

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Серикова Е.Н.<sup>1</sup>, Семенов А. В.<sup>1,2,3</sup>, Останкова Ю. В.<sup>1</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,2</sup>

### МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ НИЗКОЙ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

*Разработан метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке с помощью ПЦР в режиме реального времени и оценена его значимость при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В. При разработке метода использованы образцы плазмы крови и биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в странах Средней Азии. Использованы также образцы плазмы крови от 96 беременных женщин и 37 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО, 199 иностранных граждан, проходящих медицинское освидетельствование для получения разрешений на работу в Управлении по вопросам миграции в СЗФО, 397 условно-здоровых лиц, проживающих в Социалистической Республике Вьетнам. ВГВ выявляли методом «гнездовой» ПЦР. Аналитическую чувствительность проверяли методом поэтапного разведения. Согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится амплификация ДНК ВГВ с использованием на первом этапе олигонуклеотидов, фланкирующих участок генома 2932-3182...1-1846 нт., а на втором этапе двух пар олигонуклеотидов к двум регионам (ген S и ген X) генома вируса и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, комплементарных участкам амплифицируемых фрагментов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце не флуоресцентные тушители. По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ S-региона, а по каналу, соответствующему флуорофору ROX, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ X-региона. Чувствительность метода при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы составила 10 МЕ/мл, получение порогового цикла Ct только по одному флуорофору FAM или ROX может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл, выявление ВГВ при этом возможно при повторном ПЦР-исследовании соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл). Разработанный метод позволяет идентифицировать различные геноварианты ВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Метод может быть использован для выявления ВГВ в группах риска, в популяции, а также при скринировании доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.*

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит В; скрытый гепатит В; низкая вирусная нагрузка; метод идентификации.

**Для цитирования:** Серикова Е.Н., Семенов А. В., Останкова Ю. В., Тотолян Арег А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 59-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64>

*Serikova E.N.<sup>1</sup>, Semenov A.V.<sup>1,2,3</sup>, Ostanikova Yu.V.<sup>1</sup>, Totolian Areg A.<sup>1,2</sup>*

METHOD FOR DETECTING HEPATITIS B VIRUS IN BLOOD PLASMA AT LOW VIRAL LOAD USING REAL-TIME PCR

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, 197022, Saint Petersburg, Russia;

<sup>3</sup> North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, 191015, Saint Petersburg, Russia

*A method for detecting HBV DNA in peripheral blood at low viral load using real-time PCR was developed and its significance in identifying HBsAg-negative viral hepatitis B was evaluated. When developing the method, blood plasma samples and liver tissue biopsy material were used from 128 patients living in St. Petersburg, in various regions of the Russian Federation, as well as in the Central Asia countries. We also used blood plasma samples from 96 pregnant women and 37 hemodialysis center patients living in Northwestern Federal District, 199 foreign citizens undergoing medical examination to obtain work permits at the Directorate for Migration in the Northwestern Federal District, 397 conditionally healthy people living in the Socialist Republic of Vietnam. HBV was detected by nested PCR. Analytical sensitivity was tested using the stepwise dilution method. According to the method developed by us, at the first stage, the HBV DNA is amplified using at the first stage oligonucleotides flanking the genome region 2932-3182 ... 1-1846 nt., and at the second stage two oligonucleotides pairs to the genome virus regions (gene S and gene X) and corresponding oligonucleotide fluorescently labeled probes complementary to the amplified fragments regions carrying fluorophores at the 5'-end, and non-fluorescent quenchers at the 3'-end. The channel corresponding to the FAM fluorophore detects the HBV DNA S-region amplification product, and the channel corresponding to the ROX fluorophore detects the HBV DNA X-region amplification product. The method sensitivity for DNA extraction from plasma with a 100 µl volume was 10 IU/ml.*

