

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА»

На правах рукописи

ГЕРАСИМОВА
Вилена Васильевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГЕПАТИТОВ В И С
В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)**

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители: доктор медицинских наук,
профессор Мукомолов Сергей Леонидович ;
доктор медицинских наук
Бичурина Маина Александровна

Санкт-Петербург 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С В СОВРЕМЕННЫЙ ПЕРИОД (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1. Краткая характеристика возбудителей гемоконтактных вирусных гепатитов	15
1.2. Молекулярно-эпидемиологические особенности вирусного гепатита В.	24
1.3. Определение лекарственной резистентности и механизм её формирования	31
1.4. Разнообразие мутаций в гене полимеразы вируса гепатита В, ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости	33
1.5. Молекулярно-эпидемиологические особенности гепатита С	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Методология, материалы и объем проведенных исследований.....	43
2.2. Характеристика обследованных пациентов с ХГ	45
2.3. Серологические методы	48
2.4. Молекулярно-биологические методы.....	48
2.5. Статистическая обработка данных.....	53
ГЛАВА 3. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОКОНТАКТНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)	54
3.1. Этиологическая структура хронических вирусных гепатитов в Республике Саха (Якутия). 1999-2014гг.	55
3.2. Эпидемиология хронического гепатита В в Республике Саха (Якутия)..	58
3.3. Эпидемиология хронического гепатита С в Республике Саха (Якутия)..	60
3.4. Лабораторные характеристики обследованных больных ХГВ	64
3.4.1. Количественное содержание HBsAg в сыворотке крови.....	64
3.4.2. Выявление ДНК вируса ГВ (качественный и количественный анализ)	65

3.4.3. Выявление HBeAg и анти-HBe.....	67
3.5. Некоторые лабораторные характеристики обследованных больных ХГС – выявление РНК вируса ГС (качественный и количественный анализ).....	67
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)	69
4.1. Определение генотипов вируса ГВ с помощью теста Inno-LiPA	69
4.2. Определение мутаций в области pre-core/core генома ВГВ с помощью теста INNO-LiPA.....	71
4.3. Определение мутаций лекарственной устойчивости изолятов вируса ГВ с помощью теста Inno-LiPA	76
4.4. Секвенирование изолятов вируса ГВ, выделенных от больных ХГВ из разных районов Республики Саха (Якутия), и их филогенетический анализ..	78
ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО- ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ РАЙОНАХ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)	83
5.1. Определение генотипов вируса ГС с помощью ПЦР с типоспецифическими праймерами	83
5.2. Секвенирование изолятов вируса ГС, выделенных от больных ХГС из разных районов Республики Саха (Якутия), и их филогенетический анализ	86
ОБСУЖДЕНИЕ	96
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	113
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	118
ЛИТЕРАТУРА	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Вирусные гепатиты являются серьезной проблемой здравоохранения всего мира, в том числе, России и ее регионов. Причиной этому служит их широкая распространенность в разных этнических и географических группах, разнообразие проявления их клинических форм, а также исходов. По данным ВОЗ (Онищенко Г.Г., 2003; Шахгильдян И.В. с соавт., 2005; w.w.w. who. int / ru / 2009, Dore G.J., 2014), около 50 млн. человек в мире ежегодно заражаются вирусом гепатита В, а вирусом гепатита С инфицированы почти 3 % населения земного шара. С возбудителями гемоконтактных вирусных гепатитов связаны практически все летальные исходы у больных с острым течением болезни, а кроме того все случаи формирования хронических заболеваний печени, в том числе циррозы и первичный рак (Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г., 2003; Moradpour D., 2011; Lupinacci R.M., 2013; Wallace M.C., 2015).

Вирус гепатита В (ВГВ) считается наиболее изученным среди остальных возбудителей вирусных гепатитов. Тем не менее, в последнее десятилетие увеличилась заинтересованность к воздействию генетической вариабельности вируса гепатита В на процесс и итог заболевания. Современная классификация ВГВ включает десять генетических типов, обозначенных латинскими буквами от А до J (Schaefer S., 2007; Tatematsu K., 2009; Phung ТВ., 2010) и множество субтипов, которые обозначаются прибавлением арабской цифры к заглавной букве латинского алфавита. Распределение генотипов/субтипов ВГВ разнообразно в зависимости от географических признаков. В сравнении с другими странами, данные о молекулярной эпидемиологии вируса ГВ на территории России крайне скудны (Писарева М.М., 2007).

Значительно возрастает распространение вирусного гепатита С. Высокие уровни заболеваемости хроническими формами гепатита С во многих странах мира делают проблему ВГС международной. Среди возбудителей вирусных

гепатитов вирус гепатита С (ВГС) характеризуется большим генетическим разнообразием (Калинина О.В., 2000; Dore G.J. et. al., 2014).

На территории Республики Саха (Якутия) расположены зоны как промышленные, так и сельскохозяйственные, среди населения представлены различные этнические группы, каждая со своими обычаями и культурой. Регион относится к зоне повышенного риска носительства возбудителей гемоконтактных вирусных гепатитов и заболеваемости с постоянным ростом аналогичных данных по России в 2-3 раза (Алексеева М.Н., 2002; Зотова А.В., 2007; Семенов С.И., 2009).

По итогам 2013 года, в Республике Саха (Якутия) заболеваемость хроническим ГВ составила 27,8 на 100 тысяч населения, а хроническим ГС 43,2 на 100000, а их доли в структуре хронических вирусных гепатитов распределилась следующим образом: 38,9 % – ХГВ, 60,4 % – ХГС. У небольшой доли пациентов (0,7 %) установить этиологию хронического поражения печени не удалось (Государственный доклад, 2013).

В связи с этим необходимо выделить, что в пределах указанной области отмечен высокий уровень заболеваемости и распространения, и, кроме того, инвалидности и смертности, вследствие проявления возбудителей гемоконтактных вирусных гепатитов. В Республике Саха (Якутия) лишь немногочисленные исследования посвящены изучению факторов хронизации вирусных гепатитов среди населения (как коренного, так и приезжего) и их распространению (Семенов С.И., 2002, Алексеева М.Н., 2002, Слепцов А.П., 2003, Павлов Н.Н., 2004, Саввин Р.Г., 2008).

Исследования генетической variability возбудителей ВГ в Российской Федерации проводятся с середины 1990-х годов (Львов Д.К. и Дерябин П.Г., 1997) и охватили, в основном, население европейской части страны (Мукомолов С.Л., 1993, Кузнецова И.О., 1999, Ершова О.Н., 2000, Кириллова И.Л., 2003, Максюттов Р.А., 2010, Кузин С.Н., 2011 и др.), тогда как популяция регионов Сибири и Дальнего Востока (Бахлыкова Н.Ю., 1998, Михайловская Г.В., 2010), в том числе Республики Саха (Якутия) (Писарева М.М., 2004, Зотова А.В., 2007, Семенов

С.И., 2009, Слепцова С.С., 2013), до недавнего времени в этом отношении была исследована недостаточно.

Степень разработанности темы исследования

Недостаточно сведений о гетерогенности вирусов гепатита В и С, циркулирующих на территории Республики Саха (Якутия). Исследования по этой проблеме единичны (Писарева М.М. и др., 2004, Зотова А.В., 2007, Семенов С.И. и др., 2009, Индеева Л.Д., 2010) и не дают полного представления о генотипической и субгенотипической структуре ВГВ и ВГС у пациентов с хронической формой этих заболеваний.

Исследование 59 образцов, полученных у больных ХГВ трёх национальностей, из 7 различных районов и городов (Вилуйский, Верхоянский, Жиганский улусы) показало, что на территории республики отмечается циркуляция 3 генотипов ВГВ: генотип D составил 42,4 %, А – 25,4 %, С – 25 %. По результатам проведенных исследований в 2-х образцах плазмы крови выявлена коинфекция генотипами А и D, в то время как в 2-х других – генотипами А и С (6,8%). Высокая эндемичность Якутии по гепатиту В может служить причиной большого числа случаев инфицирования двумя генотипами одновременно, а кроме того служит причиной высокого риска повторного заражения. В республике не выявлено связей распределения генотипов с этническими или географическими признаками (Писарева М.М. и др., 2004, Писарева М.М., 2007).

В Республике Саха (Якутия) независимо друг от друга отдельными группами авторов проведено определение генотипов ВГВ у пациентов с хроническими формами НВ-вирусной инфекции. В работе Зотовой А.В. определен генотип D ВГВ, циркулирующий в изолированной популяции этнических эвенков. На основании этих исследований впервые удалось определить степень гомологии среди отдельно выделенных членов группы эвенков составила, которая зафиксирована на уровне 98- 100 %. На основании этих данных можно сделать

вывод о циркуляции в данной этнической группе одного варианта ВГВ. В пределах обследуемого региона определено генотипическое разнообразие ВГС, так у некоренных жителей Нерюнгринского района обнаруживаются генотипы РНК ВГС 1b, 2a, 3a, а у коренных малочисленных народов Севера, в частности эвенков, - определен 1b генотип (Зотова А.В. и др., 2007).

Проведённые выборочные исследования показали, что среди якутской популяции установлено наличие трёх генотипов ВГВ: генотип А – 27,3 %, генотип D - 30,9 %, генотип С – 24,1 % и генотип ни А ни D – 17,7 %. В остальных случаях обнаружены смешанные формы генотипов А и D, а также генотипов А и С (Саввин Р.Г., 2008). На территории Республики Саха (Якутия) среди якутской популяции генотипическая гетерогенность вируса гепатита С характеризовалась преобладанием генотипов 1b и 3a (70 % и 10 %), в 19,8 % случаев генотип вируса гепатита С установить не удалось (Саввин Р.Г., 2008).

Также С.И. Семенов и соавторы (Семенов С.И. и др., 2009), изучив 16 изолятов, выделенных у больных из Усть-Алданского района методом «гнездовой» ПЦР, обнаружили присутствие 3 генотипов вирусного гепатита В – А (44 %), D (44 %) и С (12 %). Проводились исследования по генотипированию вируса гепатита С у 126 больных хроническим гепатитом С. Было установлено, что в Якутии основным генотипом являются 1b (68,8-76,4 %) и 3a (13,4-18,8 %) (С.И. Семенов и др., 2009).

В работах Л.Д. Индеевой также определены 3 генотипа ВГВ, но с другой частотой – D (38 %), А (24 %) и С (24 %), а также в 14 % случаев выявлено сочетание генотипов А и D (Индеева Л.Д., 2010).

Представляет значительный интерес определение структуры популяций ВГВ и ВГС по субгенотипам, генетической вариабельности в области precore/core генома вируса ГВ и мутаций, приводящих к появлению устойчивости к противовирусным препаратам на территории Республики Саха (Якутия). Кроме этого остается малоизученной распространенность вирусов гепатитов В (ВГВ) и С (ВГС) на отдельных территориях республики.

Цель исследования

Определение молекулярно-эпидемиологической характеристики вирусов гепатитов В и С в Республике Саха (Якутия) в современный период.

Задачи исследования

1. Уточнить основные эпидемиологические характеристики хронических вирусных гепатитов В и С в Республике Саха (Якутия) в 1999-2014 гг.

2. Установить с помощью методов специфической лабораторной диагностики особенности распространений хронических вирусных инфекций, вызываемых вирусами гепатитов В и С (серологические и молекулярно-генетические маркеры).

3. Изучить распространение генетических вариантов вирусов ГВ и ГС в различных регионах республики при обследовании больных хроническими формами инфекций, включая распространенность мутаций в области precore/core генома вируса ГВ и мутаций, приводящих к появлению устойчивости к противовирусным препаратам.

4. Осуществить филогенетический анализ выделенных изолятов вирусов ГВ и ГС и выявить особенности циркулирующих генетических вариантов возбудителей в Якутии.

Научная новизна

В результате проведенных исследований с использованием эпидемиологических и молекулярно-биологических методов получены новые данные, характеризующие степень распространенности и особенности циркуляции различных генетических вариантов возбудителей вирусных гепатитов среди населения Республики Саха (Якутия). Подтверждена циркуляция трех генотипов ВГВ в Якутии (А, D, С).

Впервые установлены два основных циркулирующих субтипа ВГВ (D2, D3), которые абсолютно доминируют (90 %) на различных территориях республики.

Определена частота выявления ВГВ с наличием мутаций, ассоциированных с первичной лекарственной резистентностью к нуклеозидным аналогам среди ВГВ - инфицированных лиц, не получивших противовирусной терапии.

Выявлено, что первичная резистентность изолятов ВГВ к нуклеозидным аналогам не превышает 2 % на территории РС (Я). Установлено, что большая часть обследованных больных ХГВ инфицирована генотипом D с наличием мутации в областях pre-core (РС-28) и ВСР. Обнаружена более высокая концентрация HBsAg у больных ХГВ, имеющих одновременно мутации ВСР и РС-28.

