

*На правах рукописи*

**ЕЛПАЕВА**

**Екатерина Александровна**

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА В,  
ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И  
ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

Специальность 03.02.02 — вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России

**Грудинин Михаил Павлович**

**Официальные оппоненты:**

**Михайлов Михаил Иванович,**

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова» (ФГБНУ ИПВЭ им.М.П. Чумакова), директор.

**Борисевич Сергей Владимирович,**

доктор биологических наук, профессор Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России), начальник.

**Ведущая организация:**

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

Защита диссертации состоится «   » \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_\_ час \_\_\_\_ мин на заседании Диссертационного совета Д.001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15/17).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и на сайте <http://www.influenza.spb.ru/>.

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат медицинских наук \_\_\_\_\_ **Суховецкая Вера Федотовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Вирусный гепатит В является одной из глобальных проблем здравоохранения. В настоящее время в мире вирусом гепатита В (ВГВ) инфицированы более 240 миллионов человек, и более полумиллиона носителей вируса ежегодно умирает от тяжелых последствий инфекции, таких как печеночная недостаточность, цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) (*Gao, 2015*). В России в последние годы благодаря развитой программе вакцинации случаи острого гепатита В (ОГВ) регистрируются все реже, однако заболеваемость хроническим вирусным гепатитом (ХГВ) не только остается на высоком уровне, но и продолжает возрастать (*Эсауленко, 2009*). В Санкт-Петербурге и Ленинградской области ежегодно отмечают более высокие показатели заболеваемости ХГВ, чем в среднем по России (*Эсауленко, 2012*).

В последние десятилетия основные успехи в диагностике, профилактике и лечении гепатита В связаны с изучением генетических характеристик вируса. Одним из важных факторов, влияющих на тяжесть течения болезни и эффективность противовирусного лечения, является генотип ВГВ (*Kao, 2011*).

Распространенность генотипов ВГВ в мире неоднородна и варьирует в зависимости от географических регионов мира (*Lin, Kao, 2015; Norder, 2004*).

Существенное влияние на течение ХГВ оказывает генетическая гетерогенность вирусной популяции в организме хозяина. Появление квазивидов ВГВ происходит в процессе адаптации вируса в условиях противостояния действию иммунной системы организма, а также длительного применения противовирусной терапии. Показано, что нуклеотидные замены в *preCore/Core* и *preS/S* областях генома вируса гепатита В приводят к снижению уровня экспрессии вирусных белков *HBcAg* и *HBsAg*, что затрудняет серологическую диагностику заболевания (*Tong, 2005; Lin, Kao, 2015*). Длительное лечение препаратами на основе аналогов нуклеозидов и нуклеотидов (АН) часто приводит к развитию лекарственной устойчивости за счет возникающих замен в области обратной транскриптазы белка полимеразы вируса (*Gao, 2015; Dandri, Locarnini 2012*). Из-за наличия в геноме ВГВ перекрывающихся открытых рамок считывания (ОРС) замены в гене полимеразы могут потенциально влиять на антигенные свойства вируса и, как следствие, приводить к снижению эффективности вакцинации (*Cento, 2013; Locarnini, 2010*).

В настоящее время для выявления мутаций в геноме ВГВ применяют различные методы. В 2013 году стала доступна отечественная коммерческая тест-система для выявления мутаций устойчивости к АН «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq», основанная на амплификации фрагмента гена полимеразы с последующим определением нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сенжеру. Однако данный метод не позволяет выявлять различные варианты ВГВ в одном клиническом образце.

В последние годы ведется разработка новых методов определения мутаций устойчивости ВГВ. К наименее трудоемким, быстрым и доступным методам относятся различные варианты ПЦР с детекцией в режиме реального времени (*Wang, 2006; Feng, 2011*). К сожалению данные методы позволяют выявлять лишь ограниченное число точечных мутаций в геноме ВГВ.

С появлением методов секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing) стало возможным не только определять широкий спектр мутаций устойчивости ВГВ, но и выявлять варианты гетерогенной популяции вируса (*Ko, 2012*). Несмотря на то, что данный метод пока не получил широкого распространения в клинических лабораториях из-за высокой стоимости оборудования и реактивов, применение NGS-технологии для поиска генетических вариантов ВГВ могут быть использованы для исследования механизмов адаптации вируса и его эволюции.

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

Исследования, касающиеся распространенности генетических вариантов ВГВ и их клинической значимости, имеют большое значение не только для эпидемиологического надзора за инфекцией, но и для клинической практики. Однако подобных систематических исследований ВГВ на территории России до сих пор не проводится. Сведения о молекулярно-эпидемиологической обстановке в регионах РФ имеются лишь в отдельных публикациях групп исследователей под руководством Чуланова В.П. (*Чуланов, 2003*), Мукомолова С.Л. и Шляхтенко Л.Н. (*Mukomolov, 2014*), Михайлова М.И. (*Mikhailov, 2013*) и Эсауленко Е.В. Вопросы распространения мутантных форм ВГВ и их клинической значимости отражены в публикациях групп исследователей под руководством Чуланова В.П. (*Чуланов, 2011*) и Михайлова М.И. (*Громова, 2012; Кожанова, 2013*), проблемы диагностики вирусного гепатита В в России – в работах Писаревой М.М. (*Pisareva, 1999*) и Чуланова В.П. (*Чуланов, 2003*).

**Цель исследования.** Идентификация и характеристика генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующего на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

### **Задачи исследования:**

1. Определить распределение генотипов вируса гепатита В в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в период с 2008 по 2014 год.
2. Выявить мутации в гене полимеразы вируса гепатита В, определяющие устойчивость к аналогам нуклеотидов/нуклеозидов у пациентов с хроническим гепатитом.
3. Разработать метод определения мутаций устойчивости в YMDD-мотиве полимеразы вируса гепатита В, основанный на ПЦР в реальном времени.
4. Применить полногеномное секвенирование нового поколения (NGS) для анализа структуры генома популяции ВГВ у пациентов, включая минорные варианты.

5. Провести анализ нуклеотидных замен в preCore/Core и preS/S областях генома вируса гепатита В, определяющих снижение синтеза вирусных белков (HBeAg и HBsAg).

**Научная новизна исследования.** Впервые разработан метод выявления мутации устойчивости к противовирусной терапии (rtM204I/V), основанный на ПЦР в реальном времени. Впервые для изучения популяции ВГВ в отдельном организме хозяина применено полногеномное секвенирование нового поколения (NGS).

**Теоретическая и практическая значимость.** Исследование географического распределения генотипов вируса гепатита В, а также выявление аминокислотных замен, приводящих к снижению концентрации серологических маркеров и появлению мутаций устойчивости к противовирусным препаратам, имеет важное практическое значение для прогнозирования тяжести течения заболевания и эффективности противовирусной терапии. Применение быстрых и точных методик для диагностики и мониторинга мутаций устойчивости вируса может помочь врачу-инфекционисту при выборе противовирусного терапевтического средства для лечения хронического гепатита В у пациентов. Разработанный метод определения мутаций устойчивости в YMDD-мотиве полимеразы может быть использован для создания диагностической тест-системы. Применение технологии NGS для диагностики и мониторинга мутаций устойчивости вируса может помочь в решении практических и фундаментальных задач вирусологии и эпидемиологии.

**Методология и методы исследования.** В ходе проведения научной работы применялись стандартные биохимические, вирусологические, микробиологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы. Для определения замены rtM204I/V, приводящей к устойчивости к АН, разработана оригинальная методика, основанная на ПЦР в реальном времени. Более подробно этапы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. При длительном использовании нуклеозидных аналогов для лечения пациентов с хроническим гепатитом (ХГВ) формируются мутантные варианты ВГВ, обусловленные возникновением замен в области обратной транскриптазы гена полимеразы. У пациентов с ХГВ, длительно получавших противовирусные препараты на основе аналогов нуклеозидов (ламивудин, телбивудин, энтекавир) формируются missense мутации, которые приводят к образованию замен в YMDD-мотиве полимеразы (rtM204I/V), что клинически сопровождается возникновением резистентности и кросс-резистентности к данным препаратам.