*Obtaining a threshold cycle Ct for only one FAM or ROX fluorophore may indicate the HBV DNA presence in a sample at a load of less than 10 IU / ml, HBV detection in this case is possible with a repeated PCR study of the corresponding sample with HBV DNA extraction from an increased plasma volume (200-1000 µl). The developed method makes it possible to identify various HBV genovariants, both characteristic and rare in the Russian Federation, circulating in other world regions. The method can be used to detect HBV in risk groups, in the population, as well as in screening blood donors in order to ensure the blood transfusions safety.*

**Key words:** *chronic hepatitis B; occult hepatitis B; low viral load; identification method.*

**For citation:** Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A. Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (1): 59-64 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64>

**For correspondence:** *Ostankova Yu.V.*, PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology; e-mail: [shenna1@yandex.ru](mailto:shenna1@yandex.ru)

**Information about authors:**

Serikova E.N. <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>;  
Semenov A.V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>;  
Ostankova Yu.V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;  
Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *Branch research work «Study of the viral hepatitis epidemiological process modern features».*

Received 06.08.2020  
Accepted 20.08.2020

**Введение.** Ежегодно от цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), явившихся следствием заражения вирусом гепатита В (ВГВ), умирают примерно 887 000 человек, в то время как более 240 миллионов человек больны хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) [1].

Серологическая выявляемость поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) обычно используется для определения распространенности активной инфекции ВГВ в различных географических регионах по всему миру. Распространенность HBsAg  $\geq 8\%$ , 5-7%, 2-4% и  $<2\%$  определяется как высокоэндемичные, высокопромежуточные, низкопромежуточные и низкоэндемичные районы, соответственно [2]. Лабораторное подтверждение диагноза инфекции ВГВ зависит от обнаружения серологических маркеров, например, антител анти-HBcCore IgG и IgM, анти-HBs IgG, анти-HBe IgG и других, которые могут использоваться для мониторинга инфекции и оценки иммунного ответа. Однако одной из форм естественного течения ХВГВ является скрытый или occultный ХВГВ (окГВ), который определяется как наличие репликативно компетентной ДНК вируса, то есть ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК) в печени при недетектируемом уровне HBsAg в периферической крови вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в периферической крови [3]. При этом встречается как серопозитивный, так и серонегативный по другим маркерам инфицирования HBsAg-негативный ВГВ. Более того, скрытая инфекция ВГВ может быть выявлена у пациентов с серологическими маркерами реконвалесценции, свидетельствующими о перенесенной инфекции [4]. Несмотря на то, что элиминация вируса не происходит, экспрессия генов и репликация вируса в большинстве случаев подавлены, стандартными методами выявить ВГВ в периферической крови больного не представляется возможным из-за крайне низкой вирусной нагрузки [4].

Таким образом, окГВ не может быть идентифицирован во всех случаях с помощью тестирования на HBsAg и ДНК ВГВ при использовании наиболее распростра-

ненных коммерческих наборов с чувствительностью 100 МЕ/мл [5].

Несмотря на низкую вирусную нагрузку, при окГВ сохраняются те же факторы риска, что и при HBsAg-позитивной форме течения ХВГВ [6]. Так, показана роль HBsAg-негативного ВГВ в развитии фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [7]. При ВИЧ-инфекции и других состояниях с подавленным иммунитетом окГВ может ускорить прогрессирование хронического гепатита до цирроза, ГЦК и терминальной стадии поражения печени. Наличие ВГВ при ВИЧ-инфекции связано также с более низким вирусологическим ответом и более частыми побочными эффектами в ходе антиретровирусной терапии (АРВТ) [8]. Необходимо отметить и возможность реактивации ХВГВ при тяжелой иммуносупрессии [9]. Показана возможность внутриутробного инфицирования ребенка HBsAg- и HBeAg-негативной матерью [10], возможность инфицирования реципиента переливанием крови или ее компонентов от донора со скрытым ВГВ, при этом минимальная инфекционная доза составляет приблизительно 16-100 копий [11], а также возможность передачи ВГВ при тесном бытовом контакте от пациента со скрытой формой течения заболевания с дальнейшим проявлением у реципиента HBsAg-позитивной инфекции [12].