Получены сведения о распространении отдельных генотипов/субтипов вируса ГС, которые представлены субтипами 1b, 1a, 2a, 3a, 3g в разных географических зонах Республики Саха (Якутия).

Впервые в Российской Федерации выявлен изолят ВГС субтипа 3g. Изоляты ВГС субтипа 1b полностью доминируют на всех территориях в Якутии (более 90 %).

Практическая значимость и внедрение результатов работы

Установлено, что в Республике Саха (Якутия) большая часть выделенных изолятов ВГВ относится к генотипу D, при инфицировании которым пациенты слабо отвечают на интерферонотерапию, по сравнению с генотипами A и B. Определенная у пациентов с хроническим гепатитом B (ХГВ) первичная резистентность к ламивудину и тенофовиру свидетельствует о том, что в Республике Саха (Якутия) циркулируют вирусы, резистентные к этим препаратам.

Выявлены изоляты ВГВ несущие мутации в ВСР и РС-28, влияющие на мониторинг больных с хроническим гепатитом B.

Результаты исследования циркуляции изолятов ВГВ и ВГС на одних и тех же территориях, в течение длительного периода времени имеют важное значение для целей эпидемиологического надзора.

Внедрение в практику

1. Депонированы в международной базе Genbank (NCBI) 30 последовательностей нуклеотидов штаммов вируса гепатита В, выделенных от пациентов в Республике Саха (Якутия).

№	Название изолята	Территория выделения	Номер депонирования
1	Yakutia_HBV_195	Хангаласский район	KP165597
2	Yakutia_HBV_244	Булунский район	KP165598
3	Yakutia_HBV_255	Булунский район	KP165599
4	Yakutia_HBV_263	г. Якутск	KP165600
5	Yakutia_HBV_265	г. Якутск	KP165601
6	Yakutia_HBV_270	Нюрбинский район	KP165602
7	Yakutia_HBV_294	Нюрбинский район	KP165603
8	Yakutia_HBV_344	Амгинский район	KP165604
9	Yakutia_HBV_398	Мирнинский район	KP165605
10	Yakutia_HBV_10	Чурапчинский район	KP143742
11	Yakutia_HBV_48	Чурапчинский район	KP143743
12	Yakutia_HBV_67	г. Якутск	KP143744
13	Yakutia_HBV_176	Булунский район	KP143745
14	Yakutia_HBV_27	Мирнинский район	KP202936
15	Yakutia_HBV_546	Таттинский район	KP202937
16	Yakutia_HBV_558	Вилуйский район	KP202938
17	Yakutia_HBV_562	Вилуйский район	KP202939
18	Yakutia_HBV_564	Вилуйский район	KP202940
19	Yakutia_HBV_783	Нерюнгринский район	KP202941
20	Yakutia_HBV_744	Нерюнгринский район	KP202942
21	Yakutia_HBV_785	Нерюнгринский район	KP202943
22	Yakutia_HBV_769	Нерюнгринский район	KP202944
23	Yakutia_HBV_775	Нерюнгринский район	KP202945
24	Yakutia_HBV_758	Нерюнгринский район	KP230541
25	Yakutia_HBV_541	Таттинский район	KP184499
26	Yakutia_HBV_495	г. Якутск (отд. гемодиализа)	KP184498
27	Yakutia_HBV_477	г. Якутск (отд. гемодиализа)	KP184497
28	Yakutia_HBV_408	Ленский район	KP184496

29	Yakutia_HBV_405	Ленский район	KP184495
30	Yakutia_HBV_2	Чурапчинский район	KM2129571

[\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)

Авторы: зав. лабораторией вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекций к.б.н. Семенов А.В., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии Останкова Ю.В., зав. лабораторией вирусных гепатитов д.м.н. Мукомолов С.Л., аспирант Герасимова В.В., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии к.б.н. Любимова Н.Е.

2. Аналитический обзор «Вирусные гепатиты в Российской Федерации», 9 выпуск / под ред. В.И. Покровского, А.Б. Жебруна. – СПб. : ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2013. – 168 с.

3. Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов: пособие для врачей / под ред. А.Б. Жебруна. – СПб. : ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. – 28 с.

Результаты исследования используются при проведении научно-практических исследований в ФГАОУ ВПО СВФУ имени М.К. Аммосова Аммосова (акт о внедрении исх. № 66/071 от 29.02.2016 г.) и в педагогическом процессе на кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова (акт о внедрении результатов в практику учебной, научной, лечебной работы №306 от 27.08.2015 г.).

Методология и методы исследования

Методологической основой исследований послужила совокупность серологических, молекулярно-биологических и эпидемиологических методов. В ходе работы использованы клинические и лабораторные методы оценки состояния пациента.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хронические вирусные гепатиты представляют значительную проблему для здравоохранения Республики Саха (Якутия). Распространённость хроническим гепатитом В достигает 719,0 на 100000, а хроническим гепатитом С – 569,0 на 100000 населения. У лиц старше 30 лет этот показатель (ХГВ) превышает значения 1000 и более на 100000 (1% населения и более), а аналогичные по уровню показатели ХГС зарегистрированы у лиц старше 50 лет.

2. На территории Республики Саха (Якутия) циркулируют три генотипа вируса ГВ А, D и С с доминированием вируса генотипа D, представленного двумя субтипами D2 и D3. Большая доля изолятов этих субтипов (71,4 %) имеет мутации в области основного промотора гена ядерного белка (ВСР) и стоп кодона Р28 (pre-C/С область генома). Доля изолятов, обладающих первичной резистентностью к нуклеоз(т)идным аналогам (мутации в Р области генома), широко используемым в мире для лечения пациентов с ХГВ, пока незначительна и составляет 2,3 %.

3. На территории Якутии циркулируют три генотипа 1, 2, 3 ВГС и пять субтипов 1a, 1b, 2a, 3a, 3g с абсолютным доминированием субтипа 1b.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечены использованием современных средств и методов проведения исследований, значительным объемом выполненных исследований, большим массивом обработанных данных и комплексным анализом полученных результатов. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам, а сформулированные положения, выводы и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из анализа полученных данных.

По данным работы опубликовано 12 научных работ, из них 4 в рецензируемых журналах ВАК Министерства образования и науки РФ и 1 статья – в международном рецензируемом журнале, а также в тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Результаты исследований доложены на:

1.V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 25-27 марта 2013 г.

2. Научно-практическом семинаре «Хронические вирусные гепатиты: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, диспансерного наблюдения и профилактики. Внедрение регистра больных вирусными гепатитами», Якутск, 8 апреля 2013 г.

3. Научной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций», посвященной 90-летию Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 5-7 июня 2013 г., г. Санкт-Петербург;

4.X Российской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты – эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика» Памяти члена-корреспондента РАМН Иосифа Васильевича Шахгильдяна, 17-19 сентября 2013 г., г. Москва;

5. III научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицинской генетики на Крайнем Севере», 10-11 июня. 2014, г. Якутск;

6. Научном симпозиуме Института Пастера. Париж 10-13 сентября 2014 года.

7. VI Всероссийского научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины», 22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь;

8.XI Российской конференции с международным участием «Этиология, диагностика и профилактика вирусных гепатитов», 29-30 сентября 2015г., г. Москва;

9. Конгрессе «Экология и здоровье человека на Севере», 14-16 ноября 2015 г., г. Якутск.

Личный вклад автора в получение научных результатов

Основные результаты получены автором самостоятельно. Выбор методов исследования и анализ полученных результатов осуществлялись по согласованию с д.м.н., профессором Мукомоловым С.Л.

Непосредственно автором проведены следующие исследования: ретроспективный эпидемиологический анализ за период 1999-2014 гг. заболеваемости вирусных гепатитов в Якутии; подготовка клинического материала к исследованию, проведение ИФА, ОТ-ПЦР (включая этап электрофоретической детекции), определение генотипов вируса ГВ и мутаций в областях Pre-Core и Р генома вируса с использованием тест-систем INNO-LIPA HBV Genotyping, INNO- LIPA PreCore, INNO-LIPA HBV Multi-DR (Innogenetics, Бельгия). Автор готовила клинические образцы для секвенирования и осуществляла филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей.

Автором проведена работа по классификации данных, их компьютерной и статистической обработке, отражению конечных итогов исследования с учетом графического распределения.

Искреннюю и глубокую благодарность автор выражает научным руководителям профессору, д.м.н. Сергею Леонидовичу Мукомолу и д.м.н. Бичуриной Майне Александровне за подробное конструктивное обсуждение полученных результатов, а также всем сотрудникам лаборатории вирусных гепатитов за доброжелательное отношение в ходе выполнения работы. Особую признательность за консультативную помощь и поддержку на всех этапах выполнения работы автор выражает член-корр. РАН, профессору, д.м.н. Анатолию Борисовичу Жебруну.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3-х глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 67 отечественных и 157 зарубежных источников. Диссертационная работа иллюстрирована 23 таблицами, 31 рисунком.

Глава 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С В СОВРЕМЕННЫЙ ПЕРИОД (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Краткая характеристика возбудителей гемоконтактных вирусных гепатитов

Впервые сведения о возбудителе, впоследствии получившем название вирус ГВ, были получены учеными под руководством Б. Бламберга в 1965 году.

В процессе исследования сыворотки крови больных гемофилией, многократно прошедших процедуру гемотрансфузии, обнаружили антитела, реагирующие с антигеном в образце сыворотки крови австралийского аборигена (Шерлок Ш., 1999). Этот антиген также был отмечен у больных вирусным гепатитом, при проведении дальнейших исследований, и получил название «австралийский антиген». В современной номенклатуре этот антиген является поверхностным антигеном вируса ГВ (HBsAg). За это открытие в 1977 г. Б. Бламберг получил Нобелевскую премию.

В 1970 г. Д. Дейн, изучая образцы крови, содержащей «австралийский антиген», впервые выявил вирусную частицу ВГВ (Соринсон С.Н., 1998).

Доказав вирусную природу сывороточного (парентерального) гепатита, советские ученые П.Г. Сергеев и Е.М.Тареев подняли изучение проблемы ГВ на новый уровень. Позже, в 1973 г. Научная группа экспертов ВОЗ официально утвердила термин «Гепатит В» (Шувалова Е.П., 2000).

ВГВ относят к семейству *Hepadnaviridae*, к роду *Orthohepadnavirus*.

Основными характеристиками вирусов, составляющих это семейство, являются:

- преимущественный гепатотропизм;
- развитие персистирующей инфекции;
- наличие двухцепочечной ДНК (наименьшей из всех ДНК-содержащих вирусов, длиной около 3200 нуклеотидов);

- размер частицы в пределах 40-48 нм;
- присутствие покрытого оболочечного белками нуклеокапсида вируса;
- выявленная вирусная ДНК-полимераза;
- наличие системы репликации, которая включает в себя этап обратной транскрипции;
- образование вирус-ассоциированного первичного рака печени.

Вирус гепатита В является одним из самых маленьких ДНК-содержащих оболочечных вирусов, который вызывает острую и хроническую инфекцию у человека. Несмотря на ограниченные возможности кодирования только с четырьмя открытыми рамками считывания, ВГВ способен уклоняться от иммунной системы хозяина и сохраняться в течение всей жизни в инфицированных гепатоцитах. Вместе с использованием обратной транскриптазы во время репликации он обеспечивает огромную генетическую гибкость для отбора вирусных мутантов по селективному давлению, например, с помощью иммунной системы или противовирусной терапии. Кроме того, вирусные геномы, дикого типа и мутантные, стабильно архивируются в ядре инфицированных гепатоцитов в виде эписомальной ДНК, что обеспечивает независимость от репликации клеток или интеграции в геном хозяина. «Мы только начинаем понимать тонкие молекулярные и клеточные взаимодействия в ходе репликативного цикла ВГВ внутри инфицированных гепатоцитов, поэтому дальнейшие исследования крайне необходимы для проведения диагностических и терапевтических мероприятий», – написали Glebe D. и Bremer C. M. в 2013 г.

С точки зрения структуры, ВГВ является сложной частицей сферической формы около 40-48 нм (среднее – 42 нм) в диаметре. Она представляет собой ядро- нуклеотид диаметром 28 нм в форме икосаэдра, расположенной внутри двухцепочечной ДНК, а также фермент ДНК- полимераза и концевой белок (рис. 1).

