл), Q101H (концентрация HBsAg 72 МЕ/мл), S143L (концентрация HBsAg >8000 МЕ/мл), то есть количество HBsAg в них было выше предела детекции, заявленного изготовителем набора и установленного в исследовании с помощью стандарта института Пауля-Эрлиха. Так, в шестнадцати наборах был получен отрицательный результат по крайней мере для одного из этих образцов, два ИФА-набора и два экспресс-теста не смогли обнаружить HBsAg в образце, содержащем генотип E субтипа ауw4, с концентрацией HBsAg 72 МЕ/мл, а четыре экспресс-теста не выявили образец с содержанием HBsAg >8000 МЕ/мл. Другие наборы выявляли эти пять образцов, но с гораздо более низкими значениями коэффициентов позитивности ($K_{\text{поз}}$). Наблюдалось 20-кратное снижение чувствительности при определении мутантного варианта T131I (концентрация HBsAg 0,36 МЕ/мл), снижение чувствительности в 13–120 раз – мутантного варианта Q101H (концентрация HBsAg 72 МЕ/мл). Для образца с мутацией S143L (концентрация HBsAg >8000 МЕ/мл) было показано существенное снижение чувствительности от 500 до >1000 раз в двух ИФА-наборах, в которых результаты могли стать отрицательными, если бы не высокая концентрация HBsAg в образце (Scheiblaue et al., 2010). Стоит отметить, что в данное исследование не был включен образец с мутацией вакцинного и диагностического ускользания G145R, который, как было показано в российском исследовании (Баженов и др., 2008), вызывает наибольшие затруднения при выявлении: только два диагностических ИФА-набора из семи,

доступных на российском рынке на момент исследования, были способны обнаруживать таких мутантов.

Все эти данные в совокупности говорят о том, что оценка наборов реагентов по способности выявлять низкие концентрации HBsAg, выполненная по одному образцу одного конкретного субтипа HBsAg/ генотипа ВГВ (например, по стандарту Пауля-Эрлиха), не является достаточной для формирования объективной картины и заключения о работе набора; вывод можно сформулировать только по совокупной способности выявлять образцы с разными субтипами HBsAg, генотипами ВГВ и мутантными формами.

Безусловно, наборы, используемые в практике здравоохранения, должны выявлять максимальный спектр возможных вариантов антигена. Как уже было отмечено в предыдущей главе, для этого необходимо использовать контрольные панели, включающие все варианты этого антигена. Для этого необходимо иметь представление о том, какие варианты вируса присутствуют на исследуемой территории.

1.10.4. Методы определения генотипов ВГВ

Определение генотипов ВГВ возможно следующими способами:

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

✓ Sequencing - прямое секвенирование ДНК (определение нуклеотидной последовательности полноразмерного генома изолята или чаще его отдельных, наиболее переменных районов) изолятов ВГВ с последующим филогенетическим анализом с использованием прототипных последовательностей изолятов известных генотипов (Okamoto et al., 1988; Norder et al., 2004). Этот метод в настоящее время является «золотым стандартом»;

✓ Hybridization strips (Line probe HBV genotyping assay). Это метод обратной гибридизации, который был разработан «Innogenetics» (Гент, Бельгия) и коммерчески доступен как INNO-LiPA® HBV Genotyping (URL: <https://www.fujirebio.com/en/products-solutions/innolipa-hbv-genotyping>). Амплифицированные биотинилированные продукты ПЦР гибридизуют с зондами, иммобилизованными на полосках мембраны, которые определяют генотипспецифические различия в доменах гена полимеразы HBV от В до С. После промывания добавляют стрептавидин, меченный щелочной фосфатазой (ЩФ), а затем субстрат (хромоген BCIP / NBT), который дает пурпурный / коричневый осадок в присутствии ALP. Этот метод может обнаруживать как одиночные, так и смешанные генотипы;

✓ Reverse dot blot assay (Flow-throug reverse dot blot FT-RDB) – Zhang с коллегами разработали этот метод для генотипирования HBV на основе консервативной области S-гена ВГВ (Zhang et al., 2007). Сначала была проведена ПЦР с использованием обратного праймера, меченного 5'-биотином. ПЦР ампликоны денатурировали и быстро охлаждали на льду перед

гибридизацией. Затем ПЦР продукты были добавлены на нейлоновую мембрану, на которой иммобилизованы генотип-специфические зонды. После гибридизации обнаружение продукта проводили путем добавления стрептавидина–ПХ, затем хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ). Реагенты, добавленные на нейлоновую мембрану, удаляли через нее с помощью прибора, снабженного вакуумным насосом. Этот метод генотипирования ВГВ недорогой, точный и быстрый;

✓ Oligonucleotide microarray chips - Song с коллегами (Song et al., 2006) разработали микрочип олигонуклеотидов, которые могут определять генотипы А – G. ПЦР-амплификацию pre-S-области выполняли с последующим мечением Cy5-dCTP. Амплифицированные продукты денатурировали нагреванием и добавляли к силилированным слайдам, на которых иммобилизованы зонды, специфичные для генотипа. На основе анализа филогенетического дерева и выравнивания 228 последовательностей pre-S области были разработаны пятнадцать зондов. После отмывки и просушивания сигналы флуоресценции регистрировали с помощью сканера. Этот метод оказался специфичным и чувствительным к обнаружению как одиночных, так и смешанных генотипов;

✓ Методы рестрикционного анализа, или «restriction fragment length polymorphism» (RFLP) (Lindh et al., 1998; Mizokami et al., 1999) – ПЦР-амплификация гена S (или pre-S1 – для модифицированного метода), расщепление рестрикционными ферментами и разделение расщепленных фрагментов электрофорезом. Сочетание разных рестрикционных ферментов используется для RFLP, выбор которых определяется в соответствии с различными последовательностями генотипа ВГВ в GenBank. Этот метод использован для определения генотипов А–Н;

✓ Restriction fragment masspolymorphism (RFMP) - Ли с коллегами (Lee et al., 2004) использовали RFMP для генотипирования ВГВ на основе генотипических вариаций в S-гене. Подобно RFLP, этот метод зависит от расщепления рестриктазами продуктов ПЦР для получения генотип-специфичных олигонуклеотидных фрагментов. Массу продуцируемых фрагментов затем определяют с помощью matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) масс-спектрометрии;

✓ Multiplex PCR - метод мультиплексной nested-ПЦР для выявления генотипов А – F – изначально двухраундовая ПЦР с внешними и внутренними праймерами плюс генотип-специфические праймеры (Naito et al., 2001). Модифицирована в однораундовую PCR для определения генотипов А-F (Kirschberg et al., 2004), и дополнительных субгенотипов B1, B2, C1, C2 (Chen et al., 2007). С 2008 г. используется мультиплексная ПЦР для определения А-G с использованием генотип-специфичных праймеров в двух реакциях на основе региона core/surface/polimerase (Liu, 2008);

✓ Real-time PCR - этот метод определяет как генотип ВГВ, так и уровень ДНК ВГВ в сыворотке крови (Payungporn et al., 2004; Yeh et al., 2004; Liu et al., 2006), который помогает в прогнозировании терапевтического исхода. ПЦР в реальном времени с использованием SYBR green I (краситель нуклеиновой кислоты, который связывается с двухцепочечной ДНК) или флуоресцентные зонды позволяют детектировать и проводить количественную оценку ДНК ВГВ; анализ кривой плавления позволяет определить генотипы. Значение температуры плавления (T_m) отличается для разных генотипов в зависимости от комплементарности между зондом и мишенью и/или содержанием GC гибридизационной последовательности.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

✓ Serotyping - серологические методы с использованием антител против HBsAg. Серологическое выявление генотипов ВГВ методом ИФА с использованием МАТ к типоспецифичным эпитопам в продукте preS2-области (Usuda et al., 1999).

Так как типирование ВГВ наиболее часто проводится в эпидемиологических целях, а «золотым стандартом» остается прямое секвенирование ДНК изолятов ВГВ с последующим филогенетическим анализом с использованием прототипных последовательностей изолятов известных генотипов, готовых к использованию коммерческих наборов реагентов для определения генотипов ВГВ немного. На данный момент доступны следующие коммерческие продукты для типирования ВГВ:

1. Коммерческий набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов А, В, С и D ВГВ в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HBV-генотип-FL» (ООО «Интерлабсервис», Россия) (URL: <https://interlabservice.ru/catalog/reagenty/ptsr-diagnostics/virusnye-gepatity/amplisens-hbv-genotip-fl-genotipirovanie-virusa-gepatita-v.html>);

2. Коммерческий набор реагентов «ABBOTT HBV SEQUENCING» («Abbott Laboratories», USA) для определения генотипа ВГВ и лекарственной резистентности в одном исследовании (URL: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/hbv-sequencing>). «Abbott HBV Sequencing» — это анализ *in vitro* для определения последовательности ДНК области обратной транскриптазы (RT) гена полимеразы ВГВ. Тест предназначен для использования в качестве вспомогательного средства при ведении пациентов с хроническим ВГВ. Данный тест не предназначен для использования при скрининге доноров крови на ВГВ или в качестве диагностического теста для подтверждения наличия инфекции ВГВ;

3. Коммерческий набор реагентов «INNO-LiPA® HBV Genotyping» («Fujirebio», N.U. Group, Япония) - анализ линейного зонда для определения генотипа ВГВ (А – H) путем обнаружения типоспецифичных последовательностей в домене гена полимеразы ВГВ от В до С

(URL: <https://www.fujirebio.com/en/products-solutions/innolipa-hbv-genotyping>);

4. Коммерческий набор реагентов «TRUGENE HBV Genotyping Kit» («Siemens Medical Solutions Diagnostics», США) для определения генотипов А-Н ВГВ (URL: <http://www.medical-siemens.com>);

5. Коммерческий набор реагентов «IMMUNIS® HBV Genotype EIA» («Institute of Immunology Co.», Ltd., Япония) для серологического определения генотипа ВГВ (URL: <https://www.tokumen.co.jp/products/manual/en/ME-IMMUNIS-HBV-Genotype-EIA.pdf>).

Хочется отметить, что не все вновь обнаруженные изоляты ВГВ могут быть отнесены к существующим группам генотипов. Во-первых, такие изоляты могут оказаться мутантами, в которых накапливающиеся изменения в ДНК не позволяют однозначно кластеризовать к определенной ветви при проведении филогенетического анализа. Во-вторых, описаны многочисленные случаи рекомбинации между ВГВ различных генетических групп и даже между ВГВ-подобными вирусами разных видов. Очевидно, что рекомбинанты будут попадать в одну или другую филогенетическую группу в зависимости от участка ДНК, выбранного для анализа, или не попадать ни в одну из них, если исследуемая последовательность включает точку рекомбинации.

1.10.5. Методы определения субтипов HBsAg

Определение субтипов HBsAg возможно несколькими способами:

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

✓ По выведенной аминокислотной последовательности ДНК изолятов ВГВ (определение «предсказанного» субтипа HBsAg) (Norder et al., 1992a; Purdy et al., 2007) (см. Таблицу 1).

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

✓ Serotyping - серологические методы с использованием антител против HBsAg. Основан на том, что все серотипы имеют общую детерминанту «а» и две пары взаимозаменяемых детерминант «d/y» и «w/r». В результате можно идентифицировать 9 серовариантов HBsAg ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ adrq- (Couroucé-Pauty et al., 1983; Usuda et al., 1986; Swenson et al., 1991). Этот метод можно считать классическим серологическим методом для определения серотипов (субтипов) HBsAg.

Хочется обратить внимание, что именно с помощью этих двух методов (определение «предсказанного» субтипа HBsAg по выведенной аминокислотной последовательности ДНК изолятов ВГВ и серологического метода с применением панели высокоспецифичных МАТ,

любезно предоставленных Dr. P.Swenson) были проведены сравнительные испытания разработанной автором методики для типирования ВГВ методом ИФА в HBsAg+ образцах сыворотки и плазмы крови, при этом обе эти методики не являются коммерчески доступным продуктом.

Единственный доступный *коммерческий* набор реагентов для субтипирования HBsAg:

1. Набор реагентов «HBsAg Subtype EIA» («Institute of Immunology Co.», Ltd., Япония) на основе ИФА с МАТ (URL: <https://www.tokumen.co.jp/products/manual/en/ME-HBsAg-Subtype-EIA.pdf>).

1.10.6. Заключение по методам определения генотипов ВГВ и субтипов HBsAg

Ранее в АО «Вектор-Бест» была разработана и зарегистрирована первая национальная стандартная панель HBsAg-позитивных сывороток (D-0540) как с высоким, так и с низким содержанием HBsAg, которая способствует совершенствованию качества разрабатываемых и выпускаемых в России наборов реагентов, направленных на выявление HBsAg - одного из важнейших маркеров для обеспечения безопасности донорской крови. Учитывая тот факт, что образцы панели изготовлены на основе нативных сывороток, для ее производства необходим постоянный поиск имеющихся (известных) вариантов субтипов HBsAg, а также новых, в том числе мутантных вариантов вируса. Для этого необходимо постоянно изучать структуру и распространенность субтипов HBsAg среди различных групп населения на территории РФ на основе унифицированного, доступного метода.

«Золотым стандартом» определения генотипа ВГВ является филогенетический анализ нуклеотидной последовательности S-гена выделенных изолятов ДНК ВГВ (Norder et al., 1992a.; Norder et al., 2004). Однако исторически именно субтипирование HBsAg с помощью МАТ анти-HBs дало возможность начать классифицировать ВГВ. Позже стало возможным предсказывать субтип HBsAg через выведенную аминокислотную последовательность, кодируемую S-геном ВГВ (Okamoto et al., 1987; Purdy et al., 2007). В настоящее время основной мишенью при изучении генотипов ВГВ в мире является вирусная ДНК. Существует ряд коммерческих наборов реагентов для определения генотипов ВГВ, предполагающие работу с вирусной ДНК. Однако предложенный автором метод может занять важную нишу в исследованиях, посвященных генотипированию ВГВ, а также субтипированию HBsAg, предоставляя возможность, во-первых, проводить исследования без дорогостоящих, предполагающих определенное приборное оснащение молекулярно-генетических методов, во-вторых, определять генотип ВГВ в образцах крови даже при недетектируемом уровне ДНК ВГВ (при наличии достаточного количества HBsAg), в-третьих – при аналогичном методе с использованием МАТ импортного производства - более бюджетным вариантом его проведения, в-четвертых - определять субтип HBsAg в

иммунобиологических препаратах, например, препаратах рекомбинантного антигена, в котором заведомо отсутствует вирусная ДНК.

1.11. Заключение по обзору литературы

Таким образом, опубликованные данные о зависимости клинического течения и исхода ХГВ от генотипа ВГВ и глобальная стратегия ВОЗ по элиминации вирусного гепатита В диктуют необходимость более пристального внимания к обнаружению HBsAg, - с одной стороны, при этом и более доступных способов изучения специфических характеристик ВГВ, - с другой. Определение субтипов HBsAg и ассоциированных генотипов ВГВ с помощью МАТ может быть хорошим дополнением или - в некоторых случаях - альтернативой молекулярным методам изучения характеристик ВГВ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Коллекция моноклональных антител против HBsAg (анти-HBs)

Коллекции МАТ против HBsAg были получены в 1992 и 2004 г. сотрудниками лаборатории гибридомной технологии НИИ СД АО «Вектор-Бест» под руководством Порываевой В. А. при иммунизации мышей сывороточным антигеном ау- субтипа в 1992 году и рекомбинантным дрожжевым антигеном ад- субтипа в 2004 году. Всего за эти годы было получено 66 анти-HBs МАТ.

С целью поиска МАТ, высокоспецифичных к определенным эпитопам HBsAg, в рамках данного исследования было изучено 33 МАТ анти-HBs. Остальные МАТ на момент начала исследования были не доступны (изъяты из коллекции ранее, как не имеющие перспективы; во время тестирования не было коллекции образцов крови, содержащих разные субтипы HBsAg).

2.1.2. Панели HBsAg-положительных образцов для отбора МАТ анти-HBs

Для формирования «базовой» внутрилабораторной панели (ВП «базовая») были отобраны пять сывороток крови человека, которые содержали следующие субтипы HBsAg/ генотипы ВГВ: ауw2/D, ауw3varA/D, ауw3varB/D, адrq+/C, адw2/A (Таблица 2). Ранее субтипы HBsAg/ генотипы ВГВ в данных образцах были установлены двумя способами: по методике Dr. P.Swenson и классическими молекулярно-генетическими методами. С целью стандартизации разрабатываемой методики из указанных пяти нативных HBsAg-положительных образцов были приготовлены (согласно внутренней инструкции предприятия) лиофилизированные образцы с содержанием HBsAg 100 МЕ/мл, определено против третьего международного стандарта ВОЗ (NIBSC code: 12/226. URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/12-226.pdf>). Таким образом, была сформирована ВП «базовая», состоящая из лиофилизированных образцов ВКО1-5 (внутренний контрольный образец), содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ в концентрации 100 МЕ/мл HBsAg (Таблица 2). Образцы ВП «базовой» были использованы для первичного отбора анти-HBs МАТ.

Внутрилабораторная панель HBsAg-положительных образцов следующего этапа отбора анти-HBs МАТ включала в себя 48 образцов (ВП «расширенная», Приложение 1). Она состояла из 43 нативных HBsAg-положительных образцов сыворотки крови хронических носителей ВГВ из разных регионов Российской Федерации с установленными ранее по методике Dr. P.Swenson субтипами HBsAg и пяти образцов ВКО1-5. В состав ВП «расширенная» вошли: 7 образцов ауw2 субтипа HBsAg, 11 образцов ауw3, 12 образцов адrq+, 18 образцов адw2. Все нативные HBsAg-

положительные образцы сывороток крови были расфасованы, заморожены и хранились до исследования при минус (18-25) °С.

Таблица 2. ВП «базовая» HBsAg-положительных образцов для первичного отбора анти-HBs МАТ

Субтип HBsAg/ генотип ВГВ	Шифр образца	Название образца в ВП
Ayw2/ D	«О»	ВКО1
Ayw3varA/ D	Ув3	ВКО2
Ayw3varB/ D	Ув5	ВКО3
Adw2/ A	P2	ВКО4
Adrq+/ C	Росх	ВКО5

2.1.3. Исследуемые образцы сывороток и плазм крови человека

2.1.3.1. Образцы плазм крови представителей коренных народностей пяти регионов Сибири

Образцы плазм крови и последовательности ДНК ВГВ. Для исследования были отобраны 146 HBsAg-положительных образцов плазм крови, полученные сотрудниками лаборатории этногенетики ИЦиГ СО РАН под руководством Осиповой Л.П. в экспедициях 1992-2006 гг. от коренного населения пяти регионов Сибири. Все обследованные лица дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. В 108 случаях были выделены изоляты вирусной ДНК, секвенированы последовательности S-гена ВГВ, на их основе предсказаны субтипы HBsAg и определены генотипы ВГВ выделенных изолятов; данная часть работы подробно была описана ранее (Мануйлов и др., 2015). Последовательности ДНК ВГВ из данных 108 образцов были депонированы в базе данных GenBank с шифрами JX090605-JX090647, JX090656-JX090724, JX125364-JX125386. В дальнейшем тексте приводятся внутренние лабораторные шифры образцов и присвоенные соответствующим изолятам шифры GenBank, например, АЛ396 (JX090622).

2.1.3.2. Образцы сывороток крови пациентов с ХГВ из трех регионов России

В сравнительные испытания по определению генотипов ВГВ и субтипов HBsAg вошли также сыворотки крови пациентов с диагнозом ХГВ, полученные из трех других регионов России:

- 49 HBsAg-положительных образцов сывороток крови, г. Барнаул, 2018-2019 гг;
- 43 HBsAg-положительных образца сывороток крови, Краснодарский край, 2018 г;
- 35 HBsAg-положительных образцов сывороток крови, г. Благовещенск, 2018 г.

Все образцы до исследования хранились в морозильной камере при минус (20-40)°С.

Исследования проводились в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации. Весь полученный клинический материал использовали с информированного согласия пациентов после одобрения проекта локальным этическим комитетом при ГБУЗ Новосибирской области «Городская инфекционная больница №1»: протокол № 1 от 28.03.2017.

2.2. Методы

2.2.1. Иммуноферментный анализ

2.2.1.1. Выявление и подтверждение наличия HBsAg

Выявление HBsAg в образцах сывороток и плазм крови проводили с помощью наборов реагентов «Вектогеп В – HBs – антиген» согласно инструкции изготовителя; наличие HBsAg подтверждали с помощью набора «Вектогеп В – HBs – антиген – подтверждающий тест» с помощью реакции нейтрализации специфическими антителами согласно инструкции изготовителя (АО «Вектор-Бест», Россия).

2.2.1.2. Определение концентрации HBsAg

Концентрацию HBsAg определяли в наборах «Вектогеп В – HBs- антиген» против третьего международного стандарта ВОЗ (URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/12-226.pdf>).

2.2.1.3. Приготовление иммуносорбента для методики субтипирования HBsAg/генотипирования ВГВ

В лунки планшета Nunc polysorp (Thermofisher, Дания) вносили по 150 мкл сорбирующего раствора (фосфатный буфер pH=7,4 с 0,5M NaCl с добавлением 5% спирта (96%) и анти-HBs ПАТ осла в концентрации 5 мг/мл) и оставляли на 18-19 часов при комнатной температуре. После экспозиции содержимое планшета удаляли, вносили по 200 мкл блокирующего раствора (фосфатный буфер pH=7,4 с 0,5M NaCl с добавлением сухого молока 5 г/л и твина-20 0,5 мл/л). Планшет оставляли на 2 часа при комнатной температуре. Содержимое планшета удаляли, отмывали планшет трижды дистиллированной водой, сушили в сухожаровом шкафу 6 минут при 50°C, затем оставляли при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты запаивали в целфеновые пакеты с замком zip-lock с вложенным силикагелем и хранили в холодильнике при температуре (2-8)°C под контролем температуры до востребования.

2.2.1.4. Определение субтипов HBsAg/генотипов ВГВ по методике Dr. P.Swenson

Для определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ использовали МАТ 3С3, 2D11, 3D9, 3А5, 3Е2, 1С10, 1С4, любезно предоставленные Dr. P.Swenson, в соответствии с методикой, описанной ранее (Swenson et al., 1991), с небольшими модификациями.

1. Исследуемые сыворотки разводили в 6 раз (1:5) сывороткой крови плодов коровы (СКПК) и вносили по 100 мкл каждого образца в 7 лунок планшета с иммобилизированными

анти-HBs ПАТ. В качестве положительного контрольного образца (K+) вносили сыворотку, содержащую HBsAg субтипа ayw2 или adw2 по 100 мкл, также в 7 лунок. В качестве отрицательного контрольного образца (K-) использовали СКПК, которую также вносили по 100 мкл в 7 лунок.

2. Инкубацию планшета проводили в течение 14-18 часов при комнатной температуре (20-23)°С. Промывали планшет 10 раз дистиллированной водой и вносили в каждую из семи лунок по 100 мкл разведенных 1:1000 в СКПК асцитических жидкостей (АЖ), содержащих МАТ 3С3, 2D11, 3D9, 3А5, 3Е2, 1С10, 1С4.

3. Инкубировали планшет в течение 1 часа при 44°С. Промывали 10 раз дистиллированной водой и в каждую лунку добавляли по 100 мкл анти-мышинных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) (Sigma) в разведении 1: 20 000 – 1: 40 000 в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,4 с 50% СКПК и 0,03% твин-20.

4. Инкубировали планшет в течение 1 часа при 44°С. Промывали 10 раз дистиллированной водой и в каждую лунку планшета внести по 100 мкл раствора ТМБ с субстратным буферным раствором (СБР) (650 мкл ТМБ на 13 мл СБР). Оставляли при комнатной температуре на 25 минут.

5. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1М H₂SO₄.

Учет реакции осуществляли при длине волны 450 нм/0 нм.

Вычисляли критическое значение оптической плотности $ОП_{крит} = 2,1 * ОП (K-)$ для каждого МАТ отдельно.

Результаты считали валидными, если оптическая плотность (ОП) K- не превышала 0,2 о.е., а результаты определения субтипа HBsAg и генотипа ВГВ в образце K+ соответствовали установленным ранее.

Если значение оптической плотности исследуемой сыворотки ($ОП_{сыв}$) в реакции с МАТ превышало соответствующее данному МАТ значение $ОП_{крит}$, то такая реакция считалась положительной; если значение $ОП_{сыв}$ было ниже $ОП_{крит}$, то такая реакция считалась отрицательной.

Результаты интерпретировали согласно Таблице 3.

Таблица 3. Реакции анти-HBs МАТ с образцами сывороток/плазм крови человека, содержащих разные субтипы HBsAg/ генотипы ВГВ

Субтип HBsAg/ генотип ВГВ	Моноклональные антитела						
	3C3	2D11	3D9	3A5	3E2	1C10	1C4
ayw1/B	-	+	-	-	+	-	-
ayw2/D	-	+	-	-	+	+	-
ayw3/D	-	+	-	+	-	+	-
ayw4/E	-	+	+	+	-	+	-
ayr/C	-	+	+	-	-	-	+
adw2/A	+	-	-	-	+	+	-
adw2/B	+	-	-	-	+	-	-
adw2/C	+	-	-	-	+	-	+
adw4/F	+	-	+	+	+	-	+
adrq+	+	-	+	-	+	-	+
ayw3varB/D	-	-	-	+	+	+	-
ayw3varA/D	-	-	-	-	+	+	-

2.2.1.5. Метод отбора МАТ для разработки методики

Анти-HBs МАТ были исследованы в виде АЖ или в виде конъюгатов с ПХ.

Для исследования МАТ в виде АЖ проводили следующие этапы:

- HBsAg-положительные образцы ВКО1-ВКО5 вносили по 100 мкл в лунки планшета с иммобилизованными ПАТ осла против HBsAg; число повторов каждого из образцов ВКО1-ВКО5 соответствовало количеству испытуемых АЖ. Планшет заклеивали клейкой пленкой. В качестве отрицательного контрольного образца использовали СКПК, которую также вносили по 100 мкл в лунки.
- Инкубировали 18 часов при комнатной температуре (20-23°C) (на ночь).
- Промывали планшет 10 раз дистиллированной водой.
- Вносили по 100 мкл разведенных 1:1000 в СКПК исследуемых АЖ, содержащих анти-HBs МАТ, в лунки каждого из образцов ВКО1-ВКО5. Планшет заклеивали клейкой пленкой.
- Инкубировали 1 час при (44±1) °C.
- Промывали планшет 10 раз дистиллированной водой.

- В каждую лунку добавляли по 100 мкл анти-мышинных антител, конъюгированных с ПХ (Cappel, Германия) в разведении 1: 20000 – 1: 40000 в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4 с 50% СКПК и 0,03% твин-20. Планшет заклеивали клейкой пленкой.
- Инкубировали 1 час при $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$.
- Промывали планшет 10 раз дистиллированной водой.
- В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл раствора ТМБ (650 мкл ТМБ на 13 мл СБР (АО «Вектор-Бест», Россия).
- Инкубировали при комнатной температуре в течение 25 минут в защищенном от света месте.
- Добавляли 100 мкл 1М H_2SO_4 .
- Учет реакции осуществляли при длине волны 450 нм.
- Вычисляли значение $\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}(\text{K-}) \cdot 2,1$
- Вычисляли $\text{K}_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{ВКО}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$.
- Положительными считали реакции, если $\text{K}_{\text{поз}}$ превышал 1, отрицательными – при $\text{K}_{\text{поз}}$ ниже 1.

Выбирали те МАТ, для которых реакции между образцами ВКО1-ВКО5 отличались существенно (отношение минимального значения $\text{K}_{\text{поз}}$ положительных реакций образцов ВКО1-5 к максимальному значению $\text{K}_{\text{поз}}$ отрицательных реакций этих образцов с этим же МАТ составляло хотя бы 2; иными словами, искали те МАТ, которые лучше всего позволяли «дифференцировать» разные субтипы HBsAg, то есть различать детерминанты и субдетерминанты HBsAg. При необходимости исследовали АЖ повторно, изменив разведение в большую (1:2000, 1:5000) или меньшую (1:500, 1:100, 1:50) сторону.

Для исследования МАТ в виде конъюгатов, меченых ПХ (МАТ-ПХ), использовали следующую методику.

- Вносили по 100 мкл HBsAg-положительных образцов ВКО1-ВКО5 в лунки планшета с иммобилизированными анти-HBs ПАТ осла; число повторов каждого из образцов ВКО1-ВКО5 соответствовало количеству испытуемых конъюгатов МАТ-ПХ. В качестве К-использовали нормальную человеческую сыворотку (НЧС), не содержащую маркеров гепатита В, которую также вносили по 100 мкл в лунки в том же количестве повторов, что и ВКО1-5.
- Вносили по 50 мкл раствора конъюгата (в разведении 1/1000) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4, с 50% СКПК и 0,03% твин-20.
- Планшет заклеивали клейкой пленкой.
- Инкубировали 1 час при 37°C .