ОкГВ зарегистрирован среди здоровых бессимптомных доноров крови, пациентов с хроническим заболеванием печени и пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [13]. Распространенность HBsAg-негативного ВГВ в мире варьирует и, вероятнее всего, коррелирует с распространенностью HBsAg-позитивной формы ВГВ в том или ином регионе [14]. При этом общая распространенность окГВ в Западной Европе и Северной Америке достигает 28% среди лиц без хронического заболевания печени и 35% у пациентов с хроническим заболеванием печени, 51% у анти-HBe-позитивных и 19% у анти-HBe-негативных больных [15]. Некоторые группы пациентов – группы риска – подвергаются более высокому риску заражения окГВ вне зависимости от их географического положения, например, лица с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и/или ВИЧ-инфекцией, подвергаю-

щиеся гемодиализу, трансплантации печени, потребители инъекционных наркотиков [16, 17].

Различные данные о встречаемости окГВ в одних и тех же географических регионах и/или сходных группах риска могут быть связаны не только с биологическими особенностями вируса и частотой встречаемости ВГВ на той или иной территории, но и с отличающимися методами выявления вируса, их чувствительностью и специфичностью [18].

Идентификация и количественная оценка кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в ткани печени методом ПЦР или гибридизации *in situ* остается «золотым стандартом» и практически единственным достоверным методом лабораторной диагностики скрытого ВГВ и позволяет не только с высокой точностью обнаружить окГВ, но и предварительно оценить уровень репликации вируса в гепатоцитах [19]. Однако необходимость инвазивного вмешательства позволяет предложить метод только в качестве дополнительной диагностики в случаях, когда пункционная биопсия печени осуществляется по клиническим показаниям, но не дает возможности использовать его для широкого скрининга популяций, доноров крови или отдельных групп пациентов.

Разработанный нами ранее метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови позволяет обнаруживать вирус при низкой вирусной нагрузке, согласно рекомендациям Таорминского консенсуса о необходимости для подтверждения обнаружения скрытого ВГВ выявления как минимум двух участков генома вируса [3]. Однако широкое применение метода затруднительно в связи с необходимостью электрофоретического анализа продуктов амплификации второго этапа ПЦР и дальнейшего секвенирования с последующим использованием генетического анализатора (секвенатора), что требует соответствующей приборной базы и квалификации специалистов.

Целью нашей работы являлось: разработать метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени и оценка его значимости при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В.

**Материал и методы.** В работе были использованы плазма крови и образцы биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в странах Средней Азии без ХВГВ и с ранее подтвержденным ХВГВ, в том числе методом выявления кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в тканях печени [19]. Использованы также образцы плазмы крови от 96 беременных женщин и 37 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО, 199 иностранных граждан из стран ближнего зарубежья, проходящих медицинское освидетельствование для получения разрешений на работу в Управлении по вопросам миграции в СЗФО, 397 условно-здоровых лиц, проживающих в Социалистической Республике Вьетнам.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя.

Вирусную нагрузку в плазме крови предварительно измеряли с помощью стандартизованного набора для количественного определения ДНК ВГВ в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

в режиме «реального времени» «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции.

ВГВ при низкой вирусной нагрузке выявляли методом «гнездовой» ПЦР с использованием олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов (табл. 1). Регистрировали полученные результаты посредством гибридизационно-флуоресцентной детекции с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 10 пМ каждого олигопраймера и 3 пМ каждого зонда, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксирибонуклеотида, 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (рН 8,8), 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

На первом этапе проводили ПЦР с использованием прямого и обратного праймеров HBV SX (табл. 1) при указанных (табл. 2) условиях.

На следующем этапе для повышения чувствительности проводили вторую ПЦР с использованием продукта амплификации первого этапа, а также внутренних (вложенных, гнездовых) олигонуклеотидов и зондов для двух регионов ВГВ в одной пробирке – HBV SrtF2, HBV SrtR2, HBV Srt-Z, HBV XrtF2, HBV XrtRd2, HBV Xrt-Z (табл. 1) – при указанных в таблице 3 условиях.