2. У пациентов, не ответивших на противовирусную терапию аналогами нуклеозидов, для первичного скрининга замен rtM204I/V целесообразно

использовать разработанный оригинальный метод на основе метода ПЦР в режиме реального времени.

3. Для повышения эффективности лечения у пациентов с обнаруженными мутациями устойчивости, а также мутациями в preCore/Core и preS/S областях генома, которые способны приводить к изменению структуры белков (HBeAg и HBsAg) и антигенных свойств вируса, необходимо проводить секвенирование нового поколения (NGS) с целью выявления квазивидов в популяции ВГВ.

**Личный вклад автора в проведенное исследование** состоит в самостоятельном планировании и проведении всех лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Методическая помощь была оказана сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России: Романовской-Романько Е.А. и Юхневой М.А. - при клонировании последовательностей ВГВ в вектор; Комиссаровым А.Б. и Фадеевым А.В. - при секвенировании методом Сенжера; Клотченко С.А. и Плотниковой М.А. - при NGS секвенировании геномов; Никитиной О.Е. – при подборе пациентов и характеристике клинического течения ХГВ; а также сотрудником лаборатории эволюционной геномики НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ Касьяновым А. С. – при обработке данных NGS секвенирования.

**Степень достоверности и апробация материалов диссертации.** Достоверность результатов исследований, проведенных автором, подтверждена статистическим анализом данных, полученных в процессе проведения исследования. Материалы диссертации были представлены на 2-ой Российско-Итальянской конференции "Социально опасные вирусные инфекции". (Великий Новгород, 2005); на 3-ей Российско-Итальянская конференция "Социально опасные вирусные инфекции" (Архангельск, 2006); на международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Новосибирск, 2009); на 7-ой и 10-ой Российско-Итальянской научно-практической конференции «Актуальные вопросы социально-значимых вирусных инфекции» (Великий Новгород, 2009, 2011); на 3-ей и 4-ой Международной конференции по инфекционным болезням (Пекин, Китай, 2009, 2010); на II-м Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2010); на VII-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010); на научно-практической конференции-биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение» (Санкт-Петербург, 2014); на конференции «Классический университет в пространстве трансграничности на севере Европы: стратегия инновационного развития» (Петрозаводск, 2014); на XXI Объединенной Российской Гастроэнтерологической неделе (Москва, 2015).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 9 тезисов докладов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы и списка иллюстраций. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 14 таблицами. Список цитируемой литературы содержит 206 источника, в том числе 12 на русском и 191 на английском языках. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утвержденными в ГОСТ Р 7.0.11.2011.

**Работа поддержана** грантами для молодых ученых и молодых кандидатов наук вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга. Работа также выполнялась в рамках Государственных тем НИР и Государственного задания, выполняемых в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Пациенты.** В период 2008-2014 гг. методом ПЦР на наличие ДНК вируса гепатита В (ВГВ) в сыворотке крови были обследованы 1414 пациентов из г. Санкт-Петербурга с подозрением на ХГВ и 67 человек из г. Петрозаводска. Для выявления мутаций устойчивости к АН проведено секвенирование методом Сенжера фрагмента гена полимеразы от 122 пациентов с ХГВ (83 пациента из г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области, 19 – из г. Петрозаводска и 20 человек из Вьетнама).

**Серологические маркеры и клинические показатели.** Вирусные антигены HBsAg и HBeAg и антитела к вирусу гепатита В AbHBs, AbHBe, AbHBcorIgM, AbHBcorIgG исследовались методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест». Индекс гистологической активности (ИГА) оценивали по шкале Knodell с оценкой паренхиматозного повреждения (ПП) (1-4 балла), степень фиброза (Ф) - по Metavir (0-4).

**Выделение ДНК ВГВ и ПЦР.** Выделение ДНК ВГВ из образцов плазмы крови проводили с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс РИБО-сорб», «АмплиПрайм РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Определение вирусной нагрузки и генотипа ВГВ проводили методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени на приборах Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и Rotor -Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) с использованием тест-систем «АмплиСенс HBV-FL», «АмплиСенс

HBV-Монитор-FL» и «АмплиСенс HBV-генотип-FL» («ИнтерЛабСервис», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

**Секвенирование фрагмента гена полимеразы для определения мутаций устойчивости к АН.** Амплификацию фрагмента генома ВГВ для определения мутаций проводили методом ПЦР с использованием реагентов: 5x реакционный буфер GoTaq Green (Promega, США), GoTaq полимеразы, 5 ед/мкл (Promega, США), DEPC-H<sub>2</sub>O (Fermentas, Литва), dNTP, 10 мМ [2,5 мМ dTTP; 2,5 мМ dATP; 2,5 мМ dCTP; 2,5 мМ dGTP](Fermentas, Литва) и оригинальных праймеров YMDD-F: 5'-СТССААТСАСТСАССААС-3' и YMDD-R: 5'-GGGTTТАААТGTАТАСССА-3' [концентрация 10 пмоль/мкл] Термальный профиль реакции: 1. 95<sup>0</sup>С – 4 мин.; 2. 95<sup>0</sup>С – 30 сек., 60<sup>0</sup>С – 30 сек., 72<sup>0</sup>С – 30 сек. – 30 циклов (с понижением температуры отжига на 0,5<sup>0</sup>С за цикл); 3. 95<sup>0</sup>С – 30 сек., 45<sup>0</sup>С – 30 сек., 72<sup>0</sup>С – 30 сек. – 30 циклов; 4. 72<sup>0</sup>С – 7 мин. Анализ и очистку продуктов ПЦР для секвенирования проводили электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромида этидия в буфер TBE (890mM Трис, 890mM борная кислота, 20mM ЭДТА; рН 8). ДНК из агарозного геля выделяли коммерческим набором QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование нуклеотидной последовательности фрагмента гена полимеразы, preS/S и preCore/Core области проводили методом Сэнжера при помощи набора реагентов ABI prism<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator v3.1 Kit с использованием оригинальных праймеров на приборе ABI PRISM 3100 (“Applied Biosystems”, США). Анализ последовательностей и построение выравниваний проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США).

**Определение мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ).** Для определения мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов был разработан метод, основанный на ПЦР-РВ. При дизайне оригинальных праймеров был модифицирован метод выявления YMDD-мутантов, использующий универсальную матрицу для ПЦР-РВ (Shi, 2006; Wang, 2006). Мутации устойчивости к АН определяли при помощи набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green (НПК «СИНТОЛ», Россия). ПЦР смесь (смесь-1) содержит реакционный буфер с SYBR Green, 200 мкМ каждого dNTP, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 ед. Taq-полимеразы, 100 пкМ праймера PrF (5'-АТАСААСАССТGTАТТСССАТСССАТ). Образец ДНК вносят параллельно в три пробирки, содержащие смесь-1 и праймеры Pr1 (5'-СССССААТАССАТСАТСНАС), Pr2 (5'-СССССААТАССАТСАТСС) и PrC (5'-СССССААТАССАТСАТС), соответственно. Праймеры Pr1 и Pr2 подобраны таким образом, чтобы выявить замену в YMDD-мотиве гена полимеразы (табл. 1). Праймер PrC является положительным контролем на наличие ДНК ВГВ и не зависит от наличия или отсутствия мутации. Термальный профиль реакции: 1. начальная денатурация 95<sup>0</sup>С – 5 мин; 2. 95<sup>0</sup>С – 15 сек, 62<sup>0</sup>С – 20 сек, 62<sup>0</sup>С – 20 сек (измерение флуоресценции на каждом цикле), уменьшение температуры отжига праймеров (Touch Down) с шагом 1<sup>0</sup>С,

7 циклов; 3. 95<sup>0</sup>С – 15 сек, 55<sup>0</sup>С – 20 сек, 62<sup>0</sup>С – 20 сек (измерение флуоресценции на каждом цикле), 30 циклов. По окончании реакции была построена кривая плавления в диапазоне от температуры отжига праймеров до температуры полной денатурации – примерно 95<sup>0</sup>С.