- Промывали планшет 5 раз ФСБ-Т.
- В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл раствора ТМБ (650 мкл ТМБ на 13 мл СБР (АО «Вектор-Бест», Россия).
- Инкубировали при комнатной температуре 30 минут в защищенном от света места.
- Добавляли 100 мкл 1М H₂SO₄.
- Учет реакции осуществляли при длине волны 450 нм/620 нм.
- Вычисляли значение ОП_{крит} = ОП (К-) + 0,200
- Вычисляли K_{поз} = ОП_{ВКО}/ОП_{крит}.

Выбирали те МАТ, реакции которых с положительными образцами ВКО1-5 отличались существенно (по принципу, описанному выше). При необходимости разведения конъюгатов меняли в большую (до 1/10 000) или меньшую (до 1/50) сторону.

2.2.1.6. Оценка воспроизводимости методики

Воспроизводимость методики оценивали по результатам исследования 4-8 повторов положительных образцов, содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ. Для оценки воспроизводимости использовали коэффициент вариации (КВ), который вычисляли для значений ОП, полученных с каждым из МАТ, как отношение стандартного отклонения к среднему значению ОП. После этого рассчитывали среднее значение КВ образцов, содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ, и границы 95% доверительного интервала (95% ДИ).

2.2.2. Молекулярно-генетические методы

2.2.2.1. Образцы плазм крови представителей коренных народностей пяти регионов Сибири

Выделенные изоляты ДНК ВГВ 108 образцов плазм крови, взятые для апробации разработанной методики определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ с применением МАТ, были описаны ранее в работе (Мануйлов и др., 2015).

Последовательности ДНК ВГВ вирусных изолятов были депонированы в базе данных GenBank с шифрами JX090605-JX090647, JX090656-JX090724, JX125364-JX125386 (здесь и далее под «шифром» последовательности подразумевается уникальный номер последовательности, депонированной в базе данных GenBank (GenBank accession number)). С использованием программного обеспечения MEGA производили выведение аминокислотных последовательностей из массива нуклеотидных последовательностей ДНК, выравненного по последовательности S-гена ВГВ (референтная последовательность X02763). Для выведения аминокислотных последовательностей из нуклеотидных использовали стандартный генетический код эукариот. Возможные сбои в рамках считывания проверяли вручную

(«дефектных» последовательностей не выявлено). Затем определяли АО, находящиеся в позициях 122, 127, 134, 140, 159, 160 и сопоставляли их с остатками, описанными для различных субтипов в работах (Okamoto et al., 1987; Norder et al., 1992a; Purdy et al., 2007). На основании набора АО в указанных положениях делали вывод об отнесении изолята к тому или иному субтипу HBsAg.

2.2.2.2. Образцы сывороток крови пациентов с ХГВ из трех регионов России

Данный блок исследования был проведен, в основном, силами Сергеевой Е. И. (лаборатория ПЦР АО «Вектор-Бест»). Автором определены предсказанные субтипы HBsAg по выведенным аминокислотным последовательностям выделенных изолятов ВГВ.

Для выделенных изолятов вируса по нуклеотидным последовательностям, кодирующим участок S-гена, выводили аминокислотные последовательности аналогично алгоритму, описанному в 2.2.2.1. По выведенным аминокислотным остаткам в положениях 122, 127, 134, 140, 159, 160, участвующим в формировании субтип-специфических детерминант (Okamoto et al., 1987; Norder et al., 1992a; Purdy et al., 2007), были установлены предсказанные субтипы HBsAg выделенных изолятов.

2.2.3. Описание методов статистического анализа

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление и систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием программы Excel. Анализ четырехпольных таблиц сопряженности (сравнение процентных долей в двух группах) с использованием непараметрических статистических критериев проводился с помощью критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера с помощью онлайн-калькулятора (URL: <https://medstatistic.ru/calculators/calchi.html?ysclid=m1koe4nlrx588972524>).

2.2.4. Дизайн апробации методики

Для апробации разработанной методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток/плазм крови человека, содержащих HBsAg, необходимо было сопоставить результаты, полученные с помощью данной методики (разработанной нами), с результатами, полученными с помощью других методик. Для этих целей были исследованы две группы образцов крови тремя способами (схематично показано на Рисунке 9):

- группа 1, образцы плазм крови представителей коренных народностей Сибири (помимо разработанной нами методики, субтип HBsAg и генотип ВГВ определяли молекулярно-генетическими методами и по методике и с реагентами Dr. P.Swenson);

- группа 2, образцы сывороток крови пациентов трех других регионов России (помимо разработанной нами методики, субтип HBsAg и генотип ВГВ определяли только молекулярно-генетическими методами).

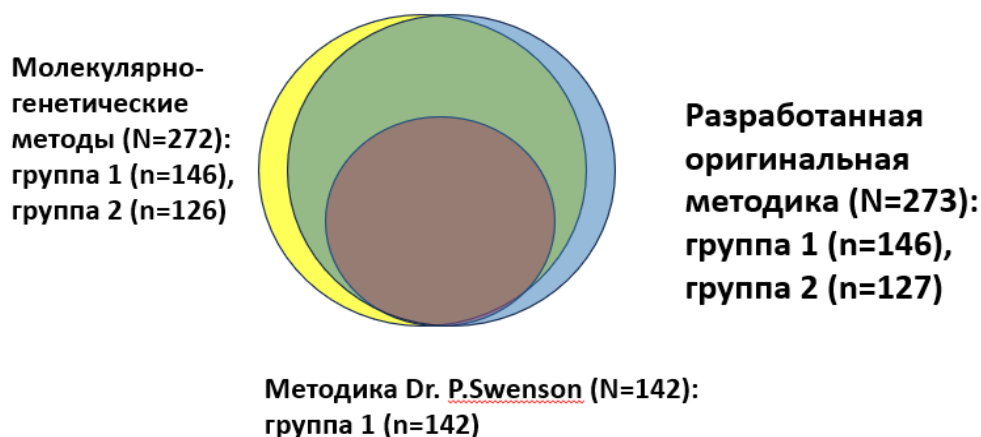


Рисунок 9. Схематическое изображение исходного множества образцов, исследованных разными методами (разработанная методика (обозначена синим цветом), молекулярно-генетические методы (желтым цветом), методика Dr. P.Swenson (исходно – красным цветом)). Группа 1 – образцы крови представителей коренных народностей Сибири, группа 2 – образцы крови пациентов трех регионов РФ. Области пересечения фигур – множество образцов, результаты которых можно попарно сопоставить. Нас интересуют, в первую очередь, две области пересечения: вся область зеленого цвета, включая площадь коричневой области (для сопоставления результатов, полученных с помощью разработанной методики и молекулярно-генетическими методами), а также отдельно область коричневого цвета (для сопоставления результатов, полученных с помощью разработанной методики и Dr. P.Swenson). Масштаб не полностью выдержан с целью визуализировать пересечения множеств для дальнейшего анализа. Остальные пояснения в тексте.

Далее сопоставляли попарно результаты субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ, полученные с помощью разработанной методики и альтернативным методом:

- пара 1 – с результатами, полученными по методике Dr. P.Swenson,
- пара 2 – с результатами молекулярно-генетических исследований.

Сопоставление проводили для тех образцов, результаты которых были валидны одновременно в двух сравниваемых методиках.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Множество полученных результатов

В данном параграфе показана общая структура исследованных множеств образцов, взятых для апробации методики (сами результаты будут изложены позже): необходимо дать краткие пояснения по количеству образцов, заявленных в материалах и методах, и при последующем сопоставлении результатов. Это объясняется тем, что не все образцы, взятые в исследование, демонстрировали валидные результаты в соответствующих тестах (Таблица 4), а для попарного сопоставления результатов разных методик количество образцов еще меньше, так как эта величина не всегда совпадала с количеством валидных результатов, полученных в одной из двух сравниваемых методик (в которой получено меньшее число валидных результатов). Связано это с тем, что образцы с валидными результатами в одной методике, не всегда демонстрировали валидные результаты в другой, и наоборот. Одним словом, при сопоставлении результатов двух методик необходимым условием было наличие валидных результатов одновременно в обеих методиках для каждого из сравниваемых образцов.

Таблица 4. Количество образцов, исследованных разными методами в разных группах, и количество образцов, взятых для сопоставления результатов

Метод типирования ВГВ	Количество образцов, взятых в исследование	Количество образцов с невалидными результатами	Количество образцов с валидными результатами	Сопоставление результатов (методы: количество образцов)	
группа 1 (коренные народности Сибири)					
А. Молекулярно-генетические исследования	146	38	108	А и Б: 91 обр	Б и В: 113 обр
Б. Разработанная методика с применением МАТ	146	17	129		
В. Методика Dr. P.Swenson	142	28	114		
группа 2 (три региона РФ)					
А. Молекулярно-генетические исследования	126	28	98	А и Б: 98 обр	
Б. Разработанная методика с применением МАТ	127	0	127		
ИТОГО					
А. Молекулярно-генетические исследования	272	66	206	А и Б: 189 обр	Б и В: 113 обр
Б. Разработанная методика с применением МАТ	273	17	256		
В. Методика Dr. P.Swenson	142	28	114		

Результаты, полученные с помощью методики Dr. P.Swenson, представлены только для группы представителей коренных народностей Сибири, так как хронологически эти исследования были выполнены ранее разработки собственной методики с отечественными МАТ, и к моменту исследования оставшейся части образцов (три региона РФ, *группа 2*) с целью типирования ВГВ для сопоставления данных эти реагенты закончились.

3.2. Результаты анализа геномных последовательностей вирусной ДНК

Результаты молекулярно-генетических исследований ВГВ в HBsAg-положительных образцах плазм крови представителей коренных народностей Сибири, собранных в экспедициях 1992-2006 гг (группа 1, всего 146 образцов, анализ ДНК ВГВ был проведен для 108 изолятов, так как в 38 образцах ДНК ВГВ не детектировалась), были представлены ранее в работе Мануйлова В. А. (Мануйлов и др., 2015). В сравнительные испытания результатов двух методик вошли 108 охарактеризованных молекулярно-генетическими методами образцов (изолятов ВГВ), в которых были установлены следующие субтипы HBsAg/ генотипы ВГВ: ayw2/D – 67, ayw3/D – 27, ayw4/D – 4, adr_q+/C – 7, adw2/A – 1, adw2/C – 1, adw2/D – 1. Согласно этому ранее проведенному анализу нуклеотидных последовательностей изолятов ВГВ, некоторые образцы не были «типичными». Так, в одном случае (АЛ482) был предсказан субтип HBsAg adw2 и определен генотип С ВГВ, но последовательность соответствовала рекомбинантному варианту между А и С; еще один вариант (МУЖ240) был определен как adw2, но представлял собой рекомбинант между А и D (подробно в работе Мануйлов и др., 2015). Результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в выделенных из данных образцов плазм крови изолятах вируса представлены в Приложении 7 с разрешения автора.

Результаты молекулярно-генетических исследований образцов сывороток крови из другой выборки (группа 2; 126 образцов, получены в 2017-2019 гг от пациентов с диагнозом ХГВ из трех регионов России), были выполнены на базе лаборатории ПЦР АО «Вектор-Бест» Сергеевой Е. И. и кратко представлены в данной работе в объеме, необходимом для проведения сравнительных испытаний разработанной методики субтипирования HBsAg/ генотипирования ВГВ. ДНК ВГВ была выделена из 98/126 (67,1%) HBsAg-положительных образцов крови пациентов с диагнозом ХГВ трех регионов России (образец БЛАГ20 не передавали для исследования молекулярно-генетическими методами, так как он закончился, но с помощью разработанных реагентов данный образец был исследован, в связи с этим исходное количество образцов – 126 вместо 127). Установленные генотипы ВГВ и предсказанные субтипы HBsAg представлены в Приложении 8. В 98/98 (100%) образцах, охарактеризованных молекулярно-генетическими методами, определен генотип ВГВ: А – 10 (10,2%), С – 1 (1,0%), D – 87 (88,8%). Сложности при определении предсказанного субтипа HBsAg возникли для 5/98 (5%) образцов.

Так, для образцов БАР11 и 10-00907 не выведен АО в 122 позиции, определяющий субдетерминанту «y/d»; для образца БАР45 – не выведен АО в 127 положении, ответственный за идентификацию субдетерминанты «w2/3/4»; для образца 10-01709 – обнаружена замена 122Т и не удалось вывести АО в 127, 134 положениях; для образца БЛАГ12 – замена 127S. Для остальных 93 образцов были выведены АО и предсказаны субтипы HBsAg: 52/98 (53%) ayw2/D, 29/98 (30%) ayw3/D, 9/98 (9%) adw2/A, 1/98 (1%) adrq+/C, 2/98 (2%) ayw4/D.

В 28/126 (22%) образцах ДНК ВГВ не детектировалась; эти образцы были исследованы, соответственно, только в ИФА с МАТ в разработанной нами методике.

Таким образом, молекулярно-генетическими методами охарактеризовано 108 образцов плазм крови представителей коренных народностей Сибири и 98 образцов сывороток крови пациентов с диагнозом ХГВ трех регионов России, что составило в общей сложности 206 образцов. Установленные в них субтипы HBsAg и генотипы ВГВ позволяют говорить о том, что данная выборка в достаточной степени представляет генотипическое и серотипическое разнообразие ВГВ, характерное для территории РФ, и является репрезентативной для проведения сравнительных испытаний разработанной методики субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ с другими методиками.

3.3. Результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах плазм крови, полученные по методике Dr. P.Swenson

Результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах плазм крови по методике Dr. P.Swenson представлены в Приложении 2.

Не все 146 образцов плазм крови от представителей коренных народностей Сибири, взятые для сравнительных испытаний, были протестированы по методике Dr. P.Swenson (4 закончились). Из 142 образцов плазм, взятых в сравнительные испытания, 10 (7%) не реагировали с МАТ. Еще 18 образцов, хоть и демонстрировали наличие реакций, но их совокупность не позволяла сделать однозначный вывод по субтипу HBsAg (подробно см. в Приложении 2). Наиболее типичная проблема в интерпретации этих 18 образцов была связана с получением сигналов ОП в зоне ОП_{крит} при взаимодействии со всеми МАТ, и затрудняло формулирование четких выводов по типированию ВГВ, в связи с чем результаты этих образцов были признаны не валидными, и в дальнейшем не были использованы для сопоставительного анализа двух серологических методик.

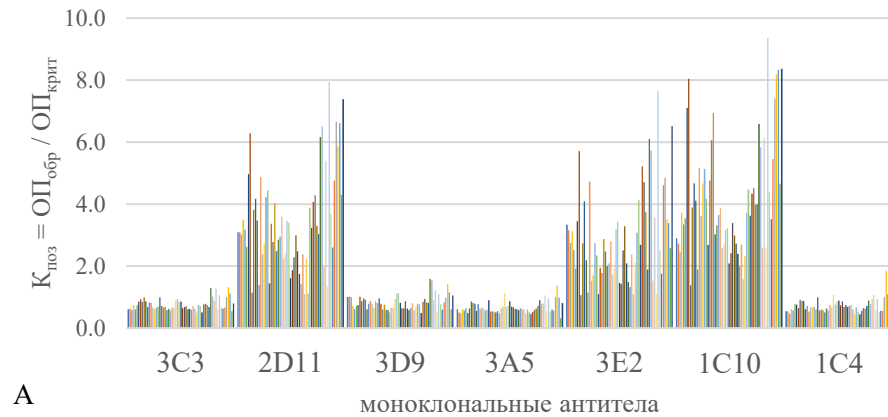
В итоге при определении субтипов HBsAg и генотипов ВГВ по методике Dr. P.Swenson результаты были признаны валидными для 114/142 (80,3%) образцов. Эти результаты распределились следующим образом: 72/114 (63%) ayw2/D, 30/114 (26%) ayw3/D, 3/114 (3%)

adw2/A, 9/114 (8%) adrq+/C. На Рисунке 10 представлены типичные «серологические портреты» образцов, содержащих указанные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ.

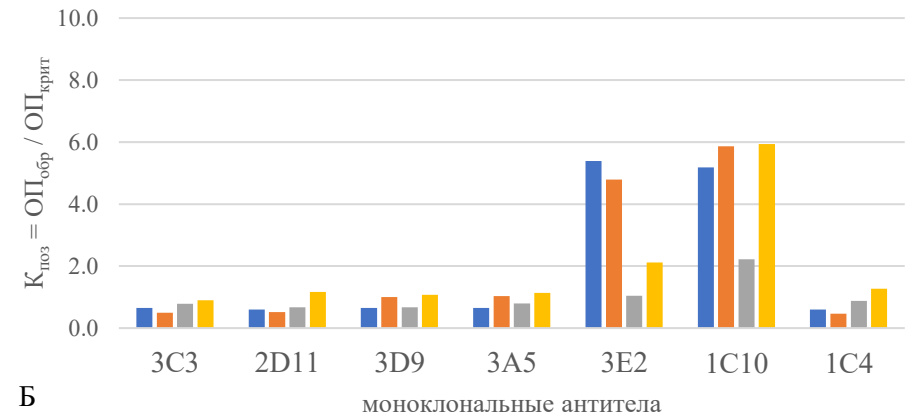
Полученные по методике Dr. P.Swenson результаты определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ сопоставимы с результатами молекулярно-генетических исследований, опубликованными в работе (Мануйлов и др., 2015) по генотипическому разнообразию ВГВ в образцах представителей коренного населения Сибири. Стоит отметить, что вклад adrq+ субтипа HBsAg был обусловлен образцами, полученными от жителей п-ва Таймыр (Красноярский край, шифры «ВО» и «ДУ»).

Оценку воспроизводимости методики проводили с помощью КВ, который вычисляли для значений ОП, полученных с каждым из МАТ 3С3, 2D11, 3D9, 3А5, 3Е2, 1С10, 1С4 как отношение стандартного отклонения к среднему значению ОП, по результатам исследования 4 повторов образца УВ2 (разведенного в 6 раз согласно методике), содержащего субтип HBsAg ауw2 генотипа D ВГВ. Значение КВ составило 6,7%.

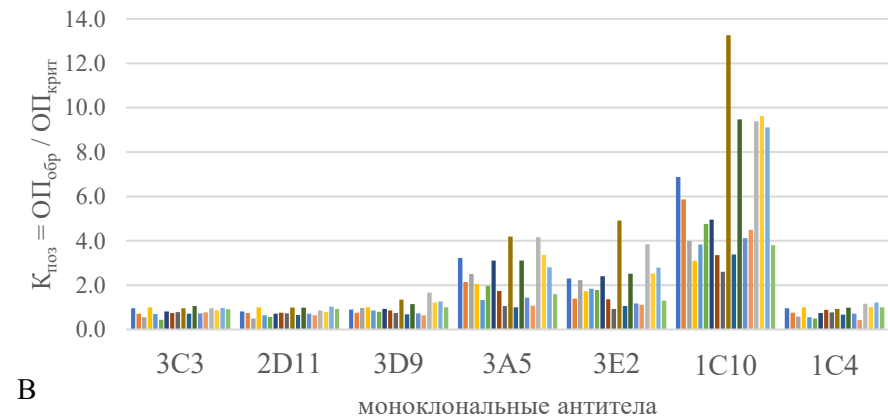
ayw2 субтип HBsAg (генотип D ВГВ) в образцах плазм крови коренных народностей Сибири



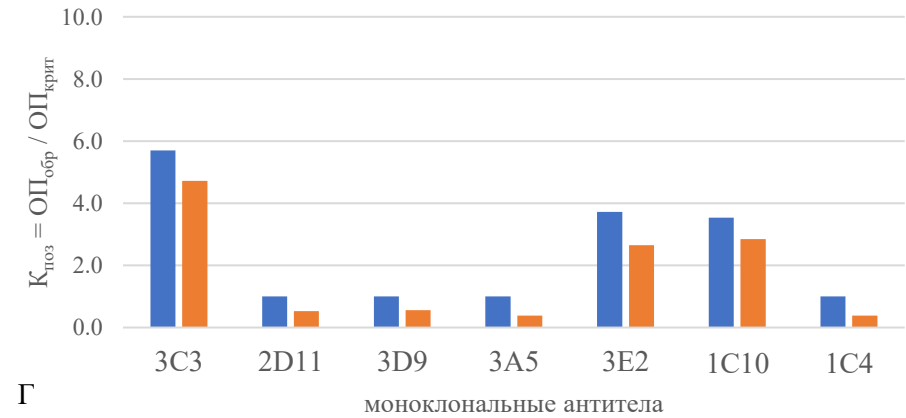
ayw3varA субтип HBsAg (генотип D ВГВ) в образцах плазм крови коренных народностей Сибири



ayw3varB субтип HBsAg (генотип D ВГВ) в образцах плазм крови коренных народностей Сибири



adw2 субтип HBsAg (генотип A ВГВ) в образцах плазм крови коренных народностей Сибири



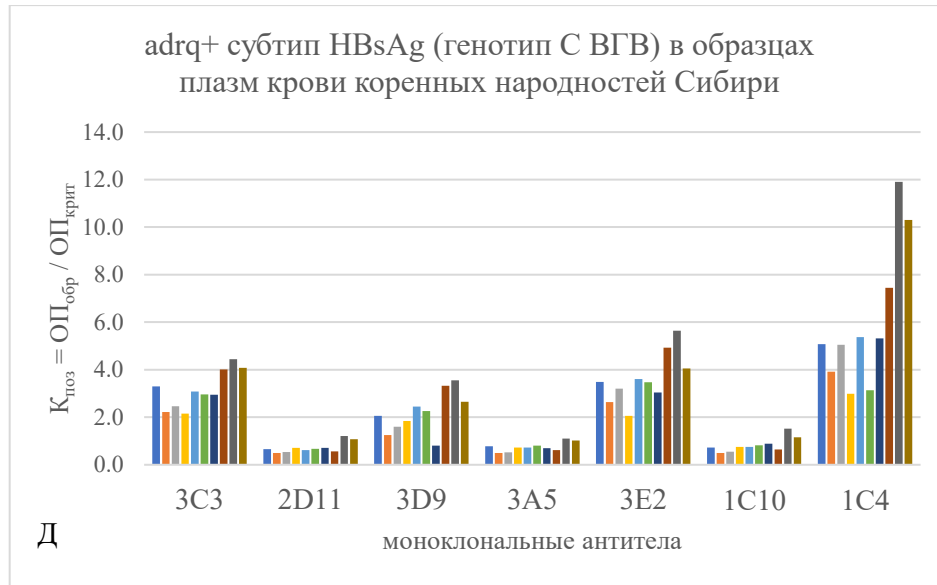


Рисунок 10. «Серологические портреты» образцов, содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ, определенные с помощью методики Dr. P.Swenson в образцах плазмы крови коренных народностей Сибири (представлены результаты определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ, полученные лично автором, которые публикуются впервые; в дальнейший сопоставительный анализ дополнительно вошли результаты исследований, также выполненные с помощью методики Dr. P.Swenson, 29 HBsAg-положительных образцов крови представителей коренных народностей Сибири, опубликованные ранее (Нетесова, 2002). Показаны индивидуальные значения $K_{поз}$ образцов. Значение $KВ$ по результатам исследования 4 повторов образца, содержащего HBsAg субтипа ауw2, составило 6,7% (определяли в отдельном эксперименте).

А. ауw2 (генотип D ВГВ, N=61). Б. ауw3varA (генотип D ВГВ, N=4). В. ауw3varB (генотип D ВГВ, N=18). Г. адw2 (генотип A ВГВ, N=2). Д. адrq+ (генотип C ВГВ, N=10)

3.4. Разработка методики определения субтипов HBsAg / генотипов ВГВ в HBsAg положительных образцах сывороток и плазм крови человека с использованием МАТ анти-HBs АО «Вектор-Бест»

3.4.1. Подбор МАТ для целей субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ

На первом этапе подбора моноклональные антитела были исследованы в виде АЖ с образцами ВП «базовая», на втором – в виде конъюгатов, меченых пероксидазой хрена (ПХ), как более удобный вариант для практического применения, с образцами ВП «расширенная».

Ранее в лаборатории гибридных технологий НИИ СД АО «Вектор-Бест» была получена представительная панель из 66 мышинных МАТ против HBsAg при иммунизации животных сывороточным антигеном субтипа «ау» в 1992 году и рекомбинантным дрожжевым субтипа «ad» в 2004 году.

В данной работе было исследовано 33 МАТ анти-HBs, остальные были утилизированы ранее как не имеющие перспективы (во время тестирования не было коллекции образцов крови, содержащих разные субтипы HBsAg). Полный список 33 исследованных МАТ анти-HBs и их реакции с HBsAg-положительными образцами ВП «базовая» приведены в Приложении 3.

11 МАТ анти-HBs не продемонстрировали существенных различий в реакции с образцами ВКО1-5, содержащими разные субтипы HBsAg. Оставшиеся 22 МАТ (см. Приложение 4) были отобраны для дальнейшей работы и объединены в группы по сходным проявлениям реакций с HBsAg разной субтиповой принадлежности. Из них было выбрано сначала 6 (Таблица 5), а затем 4 МАТ анти-HBs, продемонстрировавших специфические (отличающиеся) реакции с образцами ВКО1-5, содержащими разные субтипы HBsAg, в качестве главных кандидатов для разрабатываемой методики субтипирования HBsAg.

Эти 4 МАТ вошли в первую версию методики субтипирования HBsAg/ генотипирования ВГВ. Была выдвинута гипотеза, согласно которой сочетание реакций образцов с выбранными МАТ анти-HBs позволит установить субтип HBsAg в исследуемом образце. Для проверки данной гипотезы была использована ВП «расширенная», состоящая из 48 образцов сывороток крови пациентов с ВГВ из разных регионов Российской Федерации (Приложение 1), в которых субтип HBsAg был установлен ранее по методике Dr. P.Swenson (7 образцов ауw2 субтипа HBsAg, 11 образцов ауw3, 12 образцов adrq+, 18 образцов adw2).

При исследовании 48 образцов крови из ВП «расширенная», содержащих HBsAg разных субтипов и полученных из разных регионов Российской Федерации, с помощью выбранных 4 конъюгатов МАТ анти-HBs результаты совпали в 100% случаев с полученными ранее по методике Dr. P.Swenson результатами определения субтипов HBsAg в этих образцах.

Таблица 5. Отобранные МАТ анти-НВs (n=6), результаты представлены в виде К_{поз}

Субтип НВsAg	Образец	МАТ анти-НВs					
		16F8	3E1	10F1	13D4	16G5	17H2
		Разведение					
		1/10000	1/250	1/50	1/500	1/10000	1/500
ayw2	ВКО1	0,1	1,6	2,0	0,2	1,4	1,7
ayw3varA	ВКО2	0,3	2,9	3,7	0,3	0,3	0,0
ayw3varB	ВКО3	0,3	2,9	4,0	0,3	0,3	0,0
adw2	ВКО4	1,3	0,1	0,3	1,4	1,8	3,6
adrq+	ВКО5	1,3	0,1	1,9	0,1	2,9	0,3
		16F8	3E1	-	13D4	-	17H2

3E1 (далее по тексту E1) для отличия ay- и ad-, *предположительно видит эпитоп, содержащий аминокислотный остаток в 122 положении,*

17H2 (далее по тексту H2) для отличия ayw2 и ayw3, *предположительно видит эпитоп, содержащий аминокислотный остаток в 127 положении,*

13D4 (далее по тексту D4) для отличия adw2 и adrq+, *предположительно видит эпитоп, содержащий аминокислотный остаток в 160 положении,*

16F8 (далее по тексту F8) в качестве положительного контроля (подтверждения) ad-субтипа.

Таким образом, была создана первая версия методики с 4 высокоспецифичными МАТ анти-НВs (E1, H2, D4, F8), комбинация реакций с которыми позволяла определять основные циркулирующие на территории Российской Федерации субтипы НВsAg (ayw2, ayw3, adw2, adrq+). На данном этапе разработки основной целью являлась идентификация в образцах сывороток и плазм крови человека исключительно субтипов НВsAg и была предусмотрена для исследования образцов с содержанием НВsAg 100 МЕ/мл.

3.4.2. Подбор условий проведения ИФА

3.4.2.1. Одностадийный вариант ИФА. Двухэтапная стратегия субтипирования НВsAg

Для исследования НВsAg-положительных образцов крови человека с целью установить в них субтип НВsAg был предложен алгоритм двухэтапного тестирования с помощью конъюгатов отобранных 4 высокоспецифичных МАТ-ПХ (E1, H2, D4, F8); методика была рассчитана на исследование образцов, разведенных до содержания НВsAg в них 100 МЕ/мл. В этом случае на первом этапе при взаимодействии с парой конъюгатов E1 и H2 возможно дифференцировать субтипы ayw2 и ayw3, а образцы, содержащие субтип НВsAg «ad», будут демонстрировать отрицательную реакцию с конъюгатом E1. При тестировании таких образцов на следующем этапе с другой парой конъюгатов D4 и F8 возможно дифференцировать субтипы НВsAg adrq+ и adw2. Таким образом, алгоритм тестирования первой версии методики выглядел следующим образом.