Таблица 1

**Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для выявления ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР в режиме реального времени**

Праймер	Нуклеотидная последовательность
HBV SXF1	5'-AATCCAGATTGGGACTTCAA-3'
HBV SXR1	5'-AGAGATGATTAGGCAGAGGTG-3'
HBV SrtF2	5'-CACCTGTATTCCATCCCATC-3'
HBV SrtR2	5'-AGCCCTACGAACCACTGAACA-3'
HBV Srt-Z	5'-FAM - AAACGGACTGAGGCCACTCCCA - BHQ1/RTQ1-3'
HBV XrtF2	5'-GTCTGTGCCTTCTCATCTGCC-3'
HBV XrtRd2	5'-GTCGGTCGTTGACATTGCAG-3'
HBV Xrt-Z	5'-ROX - TGTGCACTTCGCTTCACTCTGC - BHQ2/RTQ2-3'

Таблица 2

**Параметры программы амплификации первого этапа на планшетном амплификаторе CFX96**

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин	1
	95	20 с	
2	50	30 с	20
	72	2 мин 30 с	
3	72	7 мин	1
	95	20 с	
4	50	30 с	20
	72	2 мин 30 с	
5	72	7 мин	1
6	10	Хранение	



Таблица 3

**Параметры программы амплификации второго этапа на планшетном амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).**

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	5 мин		1
	95	10 с		
2	50	20 с		7
	72	40 с		
3	72	7 мин		1
	95	10 с		
4	58	20 с	FAM, ROX	45
	72	40 с		
5	10		Хранение	

Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам: по каналу для флуорофора FAM – сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ S-региона, по каналу для флуорофора ROX – о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ X-региона. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов.

В качестве дополнительного контроля для исключения контаминации секвенировали нуклеотидные последовательности генома ВГВ выявленных анализируемых образцов при помощи генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США), использовали набор реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя.

**Результаты и обсуждение.** Для выявления ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке был разработан способ обнаружения ДНК ВГВ на базе ранее предложенной нами методики [20].

В настоящей работе, согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится амплификация ДНК ВГВ с использованием на первом этапе олигонуклеотидов, фланкирующих участок генома 2932-3182...1-1846 нт, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) [21], а на втором этапе двух пар олигонуклеотидов к двум регионам (ген S и ген X) генома вируса и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, комплементарных участкам амплифицируемых фрагментов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце не флуоресцентные тушители (см. табл. 1). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ S-региона, а по каналу, соответствующему флуорофору ROX, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ X-региона.

Аналитическую чувствительность метода проверяли методом поэтапного разведения. Были выбраны

10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГВ. Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГВ следующим образом: аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл ВГВ-негативной плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и 100 мкл нового пула переносили в третью пробирку и т. д. до получения серии последовательных разведений. После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца. Полученные образцы ДНК амплифицировали, согласно предложенному методу.

Образцы считались положительным по содержанию ДНК ВГВ, если на каналах FAM и ROX получали значение порогового цикла Ct, отрицательными – если на каналах FAM и ROX отсутствовало значение Ct.

На рисунке представлены кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе второго этапа предложенного метода.

На представленном рисунке обозначены кривые образцов №20, №21, №22. Образец №22 представляет собой отрицательный контрольный образец. №20 и №21 представляют собой результат выявления ДНК ВГВ при предположительной концентрации 4 МЕ/мл и 7 МЕ/мл, соответственно, при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы. При этом не детектировался сигнал по каналу ROX, но был сигнал по каналу FAM. При экстракции ДНК указанных образцов из увеличенного объема плазмы сигналы детектировались и по каналу FAM, и по каналу ROX.

Таким образом, получение порогового цикла Ct только по одному флуорофору FAM или ROX может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл, выявление ВГВ при этом возможно при повторном ПЦР-исследовании соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл).