**Таблица 1 - Алгоритм определения мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов в YMDD-мотиве гена полимеразы ВГВ**

Праймер	Метионин (М, Met)		Изолейцин (I, Ile)		Валин (V, Val)	
	ПЦР(-)	АТN	ПЦР(-)	АТN	ПЦР(+)	GTN
Pr1	ПЦР(-)	АТN	ПЦР(-)	АТN	ПЦР(+)	GTN
Pr2	ПЦР(+)	АТG	ПЦР(-)	АТH	ПЦР(+)	GTG
					ПЦР(-)	GTH
PrC	ПЦР(+)	RTN	ПЦР(+)	RTN	ПЦР(+)	RTN

Расчет эффективности ПЦР проводили по формуле (1):

$$E=10^{(-1/K)}, \quad (1)$$

где E – показатель эффективности ПЦР, K – угол наклона прямой зависимости разведения ДНК от значения Ct.

Клонирование последовательностей ДНК, кодирующих М, I и V в 204 положении обратной транскриптазы вируса гепатита В, в вектор pUC18 проводили по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII. Рестриktionную смесь очищали при помощи коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США). Для проведения реакции лигирования использовали реагенты фирмы Fermentas (Литва). Для трансформации плазмидами pUC18-YMDD, pUC18-YVDD и pUC18-YIDD были использованы бактериальные клетки E.coli штамм DH5 $\alpha$ , который выращивали на питательной среде LB (Luria-Bertani) с ампициллином (50 мкг/мл). Плазмидную ДНК выделяли набором QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN, США). Полученную плазмидную ДНК секвенировали методом Сэнжера при помощи праймеров M13F и M13R.

**Определение нуклеотидной последовательности геномов ВГВ методом NGS секвенирования.** Полногеномные последовательности ВГВ были амплифицированы методом ПЦР с использованием праймеров P1 (5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3'), P2 (5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3'), P3 (5'-CTCGCTCGCCCAAATTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3') и P4 (5'-CTGGTTCGGCCCAAAGTTGCATGGTGCTGG-3') (Günther, 1995). Термальный профиль реакции: 1. 94<sup>0</sup>С – 1 мин.; 2. 94<sup>0</sup>С – 40 сек., 60<sup>0</sup>С – 90 сек., 68<sup>0</sup>С – 2 мин., 72<sup>0</sup>С – 30 сек. – 40 циклов; 3. 72<sup>0</sup>С – 5 мин. Анализ и очистку продуктов ПЦР для секвенирования проводили гель-электрофорезом в 0.8%-ной агарозе с добавлением бромида этидия в буфер TBE. В качестве маркера молекулярной массы использовался Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas, Литва). ДНК из агарозного геля выделяли коммерческим набором QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование полных геномов ВГВ проводилось на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием комплекта реагентов Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (96 Samples) (Illumina, США). Для обработки полученных последовательностей использовалась программа

CLC Genomics Workbench v7.0 (Qiagen, Германия). Для сборки de novo - программа Spades (Bankevich, 2012) с дефолтными параметрами, для картирования на референсную последовательность AJ344117 - bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012), для поиска вариантов - samtools (Li, 2009). Для построения филогенетического дерева использовали программу MEGA v5.05 (Tamura, 2011), метод присоединения ближайших соседей и эволюционную двухпараметрическую модель Кимуры с аппроксимацией гамма-распределения частот эволюции среди сайтов последовательности (параметр гамма-распределения равен 1). Оценка достоверности реконструированной топологии филогенетических деревьев проводилась с помощью бутстреп-анализа (1000 репликаций).

**Статистический анализ.** Для статистического анализа данных использовался пакет Statistica для Windows, версия 5. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, U-тесту Манна-Уитни-Вилкоксона, критериям Фишера или  $\chi^2$ . Для корреляционного анализа использовался коэффициент корреляции Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Определение генотипа ВГВ и уровня вирусной нагрузки у пациентов с ХГВ.

Среди обследованных 1414 пациентов с подозрением на вирусный гепатит, ДНК вируса гепатита В была выявлена более чем у половины (55%), в том числе у 49 человек (3% случаев) были выявлены случаи сочетанного инфицирования ВГВ и вирусом гепатита С, у 16 пациентов (1% случаев) - ВГВ и вирусом гепатита D. Более чем у половины обследованных пациентов (n=300; 57,5%) наблюдалась низкая вирусная нагрузка (менее  $10^4$  копий/мл), у 149 (28,5%) – средняя ВН ( $10^4$ - $10^6$  копий/мл), и лишь у 73 (14%) - вирусная нагрузка была более 1 миллиона копий/мл. Генотип ВГВ был определен у 297 пациентов, к плазме крови которых была выявлена ДНК ВГВ. Генотип D был зарегистрирован у 80,1% пациентов, генотип А – у 16,5%, генотип С – у 0,7% (табл. 2). Случаи одновременного присутствия в плазме крови двух (А и D) генотипов вируса («микст-генотипов») были выявлены у 2,7% пациентов. Анализ зависимости между вирусной нагрузкой, определенной при выявлении ХГВ, и генотипом ВГВ у данных пациентов не показал статистически значимых различий при низкой и высокой ВН, в то время как средняя ВН достоверно чаще наблюдалась при ВГВ генотипа D (данные не показаны). При сравнении с результатами наблюдения предыдущих годов (Писарева, 2007), в 2008-2014 годы на территории Санкт-Петербурга отмечено увеличение доли ВГВ генотипа А с 4,0% - в 2002-2006 гг. до 16,5% - в 2008-2014 гг. Также в 2008-2014 гг. были выявлены случаи «микст-генотипа» (2,7%) и генотипа С (0,7%). Изменение частоты встречаемости генотипов ВГВ, циркулирующих в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, возможно, связано с изменением миграции населения в этом регионе.

**Таблица 2 - Распределение генотипов вируса гепатита В среди больных ХГВ в г. Санкт-Петербурге и Ленинградской области в период с 2002-2006 и 2008-2014 годы**

Период, годы	Генотип D, n (%)	Генотип A, n (%)	Микст- генотип A+D, n (%)	Генотип ни A, ни D, n (%)	Всего, n (%)
2002-2006	173 (96,0%)	7 (4,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	180 (100,0%)
2008-2014	238 (80,1%)*	49 (16,5%)*	8 (2,7%)*	2 (0,7%)	297 (100,0%)

\* - Разница достоверна с периодом 2002-2006 гг. (P<0,05)

Для более глубокого анализа структуры генома циркулирующих вирусов гепатита В, прослеживания их эволюционных связей и определения серотипа вируса нами были получены 12 полногеномных последовательностей ВГВ, выделенных от шести пациентов с ХГВ в различное время течения заболевания, методом NGS секвенирования (NGS – секвенирование следующего поколения). Проведенный филогенетический анализ показал, что все исследованные вирусы принадлежали к генотипу D2 (субтипу ауw3).

