

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Останкова Ю. В.¹, Семенов А. В.^{1,2,3}, Тотолян Арег А.^{1,2}

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ НИЗКОЙ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКЕ

¹ 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;
² ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, Россия;
³ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Проанализирован метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке и оценить его значимости при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В. В работе использованы образцы плазмы крови и биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих в РФ и Республике Узбекистан, без ХВГВ и с ХВГВ подтвержденным выявлением кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в гепатоцитах. Вирусную нагрузку в плазме крови измеряли с помощью набора «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). ВГВ при низкой вирусной нагрузке выявляли методом «гнездовой» ПЦР. Аналитическую чувствительность проверяли методом поэтапного разведения. Согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится асимметричная ПЦР с использованием протяженных олигонуклеотидных праймеров с разной температурой плавления, комплементарных области наибольшего сходства геномов различных образцов вируса гепатита В. Для повышения чувствительности проводится вторая ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и внутренних праймеров. Чувствительность метода при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы составила 5 МЕ/мл, специфичность 100%. Поскольку, несмотря на характерное географическое распределение генотипов ВГВ, обнаружение «чуждых» для тех или иных территорий геновариантов становится все более частым, мы апробировали метод в географически удаленных, но имеющих активные международные отношения с Российской Федерацией регионах с высокой частотой встречаемости гепатотропных вирусов. Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке на основе технологии ПЦР позволяет идентифицировать и генотипировать 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 скринировании доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.

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

Для цитирования: 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): 635-640. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640>

Ostankova Yu. V.¹, Semenov A. V.^{1,2,3}, Totolian Areg A.^{1,2}

HEPATITIS B VIRUS IDENTIFICATION IN A BLOOD PLASMA AT A LOW VIRAL LOAD

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

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

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

To analyze the method for detecting HBV DNA in peripheral blood at low viral load and evaluate its significance in identifying HBsAg-negative viral hepatitis B. In this work, samples of blood and liver tissue biopsy material were used from 128 patients living in the Russian Federation and the Republic of Uzbekistan without CHB and with CHB confirmed detection of circle covalently closed HBV DNA in hepatocytes. Plasma viral load was measured using the «AmpliSens® HBV-Monitor-FL» kit. HBV at low viral load was detected by nested PCR. Analytical sensitivity was checked by step dilution. According to our method, at the first stage, an asymmetric PCR is carried out using extended oligonucleotide primers with different melting points, complementary to the hepatitis B different genotypes greatest similarity region. To increase the sensitivity, a second PCR is performed using the first reaction amplification product and internal primers. The sensitivity of the method for DNA extraction from 100 µl of plasma was 5 IU / ml, specificity 100%. Since, in spite of the HBV genotypes characteristic geographical distribution, the detection of "alien" genovariants for certain territories is becoming more frequent, we tested the method in geographically remote but active international relations with the Russian Federation regions with a high frequency of hepatotropic viruses. The developed method for detecting HBV DNA in blood plasma at low viral load based on PCR technology allows the various HBV gene variants identification and genotyping, 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 a population, as well as when 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: *Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (10): 635-640 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640>*

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

Information about authors:

Ostankova Yu. V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Semenov A. V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 04.10.2019
Accepted 10.10.2019

Введение. Одной из самых значимых проблем здравоохранения в мире остаются гепатотропные вирусы, способные вызывать как острые, так и хронические заболевания и являющиеся седьмой по значимости причиной смертности [1]. Самым распространенным гепатотропным вирусом является вирус гепатита В (ВГВ): по данным ВОЗ в 2015 г. в мире насчитывалось 257 млн человек, живущих с хронической инфекцией гепатита В [2]. Более 47% смертей, причиной которых являются вирусные гепатиты, связаны с ВГВ [3]. Среди инфицированных вирусом гепатита В более чем у 240 миллионов человек развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) – диффузно-воспалительное заболевание, связанное с персистенцией вируса гепатита В.

Распространенность ХВГВ оценивается по частоте встречаемости HBsAg, в то время как одной из естественных форм течения заболевания является HBsAg-негативный (скрытый) ХВГВ. Скрытый гепатит В (СкГВ) определяют как стадию заболевания, при которой в ткани печени обнаруживают ДНК ВГВ при неопределяемом уровне HBsAg в сыворотке периферической крови, вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом ПЦР в периферической крови [4]. За счет подавления внутриядерной транскрипции субгеномных РНК ВГВ с матрицы кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ (ккзДНК) развивается СкГВ, так как ккз ДНК ВГВ является матрицей для субгеномных и прегеномных копий РНК, на основе которых синтезируются вирусный геном и вирусные белки [5]. В ядре гепатоцита ккзДНК находится в виде минихромосомы, где НК связана с гистоновыми и гистоноподобными белками, а транскрипционная активность регулируется по эукариотическому механизму и способна существовать долгое время [6]. В большинстве случаев, репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в периферической крови большого крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса при подавлении репликации не происходит. Ключевым фактором остается сохранение ккзДНК в виде минихромосомы, что становится причиной невозможности полной элиминации ВГВ и за рецидивы репликации вируса после прекращения противовирусной терапии [7].