Первый этап. В первые две лунки планшета вносили по 100 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО), представляющего собой пул отрицательных сывороток, не содержащих HBsAg и антител к нему В оставшиеся лунки вносили в дублях по 100 мкл исследуемых образцов сыворотки, плазмы крови, разведенные предварительно в ОКО до концентрации HBsAg в них 100 МЕ/мл. Добавляли в каждую первую лунку контролей и исследуемых образцов по 50 мкл конъюгата E1, в каждую вторую лунку - по 50 мкл конъюгата H2. Заклеивали клейкой пленкой и выдерживали в течение 1 часа при температуре 37°C. Промывали лунки планшета 5 раз раствором фосфатно-солевого буфера с твином (ФСБ-Т). Добавляли в каждую лунку по 100 мкл субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. Инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут в защищенном от света месте. Останавливали реакцию добавлением 100 мкл 0,5М серной кислоты. Регистрацию полученных значений ОП проводили в двухволновом режиме: основной фильтр 450 нм, референсный - 620 нм. Вычисляли значение ОП_{крит} для каждого конъюгата МАТ-ПХ отдельно. Реакцию считали положительной, если ОП_{сыв} ≥ ОП_{крит}.

Второй этап. Второй этап проводили аналогично первому этапу, используя другую пару конъюгатов МАТ-ПХ F8 и D4, применительно к тем образцам, которые на первом этапе демонстрировали отрицательную реакцию с МАТ-ПХ E1.

Результаты интерпретировали с помощью Таблицы 6.

Таблица 6. Интерпретация результатов анализа HBsAg+ образцов

	МАТ	Субтип HBsAg			
		Ауw2 генотип D ВГВ	Ауw3varA&B генотип D ВГВ	Адw2 генотип А ВГВ	Адrq+ генотип С ВГВ
1-й этап	E1	+	+	-	-
	H2	+	-	+	+
2-й этап	F8	Определены на 1-м этапе		+	+
	D4			+	-

Для практического применения исследование образцов, разведенных таким образом, чтобы концентрация в них антигена достигала 100 МЕ/мл, представлялось не очень удобным, так как требовало предварительного определения концентрации HBsAg. Практичнее было исследовать образцы, приготовленные определенным стандартным способом независимо от исходной концентрации HBsAg в них (или исследовать без разведения, что было бы предпочтительнее, так как в этом случае отсутствует необходимость в дополнительных процедурах, и, соответственно, есть возможность избежать дополнительных ошибок и

манипуляций, временных и трудовых затрат; но при этом увеличивается расход исследуемого образца, некоторые из которых могут быть весьма редкими экземплярами и представлять большую ценность для исследователя). В связи с этим было предложено в рамках данной методики проводить исследование образцов, разведенных в 10 раз в нормальной человеческой сыворотке, не содержащей HBsAg и антител к нему. В зависимости от полученного результата далее необходимо либо исследовать образец без разведения, либо, наоборот, в дополнительном разведении.

В данном алгоритме используется классический вариант ИФА «сэндвич». Анти-HBs, сорбированные в лунках иммуносорбента, с одной стороны, и антитела, конъюгированные с ПХ, с другой стороны, связываются с антигеном, присутствующим в образце сыворотки/плазмы. При исследовании образцов с высокой концентрацией HBsAg при совместной инкубации (одновременное внесение сыворотки крови и конъюгата антител с ПХ) возможно проявление эффекта высоких концентраций (так называемый «hook-effect»), что и было обнаружено. Например, для нативного образца УВ3 (из него приготовлен контрольный образец ВКО2), в котором присутствует HBsAg субтипа ауw3varA с исходной концентрацией $6,3 \cdot 10^4$ МЕ/мл, определенной против третьего международного стандарта (URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/12-226.pdf>), характерно наличие реакции с МАТ-ПХ Е1; при этом при исследовании этого образца без разведения значение сигнала ОП было 0,122 о.е., а при разведении его в 10 раз значение ОП в пределах той же постановки составило 0,916 о.е. (Таблица 7). Аналогичная ситуация наблюдалась для нативного образца УВ5 (из него приготовлен контрольный образец ВКО3), содержащим HBsAg субтипа ауw3varB: значения ОП с конъюгатом Е1 составили 0,466 о.е. при исследовании образца без разведения и 1,919 о.е. – при разведении в 10 раз, соответственно. Для двух нативных образцов, содержащих HBsAg субтипов ad-, при взаимодействии с конъюгатом МАТ-ПХ D4, картина была схожей. Так, для образца Р2 (из него приготовлен контрольный образец ВКО4, содержит HBsAg субтипа adw2) значения ОП при исследовании без разведения и в разведении в 10 раз составили: 2,029 и 3,352 о.е., а для образца РОСХ (из него приготовлен контрольный образец ВКО5, содержит HBsAg субтипа adrq+) – 0,257 и 0,833 о.е. соответственно (Таблица 7).

Помимо причин, указанных в предыдущем абзаце, были и другие, диктующие необходимость перехода к двухстадийному протоколу проведения ИФА и одноэтапной стратегии субтипирования HBsAg:

- реакции образцов, содержащих HBsAg субтипа adrq+, с МАТ-ПХ Н2 не всегда были положительные, вследствие чего при исследовании их на первом этапе можно было получить отрицательные результаты как с МАТ-ПХ Е1, так и Н2, что могло приводить к ошибочному заключению о невалидном результате исследования, так как не очевидны причины отсутствия

этих реакций (либо концентрация HBsAg ниже предела обнаружения методики, либо это HBsAg adrq+ субтипа);

- удобство для потребителя (проведение анализа в один этап).

Таблица 7. Значения ОП образцов УВ3, УВ5, Р2, РОСХ, исследованных без разведения и в разведении в 10 раз, в одностадийном варианте ИФА (реакции с МАТ-ПХ)

Шифр образца	УВ3		УВ5		Р2		РОСХ	
Субтип HBsAg	ayw3varA		ayw3varB		adw2		adrq+	
МАТ	без разведения	в 10 раз	без разведения	в 10 раз	без разведения	в 10 раз	без разведения	в 10 раз
E1	0,122	0,916	0,466	1,919	-	-	-	-
H2	0,049	0,054	0,019	0,017	-	-	-	-
F8	-	-	-	-	0,002	0,001	0,002	0,001
D4	-	-	-	-	2,029	3,352	0,257	0,833

Таким образом, возникло несколько причин для пересмотра подходов к алгоритму методики: условиям проведения ИФА и, как впоследствии выяснилось, к выбору МАТ.

3.4.2.2. Переход к двухстадийному варианту ИФА и одноэтапной стратегии субтипирования HBsAg. Введение конъюгата SM

Первая версия разрабатываемой методики была дополнена МАТ С4, который в смеси с МАТ F8 был назван SM (смесь) и определял одно из ключевых условий валидности результата исследуемого образца: для всех вариантов субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ наличие положительной реакции, то есть коэффициент позитивности ($K_{\text{поз}}$), вычисленный как $\text{ОП}_{\text{обр}}(\text{SM}) / \text{ОП}_{\text{крит}}(\text{SM})$ должен превышать 1, а для образцов субтипа adrq+/ генотипа С этот критерий жестче – $K_{\text{поз}}$ должен превышать 2.

Важным дополнением к алгоритму методики стало сформулированное требование к результатам образцов, в которых из-за высокой концентрации HBsAg значения ОП положительных реакций с разными конъюгатами МАТ-ПХ отличались в 10 раз и более: такие образцы необходимо дополнительно разводить в 10 раз и исследовать повторно. Так, например, при тестировании серии последовательных разведений образца УВ3, содержащего $6,3 \cdot 10^4$ МЕ/мл HBsAg, было показано, что результат интерпретировался верно для образца УВ3, разведенного в 100 или 1000 раз, но не в 10 раз или без разведения. В реакциях с выбранными конъюгатами МАТ-ПХ (Таблица 8) для образца УВ3, исследованного без разведения, полученные сигналы ОП (превышающие $\text{ОП}_{\text{крит}}$) составили 3,954, 3,944, 0,246 о.е., при этом были значения ОП, превышающие $\text{ОП}_{\text{крит}}$ и отличающиеся более чем в 10 раз, например, 3,954 и 0,246. То же самое мы наблюдали для образца УВ3, разведенного в 10 раз, сигналы ОП составляли 3,957, 3,648, 0,151

о.е., при этом были значения ОП, отличающиеся более чем в 10 раз, например, 3,957 и 0,151. При дальнейшем разведении данного образца в 100 и 1000 раз сигналы ОП, превышающие ОП_{крит}, отличались между собой менее, чем в 10 раз; в этих случаях результат интерпретировался однозначно и соответствовал субтипу HBsAg ауw3. Данный алгоритм интерпретации результатов был отражен в соответствующей предложенной инструкции.

Таблица 8. Значения ОП образца УВ3, исследованного в разных разведениях (1, 10, 100, 1000), в двухстадийном варианте ИФА (реакции с МАТ-ПХ)

		SM	E1	H2	D4
ОКО среднее		0,016	0,013	0,041	0,028
ПКО-ау		2,637	2,689	3,954	3,955
ПКО-ad		3,956	0,024	3,955	3,954
УВ3	1	3,954	3,944	0,246	0,025
	в 10	3,957	3,648	0,151	0,016
	в 100	3,107	3,299	0,062	0,018
	в 1000	0,684	0,880	0,020	0,017

Таким образом, был сгенерирован итоговый формат проведения ИФА, по протоколу которого и была в дальнейшем проведена апробация методики автором в АО «Вектор-Бест», также проверены характеристики и оценена применимость данной методики (комплекта реагентов) независимыми исследователями. Итоговый алгоритм исследования образцов сывороток (плазм) крови человека был прописан следующий:

1. Каждый из образцов (контрольных и исследуемых) вносят в объеме 100 мкл в четырех повторах в лунки 96-луночного планшета, сорбированного ПАТ против HBsAg.
2. После инкубации в течение 3 часов при 37°C, лунки планшета пятикратно отмывают раствором ФСБ-Т.
3. В каждую первую лунку с образцом вносят конъюгат SM, в каждую вторую лунку – конъюгат E1, третью - H2, четвертую – D4, каждый в объеме 100 мкл.
4. После инкубации в течение 2 часов при 37°C лунки планшета пятикратно отмывают раствором ФСБ-Т.
5. Ферментативную стадию ИФА с раствором ТМБ и перекиси водорода проводят в течение 30 минут при комнатной температуре (20-25) °C в защищенном от света месте (100 мкл).
6. Реакцию останавливают добавлением 0,5 М серной кислоты в объеме 100 мкл.

Регистрацию результатов осуществляют в двухволновом режиме измерения оптического поглощения: основная длина волны - 450 нм, референсная - 620 нм. Подсчет значения ОП_{крит} проводят для каждого конъюгата МАТ-ПХ отдельно: ОП_{крит} = ОП (ОКО) + 0,1. Реакцию считают положительной, если отношение ОП_{обр} / ОП_{крит} ≥ 1. Результаты оценивают согласно Таблице 9.

Таблица 9. Результаты реакций конъюгатов МАТ-ПХ с образцами сывороток/плазм крови, содержащими HBsAg различных субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ

Субтип HBsAg/ генотип ВГВ	МАТ-ПХ			
	SM	E1	H2	D4
adw2/ A	+	-	*	+
adrq+/ C	+	-	*	-
ayw2/ D	+	+	+	*
ayw3/ D	+	+	-	*

Серым цветом показаны реакции, обязательные для интерпретации;

*результат не учитывается

Образцы сначала исследуют разведенными в 10 раз в ОКО, представляющем собой пул отрицательных донорских сывороток, не содержащих HBsAg и анти-HBs. Если при исследовании разведенного в 10 раз образца получена отрицательная реакция с конъюгатом SM, то образец исследуют повторно без разведения. Если образец без разведения также не демонстрирует реакций, результаты исследований данного образца признают не валидными.

Если среди значений ОП образца, превышающих ОП_{крит}, есть значения ОП, отличающиеся более чем в 10 раз, такой образец следует развести в ОКО дополнительно в 10 и 100 раз, провести анализ заново.

Пример:

	Конъюгат МАТ-ПХ			
	SM	E1	H2	D4
ОП _{крит}	0,110	0,108	0,115	0,120
ОП _{обр}	3,920	3,850	0,150	0,060
Реакция	+	+	+	—
Вычисления	$3,920 / 0,150 = 26,1$ (отличаются более, чем в 10 раз)			
Действия	Образец дополнительно развести в ОКО в 10 и 100 раз и провести анализ заново			

Если при исследовании образца сделан вывод «Субтип Adrq+/ генотип С ВГВ», необходимо воспользоваться следующей таблицей.

Субтип adrq+ / генотип С ВГВ		
К _{поз} образца с конъюгатом SM более 2,0	Результаты валидны	
К _{поз} образца с конъюгатом SM от 1,0 до 2,0	исследован образец в разведении в 10 раз	переставить не разведенным (принять результаты исследования не разведенного образца) или подтвердить другим методом
	исследован не разведенный образец	подтвердить другим методом

Неопределённый результат может быть обусловлен заменами (мутациями) в нуклеотидной последовательности ДНК ВГВ исследуемого образца, и, как следствие, заменой аминокислот/ы, в субтип-значимых положениях. Замены могут возникать в процессе лечения, поэтому необходимо определять субтип HBsAg до лечения.

3.4.3. Определение генотипов ВГВ

С учетом того, что в РФ встречаются определенные сочетания субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ (Чуланов, 2013), а именно ауw2/D ауw3/D adw2/A adrq+/C, для определения генотипов ВГВ возможно применить данную методику с некоторой модификацией. Как было показано выше, МАТ Н2 позволяет дифференцировать серотипы HBsAg ауw2 и ауw3 друг от друга в пределах одного генотипа D, и поэтому реакция с данным МАТ не имеет значения при установлении генотипа ВГВ в данной методике. Таким образом, исследование HBsAg-положительных образцов сывороток/плазм крови с тремя конъюгатами МАТ-ПХ (SM, E1, D4) позволит сделать вывод о генотипе ВГВ: А, С или D (Таблица 10). Определяемые таким образом генотипы ВГВ будут являться ассоциированными с серотипами HBsAg.

Расчет ОП_{крит} и К_{поз} в этом случае проводится аналогично ранее приведенному алгоритму, для каждого конъюгата МАТ-ПХ значение ОП_{крит} вычисляется отдельно.

Таблица 10. Результаты реакций конъюгатов МАТ-ПХ с образцами сывороток/плазм крови, содержащими разные генотипы ВГВ

Генотип ВГВ/ субтип HBsAg	МАТ-ПХ		
	SM	E1	D4
A (HBsAg adw2)	+	-	+
C (HBsAg adrq+)	+	-	-
D (HBsAg ауw2, ауw3)	+	+	*

**результат не учитывается*

Таким образом, данная методика позволяет определить четыре субтипа HBsAg (ауw2, ауw3, adw2, adrq+), а также ассоциированные с ними генотипы ВГВ (А, С, D), и применима на территориях, где распространены указанные сочетания субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ: ауw2/D, ауw3/D, adw2/A, adrq+/C, то есть, на территории РФ и странах бывшего СССР. Результаты апробации данной методики представлены в следующих разделах.

3.4.4. Оценка воспроизводимости методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека

Воспроизводимость методики оценивали в отдельном эксперименте по результатам исследования 8 повторов каждого из образцов ВКО1-ВКО5, содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ. Для оценки воспроизводимости использовали КВ, который вычисляли для значений ОП, полученных с каждым из конъюгатов МАТ-ПХ (SM, E1, H2, D4) как отношение стандартного отклонения к среднему значению ОП. Вычисленные значения КВ варьировали от 3,5% до 8,4% для значений ОП, превышающих ОП_{крит} (положительный результат), и от 12,1% до 18,0% для значений ОП ниже ОП_{крит} (отрицательный результат) (Таблица 11). Среднее значение КВ, оцененное по результатам исследования 8 повторов каждого из образцов ВКО1-ВКО5, содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ, составило 10,0% (95% ДИ: от 8,9% до 11,1%).

Таблица 11. Оценка воспроизводимости разработанной методики субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ

Образец	Параметр	Конъюгаты МАТ-ПХ				КВ ВКО, %
		SM	E1	H2	D4	
ВКО1 (N=8)	ОП _{сред}	0,182	0,253	0,343	0,042	8,6
	Ст. откл.	0,011	0,018	0,031	0,005	
	КВ, %	6,2	7,0	9,0	12,3	
ВКО2 (N=8)	ОП _{сред}	0,251	0,349	0,014	0,032	9,0
	Ст. откл.	0,009	0,016	0,002	0,004	
	КВ, %	3,5	4,6	14,4	13,4	
ВКО3 (N=8)	ОП _{сред}	0,206	0,302	0,016	0,028	10,7
	Ст. откл.	0,016	0,024	0,002	0,004	
	КВ, %	7,7	8,0	13,0	14,0	
ВКО4 (N=8)	ОП _{сред}	0,286	0,008	0,370	0,276	9,6
	Ст. откл.	0,018	0,002	0,024	0,022	
	КВ, %	6,3	18,0	6,5	7,8	
ВКО5 (N=8)	ОП _{сред}	0,189	0,008	0,042	0,029	11,8
	Ст. откл.	0,016	0,001	0,005	0,004	
	КВ, %	8,4	14,2	12,1	12,6	
КВ средн., %						10,0
95% ДИ						от 8,8 до 11,1

3.4.5. Заключение по разработке методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека

Для разработки методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека были подобраны пять высокоспецифичных МАТ анти-HBs

(C4, F8, E1, H2, D4), два из которых (C4 и F8) работают в паре (SM) для определения валидности проведения анализа, другие три – разграничивают субдетерминанты y/d, w/r, w2/w3. Методика позволяет определять субтипы HBsAg ayw2, ayw3, adw2, adrq+.

Предложено исследовать образец в разведении в 10 раз, при необходимости – возможно исследование образца без разведения, а также в дополнительном разведении.

Были подобраны оптимальные условия проведения ИФА: при 37°C последовательное инкубирование в течение трех, затем еще двух часов. Ферментативная стадия занимает 30 минут при комнатной температуре.

В целях удобства применения разработана одноэтапная стратегия анализа и предложено проведение реакции с МАТ в виде конъюгатов с ПХ (МАТ-ПХ). Специальные требования к оборудованию (помимо наличия стандартного оборудования для ИФА) отсутствуют.

Предложена возможность модификации методики: исследование только с тремя конъюгатами (SM, E1, D4) для установления ассоциированного генотипа ВГВ.

Проведена оценка воспроизводимости разработанной методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ: среднее значение КВ по результатам исследования 8 повторов каждого из образцов ВКО1-ВКО5, содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ, составило 10,0% (95% ДИ: от 8,8% до 11,1%).

Таким образом, с помощью данной методики возможно определение четырех субтипов HBsAg (ayw2, ayw3, adw2, adrq+), а также ассоциированных с ними генотипов ВГВ (А, С, D). Разработанная методика определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека удобна и проста в использовании.

3.5. Апробация методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови в АО «Вектор-Бест»

3.5.1. Результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека, полученные с помощью разработанной методики

Результаты определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ, полученные с помощью разработанной методики с применением МАТ, в образцах сывороток и плазм крови представителей коренного населения Сибири (для 129/146), а также пациентов с диагнозом ХГВ трех регионов России (для 127/127) по каждому из образцов представлены в Приложениях 5 и 6 в виде $K_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{обр}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$. В Таблице 12 отражены сводные данные.

Таблица 12. Сводные данные по результатам определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах HBsAg-положительных сывороток и плазм крови, полученные с помощью разработанной методики

	Количество валидных результатов, абс. (%)	Субтипы HBsAg/генотипы ВГВ				
		Ay-/D, абс. (%)	Ayw2/D, абс. (%)	Ayw3/D, абс. (%)	Adw2/A, абс. (%)	Adrq+/C, абс. (%)
Группа 1 (коренные народности Сибири)	129 (100%)	1 (0,8%)	74 (57,4%)	42 (32,6%)	4 (3,1%)	8 (6,2%)
Группа 2 (пациенты с ХГВ трех других регионов России)	127 (100%)	0 (0,0%)	65 (51,2%)	47 (37,0%)	14 (11,0%)	1 (0,8%)
Итого	256 (100%)	1 (0,4%)	139 (54,3%)	89 (34,8%)	18 (7,0%)	9 (3,5%)

С использованием разработанных реагентов результаты субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ были получены для 256 (93,8%) из 273 HBsAg-положительных образцов сывороток и плазм крови, взятых в исследование. Для одного из этих образцов (АЛ396) удалось установить только генотип ВГВ, так как образец закончился (не проверили реакцию с конъюгатом H2, а значит, не был определен субтип HBsAg до «третьей» буквы). Стоит отметить, что с помощью разработанных реагентов для данного образца был установлен генотип D ВГВ и субтип «ау», определенный до «второй» буквы. Эти результаты совпали с указанными характеристиками ВГВ, полученными двумя другими методами (МАТ, предоставленные Dr. P.Swenson и молекулярно-генетические). Результаты исследований 17/273 образцов (6,2%) с помощью разработанной методики признаны не валидными, что связано с концентрацией HBsAg в них менее 20 МЕ/мл.

Для 256 образцов с валидными результатами тестирования в разработанной методике были сделаны следующие выводы:

- субтип HBsAg ayw2 / генотип D ВГВ – 139 (54,3%),
- субтип HBsAg ayw3 / генотип D ВГВ – 89 (34,8%),
- субтип HBsAg adw2 / генотип A ВГВ – 18 (7,0%),
- субтип HBsAg adrq+ / генотип C ВГВ – 9 (3,5%),
- субтип HBsAg ау- / генотип D ВГВ - 1 (0,4%) – образец АЛ396.

«Серологические портреты» (типичные реакции образцов с использованными МАТ SM, E1, H2, D4 в зависимости от субтипов HBsAg и генотипов ВГВ) представлены на Рисунке 11.

Результаты встречаемости генотипов ВГВ в исследованной выборке из 256 образцов совпадают с опубликованными ранее расширенными данными по генетическому разнообразию ВГВ у коренного населения Сибири, полученными на материале 143 изолятов (Мануйлов и др.,

2015), что свидетельствует о пригодности разработанной методики, как минимум, для проведения скринингового генотипирования ВГВ в эпидемиологических целях.

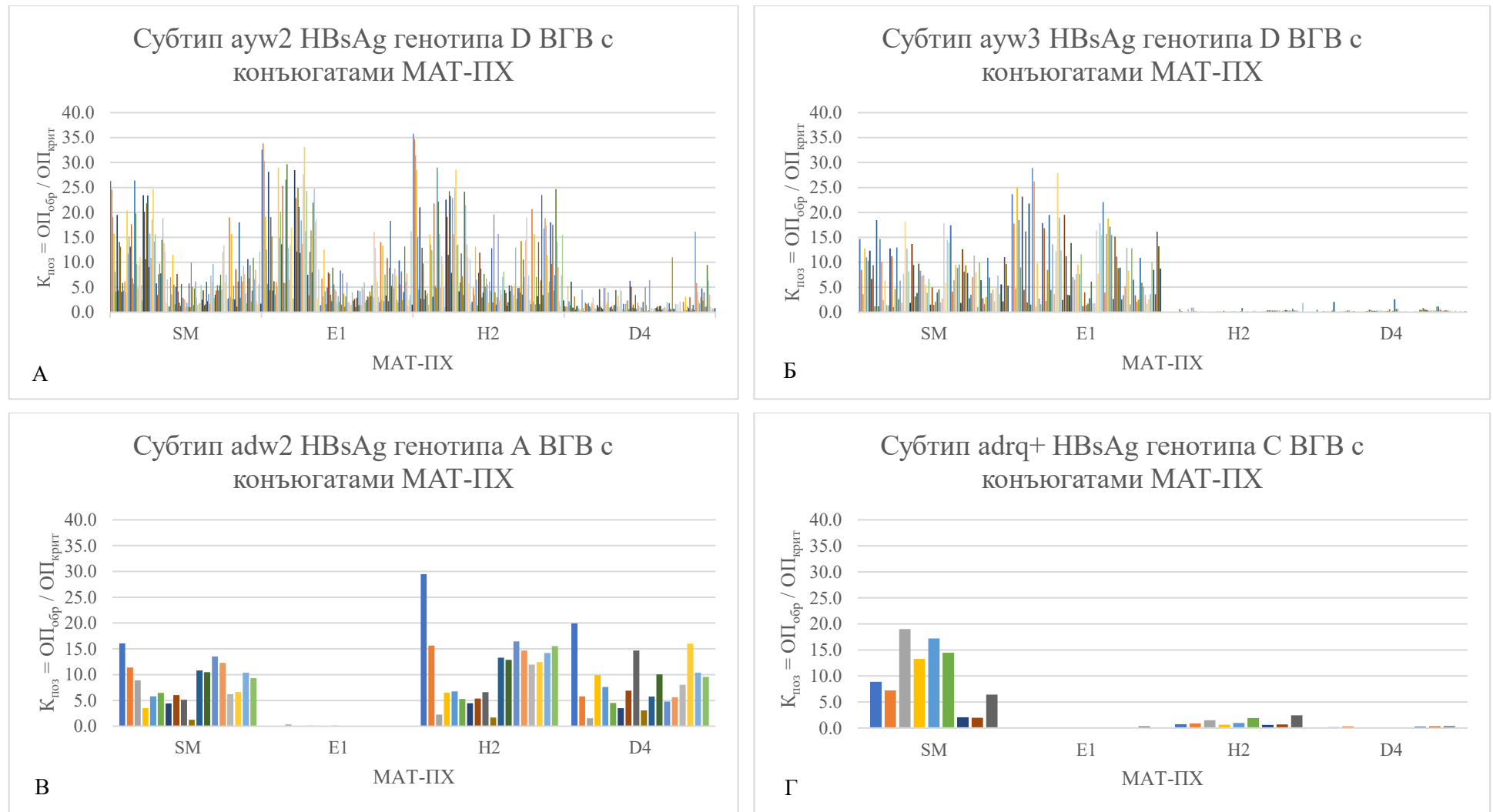


Рисунок 11. «Серологические портреты» образцов, содержащих разные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ, определенные с помощью разработанной методики. Показаны индивидуальные значения $K_{\text{поз}}$ образцов. Воспроизводимость метода была оценена в отдельном эксперименте (3.4.4. Оценка воспроизводимости методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека): значение КВ составило 10,0% (95% ДИ: от 8,8% до 11,1%).

А. ayw2 (генотип D ВГВ, N=139). Б. ayw3 (генотип D ВГВ, N=89). В. adw2 (генотип А ВГВ, N=18). Г. adrq+ (генотип С ВГВ, N=9)

3.5.2. Сопоставление полученных данных с результатами анализа геномных последовательностей вирусной ДНК выделенных изолятов

Как было сказано в предыдущем параграфе, с помощью разработанных реагентов были получены результаты субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ в общей сложности для 256 образцов. Однако не для всех 256 образцов были получены результаты молекулярно-генетических исследований, с одной стороны, равно как и не все образцы, описанные молекулярно-генетическими методами, демонстрировали реакции в разработанном тесте – с другой стороны (см. пояснения в параграфах 2.2.4. Дизайн апробации методики и 3.1. Множество полученных результатов). Результаты анализа нуклеотидных последовательностей S-гена вирусных изолятов и полученные с помощью разработанной методики результаты субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ представлены подробно в Приложениях 7 и 8.

Двумя методами одновременно было проанализировано 189 образцов (Таблица 2), из них 91 образец от представителей коренных народностей Сибири и 98 – от пациентов с ХГВ трех других регионов России. Один образец (АЛ396), о котором упоминалось в предыдущем разделе, хоть и включен в общую статистику, но субтип ау- установлен только до «второй» буквы (не проверили реакцию с H2), так как при исследовании с помощью разработанной методики объема образца оказалось не достаточным для дифференцирования субдетерминанты («w2» или «w3»), при этом по результатам реакций с тремя конъюгатами (SM, E1, D4) был установлен генотип D; заключение по установлению генотипа ВГВ, сделанное по результатам анализа нуклеотидной последовательности S-гена изолята вируса (генотип D), и с помощью МАТ в разработанной методике в ИФА, для данного образца совпало. Один образец (БЛАГ20) не передавали для исследований молекулярно-генетическими методами (в связи с тем, что закончился).

При определении генотипов ВГВ выделенных 189 изолятов вируса совпадение результатов двух методов было получено в 97,8% случаев (89/91) исследования образцов коренных народностей и в 100% случаев (98/98) при исследовании образцов из трех регионов России, что, в общей сложности, составило 98,9% (187/189). Совпадение результатов двух методов при определении субтипов HBsAg было получено в 84,6% (77/91) (коренные народности) и 91,8% (90/98) (три региона России); итого совпадение по субтипированию HBsAg было получено в 88,4% (167/189) случаев, что является хорошим показателем при сопоставлении результатов этих двух методик (Таблицы 13, 14).

Таблица 13. Сводные данные по сопоставлению результатов субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ двух методов (разработанная методика и молекулярно-генетические)

	Сопоставление результатов двух методов проведено для количества образцов, N	Совпали результаты	
		Генотип ВГВ	Субтип HBsAg
Группа 1	91	89/91 (97,8%)	77/91 (84,6%)
Группа 2	98	98/98 (100%)	90/98 (91,8%)
Итого	189	187/189 (98,9%)	167/189 (88,4%)

Частота совпадения результатов двух методов при генотипировании ВГВ и субтипировании HBsAg не зависела от исследуемой группы ($p > 0,05$)

Как видно из Таблиц 13 и 14, не все результаты гено- и субтипирования ВГВ образцов, исследованных в разработанной методике, совпали с результатами, полученными при анализе нуклеотидных последовательностей вирусных ДНК соответствующих изолятов ВГВ. Образцы с противоречивыми результатами, а также возможные причины этих расхождений рассмотрены в 3.5.4. Дискордантные результаты.