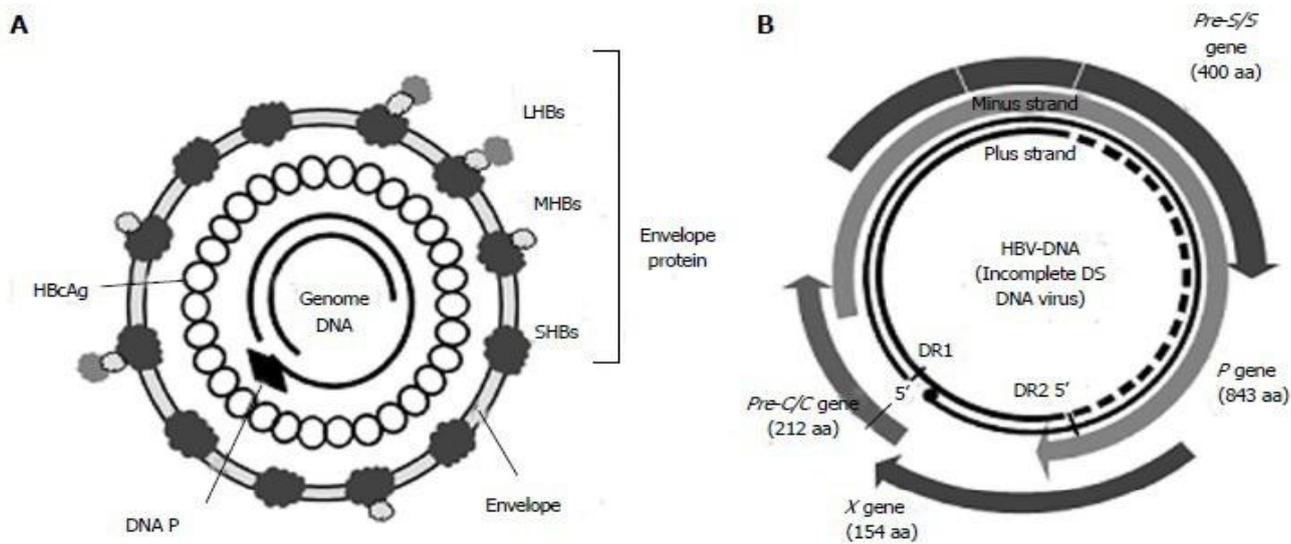


Рис. 1. Структуры вируса гепатита В (частица Дейна) (А) и геном (В) (Yano Y., 2015)

Геном ВГВ содержится внутри капсулы вируса. Он состоит приблизительно из 3200 пар оснований в длину, с четырьмя перекрывающимися открытыми рамками считывания (ОРС), которые кодируют полимеразу (P), ядро (C), поверхностный антиген (S), и X белок (рис. 1) (Seeger C., 2000). Семь вирусных белков (HBeAg, HBcAg, LHBs, MHBs, SHBs, полимеразы, и HBx) произведены из расшифровок.

Проникновение ВГВ в гепатоцит человека считается начальным шагом вирусной инфекции. Утверждают, что pre-S1 последовательность в аминокислотах 2-48 содействует проникновению вируса в клетки-мишени (Glebe D., 2005). После вторжения в клетки-мишени вирус ВГВ транспортируется к ядру, где расположена ковалентно непрерывная кольцевая ДНК как репликация матрицы ВГВ.

После проникновения ВГВ в клетку его ДНК интегрируется в клеточную ДНК самого человека. Интеграция ВГВ вызывает различные виды вторичных генетических изменений в геноме хозяина, включая делецию, перемещение, и геномную неустойчивость (Bréchet C., 2004). Выявлено, что потеря хромосомной целостности в ГЦК обусловлена делецией в некоторых хромосомах. В частности, потери в хромосомах 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q, 16p, 16q и 17p были обнаружены

в 25-45 % пациентов, тогда как рост происходит в хромосомах 1p, 6p, 8q, и 17q в 30-55 % пациентов (Zhang S.H., 2005).

ОРС S (2854-835 пар нуклеотид) кодирует три различных гена: *pre-S1*, *pre-S2*, и область S. *Pre-S* область играет существенную роль при соединении вируса к гепатоцитным рецепторам и содержит несколько антигенных детерминант, нацеленных на клетки Т и В. Домен S также важен в создании HBsAg (Glebe D., 2005). Существуют три формы поверхностных белков ВГВ различных размеров (S, М и L) (Schmitt S., 1999). Белок 24-kDa(S), который содержит 226 аминокислот, является главным компонентом оболочечного белка и играет важную роль в зарождении частиц. Белок 33-kDa (М) содержит белок S и дополнительные 55 аминокислот, закодированные *pre-S2* геном. Наконец, белок 39-kDa(L) содержит белок М и дополнительные 108 или 119 аминокислот, последовательность которых зависит от генотипа (Ni Y., 2010). Три типа HBsAg разделяют общую область, состоящую из главной антигенной петли (аминокислоты 124-147), которую называют “а” детерминантной областью. Эта детерминантная область – главный эпитоп, способный вызвать защитную иммунную реакцию. Она расположена в главной гидрофильной области белка S, который находится между аминокислотами 103 и 173. Главная гидрофильная область формирует структуру с двумя петлями. Мутации и изменения в гене S были выявлены во многих странах (Sayiner A.A., 2008). Хотя эти мутации происходят естественно, они также могут быть установлены во время терапии иммуноглобулином или в результате иммунного ответа на вакцину. Вариации в “а” детерминантной области приводят к изменению в антигенности HBsAg и могут предотвратить HBsAg в скрининговых исследованиях HBsAg (рис. 2) (Carman W.F., 1997; Melegari M., et al., 1994).

Эти мутации могут развиваться естественным путем в развивающихся странах, где отмечается нечастое применение нуклеотидных аналогов по сравнению с развитыми странами (Pourkarim M.R. et al. 2014; Suwannakarn K. et al., 2008).

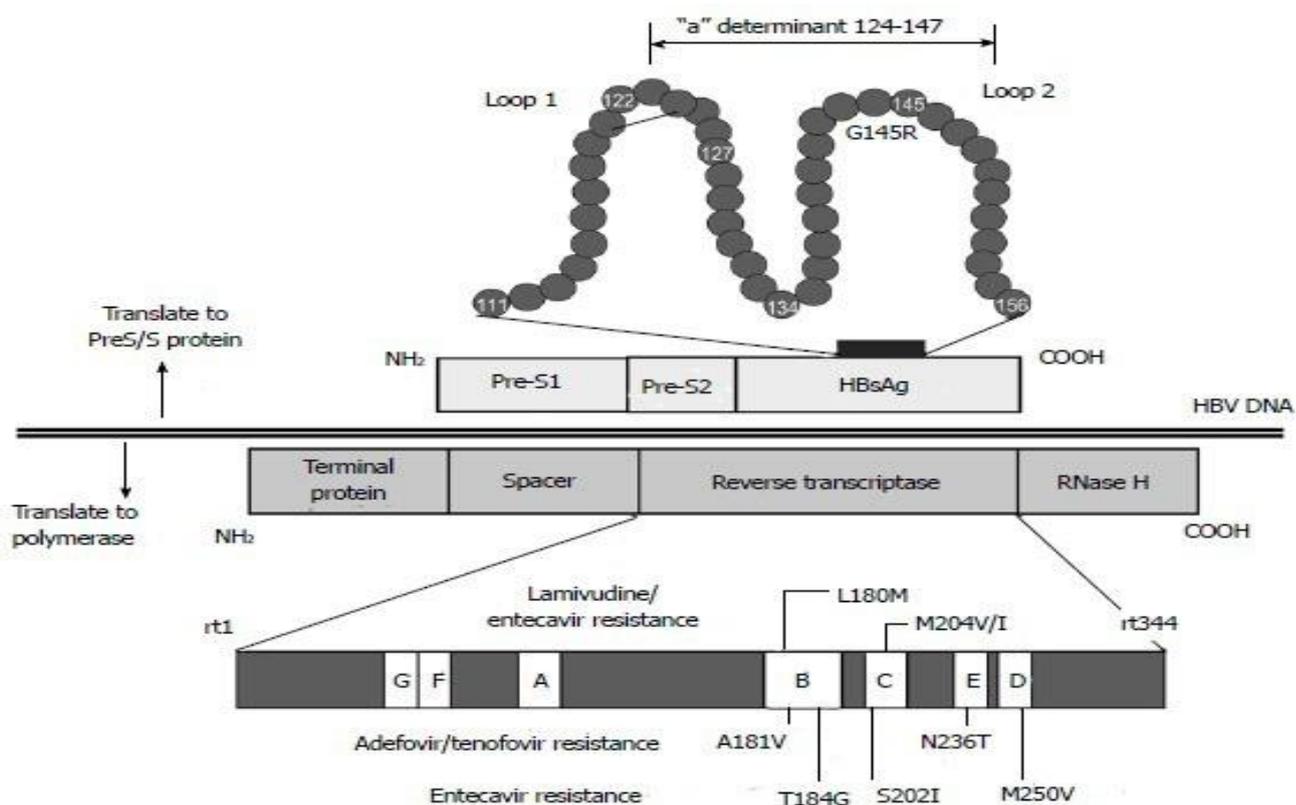


Рис. 2. Структуры перекрывающихся генов P и S

HBsAg – важный диагностический маркер, и его уровень экспрессии связан с эффективностью антивирусного лечения. Недавние исследования показали, что титр HBsAg коррелирует с уровнем ДНК ВГВ и гепатокарциногенеза. Однако мутации в области pre-S/S тесно связаны с антигенностью HBs, и наличие мутаций pre-S/S коррелирует отрицательно с титром HBsAg (Pollicino T. et al., 2012).

Ген P кодирует определенную для вируса полимеразу ДНК с 843 аминокислотами и частично накладывается на другие три гена. Полимераза ДНК расположена в ядре вируса. Он действует в качестве праймера ДНК и показывает обратную транскриптазу, RNaseH, и процессы ДНК зависимых ДНК полимераз.

Тирозин (Y) – метионин (M) – кислота аспарагиновой кислоты (D) – кислота аспарагиновой кислоты (D) мотив (YMDD), начиная в кодоне 203 формирует центр ферментативной деятельности полимеразы. Всего несколько известных точек в ДНК ВГВ, где мутации приводят к сопротивлению противовирусного

препарата. В частности, долгосрочное лечение ламивудином иногда приводит к появлению YMDD и обострению гепатита (Liaw Y.F. et al., 2000).

Нуклеотидные аналоги, рекомендованные для лечения ХГВ, включают ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин и тенофовир. Нуклеотидные аналоги имеют сходство по структуре с естественными нуклеотидами и конкурируют с естественными нуклеотидами за соединение участков на полимеразе во время синтеза ДНК. Объединение нуклеотидных аналогов вместо естественных нуклеотидов разрушает синтез ДНК и подавляет вирусную репликацию.

ОРС X (1374-1838 нуклеотидных пар) кодирует HBx, 154 аминокислотный 16.5 kDa белок. HBx является многофункциональным белком, который модулирует транскрипцию, трансдукцию сигнала, прогрессию клеточного цикла, ход белковой деградации, апоптоза и генетическую стабильность, взаимодействуя со множеством факторов носителя (Pang R. et al., 2006; Tang H. et al., 2006).

Белок HBx тесно связан с развитием ГЦК. HBx активизирует цАМФ и несколько факторов транскрипции, включая ядерный фактор κВ и активирующий фактор транскрипции 2 (Benn J. et al., 1994).

Любая форма вирусного гепатита В диагностируется при наличии хотя бы части специфических маркеров: антигенных (HBs-, HBc-, HBe-антигены), иммунологических (антитела класса IgM и IgG к антигенам), генетических (нуклеотидные последовательности ДНК HBV) (Вашукова С.С., 2002). В организме больного гепатитом В могут быть обнаружены вирусные антигены HBsAg и HBeAg, а также антитела к ним и HBcore-белку: анти-HBcore, анти-HBe, анти-HBs и ДНК HBV. Эти антигены и антитела в совокупности представляют комплекс специфических маркёров вируса гепатита В, который находится в динамическом изменении и отражает вирусную репликацию и иммунную реакцию пациента (Подымова С.Д., 1988).

Ведущим среди них является HBsAg. Он используется для обнаружения возможного наличия вируса гепатита В при острой или хронической инфекции, а также при бессимптомном носительстве (Михайлов М.И., 1996). Еще одним не

менее важным маркером является HBeAg, присутствие которого рассматривается как признак активной репликации вируса (Гураль А.Л., 2004).