Встречается как серопозитивный, так и серонегативный по другим маркерам инфицирования скрытый ВГВ [8, 9]. Развитие при серонегативном варианте может быть мгновенным, то есть при первичном инфицировании, и постепенным с потерей серологических маркеров

по мере течения заболевания. При серопозитивном варианте СкГВ потеря HBsAg может являться итогом либо разрешения острого гепатита В, либо последовательной фазой естественного течения ХВГВ [10]. Несмотря на низкую вирусную нагрузку, СкГВ может играть существенную роль в развитии фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [11].

Из-за относительно недавней идентификации этой группы ВГВ-инфицированных лиц, факторы риска, связанные со скрытой инфекцией ВГВ все еще остаются не до конца изученными и понятными, хотя некоторые данные позволяют предположить, что при СкГВ сохраняется большая часть тех же факторов риска, что и при HBsAg-позитивной форме течения ХВГВ [12]. Так, например, показана возможность внутриутробного инфицирования ребенка HBsAg и HBeAg-негативной матерью [13]. При переливании крови минимальная инфекционная доза приблизительно 16-100 копий [14]. Более того, несмотря на крайне низкую вирусную нагрузку при СкГВ, возможна передача ВГВ при тесном бытовом контакте от пациента со скрытой формой течения заболевания с дальнейшим проявлением у реципиента HBsAg-позитивной инфекции [15].

Распространенность HBsAg-негативного ВГВ в мире варьирует и, вероятнее всего, коррелирует с распространенностью HBsAg-позитивной формы ВГВ в том или ином регионе. Хорошо известно, что некоторые группы пациентов подвергаются значительно более высокому риску заражения СкГВ вне зависимости от их географического положения, например, лица с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и/или ВИЧ-инфекцией, подвергающиеся гемодиализу, трансплантации печени, потребители инъекционных наркотиков [16]. Однако различные данные о встречаемости СкГВ 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 методом выявления вируса.

Поскольку уровень вирусной нагрузки в крови при HBsAg-негативном ВГВ крайне низок (<200 МЕ ДНК ВГВ/мл), вплоть до невозможности обнаружения стандартными методами, выявление ДНК ВГВ в ткани печени остается не только «золотым стандартом», но и практически единственным достоверным методом лабораторной диагностики скрытого ВГВ. Идентификация и количественная оценка кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в ткани печени позволяет с высо-

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для выявления ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР

Праймер	Нуклеотидная последовательность
HBV LongF1.1	5'- CTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTTCACCTCTGC-3'
HBV LongR1.1	5'-CAGACCAATTATATGCCTACAGCCTCCTA-3'
SF2	5'-GGTCACCATATCTTGGGAA-3'
SR2	5'-AATGGCACTAGTAAACTGAG-3'
CF2	5'-GCCTTAGAGTCTCCTGAGCA-3'
CR2	5'-GAGGGAGTTCTTCTCTAGG-3'
XF2	5'- CCATACTGCGGAACCTCCTAGC-3'
XR2	5'- CCCAAGGCACAGCTTGGAGG-3'
PF2	5'- TCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC-3'
PR2	5'- AGTTCCGCAGTATGGATCGG-3'

кой точностью обнаружить ВГВ в скрытой фазе течения заболевания, а также предварительно оценить уровень репликации вируса в гепатоцитах [17]. 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.

Целью нашей работы являлся анализ метода выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке 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 Республике Узбекистан без ХВГВ и с ХВГВ ранее подтвержденным в том числе методом выявления кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в тканях печени [17].

Для определения специфичности разработанного метода в соответствии с отработанными условиями проведения ПЦР были исследованы предварительно охарактеризованные с использованием коммерческих тест-систем серологически и молекулярно-генетически негативные по ВГВ образцы плазмы крови детей 4-11 лет, подростков 12-18 лет, беременных женщин на различных сроках беременности, пациентов в возрасте 50-70 лет, онкологических больных (немелкоклеточный рак легкого) вне терапии, онкологических больных проходящих лечение, пациентов гемодиализного центра, пациентов с коинфекцией ВИЧ + ВГС.