Для определения специфичности разработанного метода в соответствии с отработанными условиями проведения ПЦР были исследованы предварительно серологически и молекулярно-генетически охарактеризованные по ВГВ с использованием коммерческих тест-систем образцы плазмы крови пациентов 16-70 лет, включая беременных женщин, пациентов гемодиализного центра, иностранных граждан, проходящих медицинское освидетельствование для получения разрешений на работу в Управлении по вопросам миграции в СЗФО, условно-здоровых лиц, проживающих в Социалистической Республике Вьетнам. При добавлении в реакцию амплификации геномной ДНК/кДНК вируса гепатита А, вируса гепатита С, вируса гепатита D, вируса гепатита E, вируса гепатита G, вируса иммунодефицита человека, вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вируса герпеса 6 и 8 типов, парвовируса В19, вируса клещевого энцефалита, а также геномной ДНК человека.

Оценку специфичности проводили в два этапа. На первом этапе последовательно проводили анализ охарактеризованных образцов. На втором этапе проводили «слепой» анализ, для чего пробирки с анализируемыми негативными образцами объединяли с пробирками, содержащими ВГВ-позитивную плазму крови больных, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Для кон-

троля анализируемых образцов и исключения возможной контаминации в качестве контрольных ВГВ-положительных образцов использовали плазму, содержащую ВГВ субгенотипов А1, D4, Е, выявление которых в используемых для тестирования специфичности группах маловероятно. Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК ВГВ в крови при низкой вирусной нагрузке представлены в табл. 4.

При использовании предложенного нами метода ДНК ВГВ среди беременных была выявлена у 2 пациенток. В одном случае регистрировались сигналы FAM и ROX, в другом случае регистрировался только сигнал FAM, однако при экстракции ДНК из 200 мкл плазмы регистрировались оба сигнала. Встречаемость ДНК ВГВ среди мигрантов составила 9,04%, при этом 7,5% случаев относятся к скрытому (HBsAg-негативному)

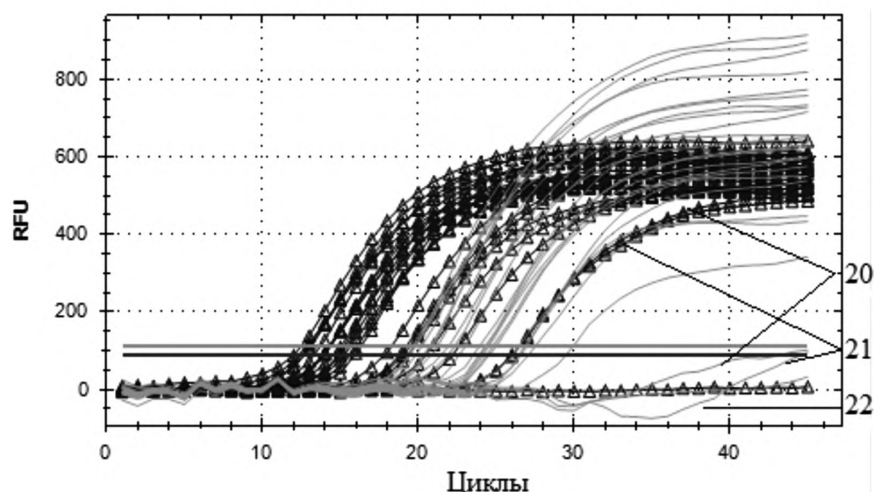
ВГВ, в том числе негативному по всем серологическим маркерам. Среди условно здоровых лиц из Вьетнама с учетом HBsAg-положительных и негативных образцов ДНК ВГВ выявили в 26,95%. В том числе идентифицировали вирус в 58 HBsAg-негативных образцах (в 5 из них при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы регистрировали только сигнал FAM, а в 2 только сигнал ROX, при увеличении объема материала во всех 7 случаях регистрировали оба сигнала).