Важным прогностическим признаком хронического гепатита является проявление HBeAg на протяжении 2-х и более месяцев. После элиминации HBeAg и окончания процесса репликации вируса, по истечению 9-ой недели острого гепатита В в крови вырабатываются антитела к HBeAg (анти-HBe). Однако анти-HBe могут исчезать в течение периода выздоровления больного. Важно отметить, что присутствие анти - HBe в крови не является признаком отсутствия инфекционности. Признаком острой инфекции и активной репликации ВГВ является наличие антител к ядерному антигену вируса гепатита В класса М (анти-HBc IgM), которые обнаруживаются по истечении 1-2 недель после выявления HBsAg и сохраняются в течение 2-18 месяцев. В некоторых случаях титры анти-HBc IgM у больных хроническим гепатитом В проявляются меньших количествах, чем в случаях острой инфекции. Анти-HBc IgM и антитела к HBcAg класса G (анти- HBc IgG) проявляются почти в одно время. Они не несут защитной функции, а скорее служат маркером перенесенной HBV-инфекции (Подымова С.Д., 1988).

Анти – HBs являются показателем перенесенной прежде инфекции или наличии поствакцинального иммунитета (защитный уровень ≥ 10 МЕ/ мл). Появляются эти антитела на стадии выздоровления больного, по истечении 4-х недель после того, как HBsAg исчезает, максимальной их концентрация становится через 1-2 года, со временем количество анти-HBs постепенно сокращается до уровня, определить который при помощи современных методов диагностики, не представляется возможным (Гураль А.Л., 2004).

Определение комплекса маркёров гепатита В позволяет оценить так называемый серологический профиль больного и наиболее полно и надежно охарактеризовать фазу течения инфекционного процесса (табл. 1) (Покровский В.И. и др., 2014).

Обнаружение серологических маркеров при различных формах гепатита В

Интерпретация результатов серологического обследования на гепатит В							
Серологический диагноз	HBs Ag	Анти-HBs	анти-HBcore суммарные		HBeAg	Анти-HBe	ДНК ВГВ, копий/мл
			HBcore-IgM	HBcore-IgG			
Острый гепатит В	+/-	-/+	+	+	+/-	-/+	+/-
Хронический интегративный ГВ (носительство HBsAg)	+	-	-	+	-	+	<10 ⁵
Хронический репликативный ГВ	+	-	+/-	+	+/-	-/+	>10 ⁵
Иммунитет после вакцинации	-	+	-	-	-	-	-
Иммунитет после перенесенного ГВ	-	+	-	+	-	+/-	-

Вирус гепатита С (ВГС) был открыт в 1989 году (Chao D.T. et al., 2011; Li H.C. et al., 2014) и отнесен к семейству *Flaviviridae*, к роду *Hepacivirus*.

Геном ВГС (приблизительно 9,6 кб) кодирует полипротеин из около 3010 аминокислот, которые примыкают на 5'-и 3'-концах небольшими высоко структурированными не транслируемыми областями (UTR). Этот предшественник полипротеина расщепляется вирусными и клеточными протеазами, что приводит к образованию 10 зрелых структурных и неструктурных белков. Ядро, E1 и E2 являются структурными белками, в то время как небольшой гидрофобный пептид p7 отделяет структурные белки от неструктурных белков (NS). К неструктурным белкам относятся: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B.

Оболочечные белки ВГС гликопротеин E1 и E2 имеют большое значение для проникновения вируса. ВГС-белок ядра взаимодействует с липидными каплями, а р7 участвует в соединении и распространении частиц ВГС. NS2, как показали исследования, взаимодействует с гликопротеинами оболочки P7 и NS3 и объединяет вирусные белки в липидные капли. NS3 белок играет важную роль в расщеплении NS5A от липидных капель и во взаимодействии вирусных частиц между собой.

Формирование мембранной сети является важной функцией NS4B. Взаимодействие NS5A и аполипопротеина (ApoE) требуется для сборки и экспорта инфекционных вирионов. NS5B представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу, что является важным ферментом для репликации РНК HCV (Afridi S.Q. et al., 2013).

В настоящее время для диагностики ВГС используют метод иммуноферментного анализа (ИФА), при котором обнаружение антител к вирусу гепатита С производят с применением наборов, содержащих антигены ядерного и неструктурного генов вируса. А также метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), при котором проводят обнаружение РНК ВГС.

Тест-системы ИФА 2-го поколения позволяют выявить анти-ВГС в сыворотке крови, инфицированной ВГС, в 90 % случаев и более. Наборы для ИФА 3-го поколения способны определять дополнительно антитела к антигенам, кодируемым NS5-регионом генома ВГС, и позволяют выявлять почти до 100 % анти-ВГС (State- ment P., 1997).

Более высоким уровнем диагностики ГС является применение ПЦР для индикации в сыворотке крови РНК ВГС (Sherlock S., 1997). Определение РНК ВГС с помощью ПЦР позволяет определить, является ли анти-ВГС свидетельством активной или перенесенной в прошлом инфекции, и в настоящее время это является решающим критерием для диагностики и определения показаний к противовирусной терапии. Генотипирование и количественное определение РНК ВГС рекомендуется только у больных до начала лечения и в динамике (Орлова И.И., 2004).

1.2. Молекулярно-эпидемиологические особенности вирусного гепатита В

Гепатит В – инфекция человека, возбудителем которой является вирус гепатита В, характерными симптомами, в случаях выраженных клинически, признаны острые поражения печени и интоксикация. Однако у широко распространенного заболевания, вызываемого данной инфекцией, выявлено большое количество клинических проявлений и исходов (Балаян М.С. и др., 1999).

Такие факторы, как генотип ВГВ, вирусная нагрузка и специфические вирусные мутации, влияют на прогрессирование заболевания. Известно, что ВГВ генотип не только влияет на прогноз клинических исходов заболевания, но и отвечает за эффективность лечения интерфероном.

Генетическая вариабельность генома ВГВ позволяет развиваться различным генотипам, субгенотипам и серотипам как вследствие эволюции генома вируса, на которые оказывают влияние многообразные селективные факторы. Сегодня определены 10 различных географически распространенных генотипов ВГВ, идентифицируемых латинскими буквами от А до J (Emekdaş G. et al., 2012). В нуклеотидной последовательности целых геномов ВГВ различных генотипов отмечены различия не менее чем на 8%. Проведенные исследования генотипов ВГВ А, В, С, D и F способствовали определению внутри них ряда субгенотипов, неидентичность полных геномных последовательностей, которых составляет от 4 до 8%. Кроме того, показано, что при одновременной инфекции вирусами гепатита В различных генотипов могут образовываться рекомбинантные генотипы (Cui C. et al., 2002; Wang Z. et al., 2005).

Острая инфекция, вызванная генотипами А и D ВГВ, приводит к более высокой частоте хронизации, чем вызванная генотипами В и С (Lin C.L. et al., 2011). Пациенты с генотипами С и D, в отличие от больных с генотипами А и В, имеют более низкие показатели спонтанной сероконверсии (HBeAg в анти-HBe). Генотип С ВГВ имеет более высокую частоту мутаций в основном промоторе гена С (BCP) A1762T/G1764A и демонстрирует более высокую вирусную

нагрузку, чем генотип В (Lin C.L. et al., 2011). Аналогичным образом, генотип D имеет более высокую распространенность мутации в области (BCP) A1762T/G1764A, чем генотип А. Эти наблюдения позволяют предположить важные различия в патогенезе инфекций, вызванных разными генотипами ВГВ. Определенные генотипы, например, С и D, могут способствовать более тяжелому течению заболеваний печени, в том числе формированию цирроза и ГЦК. Кроме того, пациенты, инфицированные генотипами А и В, лучше отвечают на интерферонотерапию, чем пациенты с генотипами С и D (Lin C.L. et al., 2011).

Следовательно, определение генотипа возбудителя у пациентов с хронической ВГВ-инфекцией может помочь практикующим врачам определить лиц, подверженных риску прогрессирования заболевания, и назначить оптимальную противовирусную терапию.

В клинической картине заболевания, путях передачи вируса, характеристике каждой фазы заболевания, ответной реакции на противовирусную терапию, развитии цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы наблюдаются существенные различия, зависящие от географического положения, о чём свидетельствуют данные, полученные в Азии, Западной Европе, Северной Америке и Африке (см. табл. 2) (Kim B.K. et al., 2011).

Таблица 2

Географическая распространенность генотипов вируса гепатита В

Генотип ВГВ	Географическое распространение
А	США, Центральная Африка, Индия, Северо-Западная Европа
В1	Китай, Индонезия
В2	Вьетнам
С	Восточная Азия, Корея, Китай, Япония, Тайвань, Вьетнам, Полинезия, Австралия, США
D	Россия, Средиземноморье, Средний Восток, Индия, США
Е	Западная Африка
F	США (редко), Центральная и Южная Америка, Полинезия
G	Европа, США (редко)
Н	Центральная и Южная Америка
I	Вьетнам, Лаос
J	Япония

В 1988 году Х. Окамото и другие предложили первую генетическую классификацию для штаммов ВГВ – определение генотипа как вирусной последовательности с нуклеотидным межтипным расхождением более чем на 8 % в расчете на весь геном. Позже Х. Нордер было предложено нуклеотидное расхождение на 4,2 % с использованием последовательности поверхностного гена S (Norder H. et al., 1992). Согласно их открытию, для каждого нового генотипа был определен тот же критерий обозначения буквами в алфавитном порядке от А до J.

Однако, учитывая широкое разнообразие геномов ВГВ по всему миру, несколько авторов предложили уточнить критерии определения и описания конкретного генотипа / субгенотипа (Miyakawa Y. et al., 2003; Kramvis A., 2005; Schaefer S., 2007; Schaefer S. et al., 2009).

Ф. Курбанов и др. поддержали эту идею и предложили свои рекомендации: использование целых последовательностей генома, расхождение $\geq 7,5$ % для обозначения генотипов и от > 4 % до $< 7,5$ % в случае субгенотипов (Kurbanov F. et al., 2010). Рассматривается географическое распределение генотипов ВГВ в тесной связи с эндемичным регионом и коренным населением: ВГВ генотипы В и С связаны с населением азиатских стран, а генотипы А и D распространены среди европейских стран и в США (Okamoto H. et al., 1988); генотипы Е и F обнаруживаются в странах Африканского континента и Америки (Центральная и Южная Америка) (Norder H. et al., 1994). ВГВ генотипа G впервые обнаружен во Франции (Stuyver L. et al., 2000), но распространился повсеместно, а ВГВ генотипа Н впервые был выявлен в Центральной Америке (Arauz-Ruiz P. et al., 2002). Высока распространенность ВГВ генотипа G в Северной и Южной Америке, особенно среди населения Мексики (Roman S. et al., 2013).

В Китае генотипы В, С и D ВГВ распределены следующим образом: преобладающий генотип В (67,12 %), на втором месте – С (32,19 %) и незначительный D (0,68 %) (Ma M. et al., 2014).

В работе французских ученых изучалась молекулярная эпидемиология инфекции ВГВ на острове Мартиника. С этой целью образцы крови у 86

инфицированных ВГВ пациентов из центральных больниц острова были ретроспективно проанализированы: прямое секвенирование области pre S1 или pre core/core или полное секвенирование генома, после чего был выполнен филогенетический анализ. Были выявлены генотипы: ВГВ/A1 (68,6 %), ВГВ/A2 (10,5 %), ВГВ D (D3 и D4) (8,1 %), ВГВ / F (3,5 %), а также ВГВ / E (2,3 %) – в 2-х изолятах, выделенных от двух западноафриканских пациентов (Brichler S. et al., 2013).

Гепатит В (ВГВ) представляет собой важную проблему здравоохранения в странах Магриба (Алжир, Ливия, Мавритания, Марокко и Тунис). Авторы Эззикури С., Пино П., Банжеллон С. (Ezzikouri S. et al., 2013) изучили молекулярные особенности вирусных штаммов, циркулирующих в регионе. Анализ данных показывает, что в регионе Магриба широко распространены генотип D, подтип D7, преобладают мутации в pre core/ core области генома ВГВ.

Генотип D является преобладающим типом среди пациентов с гепатитом В в различных регионах Турции (Emekdaş G. et al., 2012).

Результаты исследований, проведённых в Италии, показали распределение генотипов, выделенных от больных ВГВ: 53 % – генотип D, 44 % – генотип А и 3 % – генотип E (Ferraro D. et al., 2012).