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

Вирусную нагрузку в плазме крови предварительно измеряли с помощью стандартизированного набора для количественного определения ДНК ВГВ в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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 на втором этапе нескольких пар праймеров, фланкирующих четыре региона генома вируса. В том числе фрагменты, включающие рекомендованный для гено- и субгенотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S [18].

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 3-30 пМ каждого олигопраймера, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (pH 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при 95°C в течение 5 мин устанавливали 30-40 циклов амплификации в режиме: 95°C – 20-40 сек, 55-65°C – 20-30 сек, 72°C – 30-90 сек; затем финальная элонгация при 72°C – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1xTBE), окрашенном бромистым этидием.

На первом этапе проводили асимметричную ПЦР с использованием 3 пмоль/л прямого и 30 пмоль/л обратного праймеров HBV Long (табл. 1). На втором этапе для повышения чувствительности проводили вторую ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних (вложенных, гнездовых) праймеров для четырех регионов ВГВ (см.табл. 1) – по 15 пмоль/л каждого.

В качестве дополнительного контроля для исключения контаминации секвенировали полученные фрагменты амплификации 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 методики, предложенной в работе, посвященной передаче ВГВ от матери ребенку [19]. Недостаток метода, предложенного D.Candotti и соавт. [4], заключается в необходимости большого объема плазмы крови для экстракции ДНК (500 мкл), а также в невозможности убедиться в полноте генома вируса за счет секвенирования как минимум двух из четырех участков генома ВГВ, как это было рекомендовано на совещании по скрытому ВГВ.

Согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится амплификация ДНК методом асимметричной ПЦР с использованием протяженных олигонуклеотидных праймеров с разной температурой плавления, комплементарных области наибольшего сходства геномов различных образцов вируса гепатита В. Для повышения чувствительности проводится вторая полимеразная цепная реакция с использованием продукта амплификации первой реакции и внутренних праймеров (см.табл.1), соответствующих одному из четырех рекомендованных при диагностике СкГВ регионов генома ВГВ. В составе амплификационной смеси на каждом этапе предложено неравное соотношение дезок-

Таблица 2

Вирусная нагрузка использованных в оценке аналитической чувствительности образцов в разведениях

Образец	МЕ/мл образец	МЕ/мл пул 1	МЕ/мл пул 2	МЕ/мл пул 3	МЕ/мл пул 4	МЕ/мл пул 5	МЕ/мл пул 6	МЕ/мл пул 7	МЕ/мл пул 8	МЕ/мл пул 9
1	38*10 ⁶	19*10 ⁶	9,5*10 ⁶	4,7*10 ⁶	2,3*10 ⁶	1,0*10⁶	5,9*10 ⁵	2,9*10 ⁵	1,4*10 ⁵	7,4*10 ⁴
2	24*10 ⁵	12*10 ⁵	6*10 ⁵	3,2*10⁵	1,5*10 ⁵	7,5*10 ⁴	3,7*10 ⁴	1,8*10 ⁴	9,3*10 ³	4,6*10 ³
3	11*10 ⁵	5,5*10 ⁵	2,7*10 ⁵	1,3*10 ⁵	6,8*10 ⁴	3,4*10 ⁴	1,7*10 ⁴	8,5*10³	4,2*10 ³	2,1*10 ³
4	47*10 ⁴	23,5*10 ⁴	11,7*10 ⁴	5,8*10 ⁴	2,9*10 ⁴	1,4*10 ⁴	7,3*10 ³	3,6*10 ³	1,7*10³	9,1*10 ²
5	21*10 ⁴	10,5*10 ⁴	5,2*10 ⁴	2,6*10 ⁴	1,3*10 ⁴	6,5*10 ³	3,1*10³	1,6*10 ³	8,2*10 ²	4,1*10 ²
6	8*10 ⁴	4*10 ⁴	2*10 ⁴	1*10 ⁴	5*10 ³	2,7*10³	1,2*10 ³	6,2*10 ²	3,1*10 ²	1,5*10 ²
7	9*10 ³	4,5*10 ³	2,2*10 ³	1,1*10 ³	5,6*10 ²	2,8*10²	1,4*10²	70	35	17
8	6*10 ³	3*10 ³	1,5*10 ³	7,5*10 ²	3,9*10²	1,8*10 ²	93	46	23	11
9	5*10 ³	2,5*10 ³	1,2*10 ³	6,2*10 ²	3,0*10²	1,6*10²	78	39	19	9,7
10	7*10 ²	3,5*10 ²	1,7*10²	87	43	21	10	5	2,5	1,2

Примечание. Вирусная нагрузка в пулах анализировалась выборочно (выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием).