Для позитивных образцов проводили секвенирование и субгенотипирование ДНК ВГВ. Ни один из амплифицированных фрагментов не относился к ВГВ субгенотипов А1, D4, Е.

При проведении тестирования образцов ДНК/кДНК вышеперечисленных вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было, что является подтверждением специфичности разработанного метода.

Вышеописанный метод был разработан с использованием в качестве образцов ВГВ, циркулирующих на территории РФ и Республики Узбекистан геновариантов (D1, D2, D3, A2). Однако известна тенденция к смещению распределения геновариантов ВГВ в различных географических регионах за счет завозов вируса соответствующих субгенотипов из других стран, в том числе стран Средней Азии [22]. Предложенный метод позволил выявить и охарактеризовать HBsAg-негативный ВГВ среди беременных женщин и пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО, а также среди мигрантов из ближнего зарубежья. Метод был апробирован в Социалистической Республике Вьетнам. Было показано, что метод позволяет выявлять различные геноварианты ВГВ, как широко распространенные в Российской Федерации: D1, D2, D3, A2, так и редко встречающиеся в России: A1, B2, B4, C1, C2, E (полные геномы ВГВ, полученные из образцов с низкой вирусной нагрузкой субгенотипов C2, B2, A2 депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами MT740718-MT740720).

Отметим, что пулирование плазмы крови при выявлении оГВВ значительно снижает чувствительность метода. Возможность выявления ВГВ при пулировании оценивали с использованием минипулов, включающих по 100 мкл шести случайных образцов. В каждом случае ДНК



Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе второго этапа амплификации ДНК ВГВ. Треугольниками обозначены сигналы флуорофора FAM, без дополнительных отметок – ROX.

экстрагировали из 100 мкл, 200 мкл и 300 мкл. Анализ проводили слепым методом, при котором исполнитель не знал в какие минипулы входят те или иные образцы. Всего было проанализировано 10 минипулов. Из них в четырех минипулах был показан определяемый предложенным методом уровень ДНК ВГВ, в то время как в двух минипулах ВГВ не удалось обнаружить при объеме экстрагируемой плазмы 100 мкл и удалось при объеме плазмы 300 мкл, в одном минипуле ВГВ не обнаружен даже при увеличении объема плазмы. В указанный минипул были включены пять ДНК ВГВ-негативных образцов и один ДНК ВГВ-положительный образец с предположительной вирусной нагрузкой менее 15 МЕ/мл.

Предложенный метод позволит выявлять ВГВ с низкой вирусной нагрузкой у ВИЧ- и ВГС-инфицированных пациентов, идентифицировать ВГВ у больных с гепатитом неясной этиологии. Посттрансфузионная инфекция ВГВ представляет собой серьезную проблему и является одним из значимых факторов риска инфицирования людей, риск инфицирования ВГВ после трансфузии выше, чем у других передаваемых через кровь вирусов, таких как ВИЧ и ВГС. Таким образом, описанный метод может быть востребован для совершенствования обеспечения инфекционной безопасности крови при трансфузиоло-

Таблица 4

Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК ВГВ в крови при низкой вирусной нагрузке

Наименование группы образцов	Количество образцов	Положительные	Отрицательные	Сомнительные
Беременные женщины (СЗФО)	96	2	94	0
Пациенты гемодиализного центра (СЗФО)	37	1	36	0
Мигранты (страны ближнего зарубежья)	199	18	181	0
Условно-здоровые лица (Вьетнам)	397	107	290	0

гических и иных манипуляциях, включая гемотрансфузии при проведении плановых и экстренных хирургических операций, что является актуальной медицинской проблемой и должно осуществляться в первую очередь с целью предупреждения передачи вирусов.

**Заключение.** Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке на основе технологии ПЦР в режиме реального времени позволяет идентифицировать различные геноварианты ХВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Метод может быть использован для выявления ВГВ в группах риска, в популяции, а также при скрининге доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.