Таблица 14. Результаты субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ, полученные с помощью разработанной методики и молекулярно-генетическими методами

	Кол-во образцов	Метод		Субтип HBsAg / генотип ВГВ								
				Ay-/ D (АЛ396*)	Ayw2/ D	Ayw3/ D	Adw2/ A	Adrq+/ C	Ayw4/ D	Adw2/ C	Adw2/ D	Замены или ? АО в субтип-значимых позициях
Группа 1	91 (100%)	ИФА	Абс. (%)	1 (1,1%)	51 (56,0%)	30 (33,0%)	3 (3,3%)	6 (6,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
		МГМ	Абс. (%)	0 (0,0%)	53 (58,2%)	24 (26,4%)	1 (1,1%)	7 (7,7%)	4 (4,4%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)
Группа 2	98 (100%)	ИФА	Абс. (%)	0 (0,0%)	57 (58,2%)	30 (30,6%)	10 (10,2%)	1 (1,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	-
		МГМ	Абс. (%)	0 (0,0%)	52 (53,1%)	29 (29,6%)	9 (9,2%)	1 (1,0%)	2 (2,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (5,1%)
ИТОГО	189 (100%)	ИФА	Абс. (%)	1 (0,5%)	108 (57,1%)	60 (31,7%)	13 (6,9%)	7 (3,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
		МГМ	Абс. (%)	0 (0,0%)	105 (55,6%)	53 (28,0%)	10 (5,3%)	8 (4,2%)	6 (3,2%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	5 (2,6%)

ИФА – иммуноферментный анализ

МГМ – молекулярно-генетические методы

**АЛ396 - с помощью разработанных реагентов для данного образца был установлен генотип D ВГВ и субтип «ay», определенный верно до «второй» буквы (образец закончился). Эти результаты совпали с указанными характеристиками ВГВ, полученными двумя другими методами (МАТ, предоставленные Dr. P.Swenson, и молекулярно-генетические методы).*

Распределения вариантов ВГВ, полученные двумя сравниваемыми методами, не отличаются ($p > 0,05$)

3.5.3. Сопоставление полученных данных с результатами субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ с использованием методики Dr. P.Swenson

Как упоминалось ранее, эта часть работы была выполнена только для образцов крови представителей коренного населения Сибири (см. пояснения в 2.2.4. Дизайн апробации методики и 3.1. Множество полученных результатов). Результаты субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ, полученные по методике Dr. P.Swenson, представлены по каждому из образцов в виде $K_{\text{поз}}$ в Приложении 2 и подробно изложены в разделе 3.3. Результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах плазм крови, полученные по методике Dr. P.Swenson. Тестирование образцов по методике Dr. P.Swenson было проведено для 108 образцов с наличием ДНК ВГВ и для 38 с недетектируемым уровнем ДНК ВГВ. Сопоставление результатов субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ, выполненное с помощью двух серологических методик (разработанная и Dr. P.Swenson) для каждого из исследуемых образцов, представлено в Приложении 7.

Для сопоставления результатов двух серологических методик были взяты образцы, для которых, во-первых, по методике Dr. P.Swenson был однозначно определен субтип HBsAg (таких образцов было 114/146 (78.1%)), а во-вторых, результаты были получены в обеих сравниваемых методиках. Таким образом, сопоставить результаты оказалось возможным для 113 образцов, прореагировавших одновременно в двух методиках (образец ДУ28 не демонстрировал реакций в разработанной нами методике) (Таблица 15).

Таблица 15. Сопоставление результатов субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ, полученных с помощью разработанной методики и по методике Dr. P.Swenson

Кол-во образцов	Метод		Субтип HBsAg / генотип ВГВ			
			Ауw2/ D	Ауw3/ D	Адw2/ A	Адrq+/ C
113 (100%)	Разработанная методика	Абс. (%)	69 (61%)	32 (28%)	4 (4%)	8 (7%)
	Методика Dr. P.Swenson	Абс. (%)	71 (63%)	30 (26%)	3 (3%)	9 (8%)

Распределения вариантов ВГВ, полученные двумя сравниваемыми методами, не отличаются ($p > 0,05$)

Стоит отметить, что образцы с «сомнительными» результатами, полученные в методике Dr. P.Swenson, такие как, например, АЛ151 с «сомнительным» выводом «ауw1?» и 2 образца (БЕК93 и АЛ396) с «сомнительными» выводами «ауw4?», которые не вошли в сопоставительный анализ, будут обсуждаться позже более детально.

Для 113 (100%) образцов, для которых был проведен сравнительный анализ, совпадение результатов двух методик составило:

- при определении генотипов ВГВ: 111/113 (98,2%); не совпали результаты двух образцов (ВО163 и НУК14);

- при определении субтипов HBsAg: 108/113 (95,6%); один образец с несовпадающими результатами генотипирования и субтипирования (упомянутый выше НУК14) и еще 4 образца, для которых при совпадающем генотипе D получены отличающиеся результаты только субтипирования: для одного образца (КРА148) с помощью собственных реагентов был получен субтип HBsAg ауw2, с МАТ Dr. P.Swenson - ауw3, в трех других (ВО187, МУЖ146, НУК416) – наоборот. Отметим, что эти два сероварианта белка отличаются одной заменой в 127 положении (пролин для варианта «w2» и треонин для варианта «w3»). Образцы с расхождениями в интерпретации подробно рассмотрены в отдельном разделе 3.5.4. «Дискордантные результаты».

Таким образом, при сопоставлении результатов определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови, полученных в ИФА с помощью двух альтернативных методик с применением МАТ (разработанной нами и Dr. P.Swenson), было получено совпадение 111/113 (98,2%) при определении генотипов ВГВ и 108/113 (95,6%) при определении субтипов HBsAg.

3.5.4. Дискордантные результаты

Для того, чтобы верифицировать данные того или иного способа анализа, использовали три независимых метода: 1. разработанная методика с применением МАТ, 2. классические молекулярно-генетические методы (выделение нуклеиновой кислоты, ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ и предсказание субтипа HBsAg на основе выведенной аминокислотной последовательности), 3. методика Dr. P.Swenson (Swenson et al., 1991). В данном разделе рассмотрены случаи, когда были получены расхождения при определении субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в разработанной методике с применением МАТ АО «Вектор-Бест» как с результатами анализа нуклеотидных последовательностей вирусных изолятов ВГВ, так и с методикой Dr. P.Swenson. В первом случае сопоставление проведено по результатам 189 образцов, во втором – по результатам 113 образцов (см. раздел 3.1. Множество полученных результатов). Стоит обратить внимание, что 18 образцов, для которых были сложности с интерпретацией результатов по методике Dr. P.Swenson и которые, соответственно, не были взяты для сопоставления двух серологических методик, вошли в группу дискордантных при сопоставлении результатов субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ, выполненных с помощью разработанной методики и молекулярно-генетическими методами. При этом противоречивые результаты субтипирования HBsAg в данных образцах возникали чаще не по причине использования разных методик, а как следствие «нестандартных» вариантов вируса.

В общей сложности для 23 случаев с дискордантными результатами (Таблица 16) представлены данные всех трех исследований и для 2 – данные двух альтернативных серологических методик с МАТ.

Только для двух из 189 образцов (1,1%) при сопоставлении результатов, полученных с помощью разработанных реагентов и при анализе последовательностей ДНК ВГВ, были выявлены расхождения в результатах генотипирования (Таблица 16, ч. I. п.1). Один из этих образцов, НУК14 (JX125365) при повторном исследовании с МАТ показал совпадающий с данными секвенирования результат, что позволяет квалифицировать первично полученную реакцию как возникшую в результате технической ошибки. Другой образец, ВО163 (JX125371) демонстрировал в ИФА реакции, характерные для генотипа А (субтип *adw2*), при том, что по данным секвенирования данный изолят может быть отнесен к генотипу С (субтип *adrq+*) (Таблица 16). В то же время, в выведенной аминокислотной последовательности НВsAg данного изолята (JX125371) в положении 126 показано наличие остатка треонина, что не является типичным для последовательностей субтипа *adrq+*, на который указывают аминокислотные остатки в других субтип-значимых позициях этого изолята (у других описанных изолятов ВГВ субтипа *adrq+* в положении 126 находится изолейцин, а треонин характерен для субдетерминант типа «w» (Norder et al., 1992a). Описанный уникальный феномен последовательности НВsAg изолята ВО163 (JX125371) мог послужить причиной его нетипичной реакции с использованными МАТ. Это предположение подтверждается тем фактом, что образец демонстрирует нетипичную реакцию также по методике Dr. P.Swenson: реакцию, характерную для генотипа С субтипа *adw2*, но не *adrq+*, как было предсказано при анализе нуклеотидной последовательности изолята вируса. Подводя промежуточный итог, можно заключить, что показатель правильности определения генотипа ВГВ, предварительно определенный в рамках описываемых испытаний, составил 0,99 (верно генотипированы 187 из 189 прореагировавших с МАТ образцов), что является удовлетворительным значением для теста, основанного на методе ИФА. Полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными ранее данными по совпадению результатов (95,6%) при определении генотипа ВГВ методом ИФА и анализом нуклеотидных последовательностей S-гена на выборке из 91 НВsAg+ образца в исследовании, проведенном другой группой авторов (Tanaka et al., 2009). При этом неправильное определение генотипа не было связано с систематической ошибкой используемого метода, а являлось следствием наличия в исследуемой выборке мутантных изолятов ВГВ или же технических ошибок, то есть воздействия случайных факторов.

Помимо двух, описанных выше образцов (для которых не были правильно определены одновременно генотип ВГВ и субтип НВsAg), еще для 21 образца не совпали только результаты субтипирования с данными анализа нуклеотидных последовательностей изолятов ВГВ (Таблица

16). Из них пять изолятов (Таблица 16, ч. I. п. 2.1) имеют различные генетические aberrации в S-гене, кодирующем, как известно, HBsAg. Два из них (МУЖ240 и АЛ482) являются межгенотипными рекомбинантами с точками рекомбинации внутри S-гена (Мануйлов и др., 2015), а три несут смысловые замены аминокислот HBsAg:

- T126P127→N126S127, не позволяющую различить субтип-значимые субдетерминанты «w2» и «w3» в образце ЛИС15,

- замена 127S, в результате чего невозможно предсказать детерминанту «w1/2/3/4» в образце БЛАГ12,

- замена 122T и не выведены АО в 127, 134 положениях, вследствие чего невозможно предсказать субтип HBsAg в образце 10-01709.

Интересно, что во всех трех случаях были доступны результаты трех альтернативных методик субтипирования HBsAg, при этом результаты субтипирования двумя серологическими методами с использованием МАТ (разработанная нами и Dr. P.Swenson) полностью совпали (Таблица 16, ч. I. п.2.1). Поскольку субтип HBsAg является серологической характеристикой ВГВ, в данном случае, по-видимому, верным будет установить субтип именно по результатам ИФА. Очевидно, описанные генетические особенности в перечисленных трех изолятах затрудняют предсказание субтипа при анализе выведенной аминокислотной последовательности, но при этом не затрагивают эпитопы распознавания использованных субтип-специфичных МАТ.

Еще шесть образцов с дискордантными результатами (Таблица 16, ч. I. п. 2.2) содержали, согласно данным секвенирования, HBsAg субтипа ауw4 (генотип D), встречающийся в Сибири у 1-5% инфицированных пациентов. Многоступенчатый алгоритм определения данного субтипа по выведенной аминокислотной последовательности описан в статье (Purdy et al., 2007). В разработанной методике не предусмотрена возможность распознавания субтипа ауw4, что отражено в Таблице 9, при этом генотип D в данных образцах был установлен верно (Таблица 16, ч. I. п. 2.2).

Еще для трех образцов (Таблица 16, ч. I. п.2.3), вошедших в раздел «Дискордантные результаты», не были выведены АО в субтип-значимых положениях; по методике Dr. P.Swenson данные образцы не были исследованы ввиду отсутствия возможности. Строго говоря, эти результаты невозможно полноценно сопоставить.

Наконец, для семи оставшихся образцов (Таблица 16, ч. I. п. 2.4) выдвинуть обоснованных предположений о причинах расхождения результатов, полученных в разных методиках, не представляется возможным. Тот факт, что субтип HBsAg в данных образцах не мог быть в большинстве случаев установлен и с использованием методики Dr. P.Swenson, заставляет

предположить наличие в образцах дополнительных белковых примесей, неспецифически взаимодействующих с антителами (Горайнова и др., 2019).

Результаты еще двух образцов, которые были исследованы только серологическими методами (разработанная нами методика и Dr. P.Swenson), также внесены в данную таблицу (Таблица 16, ч. II), причины дискордантных результатов не установлены, возможно лишь констатировать сам факт разночтений при определении субтипов HBsAg (в пределах совпадающего генотипа D). Таким образом, в общей сложности при сопоставлении валидных результатов двух методик, основанных на ИФА, были получены расхождения по 2/113 (1,8%) образцам (BO163, НУК14) при оценке результатов генотипирования ВГВ; по 5/113 (4,4%) образцам (BO187, КРА148, МУЖ146, НУК14, НУК416) - при оценке результатов субтипирования HBsAg.

Таблица 16. Дискордантные результаты, полученные при сопоставлении трех методик (разработанная методика, анализ нуклеотидных последовательностей S-гена изолятов ВГВ, методика Dr. P.Swenson)

Шифр образца (изолята)	Результаты анализа последовательностей ДНК изолятов ВГВ, субтип HBsAg/ генотип ВГВ	Результат в ИФА в разработанной методике определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ	Результат в ИФА по методике Dr. P.Swenson	Предполагаемые причины несоответствий
I. ОБРАЗЦЫ С ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК ВГВ				
1. Не совпали результаты генотипирования и субтипирования (2 образца)				
НУК14 (JX125365)	adrq+/C	adw2/A (adrq+/C в повторе)	adrq+/C	техническая ошибка
ВО163 (JX125371)	adrq+?/C	adw2/A (adw2/A в повторе)	adw2/C	замена I126T, характерная для субдетерминанты w
2. Совпали результаты генотипирования, выявлены расхождения в результатах субтипирования (21 образец), в том числе:				
<i>2.1. Нетипичная структура S-гена изолятов ВГВ (5 образцов)</i>				
МУЖ240 (JX090678)	adw2/ рекомбинант между А и D	ayw2/D	ayw2/D	рекомбинант между А и D
АЛ482 (JX125369)	adw2/ рекомбинант между А и С	adrq+/C	adrq+/C	рекомбинант между А и С
ЛИС15 (JX090648)	ayw?/D	ayw3/D	ayw3/D	замены T126P127→ N126S127, невозможно дифференцировать субдетерминанты w2 и w3
БЛАГ12	adw?/A	adw2/A	н/и	замена 127S, невозможно предсказать детерминанту w1/2/3/4
10-01709	?/D	ayw3/D	н/и	невозможно предсказать субтип (замена 122T и ? АО в 127, 134 п)
<i>2.2. Образцы с субтипом ayw4 HBsAg (6 образцов)</i>				
АЛ396 (JX090622)	ayw4/D	ay-/D (закончился образец)	ayw4?/?	методика не дифференцирует субдетерминанту w4
БЕК93 (JX090636)	ayw4/D	ayw3/D	ayw4?/?	
ДУ65 (JX090640)	ayw4/D	ayw2/D	ayw2/D	
ЩУ115 (JX090697)	ayw4/D	ayw3/D	ayw4?/?	

БАР23	ayw4/D	ayw3/D	н/и	
БАР35	ayw4/D	ayw3/D	н/и	
2.3. Невозможно предсказать субтип HBsAg по выведенным АО последовательностей ДНК ВГВ (3 образца)				
БАР11	a?w2/D	ayw2/D	н/и	невозможно предсказать детерминанту y/d (? АО в 122 п)
10-00907	a?w2/D	ayw2/D	н/и	невозможно предсказать детерминанту y/d (? АО в 122 п)
БАР45	ayw?/D	ayw2/D	н/и	невозможно предсказать детерминанту w1/2/3/4 (? АО в 127 п)
2.4. Неустановленные причины расхождения результатов (7 образцов)				
АЛ161 (JX090610)	ayw2/D	ayw3/D	не определен	причина не установлена
Ж103 (JX090719)	ayw2/D	ayw3/D	не определен	
МС428 (JX090667)	ayw2/D	ayw3/D	не определен	
МУЖ146 (JX090676)	ayw2/D	ayw3/D	ayw2/D	
ВОС215 (JX090714)	ayw3/D	ayw2/D	не определен	
БАР20	ayw3/D	ayw2/D	н/и	
БАР60	ayw3/D	ayw2/D	н/и	
II. ОБРАЗЦЫ С НЕДЕТЕКТИРУЕМОЙ ДНК ВГВ				
Не совпали результаты субтипирования (2 образца)				
ВО187	ДНК ВГВ не детектируется	ayw3/D	ayw2/D	причина не установлена
КРА148	ДНК ВГВ не детектируется	ayw2/D	ayw3/D	причина не установлена

н/и – не исследовали

3.5.5. Заключение по апробации разработанной методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека

Сравнительная оценка двух методик по определению генотипов ВГВ и субтипов HBsAg в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови, выполненная на выборке из 189 образцов, исследованных одновременно с помощью разработанных реагентов и **молекулярно-генетическими методами**, показала совпадение 98,9% (187/189) результатов при генотипировании ВГВ и 88,4% (167/189) при субтипировании HBsAg.

При сравнении результатов разработанной методики с другим серологическим методом определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ (**методикой Dr. P.Swenson**) на выборке из 113 образцов плазм крови представителей коренного населения Сибири, совпадение результатов было показано для 111/113 (98,2%) образцов при определении генотипов ВГВ и 108/113 (95,6%) при определении субтипов HBsAg.

Стоит отметить, что в выполненной ранее работе (Мануйлов и др., 2005) при одновременном определении субтипов HBsAg с применением методики Dr. P.Swenson и по нуклеотидным последовательностям S-гена изолятов ВГВ, было показано 90% (10/11) совпадение результатов. В нашем исследовании с помощью разработанной методики, с учетом всех изложенных причин, субтипы HBsAg были правильно установлены для 88,4% - 95,6%, а генотипы ВГВ – для 98,2% - 98,9% образцов.

Разработанная и апробированная методика позволяет установить субтипы HBsAg до 3-й буквы (ayw2, ayw3, adw2, adr_q+) и ассоциированные с ними генотипы ВГВ А, С, D. С ее помощью возможно определение генотипов ВГВ в образцах сывороток, плазм крови, содержащих HBsAg, даже с отрицательным результатом молекулярного генотипирования ВГВ. В результате апробации разработанных реагентов на выборке HBsAg-положительных образцов сывороток и плазм крови, полученных из разных регионов РФ, был обнаружен субтип ayw4 HBsAg генотипа D ВГВ, который был предсказан на основе выведенной аминокислотной последовательности изолята ВГВ. Образец с субтипом ayw4 был включен в состав 7 серии Стандартной панели сывороток крови D-0540, содержащей разные субтипы и мутантные формы HBsAg ВГВ (Таблица 17, образцы 16-18), предназначенной для оценки возможности коммерческих иммуноферментных наборов реагентов выявлять циркулирующие на территории РФ субтипы этого антигена. Более того, несмотря на указанное в инструкции к стандартной панели использование для ИФА методов выявления HBsAg, эта панель применима также для наборов, основанных на методе ИХЛА. Это возможно благодаря тому, что, во-первых, по сути, ИХЛА – это тот же ИФА, но с использованием другой системы детекции сигнала; во-вторых, наборы выявляют сам HBsAg (а не антитела к нему); в-третьих, что особенно важно, в состав

Стандартной панели сывороток крови D-0540 входят образцы нативных сывороток (а не рекомбинантные белки, которые могут не соответствовать истинной конформации нативного антигена). Возможность применения Стандартной панели сывороток крови D-0540 для наборов ИХЛА-формата была показана в работе (Солонин и др., 2024).

Таблица 17. Состав стандартной панели сывороток крови D-0540, серия 7

№ сыворотки в панели	Субтип, мутантная форма HBsAg	Аттестация против стандарта «ДС-СО-HBsAg», МЕ/мл	Аттестация против стандарта WHO International Standard for HBsAg (NIBSC code 12/226), МЕ/мл
1	ayw2	0,1	0,1
2	ayw2	0,05	0,05
3	ayw2	<0,05	<0,05
4	adw2	0,1	0,1
5	adw2	0,05	0,05
6	adw2	<0,05	<0,05
7	ayw3varA	0,1	0,1
8	ayw3varA	0,05	0,05
9	ayw3varA	<0,05	<0,05
10	ayw3varB	0,1	0,1
11	ayw3varB	0,05	0,05
12	ayw3varB	<0,05	<0,05
13	adrq+	0,1	0,1
14	adrq+	0,05	0,05
15	adrq+	<0,05	<0,05
16	ayw4	0,1	0,1
17	ayw4	0,05	0,05
18	ayw4	<0,05	<0,05
19	ayw3, S143L	0,1	0,1
20	ayw3, S143L	0,05	0,05
21	ayw3, S143L	<0,05	<0,05
22	adw3, G145R	0,17	0,1
23	adw3, G145R	0,09	0,05
24	adw3, G145R	0,05	<0,05

Обнаруженный в ходе апробации разработанной методики образец субтипа ayw4 пополнил нашу коллекцию положительных образцов, содержащих разные субтипы HBsAg. И хотя на данный момент разработанная методика пока имеет ограничения для дифференцирования субтипа ayw4 HBsAg из-за прежнего отсутствия в достаточном количестве образца крови данного субтипа (для выбора дополнительных МАТ), работа по поиску HBsAg-положительных образцов, содержащих другие известные генотипы ВГВ/субтипы HBsAg, а также

по поиску МАТ, способных специфически их отличить (в том числе генотип D/субтип ауw4 HBsAg), будет продолжена.

Проведенное сопоставление позволяет говорить о высокой корреляции результатов, полученных с помощью разработанной методики с применением панели МАТ методом ИФА и двумя альтернативными методами: молекулярно-генетическими и методикой Dr. P.Swenson; показано совпадение результатов не менее 98,2% при определении генотипов ВГВ и не менее 88,4% при определении субтипов HBsAg. Результаты свидетельствуют о том, что набор подходит для скрининговых исследований по определению генотипов ВГВ/ субтипов HBsAg образцах сывороток/плазм крови человека, содержащих HBsAg, как минимум, на территории РФ. Кроме того, данная методика может хорошо дополнить молекулярные методы в случаях, когда не доступна нуклеиновая кислота ВГВ (нет специального оборудования либо не удастся выделить ДНК ВГВ при наличии специального оборудования). Разработанная методика определения генотипов ВГВ/ субтипов HBsAg в HBsAg-положительных образцах сывороток или плазм крови с помощью панели МАТ доступна и проста в использовании. Ранее для выполнения типирования ВГВ (определение субтипов HBsAg и генотипов ВГВ) в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови с помощью МАТ Dr. P.Swenson требовалось 20.5 часов, проведение иммунологической стадии проводили в три этапа, так как МАТ анти-HBs применяли в виде АЖ мыши, а для «проявления» сигналов требовались дополнительные антивидовые антитела, направленные против антител мыши (и конъюгированные с ПХ). Разработанная методика определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ имеет ряд преимуществ по сравнению с ранее используемой: она менее продолжительная (позволяет проводить анализ за 5.5 часов), МАТ анти-HBs конъюгированы с ПХ, что позволяет избежать дополнительных стадий (анализ проводится в две стадии, то есть на одну стадию меньше) и, таким образом, является более удобным форматом для исследователей, проводящих ИФА. Более того, МАТ анти-HBs, используемые в разработанной методике, являются продуктом отечественного производства, что также важно в связи с импортозамещением.

Результаты данной работы были внедрены в производственную практику, написаны инструкции по подготовке компонентов для методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека, содержащих HBsAg (Приложение 9) и по применению данной методики (Приложение 10).

3.6. Валидация разработанной методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ

3.6.1. Результаты определения генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД, в том числе в образцах с недетектируемым уровнем ДНК ВГВ

Для того, чтобы иметь доказательную базу для исследований, был проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ВГВ (длина фрагмента 713 нт), выделенных из образцов сывороток крови пациентов с ХГВ (моноинфекция ВГВ). Всего при тестировании 122 образцов сывороток крови от пациентов с ХГВ из Республики Саха (Якутия) ДНК ВГВ была выявлена в 86 (70,5%) образцах. Распределение генотипов ВГВ в них оказалось следующим: А - 36% (n=31), С - 6% (n=5), D - 58% (n=50). Генотип А был представлен субгенотипом А2 (100%), генотип D - субгенотипами D1 (1 изолят, 2%), D2 (11 изолятов, 22%) и D3 (36 изолятов, 72%). Для двух геноизолятов генотипа D (4%) субгенотип установить не удалось.

При исследовании 211 образцов от пациентов с гепатитом D (сочетанная инфекция ВГВ+ВГД) из Республики Тыва только в восьми образцах (4%) была выявлена ДНК ВГВ и определен генотип D (субгенотип D1 – 5 изолятов, субгенотип D2 – 3 изолята), в остальных 203 образцах (96%) генотип ВГВ не был установлен из-за недетектируемой ДНК ВГВ.

Число валидных результатов, полученных в разработанной методике, основанной на применении МАТ, и число совпавших результатов двух методик (молекулярно-генетический метод генотипирования и с помощью МАТ) при тестировании образцов сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД представлены в Таблице 18.

С помощью разработанной методики с применением МАТ в целом, для всех групп образцов, было получено 96% (320/333) валидных результатов. Для образцов, полученных от пациентов с ХГВ с детектируемой ДНК ВГВ (группа 1) было получено 95% (82/86) валидных результатов в разработанной методике генотипирования с применением МАТ. Для двух из четырех образцов в этой группе, результаты которых признаны не валидными, была определена концентрация HBsAg - 8 и 51 МЕ/мл, соответственно (два других образца закончились). Для 81/82 (99%) образцов в этой группе результаты определения генотипа ВГВ совпали с результатами анализа нуклеотидных последовательностей ДНК ВГВ. Для одного образца (13Я) были получены дискордантные результаты: с использованием панели МАТ был определен генотип А, в то время как филогенетический анализ нуклеотидной последовательности указывал на принадлежность генотипу С. Для данного изолята на основании выведенной аминокислотной

последовательности был предсказан серотип adrq⁺ генотипа С ВГВ с аминокислотной заменой I126T в поверхностном белке ВГВ.

Таблица 18. Количество валидных результатов, полученных в разработанной методике на основе МАТ, и количество совпавших результатов двух методик (молекулярно-генетические исследования и ИФА с МАТ) при тестировании образцов сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД

Инфекция	Группы образцов	Количество образцов	Валидных результатов в тесте с МАТ (%)	Количество совпавших результатов двух методов (%)
ВГВ	ДНК ВГВ выявлена (1-я группа)	86	82/86 (95%)	81/82 (99%)
	ДНК ВГВ не детектировалась (2-я группа)	36	35/36 (97%)	н.п.
	Всего ВГВ	122	117/122 (96%)	н.п.
ВГВ+ВГД	ДНК ВГВ выявлена (3-я группа)	8	8/8 (100%)	8/8 (100%)
	ДНК ВГВ не детектировалась (4-я группа)	203	195/203 (96%)	н.п.
	Всего ВГВ+ВГД	211	203/211 (96%)	н.п.

н.п. - не применимо

В группе образцов (группа 2), полученных от пациентов с диагнозом ХГВ с недетектируемой ДНК ВГВ (при чувствительности детекции около 50 МЕ/мл), валидные результаты с помощью разработанных реагентов были получены в 97% (35/36) случаев (Таблица 18). При этом высокий показатель совпадения результатов определения генотипов ВГВ, полученный на охарактеризованной молекулярно-генетическими методами панели образцов (99%), предполагает высокую вероятность получения верных результатов с помощью панели МАТ при исследовании HBsAg-положительных образцов сывороток крови пациентов с недетектируемой ДНК ВГВ. При исследовании образцов группы 2 с помощью разработанных реагентов распределение генотипов ВГВ было следующим: генотип А - 31% (n=11), генотип С - 3% (n=1), генотип D - 66% (n=23) (Таблица 19). В целом, для образцов от пациентов с ХГВ (объединенные группы 1 и 2) соотношение генотипов ВГВ А: С: D было следующим - 37%: 3%: 60%.