синуклеотидтрифосфатов и высокая концентрация MgCl₂, на первом этапе в смеси присутствуют формамид и глицерин в количестве 4% и 6% от конечного объема соответственно, а на втором этапе формамид и DMSO в количестве 4% и 10% от конечного объема соответственно.

Аналитическую чувствительность метода проверяли методом поэтапного разведения. Были выбраны 10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГВ. Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГВ (чистой плазмой) следующим образом. Аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку Eppendorf объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл чистой плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и 100 мкл нового пула переносили в третью пробирку итд. до десятикратного последовательного разведения (табл. 2). После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца. Полученные образцы ДНК амплифицировали, согласно предложенному методу. Результаты выявления вируса в пулах разведения представлены в табл. 3.

В качестве примера оценки чувствительности на гель-электрофорезе на рисунке представлен черно-белый негатив фотографии электрофореза продуктов амплификации второго этапа (праймеры SF2/SR2) последовательных разведений образца № 9, вирусная нагрузка 5*10³ МЕ/мл. Продукт амплификации последнего разведения предположительно около 9,7 МЕ/мл. Данной концентрации фрагмента было достаточно для проведения секвенирующей реакции.

Для определения уровня диагностической чувствительности разработанного метода относительно «референсных» коммерческих тест-систем был использован набор реагентов для качественного определения ДНК ВГВ в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН

Таблица 3

Выявление ВГВ в пулах разведения в соответствии с таблицей 2.

Образец	Без разведения	пул 1	пул 2	пул 3	пул 4	пул 5	пул 6	пул 7	пул 8	пул 9
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
10	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-

Примечание. «+» – образец, визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле, «-» – образец, визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле, «+/-» – образец, слабо визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле, хорошо визуализируемый в полиакриламидном геле. Для «+» и «+/-» образцов возможно дальнейшее секвенирование.

ЦНИИЭ, Москва), а также одна из наиболее чувствительных (аналитическая чувствительность 3,8 МЕ/мл) тест-систем HBV RG PCR Kit (Qiagen) с предварительной экстракцией анализируемой ДНК из различного объема биологического материала. В качестве анализируемого биологического материала использовали образцы и пулы образцов, приведенные в табл. 4.

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

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-положительную плазму крови больных, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Для контроля анализируемых образцов и исключения возможной контаминации в качестве контрольных ВГВ-

Таблица 4

Определение чувствительности разработанного метода в сравнении с «референсными» тест-системами

Наименование образцов и объем биологического материала экстракции	Концентрация (предположительная концентрация) образца МЕ/мл	АмплиСенс HBV-FL	HBV RG PCR Kit	Предложенный нами метод выявления ВГВ при низк. вирусной нагрузке
1 без разведения	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
1 пул 7	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
4 пул 8	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
6 пул 3	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
6 пул 9	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
7 пул 4	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
7 пул 8	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	-	+	+
9 пул 5	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
9 пул 9	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	-	+	+
10 пул 3	500 мкл	+	+	+
	100 мкл	+	+	+
10 пул 7	500 мкл	-	+	+
	100 мкл	-	+	+
10 пул 8	500 мкл	-	+	+
	100 мкл	-	-	-

позитивных 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. 5.

Из представленных данных видно, что 98,82% обследованных образцов являлись отрицательными, сомнительных образцов не обнаружено, четыре образца (1,18%) положительны при использовании указанного метода выявления ВГВ при низкой вирусной нагрузке. Для позитивных образцов проводили секвенирование и субгенотипирование полученных фрагментов ДНК. Ни один из амплифицированных фрагментов не относился к ВГВ субгенотипов А1, D4, Е.

Дополнительно для оценки специфичности был проведен анализ посредством добавления в реакцию амплификации геномной ДНК/кДНК следующих вирусов: вирусы гепатитов А, С, D, Е, G, вирус иммунодефицита человека, парвовирус В19, вирус Эпштейн-Барра, цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус клещевого энцефалита. При проведении тестирования образцов ДНК/кДНК вышеперечисленных вирусов позитивной реакции на присутствие ДНК ВГВ и неспецифических реакций выявлено не было.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности разработанного метода при исследовании биологического материала.