Филогенетическим анализом S-генных последовательностей определен генотип E ВГВ (HBV / E, N = 96) и (HBV / A, N = 47), который распределился следующим образом: 87 % HBV / E и 13 % ВГВ / в Кот-д'Ивуар, 100 % ВГВ / E в Гане, 67% от HBV / E и 33 % ВГВ / в Камеруне и 100 % от ВГВ / в Уганде. Среднее и максимальное различие между нуклеотидными последовательностями ВГВ E оказались равны 1,9 % и 6,4 % соответственно, что свидетельствует о большем генетическом разнообразии внутри этого генотипа, чем сообщалось ранее ($p < 0,001$) (Forbi JC. et al., 2013).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолятов ВГВ с Африканского континента подтвердил предложения о распространении субгенотипов A1, A2, A3 и в Восточной, Южной и Западной / Центральной Африке, соответственно (Forbi JC. et al., 2013).

Изучение геномной гетерогенности вируса гепатита В стало одним из важнейших вопросов в исследованиях в Марокко (Baha W. et al., 2012), направленных на понимание связи между мутантами ВГВ и широким спектром клинических и патологических состояний, связанных с инфекцией ВГВ. Генотипы ВГВ были определены у 221 хронического носителя с использованием, INNO-LiPA HBV анализа и ПЦР. Филогенетический анализ проводили на 70 изолятах, мультиплексный метод ПЦР использовался для подтверждения некоторых результатов генотипирования. Распределение генотипов было следующим: D в 90,5 % случаев, E – 1 случай (5,9 %), и смешанные генотипы (5 A / D и 2 D / F) – 3,2 % больных. ВГВ в образцах с генотипом D могут быть отнесены к D7 (63,3 %), D1 (32,7 %) и по 2 % штаммов к D4 и D5. Все изоляты генотипа A принадлежат к A2 субгенотипу. Изоляты генотипа E субгенотипировать не удалось. При изучении 70 исследованных штаммов в геноме мутации были обнаружены в 88,6 % случаях, в том числе мутации в стоп-кодоне РС – у 40 % больных, у 21,5 % присутствовала смесь геномов дикого типа и мутации G1896A ВСР. В целом, мутации в области ВСР были обнаружены в 65,7 % случаев (Baha W. et al., 2012).

В Японии генотипы В и С являются преобладающими генотипами у больных хроническим гепатитом В (Uchida Y. et al., 2013). В целом, генотип В вируса ГВ широко распространен в странах Азии: шесть подтипов генотипа В-В1 в Японии, В2-В5, В7 – в Восточной Азии, В6 – среди коренных народов, проживающих в арктических регионах, в том числе на Аляске, севере Канады и в Гренландии.

Генотип А широко распространен в странах Африки южнее Сахары (подтип А1), Северной Европе (подтип А2) и Западной Африке (подтип А3). Генотипы В и С широко распространены в Азиатско-Тихоокеанском регионе. Показатели распространенности генотипов В и С изменяются среди различных азиатских стран (Lin CL. et al., 2008). Например, HBV-С является более распространенным, чем HBV-В в Китае, Японии и Корее, в то время, как HBV-В является более распространенным генотипом в Тайване и Вьетнаме (Lin CL. et al., 2011). Особо следует отметить тот факт, что почти все больные хроническим гепатитом В в Корее инфицированы HBV-С (Lin CL. et al., 2008).

Генотип С, имеющий подтипы С1-С5, находят в Восточной и Юго-Восточной Азии.

Генотип D, который имеет подтипы D1-D5, распространен в Африке, Индии, Средиземноморском регионе, Европе.

Распространенность генотипа E ограничивается регионом Западной Африки. Генотип F, который имеет 4 подтипа (F1-F4), циркулирует в Центральной и Южной Америке. Генотип G – во Франции, Германии, США. Генотип H – в Центральной Америке (Као JH. et al., 2006; Datta S., 2008). Позднее генотип I был выделен во Вьетнаме и Лаосе (Phung TB. et al., 2010) и генотип J – в Японии (Tatematsu K. T et al., 2009).

Исследования распространения отдельных генотипов вируса ГВ на территории России немногочисленны.

По результатам молекулярно-генетических исследований, проводимых в стране с участием Референс-центра по мониторингу за гепатитами, установлено, что на территории Российской Федерации циркулируют 3 генотипа вируса гепатита В (D, A, C). Из трёх генотипов вируса ГВ, встречающихся на территории страны во всех федеральных округах с разными популяционными частотами, доминирует генотип D (так же, как и в Европе, Украине, Средней Азии), распространённость которого в целом по России составляет около 88 % (Онищенко Г.Г., 2013).

На территории Чукотского А О у большинства больных гепатитом В выделяли вирус генотипа D и у четверти больных – генотипа C (Михайловская Г.В. и др., 2010). Из 343 образцов сывороток крови пациентов с хроническим гепатитом В, проживающих в Горном Алтае, Хабаровске, Нижнем Новгороде, Краснодаре, Санкт-Петербурге в 95,8 % проб определен генотип D и в 4,2 % – генотип C (Максютов Р.А., Канаев А.Н., 2010).

Данные, полученные при изучении генотипов ВГВ у коренных народностей Сибири, показали, что генотип D встречается у 96 % населения, генотипы А и С по 2 % каждый (Мануйлов В.А. и др., 2007).

В Республике Саха (Якутия) у больных ХГВ трёх национальностей из 7 различных посёлков и городов (Вилуйский, Верхоянский, Жиганский) были обнаружены 3 генотипа ВГВ, генотип D составил – 42,4 %, А – 25,4 %, С – 25 % . По результатам проведенных исследований в 2-х образцах плазмы крови выявлена коинфекция генотипами А и D, в то время как в 2-х других – генотипами А и С (6,8%). Высокая эндемичность Якутии по гепатиту В может служить причиной большого числа случаев инфицирования двумя генотипами одновременно, а кроме того служит причиной высокого риска повторного заражения. В республике не выявлено связей распределения генотипов по этническими или географическими признаками (Писарева М.М. и др., 2004, Писарева М.М., 2007).

А.Д. Неверовым с соавторами отмечено, что в Якутии доминируют те же самые генотипы ВГВ, что и в других регионах России, однако доля генотипа А значительно выше (Неверов А.Д., 2007).

Кроме этого, независимо друг от друга отдельными группами авторов проведено определение генотипов ВГВ у пациентов с хроническими формами НВ- вирусной инфекции. Так, С.И. Семенов и соавторы (Семенов С.И. и др., 2009), изучив 16 изолятов, выделенных у больных из Усть-Алданского района методом «гнездовой» ПЦР, обнаружили присутствие 3 генотипов вирусного гепатита В - А (44 %), D (44 %) и С (12 %). В работах Л.Д. Индеевой (Индеева Л.Д., 2010) также определены эти 3 генотипа, но с другой частотой – D (38 %), А (24 %) и С (24 %), а также в 14 % случаев выявлено сочетание генотипов А и D.

У эвенков, проживающих в Нерюнгринском районе, южной части Якутии, выделен только генотип D ВГВ (Зотова А.В. и др., 2007).

По результатам выборочных исследований среди якутской популяции выявлено наличие 3-х генотипов ВГВ: генотип D – 30,9 %, генотип А – 27,3 %, генотип С – 24,1 % и генотип ни А ни D – 17,7 %. Данные исследований также показали смешанные формы генотипов А и D, генотипов А и С в остальных случаях (Саввин Р.Г., 2008).

1.3. Определение лекарственной резистентности и механизм её формирования

В лечении хронического гепатита В рекомендованы интерфероны- α (стандартные, пегилированные) и аналоги нуклеоз(т)идов – ингибиторы обратной транскриптазы (ИОТ). Длительное лечение аналогами нуклеоз(т)идов ассоциирована с возможностью формирования лекарственной устойчивости, в дальнейшем – с прогрессированием течения заболевания (Wightman F. et al., 2004; Yamazhan T. et al., 2007).

Продолжительная персистенция вируса гепатита В в инфицированных клетках печени, высокая частота возникновения спонтанных мутаций являются основой для селекции мутантных вариантов ВГВ, ассоциированных с формированием лекарственной устойчивости к ИОТ (Colonna R. et al., 2006; Ghany M. et al., 2007).

Одним из важных моментов в лечении пациентов, нуждающихся в терапии аналогами нуклеоз(т)идов, является выявление вариантов ВГВ с мутациями в геноме полимеразы (Р-ген), связанных с развитием лекарственной устойчивости, еще до начала лечения.

Необходимо отметить, что резистентность к противовирусным препаратам приводит к снижению или утрате влияния ингибиторов обратной транскриптазы на восприимчивость ВГВ. В клинических исследованиях лекарственная резистентность определена как селекция вариантов ВГВ, несущих аминокислотные изменения в вирусной полимеразе, связанные с понижением влияния ВГВ на противовирусное действие ИОТ.

Репликация ВГВ возникает посредством обратной транскрипции с образованием прегеномной РНК с ДНК-матрицы.

В связи с невозможностью проверки правильности считывания нуклеотидных последовательностей обратной транскриптазой ВГВ, зачастую возникают ошибки при обратной транскрипции прегеномной РНК ВГВ. Возникающие в процессе репликации ВГВ ошибки распознавания информации и

влияние повышенного количества вирионов в сутки (1012-1013) увеличивают вероятность формирования мутаций в геноме вируса. Превалирующее число спонтанных мутаций губят вирус и негативно влияют на процесс его репликации (Кожанова Т.В. и др., 2013). Возникновение лекарственной резистентности ВГВ становится результатом влияния таких факторов, как:

1. Мощность действия противовирусного препарата, его генетический барьера и структура.
2. Скорость репликации вируса, репликативной способности мутантных форм, присутствия аминокислотных замен в ДНК-полимеразе ВГВ.
3. Подверженность лечению организма-хозяина, проведение предшествующей терапии, фармакогеномика, иммунный статус и масса тела больного.

Резистентность разделяют на следующие виды:

1. Вирусологическая резистентность т.е. способность ВГВ к длительной интенсивной репликации, вопреки применению высоких доз ИОТ. В таких случаях повышается уровень ДНК ВГВ $> 1\log$ в двух последовательных определениях от минимального значения, достигнутого противовирусной терапией.

2. Фенотипическая резистентность обусловлена появлением генотипа резистентности, проявляется к противовирусному действию ИОТ.

3. Перекрестная резистентность (кросс-резистентность) представляет собой устойчивость к ИОТ, следствием которой становится резистентность к влиянию аналогичного препарата того же класса.

4. Генотипическая резистентность характеризуется проявлением мутаций в Р-гене полимеразном гене. Данные мутации могут присутствовать изначально, либо развиться при противовирусной терапии.

5. Множественная резистентность возникает при выявлении мутантных вариантов ВГВ, резистентных к двум и более нуклеоз(т)идным аналогам (например, последовательное применение ламивудина и затем адефовира).

6. Клиническая резистентность выявляется при сокращении частоты сероконверсии HBeAg, повторном росте активности АЛТ, ухудшением морфологической картины печени (прогрессирование фиброза увеличение количества некрозов гепатоцитов, увеличении воспаления).

(Durantel D. et al., 2005; Locarnini S. et al., 2006; Lok A. et al., 2007).

Фенотипическая и клиническая резистентность развиваются в присутствии генотипической резистентности (Dan Y. et al., 2005).

1.4. Разнообразие мутаций в гене полимеразы вируса гепатита В, ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости

В настоящее время выявлено значительное количество мутаций в Р-гене ВГВ, связанных с формированием резистентности к терапии аналогами нуклеоз(т)идов (Bartholomeusz A. et al., 2006). Наиболее распространены мутации в Р-гене, связанные с проявлением лекарственной устойчивости к ламивудину. Причиной такой резистентности являются мутации, локализующиеся в высококонсервативном YMDD локусе обратной транскриптазы (в кодонах 203-206, тирозин-метионин-аспаратат-аспаратат) – части каталитического С-сайта домена ДНК-полимеразы. Выявлено, что мутациями, влияющими на первичную резистентность к ламивудину, являются M204V, M204S, M204I (С-сайт), L80M (В-сайт) (Hie Won H. et al., 2008; Honkoop P. et al., 1998; Huang Z.M. et al., 2005; Zhi-ying O. et al., 2008).

M204I-мутация в ряде случаев выявляется как изолированная, в то время как мутации M204V и M204S встречаются исключительно в тандеме с иными изменениями в В и А сайтах ДНК-полимеразы ВГВ (Bozdayi A. et al., 2004; Bozdayi A. et al., 2003). Наиболее часто встречающиеся мутации в Р-гене ВГВ – это V173L+L180M+M204V, M204I, L180M+M204I, L180M+M204V. Среди больных ХГВ, проходящим терапию ламивудином, распространена сочетанная мутация M204V/L180M (41,3 %) (León P. et al., 2004; Moriconi F. et al., 2007).