Таблица 19. Результаты определения генотипов ВГВ, полученные в разработанной методике с применением МАТ, в образцах сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД

Инфекция	Группы образцов	Генотип А	Генотип С	Генотип D
ВГВ	ДНК ВГВ выявлена (1-я группа)	32 (39%)	3 (4%)	47 (57%)
	ДНК ВГВ не детектировалась (2-я группа)	11 (31%)	1 (3%)	23 (66%)
	Всего ВГВ	43 (37%)	4 (3%)	70 (60%)
ВГВ+ВГД	ДНК ВГВ выявлена (3-я группа)	-	-	8 (100%)
	ДНК ВГВ не детектировалась (4-я группа)	17 (8,7%)	-	178 (91,3%)
	Всего ВГВ+ВГД	17 (8,4%)	-	186 (91,6%)

Высокая степень совпадения результатов генотипирования ВГВ, полученных двумя методами, позволила ожидать высокую достоверность результатов генотипирования ВГВ с помощью разработанной методики с применением МАТ в образцах от пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД, учитывая тот факт, что в большинстве случаев у пациентов с гепатитом D достоверно реже удавалось выявить ДНК ВГВ, чем в группе пациентов с ХГВ (3,8% (8/211) против 70,5% (86/122), $p < 0,001$). При этом доля образцов с недетектируемым уровнем ДНК ВГВ (группа 4, 203 образца) в этом исследовании составила 96,2% от общего числа образцов пациентов с диагнозом гепатит D (Таблица 18).

При исследовании образцов пациентов с гепатитом D с помощью разработанной методики было получено 96,2% (203/211) валидных результатов генотипирования ВГВ (Таблица 18). Установлены следующие генотипы ВГВ: А - 17 образцов (8,4%) и D - 186 образцов (91,6%) (Таблица 19). При этом результаты определения генотипов ВГВ двумя методами, полученные для 8 образцов, позитивных по ДНК ВГВ (группа 3), полностью совпали. Все амплифицированные и секвенированные последовательности ВГВ в этой группе образцов были отнесены к генотипу D ВГВ. Кроме того, разработанная методика с МАТ АО «Вектор-Бест» позволила достоверно чаще определять генотип ВГВ по сравнению со стандартными молекулярно-генетическими методами (96,2% (203/211) против 3,8% (8/211), $p < 0,001$) у пациентов с гепатитом D. Данное преимущество связано с нередким отсутствием детектируемой ДНК ВГВ на фоне достаточного для анализа количества HBsAg у таких пациентов (Heidrich et al., 2012).

Проблема изучения сочетанной инфекции вирусами гепатита В и D для целей более специфического лечения сформулирована в мире уже давно (Rizzetto et al., 1977). Данная патология трудно излечима и, вследствие этого, любые попытки более целенаправленно и с меньшими затратами произвести лечение необходимы. Течение хронической ВГВ-инфекции

обычно включает различные клинические фазы, каждая из которых потенциально может длиться десятилетиями. Четко определенные и верифицированные диагностические маркеры в сыворотке крови и по биопсии печени позволяют оценить тяжесть заболевания, состояние репликации вируса, стратификацию риска для пациента и решения о лечении (Yuen et al., 2018), тем более что для пациентов с гепатитом D данные о связи генотипа ВГВ с исходами хронического гепатита D малочисленны из-за невозможности детектировать ДНК ВГВ молекулярными методами (Su et al., 2006). Результаты, которые были получены в данном исследовании, делают возможным легко определить генотип ВГВ с помощью ИФА с панелью МАТ у пациентов, инфицированных вирусами гепатита В и D.

При генотипировании образцов сывороток крови пациентов с ХГВ и гепатитом D с помощью разработанных реагентов была показана циркуляция генотипов А, С и D ВГВ в Республике Саха (Якутия) и А, D - в Республике Тыва. Эти данные подтвердили географическое разнообразие распределения генотипов ВГВ на территории Российской Федерации, показанное ранее в исследованиях других авторов. Так, Слепцовой С.С. (Слепцова, 2012) в популяции больных с ХГВ Республики Саха (Якутия) генотип D был обнаружен в 38% случаев, генотип А — в 24,1%, генотип С — в 24,1%, у 13,8% пациентов (4 человека) одновременно присутствовали два генотипа ВГВ. Выполненный ранее филогенетический анализ последовательностей ВГВ, выделенных от позитивных по ДНК ВГВ лиц, показал преобладание циркуляции генотипа D двух серотипов (ayw2, ayw3) на территории Республики Тыва – 96,9%, при этом генотип А ВГВ был определен у 3,1% пациентов из данного региона (Кожанова и др., 2011).

В данном исследовании было показано 99% совпадение результатов определения генотипов ВГВ, полученное на охарактеризованной молекулярно-генетическими методами панели образцов, что гарантирует высокую вероятность получения верных результатов разработанной методики с применением МАТ при исследовании HBsAg-положительных образцов сывороток крови пациентов с недетектируемой ДНК ВГВ. Всего лишь для одного образца были получены дискордантные результаты: в разработанной методике был установлен генотип А, в то время как филогенетический анализ нуклеотидной последовательности указывал на принадлежность генотипу С. Для данного изолята по выведенной аминокислотной последовательности был предсказан серотип adrq+ генотипа С ВГВ, но с заменой I126T. Вероятно, данная замена в аминокислотной позиции, находящейся внутри основной иммуногенной детерминанты HBsAg («а»-детерминанты, АО 124-147), могла послужить причиной полученных расхождений при генотипировании данного изолята. Эта особенность замены I126T подтверждается результатами апробации, проведенной в АО «Вектор-Бест», когда выделенный изолят с такой же аминокислотной заменой (BO163) демонстрировал аналогичное поведение.

Для части исследуемых образцов с диагнозом ХГВ не удалось выявить ДНК ВГВ при чувствительности детекции 50 МЕ/мл. Такой результат, вероятно, связан с более низким уровнем вирусной нагрузки, поскольку известно, что у больных хроническими формами гепатита В этот показатель значительно меньше, чем при острой инфекции (Wu et al., 2008).

Возможность определения генотипа ВГВ в HBsAg-положительных образцах реализовалась в полной мере в группе пациентов с гепатитом D. В проведенном исследовании в образцах сывороток крови пациентов с гепатитом D достоверно реже удавалось выявить ДНК ВГВ по сравнению с пациентами с моноинфекцией ВГВ (3,8% (8/211) против 70,5% (86/122), $p < 0,001$), что предположительно может свидетельствовать о подавлении ВГД репликации ВГВ, показанное (Heidrich et al., 2012) для пациентов с хроническим гепатитом D. Как известно, пациенты с гепатитом D имеют значительное количество в крови белка HBsAg, поскольку он формирует внешние оболочки вирионов обоих вирусов – ВГВ и ВГД (Hollinger et al., 2001). Соответственно, разработанная методика позволила достоверно чаще определять генотип ВГВ по сравнению со стандартными молекулярно-генетическими методами (96,2% (203/211) против 3,8% (8/211), $p < 0,001$) у пациентов с гепатитом D.

Совпадение результатов определения генотипов ВГВ в образцах сывороток крови пациентов с ХГВ с помощью разработанной методики на основе ИФА и молекулярно-генетическими методами составило 99% (81/82). С помощью разработанной методики определены генотипы ВГВ у пациентов с хроническим гепатитом D, у большинства из которых ДНК ВГВ не детектировалась. Таким образом, разработанная методика генотипирования ВГВ была валидирована на образцах сывороток крови пациентов с ВГВ и может успешно применяться для исследования образцов сывороток крови пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД, а также образцов от пациентов с моноинфекцией ВГВ при низкой концентрации вирусной ДНК.

3.6.2. Оценка возможности применения разработанной методики субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток крови пациентов в клинической лабораторной практике

В работе было исследовано 40 образцов сывороток крови пациентов различных лечебно-профилактических организаций Москвы (кроме наркологических диспансеров) с положительными результатами определения HBsAg, полученными при проведении ИФА с использованием набора реагентов «Вектогеп В-HBs-антиген-авто» (выявленные с различной ОП в ИФА) и верификацией наличия HBsAg с помощью набора «Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест» (АО «Вектор-Бест», Россия).

В исследовании, проведенном совместно с Потаповой А.А., с помощью разработанной методики с применением МАТ валидные результаты иммуноферментного гено- и

субтипирования ВГВ были получены для 10 из 40 HBsAg-положительных образцов сывороток крови. Во всех (10/10) случаях были определены генотип D ВГВ, субтипы HBsAg ауw2 – 70% (7/10) и ауw3 – 30% (3/10). Результаты, полученные с помощью разработанной методики, не противоречат данным молекулярной эпидемиологии о преобладании на территории РФ генотипа D и субтипов ауw2, ауw3 (Tallo et al., 2008; Мануйлов и др., 2015).

Полученные результаты могут расширить диагностические границы определения генотипов ВГВ/ субтипов HBsAg. В целом относительно простая методика ИФА может быть использована как альтернатива дорогостоящим молекулярно-генетическим методам и способствовать оперативному получению информации как об отдельном пациенте, так и о распределении генотипов ВГВ/ субтипов HBsAg в различных субъектах Российской Федерации.

В данном исследовании было показано, что для наиболее эффективного гено- и субтипирования ВГВ с помощью разработанной методики с применением МАТ следует использовать образцы с ОП в скрининге не менее 2,0 о.е.

Таким образом, была показана возможность использования разработанной методики субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ в клинической лабораторной практике в образцах проб пациентов с положительным заключением по HBsAg.

3.6.3. Оценка возможности применения разработанной методики субтипирования HBsAg в иммунобиологических препаратах рекомбинантного HBsAg

Для оценки возможности применения разработанной методики субтипирования HBsAg в иммунобиологических препаратах были исследованы препараты рекомбинантного HBsAg:

- коммерческий рекомбинантный антиген производства ЗАО НПК «Комбиотех» (г. Москва) субтипов ауw (серия НВС-651-А-22 от 11.2022, концентрация 2187 мкг/мл) и адw (серия НВВ-078-22 от 11.2022, концентрация 2195 мкг/мл),
- рекомбинантный антиген, полученный в АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) субтипов ауw (серия 230623 от 06.2023, концентрация 340 мкг/мл) и адw (серия 140623 от 06.2023, концентрация 300 мкг/мл).

Согласно данным изготовителя, рекомбинантный антиген производства ЗАО НПК «Комбиотех» синтезирован рекомбинантным штаммом дрожжей *Hansenula polymorpha*, содержит антигенные детерминанты поверхностного антигена ВГВ и представляет собой субстанцию-раствор для диагностических целей. Рекомбинантный антиген S-HBs (субтипов ауw и адw) производства АО «Вектор-Бест» представляет собой нативный полноразмерный белок, получен экспрессией в культуре клеток яичника китайского хомяка, выделен и очищен при помощи ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl с последующей хроматографией.

Из полученных препаратов рекомбинантного антигена были приготовлены положительные контрольные образцы ПКО-ау-К, ПКО-ад-К (из рекомбинантного антигена ЗАО НПК «Комбиотех») и положительные контрольные образцы ПКО-ау-В, э-ПКО-ад-В (из рекомбинантного антигена АО «Вектор-Бест») с расчетной конечной концентрацией HBsAg 3000 МЕ/мл.

Результаты субтипирования HBsAg в приготовленных образцах ПКО-ау-К, ПКО-ад-К, ПКО-ау-В и ПКО-ад-В, полученные с помощью разработанной методики с применением МАТ АО «Вектор-Бест» в ИФА, соответствовали совокупности реакций, характерных для субтипов HBsAg ауw2 и адw2; они представлены в Таблице 20.

Таким образом, с помощью разработанной методики с применением МАТ АО «Вектор-Бест» были установлены субтипы HBsAg в препаратах рекомбинантных антигенов двух вариантов (ауw и адw) из двух разных источников (ЗАО НПК «Комбиотех», г. Москва и АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Субтипы HBsAg полностью соответствует заявленным изготовителями ауw и адw. Следовательно, применение разработанной методики субтипирования HBsAg также возможно в иммунобиологических препаратах рекомбинантного антигена.

Таблица 20. Результаты субтипирования HBsAg в препаратах рекомбинантного антигена ПКО-ау-К, ПКО-ад-К (ЗАО НПК «Комбиотех», г. Москва) и ПКО-ау-В, ПКО-ад-В (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), представлены в виде значений ОП

	Конъюгаты МАТ-ПХ			
	SM	E1	H2	D4
ОКО _{сред}	0,017	0,013	0,018	0,022
ОП _{крит}	0,117	0,113	0,118	0,122
ПКО-ау-К («Комбиотех»)	1,766 +	1,134 +	3,956 +	3,956 +
ПКО-ау-В («Вектор-Бест»)	3,837 +	2,366 +	1,977 +	3,214 +
ПКО-ад-К («Комбиотех»)	3,956 +	0,017 -	3,953 +	3,951 +
ПКО-ад-В («Вектор-Бест»)	3,956 +	0,042 -	3,955 +	3,954 +

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика субтипирования HBsAg/ генотипирования ВГВ для удобного и эффективного определения характеристик ВГВ в образцах сывороток, плазм крови человека, содержащих поверхностный белок ВГВ - HBsAg. С использованием данной методики возможно определить субтипы HBsAg ауw2, ауw3, адw2, адrq+ и генотипы ВГВ А, С, D. Показано, что сопоставимость результатов определения генотипов ВГВ и субтипов HBsAg в HBsAg-положительных образцах плазм/сывороток крови при использовании двух альтернативных методик (молекулярно-генетические методы и методика Dr. P.Swenson) составляет: от 98,2% (111/113) до 98,9% (187/189) при генотипировании ВГВ и от 88,4% (167/189) до 95,6% (108/113) при субтипировании HBsAg.

Валидация методики, выполненная независимыми исследователями, подтвердила возможность выявлять и корректно дифференцировать генотипы ВГВ А, С, D в HBsAg-положительных образцах крови человека.

Важно отметить, что методика позволяет получать результаты в случаях с недетектируемой ДНК ВГВ. Помимо этого, в связи с наличием достаточного количества HBsAg в образцах крови больных гепатитом D, оказалось возможным определить генотип ВГВ в образцах сывороток и плазм крови у таких пациентов, у большинства из которых ДНК ВГВ не детектировалась.

Было показано, что для наиболее эффективного гено- и субтипирования ВГВ с помощью разработанной методики следует использовать образцы с ОП не менее 2,0 о.е. в ИФА.

Была показана возможность применения разработанной методики субтипирования HBsAg в иммунобиологических препаратах рекомбинантных антигенов из двух разных источников: ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия) и АО «Вектор-Бест» (Россия).

Ранее в АО «Вектор-Бест» для определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови с помощью МАТ Dr. P.Swenson требовалось 20,5 часов, а проведение иммунологической стадии проводили в три этапа. Разработанная автором методика определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ имеет ряд преимуществ по сравнению с ранее используемой: она менее продолжительная (позволяет проводить анализ за 5,5 часов), МАТ анти-HBs конъюгированы с ПХ, что позволяет избежать дополнительных стадий (анализ проводится в две стадии, то есть на одну стадию меньше) и, таким образом, методика является более удобным форматом для исследователей, проводящих ИФА. Более того, МАТ анти-HBs, используемые в разработанной методике, являются продуктом отечественного производства, что также важно в связи с импортозамещением. Данная методика может хорошо дополнить молекулярные методы в случаях, когда не доступна нуклеиновая кислота ВГВ (нет

специального оборудования или не удастся выделить ДНК ВГВ при наличии специального оборудования).

Полученные результаты расширяют диагностические границы определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови с наличием HBsAg за счет потенциального внедрения в рутинную практику КДЛ, снабженных оборудованием для проведения серологических исследований. Разработанная нами простая методика субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ на основе ИФА может быть использована как альтернатива дорогостоящим молекулярно-генетическим методам и способствовать оперативному получению информации как об отдельном пациенте, так и о распределении субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в различных субъектах Российской Федерации.

Наконец, разработанная вместе с МАТ методика позволит оперативно мониторировать возможные будущие изменения в соотношении субтипов HBsAg, которые уже начинают происходить в отдельных регионах России, и, таким образом, отслеживать вероятную в связи с этим эволюцию HBsAg, что, в свою очередь, позволит своевременно реагировать на ситуацию и модернизировать при необходимости производящиеся сейчас вакцины.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать заключение о высоком потенциале разработанной методики определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ с применением импортозамещающих МАТ АО «Вектор-Бест».

ВЫВОДЫ

1. С использованием двух охарактеризованных ранее панелей сывороток, содержащих HBsAg субтипов ауw2, ауw3, адw2, адrq+ и ДНК ВГВ генотипов А, С, D, проведено сравнительное тестирование 33 анти-HBs МАТ и выбрано 5 высокоспецифичных анти-HBs МАТ, позволяющих дифференцировать субтипы HBsAg и ассоциированные с ними генотипы ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека;

2. С применением отобранных пяти высокоспецифичных анти-HBs МАТ разработана методика для определения субтипов HBsAg и ассоциированных с ними генотипов ВГВ в образцах сывороток/плазм крови человека, содержащих HBsAg. Показано, что данная методика позволяет достоверно определять субтипы HBsAg ауw2, ауw3, адw2, адrq+ и ассоциированные с ними генотипы А, С, D ВГВ;

3. Проведено сравнение разработанной нами методики и методики, предложенной Dr. P. Swenson, по определению субтипов HBsAg и ассоциированных с ними генотипов ВГВ на HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека. Субтипы HBsAg и ассоциированные генотипы ВГВ были установлены для 256 образцов крови в разработанной методике и для 114 образцов крови представителей коренных народностей Сибири, исследованных по методике Dr. P. Swenson. Показано совпадение 98,2% (111/113) результатов при генотипировании ВГВ и 95,6% (108/113) при субтипировании HBsAg при сравнении этих двух методик;

4. Совпадение результатов, полученных с помощью разработанной нами методики и с использованием молекулярно-генетических методов, составило 98,9% (187/189) при генотипировании ВГВ и 88,4% (167/189) при субтипировании HBsAg. Совпадение результатов определения ассоциированного генотипа ВГВ в образцах сывороток крови пациентов с ХГВ, выполненное с помощью разработанной методики и молекулярно-генетическими методами, было также подтверждено результатами экспериментов, выполненных в независимой организации, и составило 99% (89/90);

5. Проведена валидация разработанной методики: показана возможность применения методики для типирования ВГВ в образцах крови пациентов с моноинфекцией ВГВ, в том числе с недетектируемой ДНК ВГВ, а также с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГD из Республики Саха-Якутия и Республики Тыва, у большинства из которых ДНК ВГВ не детектировалась; в образцах сывороток крови пациентов в клинической лабораторной практике; в иммунобиологических препаратах на основе рекомбинантного HBsAg.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. «АМПЛИСЕНС® HBV-ГЕНОТИП-FL». Генотипирование вируса гепатита В [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://interlabservice.ru/catalog/reagenty/ptsr-diagnostika/virusnye-gepatity/amplisens-hbv-genotip-fl-genotipirovanie-virusa-gepatita-v.html>.
2. Аммосов, А. Д. Гепатит В / А. Д. Аммосов. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2006. – 132 с.
3. Анализ четырехпольных таблиц сопряженности (сравнение процентных долей в двух группах) (онлайн калькулятор) [Электронный ресурс]. - Медицинская статистика. - Режим доступа: <https://medstatistic.ru/calculators/calchi.html?ysclid=mlkoe4nlrx588972524>.
4. Баженов, А. И. Алгоритм серологического поиска и оценка распространенности серологически значимых HBsAg-мутаций у носителей вируса гепатита В / А. И. Баженов, М. А. Годков, М. В. Коноплева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2007. – N. 6. – С. 30-37.
5. Баженов, А. И. Оценка чувствительности коммерческих тест-систем для иммунодетекции HBsAg по их способности выявлять HBsAg-мутанты вируса гепатита В / А. И. Баженов, М. А. Годков, М. В. Коноплева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – N. 3. – С. 49-53.
6. Баяндин, Р. Б. Генотипическое разнообразие изолятов и факторы риска инфекции вирусом гепатита В у отдельных групп населения Новосибирской области / Р. Б. Баяндин, А. В. Шустов, Г. В. Кочнева [и др.] // Инфекционные болезни. – 2004. - V. 2. - N. 3. – С. 39-44.
7. Баяндин, Р. Б. Частота обнаружения маркеров, генотипы вируса и факторы риска гепатита В у пациентов инфекционного отделения городской больницы Барнаула / Р. Б. Баяндин, А. В. Шустов, Г. В. Кочнева [и др.] // Инфекционные болезни. – 2007. - V. 5. - N. 1. - С. 5-10.
8. Горайнова, О. С. Новый метод, базирующийся на использовании иммобилизованных однодоменных антител для удаления определенных мажорных белков из плазмы крови, способствует уменьшению неспецифического сигнала в иммуноанализе / О. С. Горайнова, Е. О. Хан, Т. И. Иванова, С. В. Тиллиб // Медицинская иммунология. – 2019. – V. 21. - N. 3. – С. 567-575.
9. ГОСТ Р ИСО 18113-1—2015 Национальный стандарт Российской Федерации. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования [Электронный ресурс]. – Москва, 2016. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200126382>.

10. Гранникова, С. А. Подтиповая характеристика поверхностного антигена гепатита В в различных районах России / С. А. Гранникова, Е. В. Русакова, П. З. Будницкая [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1977. – N. 19. – С. 97-101.
11. Ивашкин, В. Т. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Российского общества по изучению печени по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В / В. Т. Ивашкин, Н. Д. Ющук, М. В. Маевская [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. - N. 3. – С. 58-88.
12. Кожанова, Т. В. Первичная лекарственная резистентность вируса гепатита В к аналогам нуклеоз(т)идов у ВГВ-инфицированных пациентов / Т. В. Кожанова, О. В. Исаева, В. В. Клушкина [и др.] // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2011. – N. 18. – С. 41-47.
13. Кочнева, Г. В. Этиология острых гепатитов и генотипическое разнообразие вирусов гепатитов А, В, С и Е в трех регионах Сибири / Г. В. Кочнева, А. А. Гражданцева, Г. Ф. Сиволобова [и др.] // Инфекционные болезни. – 2005. – Т. 3. – N. 1. - С. 26-31.
14. Кузин, С. Н. Генетическое разнообразие вируса гепатита В на территории Республики Саха (Якутия) / С. Н. Кузин, Н. Н. Забелин, Е. И. Самохвалов [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2008. – Т. 42. – N. 5. – С. 10-15.
15. Кузин, С. Н. Проблема диагностического ускользания вируса гепатита В / С. Н. Кузин, Е. И. Самохвалов, Н. Н. Забелин [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 2. - N. 58. - С. 4-9.
16. Кюрегян, К. К. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов : дис. ... д-ра биол. наук : 03.02.02 / Кюрегян Карен Каренович. – М., 2012. – 347 с.
17. Лобзин, Ю. В. Клинико-эпидемиологическая характеристика гепатита В в Республике Саха (Якутия) / Ю. В. Лобзин, С. С. Слепцова, М. Н. Алексеева, А. Г. Рахманова // Инфекционные болезни. – 2004. – Т. 2. – N. 2. – С. 13-16.
18. Мануйлов, В. А. Генетическая вариабельность изолятов вируса гепатита В у населения Шурышкарского района Ямало-Ненецкого Автономного Округа / В. А. Мануйлов, И. Г. Нетесова, Л. П. Осипова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. - N. 4. – С. 30-34.
19. Мануйлов, В. А. Встречаемость субгенотипов вируса гепатита В и субтипов HBsAg у коренного населения севера и юго-востока Сибири / В. А. Мануйлов, Л. П. Осипова, И. Г. Нетесова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2010. - N. 4. – С. 31-35.

20. Мануйлов, В. А. Распространенность различных генотипов и субтипов HBs-антигена вируса гепатита В в группах коренного населения Сибири / В. А. Мануйлов, Л. П. Осипова, И. Г. Нетесова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – N. 1. – С. 28-35.
21. Мануйлов, В. А. Генетическое разнообразие вируса гепатита В в пяти регионах России в период действия программы всеобщей вакцинации: оценка влияния новых факторов отбора на спектр генетических и серологических вариантов / В. А. Мануйлов, Е. И. Сергеева, Г. И. Будай, Т. Н. Тищенко, С. А. Морозова, В. П. Чуланов, К. К. Кюрегян, Э. Ф. Аглетдинов, Л. В. Безуглова, С. В. Нетесов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2025. – N. 1. – С. 38–48.
22. Михайлов, М. И. Детерминанты поверхностного антигена гепатита В (получение моноспецифических сывороток, география распространения субтипов) / М. И. Михайлов, Т. Е. Ворожбиева, Г. Н. Хорват [и др.] // В сборнике: Успехи гематологии. – 1984. – N. 2. – С. 145-151.
23. Михайлов, М. И. Методы выявления HBsAg / М. И. Михайлов // Мир вирусных гепатитов. – 2002. – N. 12.
24. Нетесова, И. Г. Маркеры вирусного гепатита В у южных алтайцев пос. Мендур-Соккон (Республика Алтай). Субтипирование HBsAg изолятов ВГВ с помощью моноклональных антител / И. Г. Нетесова, Р. D. Swenson, Л. П. Осипова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – N. 2. – С. 29-33.
25. Нетесова, И. Г. Субтип HBsAg как одна из характеристик инфекции гепатита В у различных групп населения Западной Сибири : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.06. / Нетесова Ирина Григорьевна. - Кольцово, 2002. – 126 с.
26. Нетесова, И. Г. Субтипы HBsAg вируса гепатита В в Западной Сибири / И. Г. Нетесова, Р. D. Swenson, Т. В. Калашникова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2004. – N. 1. – С. 17-20.
27. Сводное руководство по стратегической информации о вирусных гепатитах. Планирование и мониторинг прогресса на пути к элиминации [Электронный ресурс]. - Всемирная организация здравоохранения. - 2019. - Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1259202/retrieve>.
28. Семенов, А. В. К вопросу о молекулярной эпидемиологии гепатита В в Республике Саха (Якутия) / А. В. Семенов, Ю. В. Останкова, В. В. Герасимова [и др.] // Журнал инфектологии. – 2016. – V. 8. – N. 1. – С. 57-65.
29. Слепцова, С. С. Роль генотипов вирусов гепатитов В, С и D в развитии первичного рака печени / С. С. Слепцова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2012. – V. 4. – N. 4. – С. 67-73.

30. Солонин, С. А. Опыт применения аттестованных контрольных материалов поверхностного антигена вируса гепатита В, предназначенных для оценки чувствительности иммуноферментных тест-систем, в иммунохемилюминесцентном анализе / С. А. Солонин, В. В. Шустов, Н. Е. Терешкина [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. - 2024. - Т. 69. - N. 7. - С. 70-78.
31. Чуланов, В. П. Современный взгляд на проблему выбора вакцины против гепатита В / В. П. Чуланов, Т. А. Семененко, И. В. Карандашова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 4. - N. 95. - С. 65-72.
32. Чуланов, В. П. Эпидемиологическое и клиническое значение генетической гетерогенности вирусов гепатита А и В: автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.02.02, 14.01.09 / Чуланов Владимир Петрович. - М., 2013. - 47 с.
33. Abbott HBV sequencing assay [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/hbv-sequencing>.
34. Abe, K. Molecular epidemiology of hepatitis B, C, D and E viruses among children in Moscow, Russia / K. Abe, E. Hayakawa, A. V. Sminov [et al.] // Journal of Clinical Virology. – 2004. – V. 30. – N. 1. – P. 57-61.
35. Almeida, J. D. New antigen-antibody system in Australia- antigen-positive hepatitis / J. D. Almeida, E. M. Rubenstein, E. J. Stott // The Lancet. – 1971. – V. 298(7736). – P. 1225-1227.
36. Arankalle, V. A. Hepatitis B virus: predominance of genotype D in primitive tribes of the Andaman and Nicobar islands, India (1989-1999) / V. A. Arankalle, K. M. Murhekar, S. S. Gandhe [et al.] // Journal of General Virology. – 2003. – V. 84. – N. 7. – P. 1915-1920.
37. Arauz-Ruiz, P. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America / P. Arauz-Ruiz, H. Norder, B. H. Robertson, L. O. Magnius // Journal of General Virology. – 2002. – V. 83. - N. 8. – P. 2059-2073.
38. Arauz-Ruiz, P. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene / P. Arauz-Ruiz, H. Norder, K. A. Visona, L. O. Magnius // The Journal of Infectious Diseases. – 1997. – V. 176. – N. 4. – P. 851-858.
39. Asadi Mobarkhan, F. A. Post-Vaccination and Post-Infection Immunity to the Hepatitis B Virus and Circulation of Immune-Escape Variants in the Russian Federation 20 Years after the Start of Mass Vaccination / F. A. Asadi Mobarkhan, V. A. Manuylov, A. A. Karlsen [et al.] // Vaccines. – 2023. – N. 11. – P. 430.