Исследование географического распределения серотипов и генотипов ВГВ широко используется в качестве эпидемиологических маркеров мониторинга эффективности применяемых вакцин против ВГВ (*Norder, 2004; Tallo, 2004*). Превалирование ВГВ генотипа D отражает адекватность применяемых в данном регионе вакцин, ориентированных на субтипы ауw2 и ауw3. Следует отметить, что увеличение циркуляции ВГВ генотипа A, определяющего субтипы адw, в Санкт-Петербурге и ЛО за последние годы требует дальнейшего мониторинга для исключения возможного снижения эффективности вакцинации.

#### **Выявление мутантных форм ВГВ**

Для ВГВ генотипа D характерно возникновение мутаций в различных участках генома под действием аналогов нуклеозидов и иммунного «прессинга» (*Кuo, Gish, 2012; Lin, Kao, 2015*). Для дальнейшего анализа генетических вариантов ВГВ были отобраны 122 пациента с ХГВ генотипа D.

*Определение мутаций в гене полимеразы ВГВ, определяющих устойчивость к АН, методом прямого секвенирования*

Для определения мутаций устойчивости к АН методом секвенирования по Сенжеру у 122 пациентов с ХГВ (83 пациента из Санкт-Петербурга и Ленинградской области, 19 – из г. Петрозаводска и 20 человек из Вьетнама) была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена полимеразы.

Для анализа мутаций устойчивости все пациенты из Санкт-Петербурга были разбиты на 5 групп. Пациенты первой группы получали монотерапию пегилированным интерфероном (ПЕГ-ИФН) в течение 48 недель, пациенты второй группы принимали ламивудин (ЛАМ), третьей группы – телбивудин (ТБВ), четвертой – энтекавир (ЭНТ), в пятую группу вошли пациенты, не

получавшие противовирусную терапию (ПВТ). Длительность лечения АН была различной (от трех месяцев до шести лет) в зависимости от исходного уровня вирусной нагрузки, степени фиброза и ответа на терапию АН. Среди пациентов первой группы снижение вирусной нагрузки до недектируемого уровня наблюдалась у 40% пациентов (табл. 3). У четырех - ответа на терапию не выявлено, поэтому два пациента были переведены на терапию телбивудином, и один – энтекавиром. У пяти пациентов после временного снижения ВН наблюдался вирусологический прорыв, двоим из этих пациентов впоследствии была назначена терапия энтекавиром. Мутаций устойчивости к АН в гене полимеразы ВГВ в данной группе обнаружено не было.

**Таблица 3 - Влияние замен в полимеразе на эффективность лечения пациентов с ХГВ из Санкт-Петербурга**

Показатели, n (%)	Группа I Пег-ИФН n=15	Группа II ЛАМ n=18	Группа III ТБВ n=10	Группа IV ЭНТ n=27	Группа V без ПВТ n=13
Мужчины	12 (80%)	11 (61%)	7 (70%)	19 (70%)	6 (46%)
Женщины	3 (20%)	7 (39%)	3 (30%)	8 (30%)	7 (54%)
Средний возраст, лет	36,5±17,6	29,7±16,7	37,9±15,2	38,4±14,2	45±11,7
Средняя длительность лечения, недели	54±24	47±34	144,4±72	159,7±85	0±0
HBsAg(+) до лечения	15 (100%)	18 (100%)	10 (100%)	27 (100%)	13 (100%)
НВеAg(+) до лечения	2 (13%)	4 (22%)	1 (10%)	7 (26%)	0 (0%) **, ****
AbHBe (+) до лечения	13 (87%)	14 (78%)	9 (90%)	20 (74%)	13 (100%) **, ****
Положительная динамика	6 (40%)	6 (33%)	3 (30%)	12 (44%)	0 (0%) *, **, ****
Без эффекта	4 (27%)	9 (67%) ***	1 (10%) **	6 (22%) **	13 (100%) *, **, **, ****
Рост уровня вирусной нагрузки при терапии	2 (13%) ***	0 (0%) ***, ****	6 (60%) *, **	8 (30%) **	0 (0%) ***, ****
Рост уровня вирусной нагрузки после прекращения лечения	3 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)
Замены в полимеразе	0 (0%)**	5 (28%)*	2 (20%)	3 (11%)	1 (7%)**

\* - Разница достоверна с I группой (P<0,05); \*\* - Разница достоверна с группой II (P<0,05); \*\*\* - Разница достоверна с группой III (P<0,05); \*\*\*\* - Разница достоверна с группой IV (P<0,05);

У пациентов второй группы снижение ВН регистрировалось у шести пациентов (33%). В оставшихся случаях эффекта от лечения выявлено не было, поэтому три пациента были переведены на терапию телбивудином, пять – энтекавиром, и один пациент получал параллельно телбивудин и энтекавир в рамках клинического исследования. Мутации устойчивости были выявлены у пяти пациентов, не ответивших на терапию. У четырех пациентов были обнаружены замены, приводящие к вторичным (компенсаторным) мутациям устойчивости: rtQ215S (n=1), rtL80V (n=1) и rtS85F+rtV84G (n=2). Существует предположение, что замены rtS85F и rtL80I/V – это два эволюционных пути для

усиления первичной устойчивости индуцированной заменой rtM204I (*Cento, 2013*). Хотя в данном исследовании данные замены найдены у пациентов, не ответивших на терапию ламивудином, первичной мутации устойчивости обнаружено не было. Мутации, приводящие к резистентности вируса была выявлена у одного пациента после 6 (rtM204I) и 18 (rtM204V, rtL80I, rtL180M, rtA181V) месяцев лечения ламивудином.

Снижение вирусной нагрузки было диагностировано у трех пациентов третьей группы. После неэффективной терапии ламивудином у одного пациента лечение телбивудином и энтекавиром привело к снижению вирусной нагрузки, у другого - лечение телбивудином привело к снижению ВН и появлению AbHBe. У третьего пациента ВН снизилась до недектируемого уровня за 4 года лечения телбивудином. У остальных пациентов был зарегистрирован рост виремии на фоне терапии, поэтому пять пациентов были переведены на терапию энтекавиром. Мутации устойчивости к телбивудину были выявлены у двух пациентов. У одного пациента после возникновения устойчивости к ламивудину, лечение в течение 14 месяцев телбивудином привело к появлению замен rtM204V, rtV173L, rtL180M, rtA181C. У второго пациента после 58 месяцев были обнаружены мутации устойчивости в гене полимеразы, приводящие к заменам rtM204I, rtL80I и rtQ215S. Среди пациентов четвертой группы положительная динамика была зафиксирована в 44% случаев. Вирусологический «прорыв» при лечении энтекавиром у двух пациентов было следствием выявленных мутаций устойчивости, приводящих к заменам rtM204V, rtV173L, rtL180M, а также к замене rtL229V (n=1), которая совместно с заменой rtM204V усиливает устойчивость к энтекавиру (*Cento, 2013*). У пациента с резистентностью к ламивудину и телбивудину лечение энтекавиром также не было эффективным ввиду сохранения популяции мутантных вирусов (замены: rtM204V, rtV173L, rtL180M, rtA181C) и лишь после добавления в схему лечения тенофовира вирусная нагрузка за 12 месяцев снизилась до уровня 300 копий/мл. В группе пациентов, не получавших противовирусную терапию, была обнаружена замена rtS78T (n=1), характерная для адефовир-устойчивых вариантов ВГВ. Известно, что данная замена встречается у пациентов, не получавших терапию АН, она может потенциально воздействовать на патогенез и онкогенность ВГВ (*Cento, 2013*).

В группе пациентов с ХГВ из Петрозаводска (n=19), получавших терапию АН, были определены первичные и вторичные мутации устойчивости, приводящие к заменам: rtL80V (n=1), rtA181S и rtQ215H (n=1), rtV84G (n=2) и rtQ215S (n=1). Мутаций, приводящих к заменам rtM204I/V, обнаружено не было.