**Финансирование.** Отраслевая НИР «Изучение современных особенностей эпидемиологического процесса вирусных гепатитов» №АААА-А16-116061410037-0.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-16, 18, 21  
см. REFERENCES)

- Семенов А.В., Останкова Ю.В. Окультный (скрытый) гепатит В: проблемы лабораторной диагностики. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8(3): 60–9.
- Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Voumbaly S., Balde T.A., Семенов А.В. Характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека среди пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ из Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; (3): 118–24.
- Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64(9): 565–7.
- Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64 (10): 635–40.
- Останкова Ю. В., Семенов А. В., Зуева Е.Б., Габдрахманов И. А., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян Арег А. Разнообразие геновариантов вируса гепатита В у военнослужащих. *Журнал инфектологии.* 2019; 11(3): 46–53.

REFERENCES

- Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>>. Accessed 2020.05.08.
- Guideline for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection, World Health Organization, Geneva, 2015. Available at [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059\\_eng.pdf;sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059_eng.pdf;sequence=1). Accessed 2020.05.08.
- Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2008; 49: 652–7.
- Calux S.J., Silva V.C.M., Compri A.P., Lemos M.F., Santos A.P.T, Oba I.T., Mendes-Correa M.C.J., Moreira R.C. Hepatitis B: Prevalence and occult infection in HIV-infected patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2020; 53: e20180533.
- Semenov A.V., Ostantkova Yu.V. Occult (latent) hepatitis B virus: problems of laboratory diagnostics. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye.* 2019; 8(3): 60–9. (in Russian)

- Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G., Cacciola I., Raffa G., Craxi A. et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology.* 2004; 126(1): 102–10.
- Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2007; 46: 160–70.
- Shi Y., Wu Y.H., Wu W., Zhang W.J., Yang J., Chen Z. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Liver Int.* 2012; 32: 231–40.
- Ryan K., Anderson M., Gyurova I., Ambroggio L., Moyo S., Sebulunya T., Makhema J., Marlink R., Essex M., Musonda R., et al. High Rates of Occult Hepatitis B Virus Infection in HIV-Positive Individuals Initiating Antiretroviral Therapy in Botswana. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4: ofx195.
- Gui Q.D., Yue Y.F., Li S.H., Zhang F. Study on intrauterine infection of hepatitis B virus in pregnant women with hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen negative. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2005; 40: 99–102.
- Candotti D., Assenato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut.* 2019; 68(2): 313–21.
- Hu L.P., Liu D.P., Chen Q.Y., Harrison T.J., He X., Wang X.Y. et al. Occult HBV Infection May Be Transmitted through Close Contact and Manifest as an Overt Infection. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0138552.
- Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22: 8720–34.
- Minuk G.Y., Sun D., Uhanova J., Zhang M., Caouette S., Nicolle L., Gutkin A., Doucette K., Martin B., Giulivi A. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J. Hepatol.* 2005; 42: 480–5.
- Pisaturo M., Onorato L., Russo A., Chiodini P., Coppola N. An estimation of the prevalence of occult HBV infection in Western Europe and in Northern America: A meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 2020; 27(4): 415–27.
- Samal J., Kandpal M., Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25: 142–63.
- Shchemelev A.N., Ostantkova Y.V., Zueva E.B., Voumbaly S., Balde T.A., Semenov A.V. Characterization of Hepatitis B Virus and Human Immunodeficiency Virus among HIV/ HBV Co-Infected Patients from the Republic of Guinea. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2019; (3): 118–24. (in Russian)
- Raimondo G., Caccamo G., Filomia R., Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol.* 2013; 35(1): 39–52.
- Ostantkova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 64 (9): 565–70. (in Russian)
- Ostantkova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 64 (10): 635–40. (in Russian)
- Brichler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013; 94 (Pt 10): 2318–29.
- Ostantkova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Gabdrakhmanov I.A., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Variety of the hepatitis B virus genovariants in the military. *Zhurnal infektologii.* 2019; 11(3): 46–53. (in Russian)

Поступила 06.08.20

Принята к печати 20.08.20