40. Avazova, D. Hepatitis B virus transmission pattern and vaccination efficiency in Uzbekistan / D. Avazova, F. Kurbanov, Y. Tanaka [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2008. - V. 80. - N. 2. – P. 217-224.
41. Bancroft, W. H. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen / W. H. Bancroft, F. K. Mundon, P. K. Russell // *The Journal of Immunology*. – 1972. – V. 109. - N. 4. – P. 842-848.
42. Blumberg, B. S. A 'new' antigen in leukemia sera / B. S. Blumberg, H. J. Alter, S. Visnich // *Journal of American Medical Association*. – 1965. - V. 191. – P. 541-546.
43. Borchani-Chabchoub, I. Genotyping of Tunisian hepatitis B virus isolates based on the sequencing of preS2 and S regions / I. Borchani-Chabchoub, A. Gargouri, R. Mokdad-Gargouri // *Microbes and Infection*. – 2000. – V. 2. – N. 6. – P. 607-612.
44. Bowyer, S. M. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa / S. M. Bowyer, L. van Staden, M. C. Kew, J. G. Sim // *Journal of General Virology*. – 1997. – V. 78. - N. 7. – P. 1719-1729.
45. Buster, E. H. Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b / E. H. Buster, H. J. Flink, Y. Cakaloglu [et al.] // *Gastroenterology*. – 2008. – V. 135. – P. 459-467.
46. Carman, W. F. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis / W. F. Carman, C. Trautwein, F. J. van Deursen [et al.] // *Hepatology*. – 1996. – N. 3. – P. 489-493.
47. Carman, W. F. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus / W. F. Carman, A. R. Zanetti, P. Karayiannis [et al.] // *The Lancet*. – 1990. – V. 336. – N. 8711. – P. 325-329.
48. Chau, K. H. Serodiagnosis of recent hepatitis B infection by IgM class anti-HBc / K. H. Chau, M. P. Hargie, R. H. Decker [et al.] // *Hepatology*. – 1983. – V. 3. - N. 2. – P. 142-149.
49. Chen, J. D. Hepatitis B genotypes correlate with tumor recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma / J. D. Chen, C. J. Liu, P. H. Lee [et al.] // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2004. – V. 2. – N. 1. – P. 64-71.
50. Chen, J. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A–F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2 / J. Chen, J. Yin, X. Tan [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2007. – V. 38. – P. 238–43.

51. Cooreman, M. P. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen / M. P. Cooreman, G. Leroux-Roels, W. P. Paulij // *Journal of Biomedical Science*. – 2001. – V. 8. – N. 3. – P. 237-247.
52. Couroucé-Pauty, A. M. Distribution of HBsAg subtypes in the world / A. M. Couroucé-Pauty, A. Plan on, J. P. Soulier // *Vox Sanguinis*. – 1983. – V. 44. – N. 4. – P. 197-211.
53. Dane, D. S. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis / D. S. Dane, C. H. Cameron, M. Briggs // *The Lancet*. – 1970. – V. 1. – I. 7649. – P. 695-698.
54. Davidson, M. Recombinant yeast hepatitis B vaccine compared with plasma-derived vaccine: immunogenicity and effect of a booster dose. / M. Davidson, S. Krugman // *Journal of Infection*. – 1986. – V. 13. – Supplement A. – P. 31-38.
55. Desmyter, J. Administration of human fibroblast interferon in chronic hepatitis-B infection / J. Desmyter, J. De Groote, V. J. Desmet [et al.] // *The Lancet*. – 1976. – V. 2. – I. 7987. – P. 645-647.
56. Dienstag, J. L. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection / J. L. Dienstag, R. P. Perrillo, E. R. Schiff [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1995. – V. 333. – N. 25. – P. 1657-1661.
57. Ding, X. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China / X. Ding, H. Gu, Z. H. Zhong [et al.] // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2003. – V. 56. – N. 1. – P. 19-22.
58. Doong, S. L. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues / S. L. Doong, C. H. Tsai, R. F. Schinazi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1991. – V. 88. – N. 19. – P. 8495-8499.
59. Dryden, K. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy / K. Dryden, S. F. Wieland, C. Whitten-Bauer [et al.] // *Molecular cell*. – 2006. – V. 22. – N. 6. – P. 843-850.
60. Echevarria, J. M. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing / J. M. Echevarria, A. Avell n, L.O. Magnius // *Journal of Medical Virology*. – 2005. – V. 76. – N. 2. – P. 176-184.
61. Edman, J. C. Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli* / J. C. Edman, R. A. Hallewell, P. Valenzuela [et al.] // *Nature*. – 1981. – V. 291. – I. 5815. – P. 503-506.
62. Erhardt, A. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D / A. Erhardt, D. Blondin, K. Hauck [et al.] // *Gut*. – 2005. – V. 54. – P. 1009-1013.

63. Fagan, E. A. Fulminant viral hepatitis / E. A. Fagan, R. Williams // *British Medical Bulletin*. – 1990. – V. 46. – N. 2. – P. 462-480.
64. Flodgren, E. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains / E. Flodgren, S. Bengtsson, M. Knutsson [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2000. – V. 38. – N. 1. – P. 3311-3316.
65. Francis, D. P. The prevention of hepatitis B with vaccine. Report of the centers for disease control multi-center efficacy trial among homosexual men / D. P. Francis, S. C. Hadler, S. E. Thompson [et al.] // *Annals of Internal Medicine*. – 1982. – V. 97. – N. 3. – P. 362-366.
66. Fritsch, A. Cloning of the hepatitis B virus genome in *Escherichia coli* / A. Fritsch, C. Pourcel, P. Charnay, P. Tiollais // *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. D: Sciences Naturelles*. – 1978. – V. 287. – N. 16. – P. 1453-1456.
67. Fujii, H. Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus / H. Fujii, K. Moriyama, N. Sakamoto [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1992. – V. 184. – N. 3. – P. 1152-1157.
68. Furusyo, N. Clinical outcomes of hepatitis B virus (HBV) genotypes B and C in Japanese patients with chronic HBV infection / N. Furusyo, H. Nakashima, K. Kashiwagi [et al.] // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2002. – V. 61. – N. 2. – P. 151-157.
69. Galibert, F. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli* / F. Galibert, E. Mandart, F. Fitoussi [et al.] // *Nature*. – 1979. – V. 281(5733). – P. 646-650.
70. Gandhe, S. S. Hepatitis B virus genotypes and serotypes in western India: lack of clinical significance / S. S. Gandhe, M. S. Chadha, V. A. Arankalle // *Journal of Medical Virology*. – 2003. – V. 69. – N. 3. – P. 324-330.
71. Ganem, D. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences / D. Ganem, A. M. Prince // *The New England Journal of Medicine*. – 2004. – V. 350. – N. 11. – P. 1118-29.
72. Ge, X. M. Distribution of hepatitis B virus genotypes and its clinical significance in Guangxi / X. M. Ge, D. Y. Li, Z. L. Fang [et al.] // *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. – 2003. – V. 17. – N. 2. – P. 169-173.
73. Gerlich, W. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' end of its complete strand / W. Gerlich, W. S. Robinson // *Cell*. – 1980. – V. 21. – P. 801-811.
74. Gerlich, W. Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume / W. Gerlich, R. Thomssen // *Developments in biological standardization*. – 1975. – V. 30. – P. 78-87.

75. Goldstein, S. T. Incidence and risk factors for acute hepatitis B in the United States, 1982-1998: implications for vaccination programs / S. T. Goldstein, M. J. Alter, I. T. Williams [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2002. – V. 185. - N. 6. – P. 713-719.
76. Greenberg, H. B. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis / H. B. Greenberg, R. B. Pollard, L. I. Lutwick [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1976. – V. 295. - N. 10. – P. 517-522.
77. Guidelines for the prevention, diagnosis, care and treatment for people with chronic hepatitis B infection [Электронный ресурс]. - 2024. – Режим доступа: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376353/9789240090903-eng.pdf?sequence=1>.
78. Guidelines on hepatitis B and C testing [Электронный ресурс]. - World health organization, 2017. - Режим доступа: <https://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/9789241549981-eng.pdf>.
79. Gust, I. The epidemiology of viral hepatitis / I. Gust // In: *Viral hepatitis and liver disease*. Edited by G. N. Vyas. – Orlando, FL: Gruneand Stratton, 1984. – P. 415-421.
80. Hakami, A. Effects of Hepatitis B virus mutations on its replication and liver disease severity / A. Hakami, A. Ali, A. Hakami // *The Open Virology Journal*. – 2013. – N. 7. – P. 12-18.
81. HBsAg Subtype EIA [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.tokumen.co.jp/products/manual/en/ME-HBsAg-Subtype-EIA.pdf>.
82. HBsAg/HCV Ab Rapid Test [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://ctkbiotech.com/product/hbsag-hcv-ab-rapid-test/>.
83. HBV-genotype-EIA [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.tokumen.co.jp/products/manual/en/ME-IMMUNIS-HBV-Genotype-EIA.pdf>.
84. Heermann, K. H. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence / K. H. Heermann, U. Goldmann, W. Schwarcz [et al.] // *Journal of Virology*. – 1984. - V. 52. - N. 2. – P. 396-402.
85. Heidrich, B. HBeAg-positive hepatitis delta: virological patterns and clinical long-term outcome / B. Heidrich, B. Serrano, R. Idilman [et al.] // *Liver International*. – 2012. - V. 32. - N. 9. – P. 1415-1425.
86. Hollinger, F. B. Hepatitis B virus. Hepadnaviridae: the viruses and their replication / F. B. Hollinger, T. J. Liang // In: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin [et al.]. *Fields Virology*. Vol. 2. 4th ed. - Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Wilkins, 2001. – P. 2971-3036.
87. Hoofnagle, J. H. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis / J. H. Hoofnagle, A. M. Di Bisceglie // *Seminars in Liver Disease*. – 1991. – V. 11. - N. 2. – P. 73-83.

88. Hsieh, T. H. Hepatitis B virus genotype B has an earlier emergence of lamivudine resistance than genotype C / T. H. Hsieh, T. C. Tseng, C. J. Liu [et al.] // *Antiviral Therapy*. – 2009. – V. 14. – P. 1157-1163.
89. Huy, T. T. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant / T. T. Huy, H. Ushijima, T. Sata, K. Abe // *Archives of Virology*. – 2006. – V. 151. - N. 3. – P. 589-597.
90. Huy, T. T. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups / T. T. Huy, H. Ushijima, V. X. Quang [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2004. – V. 85. – P. 283–292.
91. Hyams, K. C. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review / K. C. Hyams // *Clinical Infectious Diseases*. – 1995. – V. 20. – N. 4. – P. 992-1000.
92. INNO-LiPA® HBV Genotyping [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.fujirebio.com/en/products-solutions/innolipa-hbv-genotyping>.
93. Kaneko, S. Detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction assay / S. Kaneko, M. Unoura, K. Kobayashi // *Rinsho Byori*. – 1990. – V. 38. - N. 9. – P. 1036-1040.
94. Kao, J. H. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C / J. H. Kao, P. J. Chen, M. Y. Lai, D. S. Chen // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002a. – V. 40. – N. 1. – P. 22-25.
95. Kao, J. H. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection / J. H. Kao, P. J. Chen, M. Y. Lai, D. S. Chen // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002b. – V. 40. – N. 4. – P. 1207-1209.
96. Kao, J. H. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy / J. H. Kao, N. H. Wu, P. J. Chen [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2000. – V. 33. – P. 998-1002.
97. Kao, J. H. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus / J. H. Kao // *The Korean Journal of Internal Medicine*. – 2011. – V. 26. – P. 255-261.
98. Kao, J. H. Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects / J. H. Kao, P. J. Chen, D. S. Chen // *Advances in Cancer Research*. – 2010. – V. 108. – P. 21-72.
99. Kato, H. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping / H. Kato, R. Ruzibakiev, N. Yuldasheva [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2002. - V. 67. - N. 4. – P. 477-483.

100. Khan, A. Epidemiological and clinical evaluation of hepatitis B, hepatitis C, and delta hepatitis viruses in Tajikistan / A. Khan, F. Kurbanov, Y. Tanaka [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2008. – V. 80. – N. 2. – P. 268-276.
101. Kimbi, G. C. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa / G. C. Kimbi, A. Kramvis, M. C. Kew // *Journal of General Virology*. – 2004. – V. 85. – P. 1211-1220.
102. Kirschberg, O. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A–F / O. Kirschberg, C. Schu"ttler, R. Repp, S. Schaefer // *Journal of Clinical Virology*. – 2004. – V. 29. – P. 39–43.
103. Kobayashi, M. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C / M. Kobayashi, Y. Arase, K. Ikeda [et al.] // *Journal of Gastroenterology*. – 2002. – V. 37. – N. 1. – P. 35-39.
104. Kostyushev, D. CRISPR/Cas and Hepatitis B Therapy: Technological Advances and Practical Barriers / D. Kostyushev, A. Kostyusheva, N. Ponomareva [et al.] // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2022. – V. 32. – N. 1. – P. 14-28.
105. Kostyushev, D. Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9 / D. Kostyushev, A. Kostyusheva, S. Brezgin [et al.] // *Molecular Therapy: Nucleic Acids*. – 2023. – V. 31. – P. 482-493.
106. Kramvis, A. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa / A. Kramvis, L. Weitzmann, W. K. Owiredo, M. C. Kew // *Journal of General Virology*. – 2002. – V. 83. – P. 835-839.
107. Kramvis, A. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus / A. Kramvis, K. Arakawa, M. C. Yu [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2008. – V. 80. – N. 1. – P. 27-46.
108. Kumagai, I. A male patient with severe acute hepatitis who was domestically infected with a genotype H hepatitis B virus in Iwate, Japan / I. Kumagai, K. Abe, T. Oikawa [et al.] // *Journal of Gastroenterology*. – 2007. – V. 42. – P. 168–175.
109. Kurbanov, F. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus / F. Kurbanov, Y. Tanaka & M. Mizokami // *Hepatology Research*. – 2010. – V. 40. – N. 1. – P. 14-30.
110. Lai, M. M. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: Surprises from hepatitis delta virus / M. M. Lai // *Journal of Virology*. – 2005. – V. 79. – P. 7951–7958.
111. Lazarevic, I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances / I. Lazarevic // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – N. 20. – P. 7653-7664.

112. Le Bouvier, G. L. The heterogeneity of Australia antigen / G. L. Le Bouvier // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1971. – V. 123. – N. 6. – P. 671-675.
113. Lee, J. M. Reappraisal of HBV genotypes and clinical significance in Koreans using MALDI-TOF mass spectrometry / J. M. Lee, S. H. Ahn, H. Y. Chang [et al.] // *The Korean Journal of Hepatology*. – 2004. – V. 10. – P. 260–70.
114. Lempp, F. A. Hepatitis Delta Virus: Replication Strategy and Upcoming Therapeutic Options for a Neglected Human Pathogen / F. A. Lempp, S. Urban // *Viruses*. – 2017. – V. 9. - N. 7. – P. 172.
115. Liaw, Y. F. Hepatitis B e antigen seroconversion: a critical event in chronic hepatitis B virus infection / Y. F. Liaw, G. K. Lau, J. H. Kao, E. Gane // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2010. – V. 55. – P. 2727-34.
116. Lin, C. L. Clinicopathological differences between hepatitis B viral genotype B- and C-related resectable hepatocellular carcinoma / C. L. Lin, J. D. Chen, C. J. Liu [et al.] // *Journal of Viral Hepatitis*. – 2007. – V. 14. – N. 1. – P. 64-69.
117. Lin, C. L. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances / C. L. Lin, J. H. Kao // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2011. – V. 26. – Sup. 1. – P. 123-130.
118. Lin, S. R. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo / S. R. Lin, H. C. Yang, Y. T. Kuo [et al.] // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. – 2014. – V. 3. – P. 186.
119. Lindh, M. Acute hepatitis B in Western Sweden - genotypes and transmission routes / M. Lindh, P. Horal, G. Norkrans // *Infection*. – 2000. – V. 28. – N. 3. – P. 161-163.
120. Lindh, M. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon / M. Lindh, J. E. Gonzalez, G. Norkrans, P. Horal // *Journal of Virological Methods*. – 1998. – V. 72. - P. 163-174.
121. Liu, C. J. Hepatitis B virus basal core promoter mutation and DNA load correlate with expression of hepatitis B core antigen in patients with chronic hepatitis B / C. J. Liu, Y. M. Jeng, C. L. Chen [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2009. – V. 199. – P. 742-749.
122. Liu, W. C. Genotyping of hepatitis B virus genotypes A to G by multiplex polymerase chain reaction / W. C. Liu, M. Lindh, M. Buti [et al.] // *Intervirology*. – 2008. - V. 51. – P. 247–52.
123. Liu, W. C. Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis / W. C. Liu, M. Mizokami, M. Buti [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – V. 44. – P. 4491–7.

124. Livingston, S. E. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F / S. E. Livingston, J. P. Simonetti, B. J. McMahon [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – V. 195. – N. 1. – P. 5-11.
125. Lok, A. S. Chronic hepatitis B / A. S. Lok, B. J. McMahon // *Hepatology*. – 2007. – V. 45. – P. 507-539.
126. Lucifora, J. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection / J. Lucifora, S. Arzberger, D. Durantel [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2011. – V. 55. – N. 5. – P. 996-1003.
127. Madalinski, K. Subtypes of HBsAg in eastern and south-eastern Europe / K. Madalinski, P. V. Holland, Z. Moraczewska [et al.] // *Vox Sanguinis*. – 1977. - V. 32. – N. 4. – P. 224-229.
128. Magnus, L. O. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen / L. O. Magnus, A. Espmark // *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*. – 1972. – V. 80. - N. 2. – P. 335-337.
129. Magnus, L. O. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene / L. O. Magnus, H. Norder // *Intervirology*. – 1995. – V. 38. – P. 24-34.
130. Marcellin, P. Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a / P. Marcellin, F. Bonino, G. K. Lau [et al.] // *Gastroenterology*. – 2009. – V. 136. – P. 2169-2179.
131. Marcellin, P. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B / P. Marcellin, E. J. Heathcote, M. Buti [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2008. – V. 359. – P. 2442-2455.
132. Mason, W. S. Deltavirus / W. S. Mason, C. J. Burrell, J. Casey // In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball. *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. – 2005. – P. 735.
133. Mbayed, V. A. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina / V. A. Mbayed, J. L. Lopez, P. F. Telenta [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1998. – V. 36. – P. 3362-3365.
134. McLean, A. A. Summary of world wide experience with HB-Vax. / A. A. McLean, M. R. Hilleman, W. J. McAleer, E. B. Buynak // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1983. – V. 7 (Sup). – P. 95-104.
135. McMahon, B. J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B / B. J. McMahon // *Hepatology International*. – 2009. – V. 3. – P. 334-342.

136. Milich, D. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection / D. Milich, T. J. Liang // *Hepatology*. – 2003. – V. 38. – P. 1075–1086.
137. Mizokami, M. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns / M. Mizokami, T. Nakano, E. Orito [et al.] // *FEBS Letters*. – 1999. – V. 450. – P. 66-71.
138. Morales-Romero, J. Occult HBV infection: a faceless enemy in liver cancer development / J. Morales-Romero, G. Vargas, R. García-Román // *Viruses*. – 2014. – V. 6. – N. 4. – P. 1590-1611.
139. Moriya, T. Distribution of hepatitis B virus genotypes among American blood donors determined with a PreS2 epitope enzyme-linked immunosorbent assay kit / T. Moriya, I. K. Kuramoto, H. Yoshizawa [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – V. 40. – N. 3. – P. 877-880.
140. Moucari, R. Hepatitis B virus surface antigen levels during and after pegylated interferon – alfa 2a treatment might be predictors of sustained viral response / R. Moucari [et al.] // *Hepatology*. – 2009. – V. 49. – P. 1151.
141. Naito, H. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers / H. Naito, S. Hayashi, K. Abe // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – V. 39. - P. 362–4.
142. Nassal, M. Hepatitis B virus replication: Novel roles for virus-host interactions / M. Nassal // *Intervirology*. – 1999. – V. 42. – P. 100-116.
143. Netesova, I. G. Determination of HbsAg subtypes in Western Siberian part of Russia / I. G. Netesova, P. D. Swenson, L. P. Osipova [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2003. - V. 71. – P. 183-187.
144. Ni, Y. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes / Y. Ni, F. A. Lempp, S. Mehrle [et al.] // *Gastroenterology*. – 2014. – V. 146. - N. 4. – P. 1070-83.
145. Ning, X. Secretion of genome-free hepatitis B virus – single strand blocking model for virion morphogenesis of para-retrovirus / X. Ning, D. Nguyen, L. Mentzer [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2011. - V. 7. - N. 9. – P. 1002255.
146. Nkongolo, S. Bulevirtide als erster spezifischer Wirkstoff gegen Hepatitis-D-Virusinfektionen – Mechanismus und klinische Wirkung [Bulevirtide as the first specific agent against hepatitis D virus infections-mechanism and clinical effect] / S. Nkongolo, J. Hollnberger, S. Urban // *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. – 2022. – V. 65. - N. 2. - P. 254-263.

147. Norder, H. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains / H. Norder, B. Hammas, S. Losfdahl [et al.] // *Journal of General Virology*. – 1992a. – V. 73. - N. 5. – P. 1201-1208.
148. Norder, H. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes / H. Norder, A. M. Couroucé, L. O. Magnius // *Virology*. – 1994. – V. 198. – P. 489-503.
149. Norder, H. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes / H. Norder, A. M. Couroucé, P. Coursaget [et al.] // *Intervirology*. – 2004. - V. 47. - N. 6. – P. 289-309.
150. Norder, H. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen / H. Norder, B. Hammas, S. D. Lee [et al.] // *Journal of General Virology*. – 1993. – V. 74. – N. 7. – P. 1341-1348.
151. Norder, H. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. / H. Norder, A. M. Couroucé, L. O. Magnius // *Journal of General Virology*. – 1992b. – V. 73. – N. 12. – P. 3141-3145.
152. Norder, H. The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades / H. Norder, P. Arauz-Ruiz, L. Blitz [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2003. – V. 84. - N. 8. – P. 2083-2087.
153. Norder, H. Typing of hepatitis B virus genomes by simplified polymerase chain reaction / H. Norder, B. Hammas, L. O. Magnius // *Journal of Medical Virology*. – 1990. – V. 31. – P. 215-221.
154. Novel antibody specific for HBV DNA virus HB surface antigen glycan isomer (HBsAgGi) [Электронный ресурс]. - RCMG Inc. Japan. - Режим доступа: https://med-glycosci.com/pdf/2022/Leaflet%20for%20HBsAgGi%20Ab_ELISA-v1.pdf.
155. Odemuyiwa, S. O. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa / S. O. Odemuyiwa, M. N. Mulders, O. I. Oyedele [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2001. – V. 65. – N. 3. – P. 463-469.
156. Okamoto, H. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission / H. Okamoto, M. Imai, M. Kametani [et al.] // *The Japanese Journal of Experimental Medicine*. – 1987b. – V. 57. – P. 231-236.
157. Okamoto, H. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr / H. Okamoto, M. Imai, F. Tsuda [et al.] // *Journal of Virology*. – 1987a. – V. 61. - N. 10. – P. 3030-3034.

158. Okamoto, H. The loss of subtypic determinants in alleles, d/y or w/r, on hepatitis B surface antigen / H. Okamoto, S. Omi, Y. Wang [et al.] // *Molecular Immunology*. – 1989. – V. 26. – P. 197-205.
159. Okamoto, H. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes / H. Okamoto, F. Tsuda, H. Sakugawa [et al.] // *Journal of General Virology*. – 1988. – V. 69. – P. 2575-2583.
160. Olinger, C. M. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences / C. M. Olinger, N. V. Lazouskaya, V. F. Eremin, C. P. Muller // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2008. - V. 14. - N. 6. – P. 575-581.
161. Orito, E. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences / E. Orito, M. Mizokami, Y. Ina [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1989. – V. 86. – P. 7059-7062.
162. Ou, J. H. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen / J. H. Ou, O. Laub, W. J. Rutter // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1986. – V. 83. – P. 1578-1582.
163. Payungporn, S. Simultaneous quantitation and genotyping of hepatitis B virus by real-time PCR and melting curve analysis / S. Payungporn, P. Tangkijvanich, P. Jantaradsamee [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2004. – V. 120. – P. 131–40.
164. Purdy, M. A New Algorithm for Deduction of Hepatitis B Surface Antigen Subtype Determinants from the Amino Acid Sequence / M. Purdy, G. Talekar, P. Swenson [et al.] // *Intervirology*. – 2007. – V. 50. – P. 45–51.
165. Quintero, A. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Afro-Venezuelan populations / A. Quintero, D. Martínez, B. Alarcón de Noya [et al.] // *Archives of virology*. – 2002. – V. 147. – P. 1829-36.
166. Rajoriya, N. How viral genetic variants and genotypes influence disease and treatment outcome of chronic hepatitis B. Time for an individualized approach? / N. Rajoriya, C. Combet, F. Zoulim [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2017. – V. 67. - N. 6. – P. 1281-1297.
167. Rizzetto, M. Delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees / M. Rizzetto, B. Hoyer, M. G. Canese [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences – USA*. – 1980b. – V. 77. – P. 6124– 8.
168. Rizzetto, M. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers / M. Rizzetto, M. G. Canese, S. Arico [et al.] // *Gut*. – 1977. – V. 18. – P. 997– 1003.

169. Rizzetto, M. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees / M. Rizzetto, M. G. Canese, J. L. Gerin [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1980a. – V. 141. – P. 590–602.
170. Sanchez, L. V. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains / L. V. Sanchez, M. Maldonado, B. E. Bastidas-Ramirez [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2002. – V. 68. – N. 1. – P. 24-32.
171. Sanchez-Tapias, J. M. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients / J. M. Sanchez-Tapias, J. Costa, A. Mas [et al.] // *Gastroenterology*. – 2002. – V. 123. – P. 1848-1856.
172. Schaefer, S. Under construction: classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes / S. Schaefer, L. Magnus, H. Norder // *Intervirology*. – 2009. - V. 52. - N. 6. – P. 323-325.
173. Scheiblaue, H. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes / H. Scheiblaue, M. El-Nageh, S. Diaz [et al.] // *Vox Sanguinis*. – 2010. – V. 98. – P. 403-414.
174. Seeger, Ch. DNA viruses / Ch. Seeger, F. Zoulim, W. S. Mason // In: P. M. Howley, D. M. Knipe. *Fields Virology*. - Seventh edition. – Philadelphia : Wolters Kluwer, 2021. - V. 2. - Chapter 18. – P. 641-682.
175. Seitz, S. Crio-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions / S. Seitz, S. Urban, Chr. Antoni and B. Böttcher // *The EMBO Journal*. – 2007. - V. 26. - N. 18. – P. 4160–4167.
176. Shapiro, C. N. Epidemiology of hepatitis B / C. N. Shapiro // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 1993. – V. 12. – N. 5. – P. 433-437.
177. Simmonds, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans / P. Simmonds // *Journal of General Virology*. – 2001. – V. 82. – P. 693-712.
178. Sominskaya, I. Hepatitis B and C virus variants in long-term immunosuppressed renal transplant patients in Latvia / I. Sominskaya, M. Mihailova, J. Jansons [et al.] // *Intervirology*. – 2005. - V. 48. - N. (2-3). – P. 192-200.
179. Song, Y. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray / Y. Song, E. Dai, J. Wang [et al.] // *Molecular and Cellular Probes*. – 2006. – V. 20. – P. 121–7.

180. Stuyver, L. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness / L. Stuyver, S. De Gendt, C. Van Geyt [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2000. – V. 81. – P. 67-74.
181. Su, C. W. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients / C. W. Su, Y. H. Huang, T. I. Huo [et al.] // *Gastroenterology*. – 2006. – V. 130. – N. 6. – P. 1625-1635.
182. Sugiyama, M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens / M. Sugiyama, Y. Tanaka, T. Kato [et al.] // *Hepatology*. – 2006. – V. 44. – P. 915-924.
183. Sung, J. L. Geographical distribution of the subtype of hepatitis B surface antigen in Chinese / J. L. Sung, D. S. Chen // *Gastroenterologia Japonica*. – 1977. – V. 12. – N. 2. – P. 58-63.
184. Suzuki, F. Efficacy of Lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan / F. Suzuki, A. Tsubota, Y. Arase [et al.] // *Intervirology*. – 2003. – V. 46. – N. 3. – P. 182-189.
185. Swenson, P. D. Determination of HBsAg subtypes in different high-risk populations using monoclonal antibodies / P. D. Swenson, J. T. Riess, L. E. Kruger // *Journal of Virological Methods*. – 1991. – V. 33. – P. 27-38.
186. Tallo, T. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region / T. Tallo, V. Tefanova, L. Priimagi [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2008. – V. 89. – P. 1829-1839.
187. Tallo, T. Hepatitis B virus genotype D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4 / T. Tallo, H. Norder, V. Tefanova [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2004. – V. 74. – N. 2. – P. 221-227.
188. Tan, Y. The naturally occurring YMDD mutation among patients chronically infected HBV and untreated with lamivudine: A systematic review and meta-analysis / Y. Tan, K. Ding, J. Su [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – N. 3. – P. e32789.
189. Tanaka, Y. Evaluation of hepatitis B virus genotyping EIA kit / Y. Tanaka, F. Sugauchi, K. Matsuura [et al.] // *Rinsho Byori*. – 2009. – V. 57. – N. 1. – P. 42-47.
190. Tanaka, Y. Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes / Y. Tanaka, M. Mizokami // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – V. 195. – N. 1. – P. 1-4.