Среди пациентов с ХГВ из г. Ханой (Вьетнам) 7 человек не получали противовирусную терапию и мутаций устойчивости к АН у них выявлено не было, а у 13 пациентов применялась комбинированная терапия аналогами нуклеозидов (ламивудин/адефовир). У 3-х из 13 пациентов были выявлены замены rtS202N и rtA181T, и у одного - только rtS202N. Наличие замены rtA181T у исследуемых пациентов может быть следствием применения

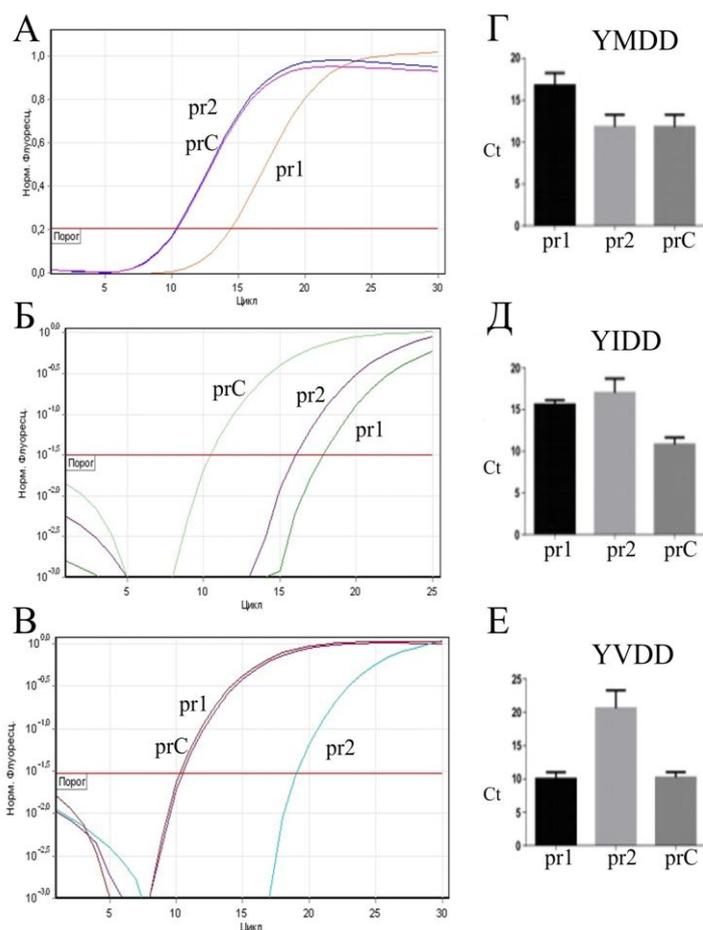
комбинированной терапии ламивудином и адефовиrom. Однако, несмотря на то, что обследованные пациенты не подвергались лечению энтекавиром, вирус гепатита В уже содержал мутацию устойчивости rtS202N.

Полученные нами результаты показали, что увеличение ВН или ее отсутствие при длительном лечении АН лишь в редких случаях может быть следствием возникновения мутаций (табл.3). Лечение энтекавиром показало высокую эффективность, однако длительная терапия энтекавиром может также привести к резистентности, что было показано у двух человек на шестой и восьмой год приема препарата. При возникновении устойчивости к ламивудину применение телбивудина может привести к кросс-резистентности, и, как следствие, к усилению устойчивости, что было показано в нашем исследовании у одного пациента. Использование энтекавира при преобладании ЛАМ/ТБВ-резистентных вариантов ВГВ не всегда достаточно эффективно. В нашем исследовании у пациента с резистентностью к ламивудину и телбивудину снижение вирусной нагрузки было зарегистрировано только после добавления тенофовира. Несмотря на этот факт, использование АН с высоким барьером против возникновения мутаций устойчивости, таких как тенофовир и энтекавир, оправдано и показало высокую эффективность.

*Выявление мутаций, приводящих к изменениям YMDD-мотива ВГВ с использованием ПЦР в реальном времени*

В последние десятилетия в России для лечения ХГВ широко применяют аналоги нуклеозидов (ламивудин, телбивудин и энтекавир). Длительная терапия данными препаратами часто приводит к возникновению мутаций устойчивости (rtM204I/V) (Damerow, 2010; Stuyver et, 2001). Применение адефовира и тенофовира у пациентов с устойчивостью к аналогам нуклеозидов показало высокую эффективность. В связи с этим, раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ. Был разработан быстрый и точный метод определения замен в YMDD-мотиве полимеразы (rtM204I/V), основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Специфичность данного метода была исследована при помощи сконструированных плазмид рUC18 со вставкой последовательности ДНК, кодирующей М, I или V в 204 положении обратной транскриптазы (наличие вставки подтверждалось секвенированием с использованием праймеров M13F и M13R). Положительные результаты ПЦР были определены при расчете статистически достоверной разницы в среднем значении Ct: для рUC-18-YMDD  $\Delta Ct1 \geq 5$ ,  $\Delta Ct2 < 5$ ; для рUC-18-YIDD  $\Delta Ct1 \geq 5$ ,  $\Delta Ct2 \geq 5$ ; для рUC-18-YVDD  $\Delta Ct1 < 5$ ,  $\Delta Ct2 \geq 5$ , где  $\Delta Ct1 = Ct Pr1 - Ct PrC$ ,  $\Delta Ct2 = Ct Pr2 - Ct PrC$  (рис. 1). Для оценки специфичности праймеров в образцах, содержащих различные варианты ВГВ, плазмиды рUC-18-YIDD и рUC-18-YVDD были смешаны с плазмидой рUC-18-YMDD («дикий тип») в конечной концентрации  $10^5$  копий/мл (табл. 4).



**Рисунок 1** Оценка специфичности праймеров для анализа мутаций устойчивости *rtM204I/V* и расчет статистически достоверной разницы в значении *Ct* для *pUC-18-YMDD*, *pUC-18-YIDD* и *pUC-18-YVDD*. Амплификация плазмид *pUC-18-YMDD* в концентрации 10<sup>4</sup> копий/мл (А), *pUC-18-YIDD* в концентрации 10<sup>3</sup> копий/мл (Б), *pUC-18-YVDD* в концентрации 10<sup>3</sup> копий/мл (В) Для *pUC-18-YMDD* разница достоверна между Pr1/Pr2 и между Pr1/PrC (P=0,0079), и не достоверна между Pr2/PrC (P>0,9999) (Г), Для *pUC-18-YIDD* разница достоверна между Pr1/PrC и между Pr2/PrC (P=0,0079) и не достоверна между Pr1/Pr2 (P=0,1429) (Д), Для *pUC-18-YVDD* разница достоверна между Pr1/Pr2 и между Pr2/PrC (P=0,0079) и не достоверна между

**Таблица 4 - Оценка специфичности праймеров в образцах, содержащих различные варианты плазмид**

Пор. №	Образец	Итоговый результат
1	50% <i>pUC-18-YVDD</i> + 50% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
2	30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 70% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
3	10% <i>pUC-18-YVDD</i> + 90% <i>pUC-18-YMDD</i>	M
4	50% <i>pUC-18-YIDD</i> + 50% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I
5	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 70% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I
6	10% <i>pUC-18-YIDD</i> + 90% <i>pUC-18-YMDD</i>	M
7	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 40% <i>pUC-18-YMDD</i>	V/I/M
8	10% <i>pUC-18-YIDD</i> + 30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 60% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
9	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 10% <i>pUC-18-YVDD</i> + 60% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I