Принято считать, что M204V/I-мутация становится причиной частичной резистентности, а изолированная L180M-мутация не оказывает влияния на степень эффективности лечения ламивудином. Ламивудин представляет собой резистентные варианты ВГВ, обладающий невысокой репликативной активностью. Но, вместе с тем, зафиксирована связь восстановления репликативной способности ВГВ с сочетанием мутации L180M мутациями M204V или M204I с (León P. et al., 2004).

Результаты большего числа исследований показывают синергическое взаимодействие мутаций M204V и L180M, которое оказывает значительное влияние на вероятность развития резистентности (León P. et al., 2004).

Такие компенсаторные мутации как L80V/I и V173L соответственно выявляются в сайтах А и В домена обратной транскриптазы ДНК-полимеразы, наиболее частые их сочетания обнаружены с мутациями M204S или M204V (Li M.W. et al., 2007). Первые случаи таких мутаций зафиксированы при лечении ламивудином пациентов с рецидивом ВГВ-инфекции, перенесших трансплантацию печени. (Ling R. et al., 1996; Villeneuve J. et al., 2003). При продолжительном приеме ламивудина у 27-62,5% реципиентов донорской печени выявляются ламивудин-резистентные варианты ВГВ. Вероятность стремительного проявления фенотипической резистентности связана с повышенным уровнем ДНК ВГВ до начала лечения ($>50 \times 10^6$ копий/мл) (Ben-Ari Z. et al., 2003; Ling R. et al., 1996).

Показано, что при образовании мутантных вариантов лекарственная резистентность к ламивудину в ряде случаев проявляется не ранее чем через 4-6 месяцев. Частота YMDD-мутаций фиксируется в пределах от 19-27 % через год до 44 % и 70 % – после 2 и 5 лет лечения ламивудином. (Aggarwal R. et al., 2004; Tillmann H.L., 2007). Отмечено несколько случаев связи сероконверсии по HBeAg с малой частотой образования мутаций в Р-гене ВГВ на протяжении приема ламивудина. На основании этих исследований выдвинута гипотеза о возможности ассоциирования различных генотипы ВГВ с разными вероятностями проявления ламивудиновой резистентности (Zoulim F. et al., 2007). Представленная ниже табл. 3 показывает мутации YMDD локуса при различных серотипах и генотипах ВГВ.

**Частота выявления мутаций гена полимеразы ВГВ при различных серотипах
и генотипах вируса (Zoulim F. et al. 2007)**

Мутации	Частота определения	Серотип ВГВ		Генотип ВГВ		
		НВе- позитивные	НВе- негативные	А	Д	другие
L180M	68,4 %	71,2 %	66,1 %	71,1 %	57,1 %	79,3 %
M204I	41,2 %	38,5 %	43,6 %	31,6 %	57,1 %	31,0 %
M204V	68 %	63,5 %	56,5 %	71,1 %	40,5	69,0 %

Отмечено, что у пациентов, инфицированных генотипом А ВГВ, частота выявления мутаций L180M и M204V встречается чаще, а при генотипе D ВГВ больше вероятность замены M204I.

Первичная резистентность к адефовиру ассоциирована с мутациями, локализованными в В (A181T) и D (N236T, I233V) сайтах домена ДНК-полимеразы (Schildgen O. et al., 2006). В сравнении с ламивудином, лекарственная резистентность к адефовиру наблюдается реже, так по итогам его продолжительного применения лекарственная резистентность возникает у 3 %, 9 %, 18 %, 28 % больных через 2, 3, 4 и 5 лет, соответственно (Tillmann H.L., 2007). В то время как у пациентов, инфицированных ламивудинрезистентными вариантами ВГВ, устойчивость к адефовиру отмечается раньше (18-25 % после 1-2 года лечения) (Lindh M. et al., 2008).

Первый случай мутации N236T был описан после наблюдения пациента, получавшего адефовир, после трансплантации печени (Villeneuve J. et al., 2003), в время как мутация I233V выявлена сравнительно недавно. В результате клинических исследований выяснилось, что мутация I233V в Р-гене ВГВ наблюдается примерно у 2 %, A181V и N236T – у 5,9 % пациентов с ВГВ-инфекцией на втором году лечения адефовиром. Многие исследователи отмечают, что устойчивость к энтекавиру наблюдается у пациентов, подверженных

лекарственной резистентности к ламивудину. Связанные с появлением резистентности к энтекавиру мутации локализируются в В-сайте (T184S/A/I/L), С-сайте (S202G/C) и Е-сайте (M250I/V) домена ДНК-полимеразы (Nagasaki F. et al., 2007).

Высоким барьером к развитию устойчивости ВГВ обладает энтекавир, в связи с чем, резистентность к нему наступает только после последовательных мутаций, две из которых должны быть ассоциированными с терапией ламивудином (L180M и M204V). Отмечается случаев менее 1 % развития лекарственной устойчивости ВГВ на 4 году применения энтекавира в качестве монотерапии. Наиболее часто резистентность к энтекавиру встречается при лечении пациентов с исходной резистентностью к ламивудину, что составляет 6 %, 19 % и 40 % после 1, 3 и 4 лет приема препарата (Lindh M. et al., 2008).

Не так давно была описана резистентность к тенофовиру. Она ассоциирована с мутациями, локализованными в В- и С-сайтах домена ДНК-полимеразы ВГВ (A194T, L180M, M204V). По результатам исследований G. Schmutz выявлено, что чаще всего указанные мутации встречаются у ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов, прошедших лечение тенофовиrom (Guenther S. et al., 2006). Другие исследования показали, что по итогам первого года лечения тенофовиrom частота появления мутантных вариантов ВГВ на фоне его селекционного «давления» составляет 0 %, устойчивость к тенофовиру не отмечается. (Кожанова Т.В., Л.Ю. Ильченко., О.В. Исаева., 2009).

1.5. Молекулярно-эпидемиологические особенности гепатита С

Вирус гепатита С (ВГС) стал одной из ведущих причин хронического гепатита во всем мире. Хроническая инфекция ВГС часто прогрессирует до цирроза печени и связана с повышенным риском развития гепатоцеллюлярной карциномы. Хотя симптомы могут быть умеренными в течение многих десятилетий, у 20 % постоянно инфицированных лиц могут развиваться серьезные заболевания печени, включая цирроз (Ali S. et al., 2011), у каждого пятого –

первичный гепатоцеллюлярный рак (Широкова Е.Н. и др., 2002; Радченко В.Г., Стельмах В.В., Козлов В.К., 2004; Белозеров Е.С., 2005).

Распространенность инфекции ВГС весьма велика и обнаружена более чем у 170 миллионов человек (Amjad Ali. et al., 2011, Dore G.J. et al. 2014).

Вирус гепатита С – это оболочечный вирус с одноцепочной РНК, состоящий приблизительно из 9500 нуклеотидов, кодирующий полипротеин примерно из 3000 аминокислот (Choo Q.-L. et al., 1991; Inchauspe, G. et al., 1991; Lemon SM. et al., 2007).

Геном ВГС был впервые обнаружен в 1988 г. группой американских исследователей под руководством М. Houghtona и Q. Choo (Choo.Q.-L., 1989). В таксонометрической иерархии ВГС принадлежит к семейству *Flaviviridae* (Butt S., 2010; Idrees M., 2008); Choo. Q.-L. et al., 1991).

Анализ генома ВГС продемонстрировал исключительно высокую гетерогенность в обеих структурных и неструктурных кодирующих областях и определил семь различных генотипов и шестьдесят семь подтвержденных субтипов. Кроме них в современной классификации представлено 20 предварительно номинированных и 20 неноминированных субтипов (Smith D.V. et al., 2014).

Идентификация генотипа ВГС чрезвычайно важна для назначения терапии, поскольку генотипы 1 и 4 трудно поддаются терапии ПЭГ - интерфероном и рибавирином, по сравнению с генотипами 2 и 3, поэтому продолжительность и доза противовирусной терапии определяется в зависимости от вида генотипов ВГС (Jimenez M.R. et al., 2010).

Геномы среди генотипов ВГС отличаются друг от друга примерно на 30-35 %, а геномы среди подтипов отличаются на 15-20 %. (Thong V.D. et al., 2014). Распространенность и распределение генотипов ВГС зависят от географического положения (Mellor J. et al., 1995). Преимущественное распространение в мире имеют 1, 2 и 3 генотипы ВГС (Мукомолов С.Л., 1996; Ильина Е.Н., 2000; Михайлов М.И., 2001; Шустов А.В., 2003; Ястребова О.Н., 2005; Schaefer S., 2007). Определение генотипа ВГС важно для того, чтобы определить

продолжительность лечения, оценить реакцию организма на лечение и прогнозировать дальнейшую деятельность (Hadinedoushan H. et al., 2014).

Генотип 1 ВГС распространен по всему миру, в том числе в развитых регионах, таких как Северная Америка и Европа. Генотип 2 ВГС имеет высокую распространенность в Центральной и Западной Африке, а также в некоторых западных странах, в то время как генотип 3 ВГС циркулирует преимущественно на Дальнем Востоке и в Индийском субконтиненте (Simmonds P., 2004). В Афганистане были обнаружены генотипы ВГС: 1а (35,2 %, n = 25), 3а (62,0 %, n = 44) и 1b (2.8 %, N =2) (Sanders-Buell E. et al., 2013).

Между тем, генотипы ВГС 4, 5 и 6 являются эндемичными для конкретных географических точек: генотип 4 ВГС, в основном, встречается в Египте и странах Африки, южнее Сахары; генотип 5 ВГС – в Южной Африке (Antaki N. et al., 2010) и генотип 6 ВГС – в Южном Китае и Юго-Восточной Азии (Simmonds P. et al., 2005) (рис. 3).

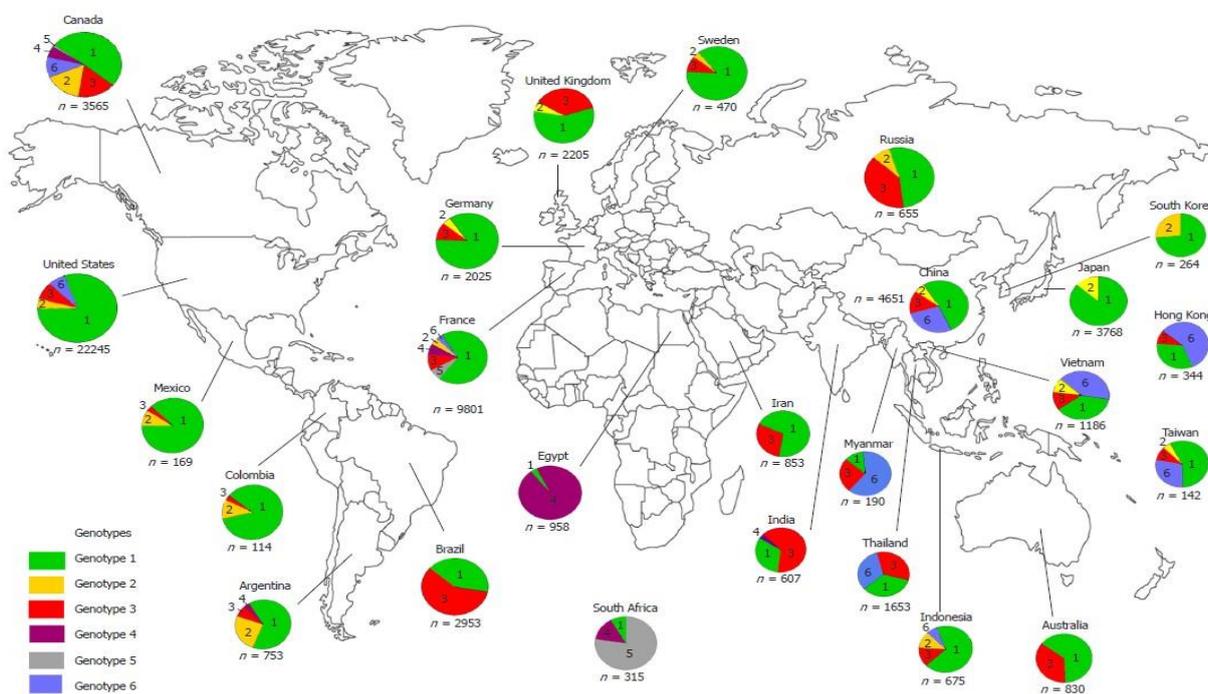


Figure 1 The prevalence of the various hepatitis C virus genotypes varies considerably between countries and regions^[13-34]

Thong VD et al. Hepatitis C virus genotype 6

Рис. 3. Распространенность и распределение генотипов ВГС

Распространенность различных вирусных гепатитов С генотипа значительно варьируется между странами и регионами (Thong VD. et al., 2014).