191. Tatematsu, K. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J / K. Tatematsu, Y. Tanaka, F. Kurbanov [et al.] // *Journal of Virology*. – 2009. - V. 83. – P. 10538–10547.
192. Taylor, J. M. Hepatitis delta virus / J. M. Taylor // *Virology*. – 2006. – V. 344. – P. 71–76.
193. Theamboonlers, A. Genotypes and subtypes of hepatitis B virus in Thailand / A. Theamboonlers, P. Tangkijvanich, C. Pramoolsinsap, Y. Poovorawan // *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. – 1998. – V. 29. – N. 4. – P. 786-791.
194. Thomas, H. C. Hepatitis B virus: pathogenesis and treatment of chronic infection / H. C. Thomas, M. R. Jacyna // In: *Viral Hepatitis*. Edited by A. J. Zuckerman and H. C. Thomas. – Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993. – P. 185–207.
195. Tran, T. T. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam / T. T. Tran, T. N. Trinh, K. Abe // *Journal of Virology*. – 2008. - V. 82. – P. 5657–5663.
196. TRUGENE HBV Genotyping Assay (RUO) [Электронный ресурс]. - Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY, USA. - Режим доступа: <http://www.medical-siemens.com>.
197. Usuda, S. A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic antigen determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies / S. Usuda, F. Tsuda, T. Gotanda [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. – 1986. - V. 87. – P. 203-210.
198. Usuda, S. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product / S. Usuda, H. Okamoto, H. Iwanari [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 1999. - V. 80. – P. 97-112.
199. Valenzuela, P. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. / P. Valenzuela, A. Medina, W. J. Rutter [et al.] // *Nature*. – 1982. – V. 298. – I. 5872. – P. 347-50.
200. Wagatsuma, T. Highly Sensitive Glycan Profiling of Hepatitis B Viral Particles and a Simple Method for Dane Particle Enrichment / T. Wagatsuma, A. Kuno, K. Angata [et al.] // *Anal Chem*. – 2018. – V. 90. - N. 17. – P. 10196-10203.
201. WHO International Standard. Third International Standard for HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ayw1/adw2). NIBSC code: 12/226. Instructions for use (Version 2.0, Dated 30/01/2017) [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/12-226.pdf>.
202. Wiegand, J. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence / J. Wiegand, D. Hasenclever, H. L. Tillmann // *Antiviral Therapy*. – 2008. – V. 13. – P. 211-220.

203. Wu, X. Preparation of the national reference panel for hepatitis B surface antigen / X. Wu, C. Zhou, W. J. Gu [et al.] // *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. – 2008. – V. 22. - N. 4. – P. 311-313 (In Chinese).
204. Yamada, N. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection / N. Yamada, R. Shigefuku, R. Sugiyama [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – V. 20. – N. 11. – P. 3044-3049.
205. Yang, H. I. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma / H. I. Yang, S. H. Yeh, P. J. Chen [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2008. – V. 100. – P. 1134-1143.
206. Yeh, S. H. Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis / S. H. Yeh, C. Y. Tsai, J. H. Kao [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2004. - V. 41. – P. 659–66.
207. Yuen, M. F. Hepatitis B virus infection / M. F. Yuen, D. S. Chen, G. M. Dusheiko [et al.] // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2018. – V. 4. – P. 18035.
208. Zhang, R. Determination of hepatitis B virus genotype by flow-through reverse dot blot / R. Zhang, Y. Deng, C. P. Muller [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2007. - V. 39. – P. 94–100.
209. Zhao, S. M. High Prevalence of HBV in Tibet, China / S. M. Zhao, H. C. Li, H. Lou [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2001. – V. 2. – N. 4. – P. 299-304.
210. Zoulim, F. New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection / F. Zoulim, L. Mimms, M. Floreani // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1992. – V. 30. - N. 5. – P. 1111-1119.

Автор выражает благодарность к.б.н. Осиповой Л. П., Воеводской Л. Ю., Половице Н. В., к.м.н. Лысых Е. Е. за предоставленные образцы сывороток и плазм крови; Порываевой В. А. за предоставленные МАТ анти-HBs; Вторушиной И. А. за синтез конъюгатов МАТ-ПХ; к.б.н. Сорокину М. А. за предоставленный рекомбинантный HBsAg; к.б.н. Мануйлову В. А. и к.б.н. Сергеевой Е. И. за предоставленные данные молекулярно-генетических исследований; сотрудникам научной группы под руководством д.б.н. Кюрегян К. К. за проведение валидации методики в образцах крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и с сочетанной инфекцией ВГВ + ВГД; д.б.н. Потаповой А. А. за оценку возможности применения разработанной методики в клинической лабораторной практике. Автор выражает огромную благодарность к.б.н. Нетесовой И. Г. за консультации и ценные советы и своему научному руководителю д.б.н., проф., академику РАН Нетесову С. В. за наставничество и бесценный опыт.

Приложение 1. Внутрिलाбораторная панель HBsAg+ образцов «расширенная»

№	Шифр образца	Субтип HBsAg, установленный по методике Dr. P.Swenson
1	B26	adw2
2	B39	adw2
3	B40	adw2
4	B41	adw2
5	B42	adw2
6	B45	adw2
7	B58	adw2
8	B62	adw2
9	B65	adw2
10	B67	adw2
11	B77	adw2
12	B85	adw2
13	B87	adw2
14	B89	adw2
15	B95	adw2
16	Шер	adw2
17	Со6	adw2
18	Ч3	adrq+
19	Ч6	adrq+
20	Ч7	adrq+
21	Ч14	adrq+
22	Ч19	adrq+
23	Ч22	adrq+
24	Ч23	adrq+
25	Ч24	adrq+
26	Ч26	adrq+
27	Ч27	adrq+
28	Ч29	adrq+
29	УВ1	ayw2
30	УВ2	ayw2
31	УВ4	ayw2
32	УВ6	ayw2
33	УВ9	ayw2
34	УВ10	ayw2
35	УВ7	ayw3varB
36	P5	ayw3varA
37	P12	ayw3varB
38	P14	ayw3varB
39	P18	ayw3varA
40	Б5	ayw3varB

41	Б9	ayw3varA
42	Б12	ayw3varB
43	Б15	ayw3varB
44	BKO1	ayw2
45	BKO2	ayw3varA
46	BKO3	ayw3varB
47	BKO4	adw2
48	BKO5	adrq+

Приложение 2. Результаты определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах плазм крови представителей коренных народностей Сибири, установленные по методике Dr. P.Swenson

№	Образец	Моноклональные антитела анти-HBs							Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	Примечание
		3C3	2D11	3D9	3A5	3E2	1C10	1C4			
Образцы с выделенной ДНК ВГВ											
1	AB24	-	-	-	-	-			нет реакции		
2	AB33	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
3	AB35	-	-	-	-	-			нет реакции		
4	AB55	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
5	AB65	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
6	AB223	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
7	AB224	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
8	AB236	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
9	АЛ10	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
10	АЛ105	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
11	АЛ134	не исследовали по методике Dr. P.Swenson									
12	АЛ135	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
13	АЛ151	-	+	-	-	+	-	-	ayw1?	B?	сомнительно
14	АЛ161	+	+	+	+	+	+	+	?		
15	АЛ162	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
16	АЛ165	+	+	-	-	-	+	+	?		все сигналы в зоне ОП _{крит}
17	АЛ197	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
18	АЛ199	-	-	-	-	+	+	-	ayw3varA	D	
19	АЛ209	не исследовали по методике Dr. P.Swenson									
20	АЛ213	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
21	АЛ247	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	

22	АЛ273	не исследовали по методике Dr. P.Swenson									
23	АЛ326	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
24	АЛ352	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
25	АЛ369	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
26	АЛ378	не исследовали по методике Dr. P.Swenson									
27	АЛ396	-	+	+	+	-	+	-	ayw4?		все сигналы в зоне ОП _{крит}
28	АЛ398	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
29	АЛ482	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	дефект по 3D9
30	БЕК10	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
31	БЕК32	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
32	БЕК93	-	+	+	+	-	+	-	ayw4	E?	сомнительно
33	БЕК94	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
34	БЕК115	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
35	ВО36	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
36	ВО41	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
37	ВО61	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
38	ВО62	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
39	ВО73	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
40	ВО83	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
41	ВО84	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
42	ВО120	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
43	ВО142	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
44	ВО155	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
45	ВО158	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
46	ВО163	+	-	-	-	+	-	+	adw2	C	
47	ВО208	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
48	ВОС073	исследованы ранее (Нетесова, 2002)							ayw3varB		
49	ВОС109	исследованы ранее (там же)							?		
50	ВОС115	исследованы ранее (там же)							ayw2		

51	ВОС123	исследованы ранее (там же)							?		
52	ВОС125	исследованы ранее (там же)							ayw3varB		
53	ВОС155	исследованы ранее (там же)							ayw3varB		
54	ВОС215	исследованы ранее (там же)							?		
55	ВОС318	исследованы ранее (там же)							ayw3varB		
56	ДУ28	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
57	ДУ57	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
58	ДУ59	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
59	ДУ65	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
60	ДУ68	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
61	ДУ78	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
62	ДУ79	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
63	ДУ80	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
64	ДУ85	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
65	ДУ95	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
66	Ж103	исследованы ранее (там же)							?		
67	Ж132	исследованы ранее (там же)							ayw2		
68	Ж139	исследованы ранее (там же)							ayw2		
69	КРА217	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
70	ЛИС6	+	-	-	+	-	-	-	?		все сигналы в зоне ОП _{крит}
71	ЛИС15	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
72	МГ104	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
73	МГ126	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
74	МГ132	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
75	МГ135	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
76	МГ172	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
77	МГ222	-	-	-	-	-	-	-	нет реакции		
78	МС287	исследованы ранее (там же)							ayw2		
79	МС302	исследованы ранее (там же)							ayw2		

80	МС311	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw2		
81	МС386	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw2		
82	МС413	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw2		
83	МС422	<i>исследованы ранее (там же)</i>							?		
84	МС428	<i>исследованы ранее (там же)</i>							?		
85	МУЖ2	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw3varB		
86	МУЖ100	<i>исследованы ранее (там же)</i>							?		
87	МУЖ146	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw2		
88	МУЖ240	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw2		
89	НУК14	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
90	НУК101	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
91	НУК368	-	+	-	+	-	+	-	ayw3	D	
92	НУК416	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
93	НУК429	-	-	-	-	+	+	-	ayw3varA	D	
94	НУК546	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
95	НУК550	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
96	НУК622	+	-	-	-	+	+	-	adw2	A	
97	НУК629	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
98	НУК635	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
99	НУК641	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
100	ОЛП27	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw3varB		
101	ОЛП36	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw2		
102	ПИТ215	<i>исследованы ранее (там же)</i>							?		
103	ПИТ247	<i>исследованы ранее (там же)</i>							?		
104	ПРИ83	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
105	ТХ29	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ay?		
106	ТХ85	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ay?		
107	ШУР185	<i>исследованы ранее (там же)</i>							ayw3varB		
108	ЩУ115	-	+	+	+	+	+	-	?		

Образцы с недетектируемой ДНК ВГВ											
№	образец	моноклональные антитела а-НВs							субтип НВsAg	генотип ВГВ	примечание
		3C3	2D11	3D9	3A5	3E2	1C10	1C4			
1	АЛ55	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
2	АЛ222	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
3	АЛ245	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
4	АЛ317	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
5	АЛ329	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
6	БЕК2	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
7	БЕК28	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
8	БЕК39	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
9	БЕК68	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
10	ВО1	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
11	ВО3	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
12	ВО7	+	-	+	-	+	-	+	adrq+	C	
13	ВО19	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
14	ВО21	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
15	ВО22	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
16	ВО175	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
17	ВО183	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
18	ВО187	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
19	ВО201	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
20	ДУ61	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
21	КАТ96	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
22	КРА148	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
23	НУК13	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
24	НУК20	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	

25	HYK21	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
26	HYK88	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
27	HYK102	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
28	HYK105	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
29	HYK118	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
30	HYK139	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
31	HYK154	+	-	-	-	+	+	-	adw2	A	
32	HYK316	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
33	HYK396	-	-	-	-	+	+	-	ayw3varA?	D	
34	HYK558	-	+	-	-	+	+	-	ayw2	D	
35	HYK560	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
36	HYK592	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
37	HYK630	-	-	-	+	+	+	-	ayw3varB	D	
38	HYK646	-	-	-	-	+	+	-	ayw3varA	D	

Приложение 3. Результаты исследования МАТ анти-НВs, выполненного с использованием образцов «базовой» ВП, содержащих НВsAg разных субтипов

(в виде $K_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{обр}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$, N=33)

	МАТ а-НВs	1Н9- 11	1Н1	1А8- 22	3G3- 31	3D2- 413	3F5- 25	3G11- 31	3G8- 25	3E1- 11	5D2- 1Н1- 67	5D2 (O.A.)	5F5- 27	6E3- 67	7G4- 12	7D8- 416	8E5- 515	8E5- 42	9E11- 13
Субтип НВsAg	Разве- дение	1/ 4000	1/ 4000	1/ 8000	1/ 100	1/ 4000	1/ 4000	1/ 4000	1/ 2000	1/ 250	1/ 4000	1/ 4000	1/ 500	1/ 20	1/ 500	1/ 1000	1/ 500	1/ 4000	1/ 4000
ayw2	ВКО1	7,4	2,0	1,2	3,1	2,6	1,7	5,0	4,8	1,6	1,5	1,8	2,2	2,5	3,2	1,3	2,4	1,9	4,0
ayw3vA	ВКО2	8,7	3,2	2,3	3,7	1,9	4,0	9,1	3,8	2,9	1,8	1,5	0,5	2,5	2,7	2,7	0,4	2,2	2,9
ayw3vB	ВКО3	н/и	3,8	2,2	2,6	н/и	5,3	11,3	3,5	2,9	1,9	н/и	0,4	-	2,1	3,8	0,4	н/и	н/и
adw2	ВКО4	0,1	0,3	0,0	0,2	3,7	0,4	1,4	2,6	0,1	0,6	2,2	4,4	0,7	0,3	0,7	0,7	0,0	3,7
adrq+	ВКО5	0,2	0,7	0,0	2,1	4,7	0,6	1,9	3,2	0,1	1,0	2,6	0,4	4,7	4,9	1,4	1,4	0,0	6,1

	МАТ а-НВs	9G11- 12	9C4- 39	10D3- 33	10F1- 2b- 411	10F1- 2a-46	13D4- 27	14A7- 26	16G5- 17	16B9- 33	16F8- 25	17H2- 111	18C4- 13	18G3- 14	20H4- 24	20D12- 16
Субтип НВsAg	Разве- дение	1/ 4000	1/ 250	1/ 50	1/ 4000	1/ 50	1/ 500	1/ 4000	1/ 8000	1/ 4000	1/ 10000	1/ 500	1/ 2000	1/ 2000	1/ 4000	1/ 50
ayw2	ВКО1	5,1	4,7	1,0	2,4	2,0	0,2	1,0	4,3	0,4	0,1	1,7	1,2	1,5	0,5	2,0
ayw3varA	ВКО2	4	9,1	1,2	2,3	3,7	0,3	1,1	1,03	0,2	0,3	0,0	0,4	0,4	0,3	3,7
ayw3varB	ВКО3	н/и	9,1	1,3	2,1	4,0	0,3	0,9	н/и	0,2	0,3	0,0	0,4	0,5	0,1	4,0
adw2	ВКО4	4,4	3,8	0,3	2,5	0,3	1,4	1,2	7,2	1,4	1,3	3,6	1,4	1,5	1,8	0,3
adrq+	ВКО5	6,3	4,5	1,4	4,5	1,9	0,1	2,2	10,4	0,7	1,3	0,3	1,4	1,4	0,6	1,9

Приложение 4. Отобранные кандидаты МАТ анти-НВs (N=22)

(результаты представлены в виде $K_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{обр}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$)

МАТ анти-НВs		16 F8- 25	Группа 1A8-22						Группа 10F1-2a-46						Группа 13D4-27			Группа 16G5-17			Группа 5F5-27		
		16F8-25	1A8-22	1H1	1H9-11	8E5-42	3E1-11	3F5-25	10F1-2a-46	6E3-67	7G4-12	7D8-416	10D3-33	20D12-16	3G3-31	13D4-27	20H4-24	16B9-33	16G5-17	18G3-14	18C4-13	5F5-27	17H2-111
Субтип НВsAg		1/10000	1/8000	1/4000	1/4000	1/4000	1/250	1/4000	1/50	1/20	1/500	1/1000	1/50	1/50	1/100	1/500	1/4000	1/4000	1/10000	1/2000	1/2000	1/500	1/500
ayw2	ВКО1	0,1	1,2	2,0	7,4	1,9	1,6	1,7	2,0	2,5	3,2	1,3	1,0	2,0	3,1	0,2	0,5	0,4	1,4	1,5	1,2	2,2	1,7
ayw3varA	ВКО2	0,3	2,3	3,2	8,7	2,2	2,9	4,0	3,7	2,5	2,7	2,7	1,2	3,7	3,7	0,3	0,3	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,0
ayw3varB	ВКО3	0,3	2,2	3,8	н/и	н/и	2,9	5,3	4,0	-	2,1	3,8	1,3	4,0	2,6	0,3	0,1	0,2	0,3	0,5	0,4	0,4	0,0
adw2	ВКО4	1,3	0,0	0,3	0,1	0,0	0,1	0,4	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3	0,3	0,2	1,4	1,8	1,4	1,8	1,5	1,4	4,4	3,6
adrq+	ВКО5	1,3	0,0	0,7	0,2	0,0	0,1	0,6	1,9	4,7	4,9	1,4	1,4	1,9	2,1	0,1	0,6	0,7	2,9	1,4	1,4	0,4	0,3

Приложение 5. Результаты субтипирования HBsAg/ генотипирования ВГВ, полученные с помощью разработанной методики, в HBsAg-положительных образцах плазм крови представителей коренных народностей пяти регионов Сибири

№	Шифр	Конъюгат МАТ-ПХ (в виде $K_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{обр}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$)				Субтип HBsAg	Генотип ВГВ
		SM	E1	H2	D4		
Образцы с выделенной ДНК ВГВ							
1	AB24	нет реакции					
2	AB33	26,3	32,6	35,8	1,2	ayw2	D
3	AB35	нет реакции					
4	AB55	24,6	33,8	34,7	1,1	ayw2	D
5	AB65	19,0	30,4	31,4	1,1	ayw2	D
6	AB223	15,7	19,2	28,5	5,3	ayw2	D
7	AB224	8,1	12,6	15,1	2,2	ayw2	D
8	AB236	4,1	5,7	4,5	1,4	ayw2	D
9	АЛ10	14,7	23,6	0,1	0,5	ayw3	D
10	АЛ105	19,5	28,1	21,0	6,1	ayw2	D
11	АЛ134	4,3	4,4	2,7	0,9	ayw2	D
12	АЛ135	14,1	19,0	12,9	0,9	ayw2	D
13	АЛ151	13,1	15,2	9,8	3,1	ayw2	D
14	АЛ161	1,4	1,6	0,9	0,2	ayw3	D
15	АЛ162	4,1	4,3	2,6	0,5	ayw2	D
16	АЛ165	нет реакции					
17	АЛ197	5,9	6,2	4,4	1,2	ayw2	D
18	АЛ199	10,1	26,2	0,0	0,1	ayw3	D
19	АЛ209	4,3	3,5	3,3	1,3	ayw2	D
20	АЛ213	нет реакции					
21	АЛ247	8,5	17,8	0,1	0,1	ayw3	D
22	АЛ273	3,7	4,8	0,0	0,1	ayw3	D
23	АЛ326	12,8	25,0	0,1	0,1	ayw3	D
24	АЛ352	11,0	18,4	0,1	0,2	ayw3	D
25	АЛ369	6,2	6,0	3,8	0,7	ayw2	D
26	АЛ378	4,1	5,2	1,5	0,4	ayw2	D
27	АЛ396	1,6	2,5	н/и	0,3	ay-	D
28	АЛ398	20,4	29,0	15,5	0,5	ayw2	D
29	АЛ482	8,9	0,0	0,7	0,1	adrq+	C
30	БЕК10	11,7	15,0	13,6	4,5	ayw2	D
31	БЕК32	15,2	20,1	12,4	0,8	ayw2	D
32	БЕК93	10,3	9,0	0,0	0,1	ayw3	D
33	БЕК94	13,1	13,6	3,1	0,2	ayw2?	D
34	БЕК115	17,6	25,4	21,8	1,9	ayw2	D
35	ВО36	7,2	0,1	0,9	0,3	adrq+	C
36	ВО41	6,8	5,9	5,3	1,7	ayw2	D

37	BO61	5,7	5,8	4,9	1,5	ayw2	D
38	BO62	19,0	0,0	1,5	0,1	adrq+	C
39	BO73	13,3	0,0	0,6	0,1	adrq+	C
40	BO83	26,4	26,6	29,0	1,8	ayw2	D
41	BO84	<i>нет реакции</i>					
42	BO120	19,8	29,7	22,2	1,2	ayw2	D
43	BO142	9,7	12,8	15,6	0,8	ayw2	D
44	BO155	4,8	6,5	4,8	1,9	ayw2	D
45	BO158	9,5	13,5	11,2	2,9	ayw2	D
46	BO163	11,4	0,1	15,6	5,8	adw2	A
47	BO208	11,0	17,0	9,6	1,6	ayw2	D
48	BOC73	14,7	28,9	0,1	0,1	ayw3	D
49	BOC109	<i>нет реакции</i>					
50	BOC115	5,4	2,8	4,9	0,8	ayw2	D
51	BOC123	12,3	23,2	0,1	0,1	ayw3	D
52	BOC125	6,6	4,5	0,0	0,2	ayw3	D
53	BOC155	9,4	16,2	0,0	0,1	ayw3	D
54	BOC215	2,4	2,6	1,0	0,6	ayw2	D
55	BOC318	1,2	2,0	0,6	0,3	ayw3	D
56	ДУ28	<i>нет реакции</i>					
57	ДУ57	23,4	28,5	22,6	1,4	ayw2	D
58	ДУ59	17,2	0,1	1,0	0,1	adrq+	C
59	ДУ65	20,1	22,9	19,1	1,0	ayw2	D
60	ДУ68	10,6	12,2	11,5	4,6	ayw2	D
61	ДУ78	21,8	24,9	24,3	1,1	ayw2	D
62	ДУ79	<i>нет реакции</i>					
63	ДУ80	23,4	21,1	23,3	0,9	ayw2	D
64	ДУ85	9,0	11,9	7,9	0,6	ayw2	D
65	ДУ95	<i>нет реакции</i>					
66	ЖАН103	18,4	21,7	0,2	2,0	ayw3	D
67	ЖАН132	15,7	18,4	22,9	4,9	ayw2	D
68	ЖАН139	10,9	13,7	15,6	4,9	ayw2	D
69	КРА217	14,5	0,0	1,9	0,1	adrq+	C
70	ЛИС6	<i>нет реакции</i>					
71	ЛИС15	1,2	1,5	0,1	0,1	ayw3	D
72	МГ104	18,6	27,6	24,9	1,5	ayw2	D
73	МГ126	<i>нет реакции</i>					
74	МГ132	<i>нет реакции</i>					
75	МГ135	<i>нет реакции</i>					
76	МГ172	24,7	33,1	28,6	2,1	ayw2	D
77	МГ222	<i>нет реакции</i>					
78	МС287	14,2	16,2	13,4	4,0	ayw2	D
79	МС302	15,7	24,3	13,6	0,9	ayw2	D
80	МС311	5,7	7,5	4,2	1,0	ayw2	D
81	МС386	3,4	3,4	5,9	1,2	ayw2	D

82	МС413	7,6	12,1	11,8	0,7	ayw2	D
83	МС422	<i>нет реакции</i>					
84	МС428	2,4	1,2	0,6	0,2	ayw3	D
85	МУЖ2	6,3	9,7	0,0	0,1	ayw3	D
86	МУЖ100	<i>нет реакции</i>					
87	МУЖ146	1,4	2,8	0,9	0,2	ayw3	D
88	МУЖ240	9,7	16,4	7,2	1,4	ayw2	D
89	НУК14	8,9	0,3	2,2	1,6	adw2	A
90	НУК101	7,8	8,0	3,4	1,5	ayw2	D
91	НУК368	12,8	17,9	0,2	0,3	ayw3	D
92	НУК416	11,2	16,8	0,1	0,3	ayw3	D
93	НУК429	1,0	2,3	0,1	0,1	ayw3	D
94	НУК546	14,5	22,0	24,1	4,4	ayw2	D
95	НУК550	4,6	8,5	0,1	0,2	ayw3	D
96	НУК622	16,1	0,0	29,5	19,9	adw2	A
97	НУК629	13,0	19,5	0,1	0,2	ayw3	D
98	НУК635	18,8	24,8	21,5	1,1	ayw2	D
99	НУК641	2,6	4,5	0,1	0,1	ayw3	D
100	ОЛП27	6,3	13,6	0,1	0,1	ayw3	D
101	ОЛП36	13,9	18,0	13,7	3,3	ayw2	D
102	ПИТ215	1,9	3,6	0,0	0,1	ayw3	D
103	ПИТ247	7,7	12,3	0,1	0,1	ayw3	D
104	ПРИ83	12,1	18,7	11,1	1,1	ayw2	D
105	ТХ29	<i>нет реакции</i>					
106	ТХ85	18,2	27,9	0,0	0,1	ayw3	D
107	ШУР185	12,7	19,0	0,1	0,1	ayw3	D
108	ЩУ115	8,2	12,4	0,1	0,2	ayw3	D
Образцы с недетектируемой ДНК ВГВ							
1	АЛ55	1,9	2,4	0,1	0,2	ayw3	D
2	АЛ222	3,9	7,7	0,2	0,2	ayw3	D
3	АЛ245	2,7	4,5	6,8	1,9	ayw2	D
4	АЛ317	2,5	4,2	5,6	1,3	ayw2	D
5	АЛ329	13,6	19,5	0,1	0,5	ayw3	D
6	БЕК2	4,1	7,7	8,7	1,0	ayw2	D
7	БЕК28	6,5	8,5	10,7	4,3	ayw2	D
8	БЕК39	1,9	3,5	2,9	1,5	ayw2	D
9	БЕК68	1,1	1,8	1,9	0,3	ayw2	D
10	ВО1	2,04	0,1	0,6	0,3	adrq+	C
11	ВО3	1,6	1,6	1,4	0,6	ayw2	D
12	ВО7	2,05	0,1	0,7	0,3	adrq+	C
13	ВО19	1,9	3,3	6,1	1,0	ayw2	D
14	ВО21	1,1	2,1	4,2	0,9	ayw2	D
15	ВО22	5,1	4,9	7,9	6,3	ayw2	D
16	ВО175	7,7	7,9	12,0	5,1	ayw2	D
17	ВО183	1,8	2,7	5,7	4,7	ayw2	D

18	BO187	5,5	9,6	0,2	0,3	ayw3	D
19	BO201	2,9	5,6	5,1	0,6	ayw2	D
20	ДУ61	5,7	8,4	12,8	2,1	ayw2	D
21	KAT96	1,0	1,5	2,0	0,3	ayw2	D
22	KPA148	5,6	8,9	7,7	3,5	ayw2	D
23	HYK13	1,3	2,2	3,9	0,8	ayw2	D
24	HYK20	1,2	1,3	1,6	0,6	ayw2	D
25	HYK21	1,1	1,4	2,1	1,6	ayw2	D
26	HYK88	9,5	11,2	0,1	0,4	ayw3	D
27	HYK102	3,2	3,5	0,1	0,3	ayw3	D
28	HYK105	7,0	6,8	4,9	0,4	ayw2	D
29	HYK118	3,6	3,2	3,4	1,7	ayw2	D
30	HyK139	3,8	3,4	0,1	0,3	ayw3	D
31	HYK154	3,5	0,1	6,5	9,9	adw2	A
32	HYK316	11,5	12,6	13,1	2,3	ayw2	D
33	HYK396	9,7	13,9	0,3	0,2	ayw3	D
34	HYK558	5,5	4,2	6,5	2,4	ayw2	D
35	HYK560	8,3	7,1	0,1	0,4	ayw3	D
36	HYK592	6,6	11,6	0,2	0,2	ayw3	D
37	HYK630	7,3	6,5	0,1	0,3	ayw3	D
38	HYK646	7,4	7,7	0,1	0,4	ayw3	D

Приложение 6. Результаты субтипирования HBsAg/ генотипирования ВГВ, полученные с помощью разработанной методики, в HBsAg-положительных образцах сывороток крови пациентов с ХГВ из трех регионов России