Специфичность метода была показана в образцах, содержащих 30 и более процентов «мутантных» вариантов плазмид (*pUC-18-YIDD* и *pUC-18-YVDD*). В случаях, если образец содержал 10 и менее процентов «мутантных» плазмид регистрировали только вариант, соответствующий вирусу «дикого» типа. В образцах, содержащих 60% *pUC-18-YMDD*, 30% *pUC-18-YVDD* и 10% *pUC-18-YIDD* или 60% *pUC-18-YMDD*, 30% *pUC-18-YIDD* и 10% *pUC-18-YVDD* выявлялись только последовательности с заменой *rtM204V* или *rtM204I* и вариант «дикого» типа. В образцах же с равным соотношением трех плазмид: 30% *pUC-18-YIDD*, 30% *pUC-18-YVDD* и 40% *pUC-18-YMDD* выявлялись три

варианта последовательности ВГВ (rtM204M/I/V) с преобладанием «мутантных» вариантов (rtM204I и rtM204V). Чувствительность метода ПЦР оценивали с помощью серии разведений плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD до конечных концентраций 1млн, 100 тыс., 10 тыс., 1 тыс. и 100 копий/мл (пять повторов для каждого разведения). Чувствительность ПЦР составила 100 копий/мл и менее (для плазмиды pUC-18-YVDD). При оценке специфичности была рассчитана разница в среднем значении  $C_t$ , которая составила 5 циклов. Данный расчет специфичности достоверен только при конечной концентрации плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD 1млн, 100 тыс., 10 тыс. и 1 тыс. копий/мл. Таким образом, чувствительность разработанного метода составила 1000 копий/мл. Во всех исследуемых образцах для серии разведений был рассчитан показатель эффективности ПЦР (E). Во всех случаях  $E=2$ , что подтверждает специфичность данных реакций без образования побочных продуктов или димеров праймеров. Отсутствие побочных продуктов также было подтверждено анализом кривых плавления для данных ПЦР продуктов.

Разработанный метод ПЦР-ВР был апробирован на образцах плазмы крови от пациентов с определенной секвенированием по Сенжеру последовательностью, кодирующей YMDD-мотив. Как было описано выше, мутаций устойчивости к АН определяли в 5 группах пациентов с ХГВ (табл. 3). В плазме крови от пациентов первой и пятой групп вирусов, содержащих мутации устойчивости rtM204I/V к АН выявлено не было, что было подтверждено результатами ПЦР (табл. 5).

**Таблица 5 - Сравнение результатов ПЦР, секвенирования по Сенжеру и NGS**

		Аминокислотный остаток в 204 положении обратной транскриптазы			Примечание
		Секвенирование по Сенжеру	ПЦР в реальном времени	NGS (% от общей популяции вируса)	
Группа I ПЕГ-ИФН (n=15)	n=15 (100%)	M	M	Н/Д	
Группа II ЛАМ (n=18)	n=17 (94%)	M	M	Н/Д	
	n=1 (6%)	I	I	I (90,4%)	после 6 месяцев лечения
		I	M/I	M (26,1%) / I (73,9%)	после 12 месяцев лечения
		V	I/V	I (63,3%) / V (24,1%) / M (12,6%)	после 18 месяцев лечения

Продолжение таблицы 5

		Аминокислотный остаток в 204 положении обратной транскриптазы			Примечание
		Секвенирование по Сенжеру	ПЦР в реальном времени	NGS (% от общей популяции вируса)	
Группа III ТБВ (n=10)	n=8 (80%)	M	M	Н/Д	
	n=1 (10%)	I	I/M	Н/Д	после 58 месяцев лечения
		I	I	Н/Д	после 65 месяцев лечения.
	n=1 (10%)	V	V	Н/Д	
Группа IV ЭНТ n=27	n=24 (89%)	M	M	Н/Д	
	n=3 (11%)	V	V	V (99,8%)	
Группа V без ПВТ n=13	n=13 (100%)	M	M	Н/Д	

В плазме крови от пациентов второй группы у одного пациента были выявлены последовательности, кодирующие замену в 204 положении обратной транскриптазы. После 6 месяцев лечения ламивудином была выявлена замена метионина на изолейцин. Причем, методом секвенирования по Сенжеру была определена только замена метионина на изолейцин через 12 месяцев лечения и замена на валин после 18 месяцев терапии, в то время как методом ПЦР-РВ после 12 и 18 месяцев терапии были выявлены смесь последовательностей ДНК ВГВ, кодирующих метионин/изолейцин и метионин/валин, соответственно. После неэффективной терапии ламивудином пациент получал телбивудин, что привело к выявлению вирусов только с заменой rtM204V, обнаруженной обоими методами. У одного пациента после 58 месяцев лечения ТБВ была определен вирус с заменой rtM204I, причем методом ПЦР кроме «мутантного» был обнаружен и «дикий» тип вируса. Еще через 7 месяцев у данного пациента обоими методами обнаруживался только «мутантный» тип вируса (rtM204I). У трех пациентов четвертой группы были выявлены вирусы, содержащие мутации устойчивости к энтекавиру (rtM204V), что также было подтверждено методом ПЦР. Для подтверждения выявленных минорных вариантов ПЦР-РВ, для одного пациента с устойчивостью к ламивудину, телбивудину и энтекавиру было выполнено секвенирование нового поколения (NGS) ДНК ВГВ (табл. 5). Во всех образцах плазмы крови данного пациента минорные варианты ВГВ выявленные методом ПЦР-РВ, были найдены и методом NGS. Методом

секвенирования по Сенжеру были определены только превалирующие варианты вируса во всех образцах от пациента.

Предложенный метод не позволяет дифференцировать последовательности для прямого определения *rtM204I*. В дальнейшем данный метод может быть модифицирован для обнаружения YIDD мотива путем добавления праймеров, выявляющих замену *rtM204I*, в смесь-1. Преимущества данного метода заключается в простоте анализа. Выявление последовательностей ВГВ с заменой *rtM204V* может быть рассчитано по разнице между *St* значения образца (*Pr1*) и контроля (*PrC*) без дополнительных количественных стандартов. Неспецифический отжиг праймеров, как рассчитано выше, исключается при значении  $\Delta Ct < 5$ .

При сравнении разработанного метода с широко используемым секвенированием по Сенжеру, данный метод более быстрый, экономичный и позволяет выявлять минорные варианты популяции ВГВ.

#### *NGS секвенирование геномов ВГВ*

В настоящее время наряду с развитием быстрых методов выявления мутаций устойчивости, таких как ПЦР-РВ, все большее значение для молекулярно-генетической характеристики возбудителей инфекционных заболеваний используются методы секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing). Для изучения популяции вируса гепатита В, циркулирующего на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области, на приборе MiSeq (Illumina) было выполнено полногеномное NGS секвенирование 12 последовательностей ВГВ, полученных от 6 пациентов с ХГВ. В семи образцах от 4-х пациентов мутаций устойчивости к АН обнаружено не было ни методом секвенирования по-Сенжеру, ни методом NGS. У одного пациента были определены первичные и вторичные мутации устойчивости к тенофовиру (*rtA194T*, *rtV214V*, *rtQ215P*), несмотря на то, что данный пациент не получал лечение АН. Известно, что в редких случаях данные мутации могут быть найдены у пациентов с ХГВ до начала терапии АН (Duroeye, 2012).