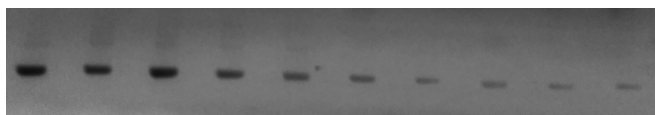
Вышеописанный метод был разработан с использованием в качестве образцов ВГВ, циркулирующих

Таблица 5

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

Наименование группы образцов	Количество образцов	Положительные	Отрицательные	Сомнительные
Плазма крови детей	28	0	28	0
Плазма крови подростков	40	0	40	0
Плазма крови беременных	96	2	94	0
Плазма крови онкобольных вне терапии	46	0	46	0
Плазма крови онкобольных проходящих лечение	27	0	27	0
Плазма крови пациентов 50-70 лет	30	0	30	0
Плазма крови пациентов гемодиализного центра	34	1	33	0
Плазма крови лиц с коинфекцией ВИЧ ВГС	36	1	35	0

на территории РФ и Республики Узбекистан генотипов (D1, D2, D3, A2). Метод позволили выявить и охарактеризовать HBsAg-негативный ВГВ среди ВИЧ-



Негатив фотографии электрофореза продуктов амплификации второго этапа последовательных разведений образца №9, вирусная нагрузка $5 \cdot 10^3$ МЕ/мл. Продукт амплификации последнего разведения, предположительно около $9,7$ МЕ/мл.

инфицированных лиц, больных хроническим вирусным гепатитом С, больных криптогенным гепатитом, доноров крови. Поскольку, несмотря на характерное географическое распределение генотипов и субгенотипов ВГВ, обнаружение «чуждых» для тех или иных территорий геновариантов становится все более частым, мы сочли необходимым оценить возможность использования предложенного метода в географически удаленных, но имеющих активные международные отношения с Российской Федерацией регионах с высокой частотой встречаемости гепатотропных вирусов, в том числе ВГВ не встречающихся в нашей стране генотипов.

Метод был апробирован в Гвинейской Республике и в Социалистической Республике Вьетнам [20]. Было показано, что предложенный метод позволяет выявлять и секвенировать различные геноварианты ВГВ как широко распространенные в РФ 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, B4 депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами MN535017-MN535019).

Заключение. Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке позволяет идентифицировать и генотипировать 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 скринировании доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8, 10-16, 18,19 см. REFERENCES)

9. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.Л., Савчук Т.Н., Тотолян Арег А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 383-92.
17. 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.
20. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Понятишина М.В., Хамитова И.В., Сафронов В.А. и др. Распространенность маркеров вируса гепатита В среди пациентов Российско-Гвинейского госпиталя г. Киндия Гвинейской Республики. В кн.: Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет. Попова А.Ю., ред. СПб.: ФБУН

НИИЭМ имени Пастера; 2017: 256-62.

REFERENCES

1. Van Nguyen D., Van Nguyen C., Bonsall D., Ngo T.T., Carrique-Mas J., Pham A.H. et al. Detection and Characterization of Homologues of Human Hepatitis Viruses and Pegviruses in Rodents and Bats in Vietnam. *Viruses*. 2018; 10(3): E102.
2. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>>. Accessed 2019.07.08.
3. Dong Hyun Sinn, Eun Ju Cho, Ji Hoon Kim, Do Young Kim, Yoon Jun Kim, Moon Seok Choi. Current status and strategies for viral hepatitis control in Korea. *Clin. Mol. Hepatol.* 2017; 23(3): 189–95.
4. 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.
5. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics. *Antiviral. research*. 2015; 122: 91–100.
6. Raffa G., Maimone S., Cargnel A., Santantonio T., Antonucci G., Massari M. et al. Analysis of occult hepatitis B virus infection in liver tissue of HIV patients with chronic hepatitis C. *AIDS*. 2007; 21: 2171–5.
7. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*. 2012; 61(1): i6–i17.
8. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2: 479–86.
9. Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T. N., Totolian Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i Immunitet*. 2017; 7(4): 383-92. (in Russian)
10. Mulrooney-Cousins P. M., Michalak T. I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13: 5682–6.
11. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2007; 46: 160–70.
12. 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.
13. 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.
14. Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stežinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut*. 2019; 68(2): 313-21.
15. 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. 10.1371/journal.pone.0138552
16. Samal J., Kandpal M., Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25: 142–63.
17. Ostankova 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)
18. Brichtler 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.
19. Candotti D., Danso K., Allain J-P. Maternofetal transmission of hepatitis B virus genotype E in Ghana, West Africa. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 2686-95.
20. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Ponyatishina M.V., Khamitova I.V., Safronov V.A. et al. The prevalence of hepatitis B virus markers among patients of the Russian-Guinean hospital in Kindia, the Republic of Guinea. In the book: Popova A.Yu., ed. Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity [Aktual'nye infektsii v Gvineyskoy Respublike: epidemiologiya, diagnostika i immunitet]. St.Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute; 2017: 256-62. (in Russian)

Поступила 04.10.19

Принята к печати 10.10.19