№	Шифр	Конъюгат МАТ-ПХ (в виде $K_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{обр}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$)				Субтип HBsAg	Генотип ВГВ
		SM	E1	H2	D4		
1	10-00305	1,5	1,2	0,1	0,3	ayw3	D
2	10-00306	1,5	2,0	4,4	0,8	ayw2	D
3	10-00505	5,0	4,0	0,1	0,6	ayw3	D
4	10-00506	1,8	1,4	7,1	0,7	ayw2	D
5	10-00606	1,8	1,4	3,5	0,6	ayw2	D
6	10-00706	5,5	3,9	8,1	0,8	ayw2	D
7	10-00907	1,6	2,9	2,0	1,2	ayw2	D
8	10-00908	9,7	6,0	13,0	2,0	ayw2	D
9	10-01007	1,5	1,4	0,1	0,1	ayw3	D
10	10-01008	2,9	2,0	2,7	0,4	ayw2	D
11	10-01107	4,4	0,1	4,5	3,5	adw2	A
12	10-01207	6,1	4,4	5,4	1,3	ayw2	D
13	10-01308	3,5	2,4	4,8	1,8	ayw2	D
14	10-01408	3,9	2,8	0,9	2,6	ayw3	D
15	10-01508	4,3	3,1	4,9	0,7	ayw2	D
16	10-01608	5,4	2,9	3,9	0,6	ayw2	D
17	10-01709	4,6	6,1	0,1	0,6	ayw3	D
18	10-02009	2,0	1,8	0,1	0,7	ayw3	D
19	10-02604	9,9	7,8	19,6	5,0	ayw2	D
20	10-03707	2,1	1,7	0,2	0,3	ayw3	D
21	10-11209	2,8	1,8	0,2	0,2	ayw3	D
22	10-13607	2,2	1,4	4,2	0,5	ayw2	D
23	10-13705	4,8	3,2	3,0	0,4	ayw2	D
24	10-14004	5,1	3,7	4,0	1,4	ayw2	D
25	10-18104	1,4	1,1	1,5	0,2	ayw2	D
26	10-18209	7,5	5,4	10,6	0,6	ayw2	D
27	10-20408	4,4	4,1	14,3	11,0	ayw2	D
28	10-21209	5,1	0,1	6,6	14,7	adw2	A
29	10-23707	3,6	4,3	5,4	0,6	ayw2	D
30	10-27305	6,2	5,9	15,7	6,4	ayw2	D
31	10-28707	1,7	1,4	5,2	0,9	ayw2	D
32	10-30006	2,5	2,3	4,4	0,9	ayw2	D
33	10-30508	5,4	3,3	3,6	0,7	ayw2	D
34	10-33309	1,2	0,1	1,7	3,1	adw2	A
35	10-36406	4,4	2,7	3,8	1,1	ayw2	D
36	10-39707	7,3	4,9	3,4	1,0	ayw2	D

37	10-40409	4,5	3,0	7,0	1,6	ayw2	D
38	10-41807	6,0	0,1	5,4	6,9	adw2	A
39	10-43806	6,5	0,1	5,3	4,5	adw2	A
40	10-43907	5,9	4,5	5,5	0,6	ayw2	D
41	10-44406	1,4	1,0	1,3	0,5	ayw2	D
42	10-47305	3,0	2,0	2,4	0,3	ayw2	D
43	10-48103	5,8	0,1	6,7	7,6	adw2	A
44	БАР1	12,6	15,1	0,3	0,5	ayw3	D
45	БАР2	2,9	5,3	3,4	0,4	ayw2	D
46	БАР3	7,2	7,7	16,8	16,1	ayw2	D
47	БАР4	8,1	11,2	0,4	0,4	ayw3	D
48	БАР5	9,4	8,8	0,4	0,8	ayw3	D
49	БАР6	7,9	8,9	0,3	0,5	ayw3	D
50	БАР7	6,1	4,8	18,9	5,9	ayw2	D
51	БАР9	2,8	2,5	0,3	0,4	ayw3	D
52	БАР10	6,4	0,3	2,4	0,4	adrq+	C
53	БАР11	9,3	8,8	17,4	4,1	ayw2	D
54	БАР12	3,5	3,4	0,4	0,4	ayw3	D
55	БАР13	7,6	7,4	11,4	2,4	ayw2	D
56	БАР14	7,0	5,2	0,4	0,3	ayw3	D
57	БАР16	11,4	12,9	0,4	0,4	ayw3	D
58	БАР17	8,0	8,3	0,3	0,4	ayw3	D
59	БАР18	1,0	1,6	0,3	0,3	ayw3	D
60	БАР20	3,7	2,5	3,9	1,7	ayw2	D
61	БАР21	9,9	12,8	0,4	1,2	ayw3	D
62	БАР22	1,8	2,0	6,1	3,1	ayw2	D
63	БАР23	6,4	6,5	0,4	1,1	ayw3	D
64	БАР24	2,8	3,4	0,3	0,5	ayw3	D
65	БАР27	10,6	10,4	18,0	4,8	ayw2	D
66	БАР29	6,8	5,6	9,6	2,3	ayw2	D
67	БАР30	9,4	8,2	17,5	4,0	ayw2	D
68	БАР31	2,2	2,4	4,3	1,0	ayw2	D
69	БАР33	4,3	4,0	7,5	1,2	ayw2	D
70	БАР34	1,6	2,1	0,3	0,3	ayw3	D
71	БАР35	3,0	2,5	0,4	0,3	ayw3	D
72	БАР36	10,9	10,9	0,7	0,4	ayw3	D
73	БАР37	10,9	13,2	24,7	9,5	ayw2	D
74	БАР38	6,9	5,9	0,3	0,4	ayw3	D
75	БАР39	6,6	6,1	14,1	6,3	ayw2	D
76	БАР41	3,8	5,1	0,3	0,3	ayw3	D
77	БАР42	4,6	3,5	0,3	0,3	ayw3	D
78	БАР44	8,5	7,7	9,0	3,5	ayw2	D
79	БАР45	2,2	1,3	2,2	1,1	ayw2	D
80	БАР47	1,6	2,5	1,2	0,4	ayw2	D

81	БАР49	2,2	1,7	0,0	0,0	ayw3	D
82	БАР52	5,6	3,5	7,4	0,8	ayw2	D
83	БАР57	4,9	2,6	0,0	0,1	ayw3	D
84	БАР60	7,4	3,6	1,9	0,3	ayw2	D
85	БАР67	3,6	10,1	0,1	0,1	ayw3	D
86	БАР70	5,6	8,5	0,1	0,1	ayw3	D
87	БАР72	2,1	3,6	0,1	0,1	ayw3	D
88	БАР73	12,1	16,2	15,5	0,5	ayw2	D
89	БАР74	11,1	16,1	0,1	0,1	ayw3	D
90	БАР75	9,7	13,2	0,1	0,1	ayw3	D
91	БАР76	1,7	1,5	2,4	0,8	ayw2	D
92	БАР83	5,3	8,7	0,1	0,2	ayw3	D
93	БЛАГ1	17,9	16,4	0,1	0,2	ayw3	D
94	БЛАГ2	5,9	7,8	0,1	0,1	ayw3	D
95	БЛАГ3	12,0	16,1	14,4	0,3	ayw2	D
96	БЛАГ4	13,4	12,9	19,0	1,6	ayw2	D
97	БЛАГ5	6,0	7,1	5,5	0,4	ayw2	D
98	БЛАГ6	7,5	6,1	7,3	2,1	ayw2	D
99	БЛАГ7	14,5	17,9	0,2	0,2	ayw3	D
100	БЛАГ8	13,9	15,4	0,3	0,2	ayw3	D
101	БЛАГ10	2,6	3,1	2,4	0,3	ayw2	D
102	БЛАГ12	10,8	0,0	13,3	5,7	adw2	A
103	БЛАГ13	10,4	0,0	12,9	10,0	adw2	A
104	БЛАГ14	13,5	0,0	16,4	4,8	adw2	A
105	БЛАГ15	2,8	2,0	1,6	0,1	ayw2	D
106	БЛАГ16	19,0	14,1	20,7	2,1	ayw2	D
107	БЛАГ17	3,1	2,5	2,2	0,5	ayw2	D
108	БЛАГ18	12,3	0,1	14,7	5,6	adw2	A
109	БЛАГ19	15,7	13,4	15,6	3,1	ayw2	D
110	БЛАГ20	2,6	2,2	1,6	0,4	ayw2	D
111	БЛАГ21	17,4	22,0	0,1	0,1	ayw3	D
112	БЛАГ22	4,1	3,9	0,1	0,1	ayw3	D
113	БЛАГ23	6,4	15,7	0,0	0,1	ayw3	D
114	БЛАГ24	9,5	18,8	0,0	0,1	ayw3	D
115	БЛАГ25	5,3	7,5	7,1	1,2	ayw2	D
116	БЛАГ26	2,6	3,4	3,2	0,8	ayw2	D
117	БЛАГ27	8,9	17,1	0,1	0,1	ayw3	D
118	БЛАГ28	8,6	10,9	14,1	3,0	ayw2	D
119	БЛАГ29	1,1	2,2	1,6	0,3	ayw2	D
120	БЛАГ30	6,2	8,9	6,4	0,7	ayw2	D
121	БЛАГ31	6,2	0,1	12,0	8,0	adw2	A
122	БЛАГ32	6,6	0,0	12,5	16,0	adw2	A
123	БЛАГ33	10,4	0,0	14,2	10,4	adw2	A
124	БЛАГ35	18,0	18,3	23,5	1,5	ayw2	D

125	БЛАГ36	9,3	0,0	15,5	9,6	adw2	A
126	БЛАГ40	9,6	15,5	0,1	0,1	ayw3	D
127	БЛАГ41	1,9	2,6	0,1	0,1	ayw3	D

Приложение 7. Сопоставление результатов определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах плазм крови представителей коренных народностей пяти регионов Сибири, полученные с помощью трех методик: разработанная методика, молекулярно-генетические исследования, методика Dr. P.Swenson

№	Шифр		Результаты, полученные с помощью:						Примечания
			<i>Разработанной методики</i>		<i>Молекулярно-генетических исследований</i>		<i>По методике Dr. P.Swenson</i>		
			Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	
ДНК ВГВ выделена									
1	AV	24	нет реакции		ayw2	D1	нет реакции		
2	AV	33	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
3	AV	35	нет реакции		ayw2	D1	нет реакции		
4	AV	55	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
5	AV	65	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
6	AV	223	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
7	AV	224	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
8	AV	236	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
9	AL	10	ayw3	D	ayw3	D?	ayw3varB	D	
10	AL	105	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
11	AL	134	ayw2	D	ayw2	D3	не исследовали		
12	AL	135	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
13	AL	151	ayw2	D	ayw2	D1	ayw1?B?	B?	
14	AL	161	ayw3	D	ayw2	D?	???		равномерные сигналы
15	AL	162	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
16	AL	165	нет реакции		ayw2	D3	???	?	
17	AL	197	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
18	AL	199	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varA	D	

19	AL	209	ayw2	D	ayw2	D3	не исследовали		
20	AL	213	не валидный		ayw2	D3	нет реакции		
21	AL	247	ayw3	D	ayw3	D?	ayw3varB	D	
22	AL	273	ayw3	D	ayw3	D2	не исследовали		
23	AL	326	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
24	AL	352	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
25	AL	369	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
26	AL	378	ayw2	D	ayw2	D1	не исследовали		
27	AL	396	ay-	D	ayw4	D3	ayw4?	?	
28	AL	398	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
29	AL	482	adrq+	C	adw2	C?	adrq+	C	дефект по 3D9
30	BEK	10	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
31	BEK	32	ayw2	D	ayw2	D?	ayw2	D	
32	BEK	93	ayw3	D	ayw4	D1	ayw4?	E?	
33	BEK	94	ayw2?	D	ayw2	D?	ayw2	D	
34	BEK	115	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
35	VO	36	adrq+	C	adrq+	C1	adrq+	C	
36	VO	41	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
37	VO	61	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
38	VO	62	adrq+	C	adrq+	C1	adrq+	C	
39	VO	73	adrq+	C	adrq+	C1	adrq+	C	
40	VO	83	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
41	VO	84	нет реакции		ayw2	D3	нет реакции		
42	VO	120	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
43	VO	142	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
44	VO	155	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
45	VO	158	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
46	VO	163	adw2	A	adrq+	C1	adw2?	C	

47	VO	208	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
48	VOS	73	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
49	VOS	109	<i>нет реакции</i>		ayw3	D2	?	?	
50	VOS	115	ayw2	D	ayw2	D2	ayw2	D	
51	VOS	123	ayw3	D	ayw3	D2	?	?	
52	VOS	125	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
53	VOS	155	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
54	VOS	215	ayw2	D	ayw3	D3	?	?	
55	VOS	318	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
56	DU	28	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	ayw2	D	
57	DU	57	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
58	DU	59	adrq+	C	adrq+	C1	adrq+	C	
59	DU	65	ayw2	D	ayw4	D1	ayw2	D	
60	DU	68	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
61	DU	78	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
62	DU	79	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	<i>нет реакции</i>		
63	DU	80	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
64	DU	85	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
65	DU	95	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	<i>нет реакции</i>		
66	ZH	103	ayw3	D	ayw2	D1	???	-	
67	ZH	132	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
68	ZH	139	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
69	KRA	217	adrq+	C	adrq+	C1	adrq+	C	
70	LIS	6	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	?		<i>нет явных реакций</i>
71	LIS	15	ayw3	D	ayw2	D?	ayw3varB?	D?	<i>нет явных реакций</i>
72	MG	104	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
73	MG	126	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	<i>нет реакции</i>		

74	MG	132	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	<i>нет реакции</i>		
75	MG	135	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	<i>нет реакции</i>		
76	MG	172	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
77	MG	222	<i>нет реакции</i>		ayw2	D1	<i>нет реакции</i>		
78	MS	287	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
79	MS	302	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
80	MS	311	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
81	MS	386	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
82	MS	413	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
83	MS	422	<i>нет реакции</i>		ayw2	D3	?	?	
84	MS	428	ayw3	D	ayw2	D1	?	-	
85	MUJ	2	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
86	MUJ	100	<i>нет реакции</i>		ayw3	D2	?	?	
87	MUJ	146	ayw3	D	ayw2	D1	ayw2	D	
88	MUJ	240	ayw2	D	adw2?	D3	ayw2	D	
89	NUK	14	adw2	A	adrq+	C1	adrq+	C	
90	NUK	101	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
91	NUK	368	ayw3	D	ayw3	D1	ayw3	D	
92	NUK	416	ayw3	D	ayw3	D3	ayw2?	D	
93	NUK	429	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varA	D	
94	NUK	546	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
95	NUK	550	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
96	NUK	622	adw2	A	adw2	A2	adw2	A	
97	NUK	629	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
98	NUK	635	ayw2	D	ayw2	D1	ayw2	D	
99	NUK	641	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
100	OLP	27	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
101	OLP	36	ayw2	D	ayw2	D?	ayw2	D	
102	PIT	215	ayw3	D	ayw3	D?	?	?	

103	PIT	247	ayw3	D	ayw3	D2	?	?	
104	PRI	83	ayw2	D	ayw2	D3	ayw2	D	
105	TH	29	нет реакции		ayw3	D2	ay?	?	
106	TH	85	ayw3	D	ayw3	D2	ay?	?	
107	SHU	185	ayw3	D	ayw3	D2	ayw3varB	D	
108	SCH	115	ayw3	D	ayw4	D?	?	?	
ДНК ВГВ не детектируется									
№	Шифр		Результаты, полученные с помощью:						Примечания
			Разработанной методики		Молекулярно-генетических исследований		По методике Dr. P.Swenson		
			Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	
1	AL	55	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw3 varB	D	
2	AL	222	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw3 varB	D	
3	AL	245	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
4	AL	317	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
5	AL	329	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw3 varB	D	
6	BEK	2	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
7	BEK	28	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
8	BEK	39	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
9	BEK	68	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
10	VO	1	adrq+	C	не детектируется ДНК ВГВ		adrq+	C	
11	VO	3	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
12	VO	7	adrq+	C	не детектируется ДНК ВГВ		adrq+	C	
13	VO	19	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
14	VO	21	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
15	VO	22	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
16	VO	175	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
17	VO	183	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	
18	VO	187	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ		ayw2	D	

19	VO	201	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
20	DU	61	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
21	KAT	96	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
22	KRA	148	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varB	D	
23	NUK	13	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
24	NUK	20	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
25	NUK	21	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
26	NUK	88	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varB	D	
27	NUK	102	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varB	D	
28	NUK	105	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
29	NUK	118	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
30	NUK	139	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varB	D	
31	NUK	154	adw2	A	не детектируется ДНК ВГВ	adw2	A	
32	NUK	316	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
33	NUK	396	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varA	D	
34	NUK	558	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw2	D	
35	NUK	560	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varB	D	
36	NUK	592	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varB	D	
37	NUK	630	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varB	D	
38	NUK	646	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	ayw3varA	D	

Приложение 8. Сопоставление результатов определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах крови пациентов с ХГВ из трех регионов России, полученные с помощью двух методик: разработанная методика, молекулярно-генетические исследования

№	Шифр	Результаты, полученные с помощью:				Примечания
		<i>Разработанной методики</i>		<i>Молекулярно-генетических исследований</i>		
		Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	
ДНК ВГВ выделена						
1	10-00305	ayw3	D	ayw3	D	
2	10-00306	ayw2	D	ayw2	D	
3	10-00505	ayw3	D	ayw3	D	
4	10-00606	ayw2	D	ayw2	D	
5	10-00706	ayw2	D	ayw2	D	
6	10-00907	ayw2	D	a?w2	D	? АО в 122 п
7	10-00908	ayw2	D	ayw2	D	
8	10-01008	ayw2	D	ayw2	D	
9	10-01107	adw2	A	adw2	A	
10	10-01207	ayw2	D	ayw2	D	
11	10-01308	ayw2	D	ayw2	D	
12	10-01408	ayw3	D	ayw3	D	
13	10-01508	ayw2	D	ayw2	D	
14	10-01608	ayw2	D	ayw2	D	
15	10-01709	ayw3	D	?	D	замена 122Т и ? в 127, 134 п
16	10-02009	ayw3	D	ayw3	D	
17	10-02604	ayw2	D	ayw2	D	
18	10-03707	ayw3	D	ayw3	D	
19	10-13607	ayw2	D	ayw2	D	
20	10-13705	ayw2	D	ayw2	D	

21	10-14004		ayw2	D	ayw2	D	
22	10-18209		ayw2	D	ayw2	D	
23	10-21209		adw2	A	adw2	A	
24	10-23707		ayw2	D	ayw2	D	
25	10-27305		ayw2	D	ayw2	D	
26	10-28707		ayw2	D	ayw2	D	
27	10-30006		ayw2	D	ayw2	D	
28	10-30508		ayw2	D	ayw2	D	
29	10-36406		ayw2	D	ayw2	D	
30	10-39707		ayw2	D	ayw2	D	
31	10-40409		ayw2	D	ayw2	D	
32	10-43806		adw2	A	adw2	A	
33	10-43907		ayw2	D	ayw2	D	
34	10-47305		ayw2	D	ayw2	D	
35	10-48103		adw2	A	adw2	A	
36	БАР	1	ayw3	D	ayw3	D	
37	БАР	3	ayw2	D	ayw2	D	
38	БАР	4	ayw3	D	ayw3	D	
39	БАР	5	ayw3	D	ayw3	D	
40	БАР	6	ayw3	D	ayw3	D	
41	БАР	7	ayw2	D	ayw2	D	
42	БАР	9	ayw3	D	ayw3	D	
43	БАР	10	adrq+	C	adrq+	C	
44	БАР	11	ayw2	D	a?w2	D	? АО в122 п
45	БАР	12	ayw3	D	ayw3	D	
46	БАР	13	ayw2	D	ayw2	D	
47	БАР	16	ayw3	D	ayw3	D	
48	БАР	17	ayw3	D	ayw3	D	
49	БАР	20	ayw2	D	ayw3	D	

50	БАР	21	ayw3	D	ayw3	D	
51	БАР	22	ayw2	D	ayw2	D	
52	БАР	23	ayw3	D	ayw4	D	набор не определяет субтип ayw4
53	БАР	24	ayw3	D	ayw3	D	
54	БАР	29	ayw2	D	ayw2	D	
55	БАР	30	ayw2	D	ayw2	D	
56	БАР	31	ayw2	D	ayw2	D	
57	БАР	33	ayw2	D	ayw2	D	
58	БАР	35	ayw3	D	ayw4/D G159A	D	набор не определяет субтип ayw4
59	БАР	36	ayw3	D	ayw3	D	
60	БАР	37	ayw2	D	ayw2	D	
61	БАР	39	ayw2	D	ayw2	D	
62	БАР	44	ayw2	D	ayw2	D	
63	БАР	45	ayw2	D	ayw?	D	? АО в 127 п
64	БАР	47	ayw2	D	ayw2	D	
65	БАР	49	ayw3	D	ayw3	D	
66	БАР	52	ayw2	D	ayw2	D	
67	БАР	60	ayw2	D	ayw3	D	
68	БАР	70	ayw3	D	ayw3 G159A	D	
69	БАР	72	ayw3	D	ayw3	D	
70	БАР	73	ayw2	D	ayw2	D	
71	БАР	74	ayw3	D	ayw3	D	
72	БЛАГ	1	ayw3	D	ayw3	D	
73	БЛАГ	3	ayw2	D	ayw2	D	
74	БЛАГ	4	ayw2	D	ayw2	D	
75	БЛАГ	5	ayw2	D	ayw2	D	
76	БЛАГ	6	ayw2	D	ayw2	D	
77	БЛАГ	7	ayw3	D	ayw3	D	
78	БЛАГ	10	ayw2	D	ayw2	D	

79	БЛАГ	12	adw2	A	adw 127S	A	замена 127S
80	БЛАГ	13	adw2	A	adw2	A	
81	БЛАГ	15	ayw2	D	ayw2	D	
82	БЛАГ	16	ayw2	D	ayw2	D	
83	БЛАГ	17	ayw2	D	ayw2	D	
84	БЛАГ	18	adw2	A	adw2	A	
85	БЛАГ	19	ayw2	D	ayw2	D	
86	БЛАГ	21	ayw3	D	ayw3	D	
87	БЛАГ	22	ayw3	D	ayw3	D	
88	БЛАГ	24	ayw3	D	ayw3	D	
89	БЛАГ	25	ayw2	D	ayw2	D	
90	БЛАГ	26	ayw2	D	ayw2	D	
91	БЛАГ	27	ayw3	D	ayw3	D	
92	БЛАГ	28	ayw2	D	ayw2	D	
93	БЛАГ	29	ayw2	D	ayw2	D	
94	БЛАГ	31	adw2	A	adw2	A	
95	БЛАГ	32	adw2	A	adw2	A	
96	БЛАГ	35	ayw2	D	ayw2	D	
97	БЛАГ	36	adw2	A	adw2	A	
98	БЛАГ	40	ayw3	D	ayw3	D	

ДНК ВГВ не детектируется

№	Шифр	Результаты, полученные с помощью:				Примечания
		<i>Разработанной методики</i>		<i>Молекулярно-генетических исследований</i>		
		Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	Субтип HBsAg	Генотип ВГВ	
1	10-00506	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		
2	10-01007	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ		
3	10-11209	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ		
4	10-18104	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ		

5	10-20408		ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	
6	10-33309		adw2	A	не детектируется ДНК ВГВ	
7	10-41807		adw2	A	не детектируется ДНК ВГВ	
8	10-44406		ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	
9	БАР	2	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	
10	БАР	14	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
11	БАР	18	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
12	БАР	27	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	
13	БАР	34	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
14	БАР	38	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
15	БАР	41	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
16	БАР	42	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
17	БАР	57	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
18	БАР	67	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
19	БАР	75	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
20	БАР	76	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	
21	БАР	83	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
22	БЛАГ	2	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
23	БЛАГ	8	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
24	БЛАГ	14	adw2	A	не детектируется ДНК ВГВ	
25	БЛАГ	20	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	
26	БЛАГ	23	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	
27	БЛАГ	30	ayw2	D	не детектируется ДНК ВГВ	
28	БЛАГ	33	adw2	A	не детектируется ДНК ВГВ	
29	БЛАГ	41	ayw3	D	не детектируется ДНК ВГВ	

Приложение 9. Инструкция по подбору и выпуску компонентов для методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека, содержащих HBsAg

АО «Вектор-Бест»	Код: 04-2-591
Инструкция	Версия: 1
Подбор и выпуск компонентов для методики определения субтипа HBsAg и генотипа ВГВ в образцах сыворотки и плазмы крови человека, содержащих HBsAg	Действует с: <i>21.09.21</i>
	Пересмотр: <i>21.09.26</i>
	стр. 1 из 11

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- 1.1. Данная инструкция определяет порядок выполнения работ по подбору и приготовлению отрицательного контрольного образца (ОКО), положительных контрольных образцов (ПКО), внутренних контрольных образцов (ВКО), иммуносорбента, определению рабочих разведений концентратов конъюгатов (титровка), выпуск серии комплекта реагентов для определения субтипа HBsAg/ генотипа ВГВ в образцах сыворотки и плазмы крови человека, содержащих HBsAg, методом иммуноферментного анализа (ИФА).
- 1.2. Образец ОКО не содержит маркеров вирусного гепатита В (HBsAg, анти-HBs).
- 1.3. Образцы ПКО-ay(D), ПКО-ad(A) содержат рекомбинантный HBsAg субтипов ayw и adw.
- 1.4. Образцы ВКО содержат HBsAg известных субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ, циркулирующих на территории РФ (ayw2/D, ayw3varA/D, ayw3varB/D, adw2/A, adrq+/C).
- 1.5. Иммуносорбент содержит поликлональные антитела (ПАТ) животного (осел) против HBsAg.
- 1.6. Концентраты конъюгатов содержат моноклональные антитела (МАТ) мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, используются для приготовления компонентов «конъюгат (концентрат)» реагентов для определения субтипа HBsAg/ генотипа ВГВ в образцах сыворотки и плазмы крови человека, содержащих HBsAg, методом ИФА.
- 1.7. Выпуск серии комплекта реагентов подразумевает выбор рабочих разведений концентратов конъюгатов для компонентов «конъюгат (концентрат)» при наличии всех других компонентов данной серии комплекта реагентов.
- 1.8. Движение и учет концентратов конъюгатов осуществлять согласно Инструкции 05-2-47.
- 1.9. В процессе работы с сыворотками/плазмой крови человека соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным биологическим материалом согласно Инструкции по охране труда №109.
- 1.10. Каждый этап работы с ОКО фиксировать в режиме реального времени в папке «Приготовление ОКО».
- 1.11. Каждый этап работы с ПКО фиксировать в режиме реального времени в папке «Приготовление ПКО» и Журнале учета рекомбинантного HBsAg (входной контроль и расход).

Разработал	Согласовал	Утвердил
Начальник отделения ИФА гепатита В <i>Л. В. Безуглова</i> « <i>21</i> » <i>сентября</i> 2021 г.	Начальник технологической лаборатории <i>И. М. Пятова</i> « <i>21</i> » <i>сентября</i> 2021 г.	Директор по производству <i>В. К. Ткачев</i> « <i>21</i> » <i>сентября</i> 2021 г.

Приложение 10. Методика определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека, содержащих HBsAg

АО «Вектор-Бест»	Код: 03-2-2422
Инструкция	Версия: 1
Методика определения субтипа HBsAg и генотипа ВГВ в образцах сыворотки и плазмы крови человека, содержащих HBsAg	Действует с: 04.10.21
	Пересмотр: 04.10.26
	стр. 1 из 7

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Инструкция устанавливает порядок и условия применения комплекта реагентов для субтипирования HBsAg/ генотипирования ВГВ в образцах сыворотки и плазмы крови человека, содержащих HBsAg.

2. СВЕДЕНИЯ О РЕАГЕНТАХ

Наименование: реагенты для Субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ.

Назначение: для определения субтипа HBsAg/ генотипа ВГВ в образцах сыворотки и плазмы крови человека, содержащих HBsAg.

Состав комплекта:

- планшет разборный с иммобилизованными поликлональными антителами к HBsAg – 1 шт.;
- отрицательный контрольный образец (ОКО), инактивированный, 1 фл., 13 мл;
- положительный контрольный образец субтипа ay HBsAg (ПКО-ay/D), инактивированный, содержит 3000 МЕ/мл рекомбинантного HBsAg субтипа ayw – 1 фл., 1 мл;
- положительный контрольный образец субтипа ad HBsAg (ПКО-ad/A), инактивированный, содержит 3000 МЕ/мл рекомбинантного HBsAg субтипа adw – 1 фл., 1 мл;
- конъюгат SM, концентрат – моноклональные антитела (МАТ) мыши к HBsAg, меченые пероксидазой хрена – 1 фл., 0,7 мл;
- конъюгат E1, концентрат – МАТ мыши к HBsAg, меченые пероксидазой хрена – 1 фл., 0,7 мл;
- конъюгат H2, концентрат – МАТ мыши к HBsAg, меченые пероксидазой хрена – 1 фл., 0,7 мл;
- конъюгат D4, концентрат – МАТ мыши к HBsAg, меченые пероксидазой хрена – 1 фл., 0,7 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) прозрачная бесцветная жидкость – 3 фл., 7 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буфера с твином (ФСБ-Тх25) – 1 фл., 28 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Разработал	Согласовал	Утвердил
Начальник отделения ИФА гепатита В <i>Л.В. Безуглова</i> « 04 » октября 2021 г.	Начальник технологической лаборатории <i>И.М. Нятова</i> « 04 » октября 2021 г.	Директор по производству <i>В.К. Ткачев</i> « 04 » октября 2021 г.