Как было описано ранее, у одного пациента после лечения ламивудином, телбивудином и энтекавиром были выявлены замены в полимеразе, приводящие к резистентности вируса к АН. Анализ популяции ВГВ у данного пациента методом NGS-секвенирования показал, что после 6 месяцев лечения ламивудином в 90,4% популяции вируса была выявлена мутация, приводящая к замене *rtM204I* (табл. 6). Через год терапии ламивудином замена *rtM204I* определялась при секвенировании и методом Сенжера и методом NGS, кроме того методом NGS были определены вирусы с заменами *rtL80I* и *rtL180M* (в 58,5% и в 29,7% популяции ВГВ, соответственно), усиливающие устойчивость вируса к лекарственному препарату. Эти же мутации были определены обоими методами после 18 месяцев лечения ламивудином, причем методом Сенжера была определена замена метионина на валин, в то время как методом NGS выявлены замены и на изолейцин (63,3%), и на валин (24,1%). Также усиление устойчивости к ламивудину было представлено заменой *rtA181V* (27,98%).

**Таблица 6 - Выявление квазивидов методом NGS**

Терапия	Секвенирование по Сенжеру	NGS (% замен от общей популяции вируса)
6 месяцев лечения ЛАМ	rtM204I	rtM204I (90,4%)
12 месяцев лечения ЛАМ	rtM204I	rtM204I (73,91%) rtL80I (58,46%) rtL180M (29,73%)
18 месяцев лечения ЛАМ	rtL80I rtL180M rtA181V rtM204V	rtL80I (69,89%) rtL180M (59,17%) rtA181V (27,98%) rtM204V (24,1%)/rtM204I (63,32%)
14 месяцев лечения ТБВ	rtM204V rtV173L rtL180M rtA181C	Н/Д
3 месяцев лечения ЭНТ	rtV173L rtL180M rtA181C rtM204V	rtV173L (100%) rtL180M (99,79%) A181C (97,35%)/A181G (2,65%) rtM204V (99,75%) rtM309K (100%)

После неудачного лечения ламивудин был заменен телбивудином, однако из-за кросс-резистентности эта терапия также не была эффективна. Замена телбивудина энтекавиром не привела к снижению вирусной нагрузки ввиду сохранения популяции мутантных вирусов (сохранялись замены: rtM204V, rtV173L, rtL180M, rtA181C). Интересно отметить, что кроме замены аланина на цистеин в 181 положении обратной транскриптазы методом NGS была выявлена замена аланина на глицин (в 2,6% популяции вируса). Также была определена мутация, приводящая к замене rtV173L (100% популяции ВГВ). Устойчивость к энтекавиру также была отмечена появлением вирусов с заменой rtM309K (100%). Данная замена была выявлена только методом NGS, поскольку праймеры для секвенирования методом Сенжера (в данном исследовании) расположены выше по последовательности и не захватывают эту область полимеразы. Хотя связь замены rtM309K с возможной устойчивостью к энтекавиру на сегодняшний день не доказана, в нашем исследовании данная замена была определена у одного пациента после лечения энтекавиром (*Cento, 2013*).

Последние исследования показали, что мутации устойчивости к АН в редких случаях могут встречаться у пациентов с ХГВ еще до начала противовирусной терапии (*Gao, 2015*). Наличие мутаций устойчивости в минорной популяции ВГВ тесно связано с ответом на лечение АН. Выявление данных мутаций, когда их доля составляет менее 20% от общей популяции ВГВ, методом секвенирования по Сенжеру невозможно из-за низкой «глубины» данного анализа. Применение технологии NGS могут преодолеть эти ограничения и определять минорные варианты в вирусной популяции.

### *Мутации S гена*

Благодаря наличию перекрывающихся рамок считывания в геноме ВГВ мутации в гене полимеразы могут приводить и к изменению аминокислотной последовательности и длины поверхностного белка. Так, в наших исследованиях обнаруженные замены в 173, 181 и 204 положениях обратной транскриптазы приводили к замене аминокислотного остатка в 164, 172/173 и 195/196 положениях S-белка, соответственно. Анализ влияния мутаций устойчивости на изменение структуры поверхностного белка имеет большое значение для практического здравоохранения. Изменение структуры HBsAg, снижение или прекращение его секреции из гепатоцита не только затрудняет этиологическую верификацию хронического гепатита, но и способствует развитию окислительного стресса, воспалению и раковой трансформации гепатоцитов на поздних стадиях ХГВ (*Ahn, 2014; Tong, 2013; Gao, 2015*). Хотя в нашем исследовании мутаций в S гене, приводящих к заменам sG145R и sP120T, обнаружено не было, а замена sD144E у одного пациента не привела к снижению уровня HBsAg, наличие замен в обратной транскриптазе rtR153W (n=13) и rtT128A/I (n=2), определенных в данном исследовании, может способствовать появлению вариантов ВГВ с измененными поверхностными белками (*Gao, 2015*). У четырех пациентов под действием противовирусной терапии мутации в гене обратной транскриптазы привели к образованию стоп-кодона в S гене и преждевременной терминации синтеза полноразмерного поверхностного белка (rtA181T/sW172\*, n=3 и rtS78T/sC69\*, n=1). Несмотря на то, что в настоящее время доля подобных случаев незначительна, необходим постоянный мониторинг мутаций, возникающих под действием терапии и одновременно приводящих к изменению антигенных свойств ВГВ.

### *Мутации preCore/Core и X генов*

Анализ мутаций в preCore/Core области имеет большое клиническое значение для HBeAg-позитивных пациентов. Поскольку HBeAg-сероконверсия является терапевтической конечной точкой, появление мутантных вариантов ВГВ может привести к ложным результатам серологических тестов. Из-за перекрытия ORC мутации в preCore/Core области приводят к возникновению изменений в структуре X гена (*Lin, Kao, 2015*). Таким образом, мутации ВГВ в preCore/Core области способствуют не только снижению синтеза HBeAg и ускользанию вируса от иммунных механизмов хозяина, но и могут привести к развитию ЦП и ГЦК. В данном исследовании у шести пациентов были выявлены мутации в основном Core промоторе (BCP) A1762T, G1764A (n=6) и T1753V (n=2), которые привели к двойным заменам K130M+V131I (n=6) и к заменам на треонин в 127 положении (n=2) в X белке. Мутации в области энхансера II (C1653T) были определены у двух пациентов и у трех - выявлена мутация G1896A в preCore области. У пациентов с мутациями в BCP (1762+1764) и preCore (1896) было зафиксировано снижение концентрации HBeAg, у пациентов с заменой G1896A - увеличение степени фиброза. Недавние исследования показали, что мутации в BCP регионе и мутация G1896A, приводящая к образованию стоп-кодона в preCore, часто появляются

вместе и могут привести к тяжелым заболеваниям печени, включая молниеносный гепатит и ГЦК. В нашем исследовании у двух пациентов с циррозом были обнаружены комбинации данных мутаций (A1762T+G1764A+G1896A, n=1 и C1653T+ G1896A+T1753, n=1). Мутации в 1814 и 1815 положениях гена Core у одного пациента не привели к прекращению синтеза HBeAg. Данные результаты показывают, что снижение секреции HBeAg и увеличение степени фиброза у восьми пациентов в данном исследовании, возможно, было следствием выявленных мутаций в Core гене (G1896A, A1762T, G1764A).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Определение генотипов вируса гепатита В и выявление аминокислотных замен, которые приводят к снижению концентрации серологических маркеров и появлению устойчивости к противовирусным препаратам, имеют важное практическое значение для прогнозирования эффективности терапии и скорости прогрессирования патологических процессов в печени. Оригинальный метод обнаружения мутаций устойчивости ВГВ rtM204I/V к АН при помощи ПЦР в реальном времени является быстрым и точным инструментом первичного скрининга пациентов с ХГВ, не отвечающих на лечение. Применение технологии NGS расширяет возможности диагностики ХГВ, помогает в выборе адекватной терапии, а также позволяет проводить углубленный анализ структуры генома ВГВ, расширяя возможности решения практических и фундаментальных задач вирусологии и эпидемиологии.