Распределение генотипов ВГС в странах Средиземноморья имеет две основные модели. В Южной и Восточной Европе наиболее распространенным подтипом является 1b, далее следуют генотипы 2 и 3. В Северной Африке – 1b, тогда как в таких странах, как Турция и Израиль – 1b и достаточно большой долей субген типа 1a. В Иране преимущественно распространены генотипы 3a и 1b. В арабских странах, таких как Египет, Ливан, Сирия, Саудовская Аравия и Кувейт, преобладает генотип 4 (Ramia S., 2006).

В Италии генотип 4 был найден на юге страны, и распространенность его особенно высока в таких регионах, как Калабрия (Ansaldi F. et al., 2005; Ciccozzi M. et al., 2012).

На сегодняшний день определены три варианта территориального распределения генотипов (Simmonds P., 2004). Один из них характеризуется высоким генетическим разнообразием, включающим географически дискретные области Западной Африки с типами 1 и 2 (Candotti D. et al., 2003; Jeannel D. et al., 1998; Ruggieri A. et al., 1996), Центральную Африку с типом 4 (Fretz C. et al., 1995; Ndjomou J. et al., 2003) и Азию с типами 3 и 6 (Abid K. et al., 2000).

Наиболее распространенным генотипом в Таиланде является подтип 3a. На основе результатов филогенетического анализа подтип 3a (38,5 %), а затем 1a (21 %), 1b (13,8 %), генотип 6 (19,9 %), состоят из подтипов 6e (0,3 %), 6F (11 %), 6i (1,9 %), 6j (1,9 %) и 6n (4,8 %) и 3b (5,6 %) (Akkarathamrongsin S. et al., 2013; Simmonds P. et al., 1996; Tokita H.H. et al., 1994; Tokita H.H. et al., 1995).

На территории Японии, Китая и Тайваня в большинстве случаев встречается генотип 1b, вследствие чего его зачастую называют «японским». В США регистрируют преимущественно генотип 1a, получившее название «американский» (D.J. Marshall et al., 1997). Это свидетельствует о длительном периоде эндемической инфекции в том или ином регионе (Simmonds P. et al., 2004).

Второй вариант включает районы с несколькими подтипами, циркулирующими в конкретных группах риска, например, подтип 3a у наркоманов (Pawlotsky J.M. et al., 1995).

При третьем варианте речь идет об области, где присутствует определенный подтип, например, в Египте с подтипа 4a (Chamberlain R.W. et al., 1997; Fretz C.D. et al., 1995; Ray S.C. et al., 2000) и Южной Африке с подтипа 5a (Chamberlain R.W. et al., 1997; Smuts H.E. et al., 1995).

В России исследования по генотипированию ВГС впервые были проведены в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН в середине 90-х годов сотрудниками (Львов Д.К., 1997, Lvov D.K., 1996). Д.К. Львов с соавторами проводили исследования структуры генотипов ВГС во многих районах России, в результате чего было установлено, что генотип 1b преобладает у пациентов всех исследованных районов. Его уровень в Центральном районе отмечен на уровне 69,6%, в Уральском – 73,6%, в Восточносибирском – 74,3%, в Северном – 88,9%. Структура генотипов по обобщенным данным представлена следующим образом: 1a – 9,9 %, 1b – 67,4 %, 2a – 4,7 %, 2b – 0,5 %, 3a – 10,9 %, 1b+3a – 0,7 % и 5,9 % типировать генотип не удалось (Львов Д.К., 1995, Львов Д.К., 1997).

Преобладающим генотипом в России является генотип 1b, циркулирующий от 50-55 % в Центральной России до 80-85 % на Дальнем Востоке соответственно (Бахлыкова Н.Ю., 1998; Писарева М.М. и др., 2004). Вторым по частоте субтипом вируса гепатита С (30-40 % случаев) является субтип 3a (Онищенко Г.Г., 2013).

Кузин С.Н., Самохвалов Е.И. и др. изучили структуру генотипов и подтипов вируса гепатита С (ВГС) у пациентов, страдающих хроническим гепатитом С, в 3 субъектах Центрального федерального округа России (Москва (1993-1995 гг., 2005 г.), Московской (2008 г.) и Владимирской областях (1993-1995 гг., 2005-2007 гг.). Подтип 1b преобладал на протяжении всего периода исследований, на всех изучаемых территориях. В 1993-1995 гг. и до 2005-2007 гг. отмечены преобразования структуры подтипов и генотипов ВГС, которые представляли собой рост подтипа 3a и сокращение удельного веса подтипа 1b. У больных хроническим гепатитом С женского пола подтип 1b регистрировали чаще, чем у больных мужского пола. В то же время отмечено, что у жителей Владимирской области подтип 3a чаще встречается у мужчин, нежели у женщин. Среди мужчин старше 30 лет наиболее распространен подтип 1b, а у мужчин до 30 лет, наоборот,

подтип 3а. По результатам исследований во Владимирской и Московской областях, у женщин старше 30 лет и у женщин до 30 лет и у женщин до 30 лет во Владимирской области чаще определяется подтип 1b. Данные аналогичных исследований Московской области показали, что подтипы ВГС 1b и 3а встречаются с равной частотой – 47,6% (Кузин С.Н. и др., 2011).

Генотипическая гетерогенность вируса гепатита С среди якутской популяции в Республике Саха (Якутия) характеризовалась выявлением в большем количестве генотипов 1b и 3а (70 % и 10 % соответственно), в то время как генотип вируса гепатита С в 19,8% случаев не был установлен (Саввин Р.Г., 2008).

С.И. Семеновым и авторами проводились исследования по генотипированию вируса гепатита С у 126 больных хроническим гепатитом С. Было установлено, что в Якутии основным генотипом являются 1b (68,8-76,4 %) и 3а (13,4-18,8 %) (С.И. Семенов и др., 2009).

Резюмируя материалы литературы, можно констатировать, что методы и подходы молекулярной эпидемиологии играют все более важную роль не только в научной разработке проблем вирусных гепатитов В и С, но и в решении вопросов эпидемиологического надзора и правильного построения лечебно-профилактических мероприятий при этих актуальных инфекциях. Особенно важно, что проведение молекулярно-генетических исследований циркулирующих вирусов позволит эффективно проводить расследование случаев групповой заболеваемости, устанавливая эпидемиологическую связь случаев между собой и с источником инфекции, выявлять завозные случаи заболеваний, получать углублённую эпидемиологическую характеристику территорий на основе генетических особенностей вирусной популяции, а также сформулировать методологические подходы к сертификации территорий по элиминации вируса гепатита В, проводить мониторинг биологических свойств возбудителя и их биологическую распространённость, адекватную оценку эпидемиологической обстановки и разработку в регионе необходимых профилактических и противоэпидемических мероприятий (Онищенко Г.Г., 2013).

Сегодня количественное определение HBsAg может использоваться не только для мониторинга течения хронического гепатита В, но и как дополнительный маркер для оценки вирусного ответа на этиотропную терапию. В 2009 г. в журнале *Hepatology* была опубликована работа, в которой была показана роль количественного определения HBsAg в сыворотке крови для предсказания вирусологического ответа пациентов на противовирусную терапию (Дудина К.Р., 2011; Балюбаш В.В., 2012).

Несколько исследований показали, что пациенты с низкой вирусной нагрузкой ($<80,0000$) получили положительный ответ на имеющуюся в настоящее время противовирусную терапию, по сравнению с пациентами с высокой вирусной нагрузкой ($> 80,0000$) (Von Wagner M. et al., 2005; Dalgard O. et al., 2004; Hayashi J. et al., 1998). Результаты нескольких исследований также показали, что снижение концентрации РНК ВГС в течение первых 2-12 недель терапии имеют благоприятный исход (Vrolijk J.M. et al., 2004). Следовательно, исходный уровень вирусной нагрузки и ее снижение в начальной стадии лечения играют важную роль в изменении и оптимизации противовирусной терапии (Ahmad W. et al., 2010).

Выраженное биоразнообразие ВГВ и ВГС, как и принципиальные географические различия в распространенности разных генетических линий вирусов, требуют проведения молекулярного мониторинга на каждой конкретной территории, что особенно актуально для Республики Саха (Якутия).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методология, материалы и объем проведенных исследований

В работе обобщены результаты исследований 15-летнего периода. Для достижения поставленной цели и решения задач, исследования проводились в трех взаимосвязанных направлениях:

1. Изучение эпидемиологических и клинико-лабораторных характеристик хронических гепатитов В и С в Республике Саха (Якутия).

2. Исследование характеристик циркулирующих изолятов вируса ГВ с помощью молекулярно-генетических и молекулярно-эпидемиологических методов.

3. Исследование характеристик циркулирующих изолятов вируса ГС с помощью молекулярно-генетических и молекулярно-эпидемиологических методов.

Использованные методологии, материалы и объем проведенных исследований представлен в табл. 4.

Таблица 4

Задачи исследования	Виды и методы исследований	Материалы и объем исследований
Уточнить основные эпидемиологические характеристики хронических вирусных гепатитов В и С в Республике Саха (Якутия) в 1999-2014 гг.	Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости, включая анализ по половому признаку в отдельных возрастных группах населения Республики Саха (Якутия) в 1999-2014 гг.	Ежегодные и ежемесячные отчетные формы государственной статистики Министерства здравоохранения Российской Федерации «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (формы №№ 1, 2) за период 1999-2014 гг.; отчеты по вирусным гепатитам – 195 отчетных форм

-Установить с помощью методов специфической лабораторной диагностики особенности проявлений хронических вирусных инфекций, вызванных вирусами гепатитов В и С (серологические и молекулярно-генетические маркеры)	Лабораторные методы:	
	Определение количественного содержания HBsAg	87 образцов сывороток крови
	Выявление HBeAg и анти-HBe	92 образцов сывороток крови, 184 исследования
	Выявление ДНК ВГВ и РНК ВГС в ПЦР	Клинический материал (сыворотки крови) - 1304 человека, 2608 исследований
Изучить распространение генетических вариантов вирусов ГВ и ГС в различных регионах республики при обследовании больных хроническими формами инфекций, включая распространенность мутаций в области пресоре/соре генома вируса ГВ и мутаций, приводящих к появлению устойчивости к противовирусным препаратам	Вирусная нагрузка	- 345 сывороток крови больных с ХГВ - 249 сывороток крови пациентов с ХГС
	Определение генотипа вируса ГВ (InnoLiPA)	- 20 образцов сывороток крови
	Определение генотипа вируса ГС (ПЦР с типоспецифическими праймерами)	- 58 образцов сывороток крови
	Мутации в областях пресоре и Р генома вируса (InnoLiPA)	- 126 образцов сывороток крови
Осуществить филогенетический анализ выделенных изолятов вирусов ГВ и ГС для выявления особенностей циркулирующих генетических вариантов возбудителей в Якутии	Определение мутаций лекарственной устойчивости изолятов вируса ГВ (InnoLiPA)	- 79 образцов сывороток крови
	Секвенирование изолятов вируса ГВ и филогенетический анализ	- 35 образцов сывороток крови
	Секвенирование изолятов вируса ГС и филогенетический анализ	- 59 образцов сывороток крови

2.2. Характеристика обследованных пациентов с ХГ

Исследования проводились на территории Республики Саха (Якутия). Административное деление республики представлено на карте (рис. 4).

Национальный состав населения, проживающего на территории республики, на 53 % представлен народами Крайнего Севера. Большая часть населения республики – 55 % – лица азиатского происхождения. Среди других национальностей преобладают лица европейского происхождения, проживающие в Юго-Западных районах республики. Преобладающее большинство населения азиатского происхождения населяет Северо-Западные и Центральные районы. Северо-Восточные и Юго-Восточные районы республики – места проживания населения обеих групп населения, как азиатского, так и европейского происхождения (рис. 5).



Рис. 4. Административное деление территории Республики Саха (Якутия)



Рис. 5. Национальный состав населения, проживающего в отдельных районах Республики Саха (Якутия)

Сыворотки крови для исследований собирались на базах ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РС (Я)» (главный врач Ушкарева О.А.) в каждом районе республики. Определение вирусной нагрузки, генотипа вируса, мутаций на участках генов С и Р генома ВГВ, определение вирусной нагрузки (249 пациентов ХВГС) и генотипирование осуществлялось в лаборатории вирусных гепатитов Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (заведующий лабораторией доктор медицинских наук, профессор С.Л. Мукомолов). В лаборатории готовились аликвоты образцов, часть которых была использована для молекулярно-биологических исследований, часть составила банк образцов сывороток крови, который заложен на хранение при -80°C .

Были исследованы сыворотки крови 1304 больных с хроническим гепатитом, из них 819 (62,8 %) женщин и 485 (37,2 %) мужчин, средний возраст больных составил 43,2 года. Все пациенты состояли на диспансерном учете в разных районах Республики Саха (Якутия). Характеристика обследованных пациентов представлена в табл. 5.