### **ВЫВОДЫ**

**1.** В период 2008-2014 гг. в Санкт-Петербурге и Ленинградской области у пациентов с хроническим гепатитом В отмечено преобладание ВГВ генотипов D (80,1%) и А (16,5%). По сравнению с периодом 2002-2006 гг. выявлено увеличение доли генотипа А ВГВ (с 4% до 16,5%).

**2.** Длительное применение телбивудина после возникновения устойчивости к ламивудину приводит к кросс-резистентности, и как следствие, к «усилению» лекарственной устойчивости ВГВ. Лечение энтекавиром показало высокую эффективность, однако в редких случаях длительное лечение этим препаратом также приводит к появлению мутаций устойчивости.

**3.** Разработанный оригинальный метод определения мутаций в YMDD-мотиве полимеразы может быть использован для первичного скрининга образцов от пациентов с ХГВ, не отвечающих на противовирусную терапию аналогами нуклеозидов.

**4.** Применения метода секвенирования нового поколения (NGS) позволяет выявлять мутации устойчивости к аналогам нуклеозидов в минорных вариантах (менее 20%) в составе популяции ВГВ, выделенной от одного носителя.

**5.** Наличие мутаций в preCore/Core области (G1896A, A1762T, G1764A) и nonsense мутаций в preS/S области, приводящих к образованию стоп-кодонов

в гене, кодирующем поверхностный белок (sW172\*, sC69\*), обеспечивает снижение синтеза вирусных белков (HBeAg и HBsAg), что затрудняет этиологическую верификацию хронического гепатита и является неблагоприятным прогностическим фактором риска развития цирроза и ГЦК.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### Статьи:

1. Елпаева, Е.А. Новый метод определения мутации устойчивости вируса гепатита В к аналогам нуклеоз(т)идов M204I/V у пациентов с хроническим гепатитом В / Е.А. Елпаева, А.Б. Комиссаров, М. М. Писарева, М.П. Грудинин, О.И. Киселев // **Инфекция и иммунитет**. – 2015. – Т. 5 (№ 3). – С. 265-272.
2. Елпаева, Е.А. Генетические варианты вируса гепатита В у пациентов с хроническим гепатитом В / Е.А. Елпаева, О.Е. Никитина, М.М. Писарева, И.В. Шилова, В.А. Грешнякова, М.П. Грудинин, О.И. Киселев // **Журнал инфектологии**. – 2015. – Т. 7 (№ 3). – С. 44-50.
3. Елпаева, Е.А. Роль мутантных форм вируса гепатита В в прогрессирующем течении хронического гепатита В / Е.А. Елпаева, М.М. Писарева, О.Е. Никитина, С.Н. Кижло, М.П. Грудинин, О.П. Дуданова // **Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Естественные и технические науки**. – 2014. – № 6(143). – С. 41–46.
4. Елпаева, Е.А. Генотипическая характеристика вируса гепатита В у хронически инфицированных больных / Е.А. Елпаева, Е.А. Порецкова, М.М. Писарева, А.Ю. Ковеленов, И.С. Аликян, Р.Б. Гальбрайт, М.П. Грудинин, Е.В. Эсауленко // **Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии**. – 2009. – №15. – С. 56–59.

### Тезисы:

1. Дуданова, О.П. Инновационные методы диагностики хронических гепатитов и воспалительных заболеваний кишечника у населения республики Карелия / О.П. Дуданова, М.Э. Шубина, И.А. Белавина, Н.А. Ларина, Е.А. Елпаева, М.М. Писарева, М.П. Грудинин // **Материалы международного форума «Классический университет в пространстве трансграничности на Севере Европы: стратегия инновационного развития»**, Петрозаводск. – 2014. – С. 23-27.
2. Елпаева, Е.А. Генетическое разнообразие вируса гепатита В / Е.А. Елпаева, М.М. Писарева, В.А. Плотникова, А.Б. Комиссаров, Е.В. Эсауленко, М.П. Грудинин // **Тезисы 10-ой Юбилейной Российско-Итальянской конференции «Актуальные вопросы социально-значимых вирусных инфекций»**, Великий Новгород. – 2011. – С. 94-96.
3. Елпаева, Е.А. Молекулярные особенности вируса гепатита В у пациентов с хроническим гепатитом В / Е.А. Елпаева, А.Б. Комиссаров, В.А. Плотникова, М.М. Писарева, О.П. Дуданова, Е.В. Эсауленко, М.П. Грудинин // **Тезисы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010»**, Москва. – 2010. – Т. I. – С. 214-216.

4. Elpaeva, E.A. Genetic diversity and nucleoside analogues resistance mutations of hepatitis B virus in Russian Federation and Viet Nam / E.A. Elpaeva, A.B. Komissarov, E.A. Poretskova, O.P. Dudanova, D.T. Tuyen, M.M. Pisareva, E.V. Esaulenko, M.P. Grudinin // *International Journal Of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 14, Supplement 2. – P. S11.
5. Елпаева, Е.А. Молекулярные особенности вируса гепатита В в Северо-Западной и Центральной России. / Е.А. Елпаева, Е.А. Порецкова, Е.В. Эсауленко, Р.Б. Гальбрайт, М.П. Грудинин // *Материалы II Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, Москва – 2010.* – Т. 8. – С. 105.
6. Elpaeva, E.A. Chronic hepatitis B: molecular, epidemiological and clinical features in northwest and central Russia / E. Elpaeva, E. Poretskova, A. Komissarov, M. Pisareva, M. Grudinin, E. Esaulenko, O. Kiselov // *International Journal Of Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 13, Supplement 1. – P. S77.
7. Эсауленко, Е.В. Хронический гепатит В: Генотипическая вариабельность и современные методы терапии / Е.В. Эсауленко, Т.В. Сологуб, Е.А. Порецкова, М.М. Писарева, Е.А. Елпаева, И.С. Аликян // *Тезисы 7-ой Российско-Итальянской научно-практической конференции «Актуальные вопросы социально-значимых вирусных инфекций»*, Великий Новгород. – 2009. – С. 131-135.
8. Елпаева, Е.А. Генетическое разнообразие вируса гепатита В в различных регионах Российской Федерации / Е.А. Елпаева, М.М. Писарева, А.Б. Комиссаров, Е.В. Эсауленко, Е.А. Порецкова, М.П. Грудинин // *Тезисы Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней»*, Новосибирск. – 2009. – С. 89-91.
9. Елпаева, Е.А. Развитие резистентности вируса гепатита В при лечении аналогами нуклеозидов / Е.А. Елпаева, О.Е. Никитина, М.М. Писарева, М.П. Грудинин // *Материалы XXI Объединенной Российской Гастроэнтерологической недели Москва, 2015 / Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2015. – Т. 25 (№5). – Приложение № 46. – С. 66.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает признательность и благодарность своему научному руководителю – заместителю директора ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, заведующему лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии, к.б.н. Грудинину М.П. и ведущему научному сотруднику лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии, к.б.н., Писаревой М.М. за предложенную интересную тему и внимательное отношение на всех этапах работы. Автор благодарит сотрудников лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии, лаборатории структурной и функциональной протеомики и специализированной клиники вирусных гепатитов ФГБУ «НИИ

гриппа» Минздрава России за понимание, поддержку, консультации при выполнении научных исследований и дружеские советы на стадии написания работы. Особую благодарность автор выражает д.б.н. Жилинской И.Н. и д.м.н., профессору Сологуб Т.В. за исчерпывающую конструктивную критику и тщательное рецензирование работы. Автор также благодарит коллег и соавторов публикаций, принимавших участие в формировании интересных задач и оформлении результатов работы. Автор выражает глубокую благодарность директору ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, академику РАН, д.б.н., профессору Кисёлеву О.И. за всестороннюю поддержку работы.