Таблица 5

Характеристика обследованных больных по территории проживания, полу и возрасту

Районы	Женщины					Мужчины					Всего больных
	18-29 лет	30-39 лет	40-49 лет	50 и старше	Всего	18-29 лет	30-39 лет	40-49 лет	50 и старше	Всего	
Алданский	4	5	15	15	39	2	8	6	17	33	72
Амгинский	3	8	18	33	62	5	7	9	13	34	96
Булунский	1	6	8	11	26	3	2	4	2	11	37
Верхоянский	1	2	4	6	13	1	4	-	1	6	19
Вилуйский	3	9	11	47	70	5	6	3	16	30	100
Жиганский	2	4	5	10	21	-	1	5	3	9	30
Ленский	7	19	7	17	50	3	23	5	9	40	90
Мегино-Кангаласский	-	-	-	3	3	-	-	-	2	2	5
Мирнинский	7	20	13	21	61	7	19	10	3	39	100
Нерюнгринский	14	21	9	22	66	15	28	11	9	63	129
Нюрбинский	2	7	11	20	40	4	12	3	2	21	61
Сунтарский	2	2	14	51	69	5	3	9	17	34	103
Таттинский	7	9	14	21	51	5	2	2	4	13	64
Томпонский	1	6	6	12	25	1	1	3	4	9	34
Хангаласский	2	4	14	50	70	5	-	10	15	30	100
Чурапчинский	3	8	5	22	38	8	1	1	11	21	59
г. Якутск	11	23	25	56	115	12	24	19	35	90	205
РС (Я)	70	153	179	417	819	81	141	100	163	485	1304

Перед включением в исследование все пациенты подписали информированное согласие, составленное в соответствии со статьями 13, 19, 20, 22 Федерального закона РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ (Федеральный закон Российской Федерации).

Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»).

2.3. Серологические методы

Методом иммуноферментного анализа с подтверждением (ИФА) все сыворотки исследовались на HBsAg и наличие антител к гепатиту С с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). У 87 пациентов определили количественное содержание HBsAg в сыворотке крови с помощью ИФА коммерческой тест-системы производства компании Алкор Био (г. Санкт-Петербург) и у 92 человек – HBeAg и anti-HBe с помощью коммерческой тест-системы HBeAg/anti-HBe EIA (Radim, Италия). Все исследования выполнялись согласно инструкции фирм- производителей.

2.4. Молекулярно-биологические методы

Для выделения ДНК вируса гепатита В из плазмы крови человека использовали тест-систему «АмплиСенс Рибо-ПРЕП» («ИнтерЛабСервис», Москва) производства ФБУН ЦНИИЭ, принцип действия которой основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора, содержащего гуанидин тиоцианат, с последующим осаждением нуклеиновых кислот изопропанолом и/или этанолом. Экстракция ДНК проводилась согласно инструкции производителя.

Определение наличия в исследуемой пробе ДНК ВГВ и ее количественное содержание определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в коммерческих тест-системах с учетом результатов в режиме реального времени «АмплиСенсHBV-Монитор-FL» («ИнтерЛабСервис», Москва).

Из числа образцов, содержащих ДНК ВГВ, в 20, полученных от жителей из различных регионов Якутии (Чурапчинский, Мирнинский, Сунтарский, Верхоянский, Булунский, Хангаласский, Нюрбинский, Амгинский, Томпонский,

Таттинский, Алданский, Вилюйский, Нерюнгринский улусы, г. Якутск) с установленным диагнозом ХГВ, определили генотип вируса, в 126 образцах – мутации в области pre-core, и в 79 образцах – мутации в области Р генома вируса с использованием тест-систем INNO-LIPA HBV Genotyping, INNO-LIPA PreCore, INNO-LIPA HBV Multi-DR (Innogenetics, Бельгия) согласно инструкции производителя.

Для выявления, количественного определения РНК и дифференциации генотипов 1/2/3 вируса гепатита С методом ПЦР в режиме реального времени применяли набор «РеалБест РНК ВГС- генотип». Нижний предел обнаружения был равен 300 МЕ/мл.

Секвенирование – последний этап молекулярного анализа предварительно отобранного и протестированного более простыми методами фрагмента ДНК или РНК. В работе были использованы образцы плазмы крови 35 больных с верифицированным ХГВ и 59 больных – с ХГС, полученные от коренных жителей различных поселков и городов Якутии.

Секвенирование участков генома изолятов ВГВ. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) были использованы три пары перекрывающихся праймеров, подобранных на основе анализа опубликованных в базе данных GenBank последовательностей вируса гепатита В, совместно фланкирующих фрагмент размером 1472 п.о., включающий участок гена полимеразы (Р), а также весь ген S, в том числе участок, кодирующий непосредственно S-белок, участок, кодирующий средний S-белок (ген S, pre-S2), и участок, кодирующий большой S-белок (ген S, pre-S1, pre-S2). Реакционная смесь для ПЦР, объемом 25 мкл включала: 2,5 мкл буфера (750 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) твин 20), 2,5 мкл dNTP (2,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата), 4 мкл MgCl₂ (25 мМ), 2 мкл DMSO, по 0,5 мкл прямого и обратного праймера (10 pmol), 0,3 мкл рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (5 е.а./мкл), 1 мкг. выделенной ДНК-матрицы (объем зависит от концентрации), вода без нуклеаз до конечного объема. Амплификацию проводили на программируемом термоциклере фирмы «ДНК-технология» (Москва) при следующих условиях: после денатурации (95°C,

5 мин.) проводили 40 циклов амплификации в режиме 94°C - 20 сек; 54-58°C – 30 сек; 72°C – 30 сек и заключительный синтез 72°C (4 мин). Для предотвращения испарения в смесь добавляли 60 мкл минерального масла. Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору GenomeLabTMDTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., США), в трех повторах, на прямых и обратных праймерах.

Реакционная смесь для секвенирующей реакции включала: DTCS Quick Start Master Mix (8 мкл), прямой или обратный праймер (1,6 мкМ), очищенный продукт амплификации (объем зависел от концентрации), воду до конечного объема 20 мкл. Постановку реакции осуществляли на термоциклере «Rotor-Gene» в режиме: 30 циклов амплификации 96°C – 20 сек; 50°C – 20 сек; 60°C – 4 мин.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали согласно инструкции к набору DTCS Quick Start Kit с модификациями:

1. Смешать компоненты из расчета на одну микропробирку:

ацетат натрия (3М, рН = 5,2)	2 мкл
Na –EDTA (100 mM, рН = 8,0)	2 мкл
гликоген (20 мк/мл)	1 мкл

2. Добавить в каждую пробирку 20 мкл продукта ПЦР, пипетировать.

3. Добавить в каждую микропробирку 60 мкл этанола 95 %, хранящегося при –20°C, перемешать, инкубировать 15-20 мин при комнатной температуре.

4. Центрифугировать при 14000 об./мин, 4°C 15 мин.

5. Удалить супернатант, оставив осадок.

6. Провести отмывку осадка, добавив в каждую микропробирку 200 мкл 70 % этанола, хранящегося при –20°C, осторожно перемешать, инкубировать 10 минут при комнатной температуре.

7. Центрифугировать при 14000 об./мин, 4°C 15 мин.

8. Повторить пункты 5-7.

9. Удалить супернатант, оставив осадок.

10. Высушить продукт ПЦР в термостате 37°C.

Для контроля качества очищения ПЦР осадок растворяли в 50 мкл воды и проводили оценку в 1,5 % агарозном геле с добавлением раствора бромистого этидия (0,5 мкг/мл), визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Разделение полученных фрагментов проводили на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP методом LFR-1. Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast. Выравнивание последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с помощью программы MEGA 6 (UPGMA).

Статистическую достоверность совпадения кластеров на филогенетическом дереве проверяли с помощью процедуры бутстэпिंगа (bootstrap) на 500 повторях.

Секвенирование участка NS5b генома изолятов вируса ГС: обратную транскрипцию проводили на неспецифичных праймерах с использованием коммерческого набора «Реверта-L» производства ФБУН ЦНИИ. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) были использованы праймеры, сконструированные на основе нуклеотидной последовательности гепатита С, фланкирующие фрагмент длиной 383 п.о., включающий участок гена неструктурного белка РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B.

Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) для каждой пары праймеров осуществляли по следующей схеме:

Реакционная смесь для ПЦР, объемом 25 мкл включала: 2,5 мкл буфера (750 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) твин 20), 2,5 мкл dNTP (2,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата), 4 мкл MgCl (25 мМ), 2 мкл DMSO, по 30 пМ. Каждого олигопраймера, 0,7 мкл рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (5 е.а./ мкл), 1 мкг. кДНК-матрицы (объем зависит от концентрации), вода без нуклеаз до конечного объема. Амплификацию проводили на программируемом термоциклере фирмы «ДНК-технология» (Москва) при следующих условиях: после денатурации (95°C, 3 мин.) проводили 40 циклов амплификации в режиме 94°C – 20 сек; 58°C – 30 сек.; 72°C – 40 сек. и заключительный синтез 72°C (5 мин). Для предотвращения испарения в смесь добавляли 60 мкл минерального масла.

Качество ПЦР определяли визуально в 2 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору GenomeLabTMDTCS – Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., США) в трех повторах, на прямых и обратных праймерах.

Реакционная смесь для секвенирующей реакции включала: DTCS Quick Start Master Mix (8 мкл), прямой или обратный праймер (1,6 мкМ), очищенный продукт амплификации (объем зависел от концентрации), воду до конечного объема 20 мкл. Постановку реакции осуществляли на термоциклере «Rotor-Gene» в режиме: 30 циклов амплификации 96°C – 20 сек; 50°C – 20 сек; 60°C – 4 мин.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по следующей методике: смесь из 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 0,125М EDTA и 1 мкл гликогена вносили в 20 мкл продукта амплификации и инкубировали при комнатной температуре в присутствии охлажденного 96 % этилового спирта 15 минут. Центрифугировали при 14000 об./мин., 4 0С 15 мин. Супернатан удаляли и дважды промывали осадок охлажденным 70 % этиловым спиртом, повторяя процедуру центрифугирования на холоде. Промытый осадок сушили.

Для контроля качества очищения продуктов амплификации осадок растворяли в 50 мкл воды и проводили оценку в 1,5 % агарозном геле с добавлением раствора бромистого этидия (0,5 мкг/мл), визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. Очищенный фрагмент достаточной концентрации использовали для постановки секвенирующих реакций.

Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере, содержащем формамид, и помещали в генетический анализатор.

Анализ фрагментов проводили на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP. Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA5, используя

алгоритм ClustalW. Для построения филогенетических деревьев использовали метод UPGMA, bootstrap N=500.

2.5. Статистическая обработка данных

Данные из первичной медицинской документации вносились в индивидуальные регистрационные карты пациентов, разработанные перед началом исследования с использованием лицензионной программы Microsoft Office Excel 2003.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием лицензионного пакета программ SPSS Statistica 17.0 в два этапа (Бююль А., 2005; Ланг Т.А., 2011; Мерков А., 1974; Юнкеров В.И., 2005).

Для обработки результатов исследований и вычисления статистических данных применялась электронно-вычислительная техника с использованием программного обеспечения пакета MS Office. Расчеты выполнены посредством универсальных методов статистической обработки данных, с учетом многолетних показателей развития, темпов прироста и снижения, проведен корреляционный анализ, применен критерий Стьюдента для определения статистической достоверности, кроме того ряд дополнительных методов: сравнительный анализ показателей заболеваемости на базе данных, полученных при наблюдении различных возрастных групп, картографические исследования.

Глава 3. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОКОНТАКТНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

В Российской Федерации за последние 15 лет заболеваемость ХВГ выросла более чем в 2,2 раза: с 23,6 (1999 г.) до 51,7 на 100 тыс. населения (2014 г.). Рост заболеваемости хроническими вирусными гепатитами обусловлен трёхкратным увеличением заболеваемости хроническим гепатитом С: с 12,9 (1999 г.) до 39,9 на 100 тыс. нас. (2014г.), заболеваемость хроническим гепатитом В увеличилась в 1,3 раза: с 8,9 до 11,3 на 100 тыс. населения. Более высокие показатели заболеваемости ХГВ и ХГС в 2013 году регистрировались в возрастных группах 30-39 лет (соответственно 21,6 и 96,3) и 20-29 лет (13,7 и 52,6), а в возрастных группах 40-49 лет составила 13,4 и 52,9 и 50-59 лет 13,2 и 33,3 на 100 тыс. населения (Ющук Н.Д. и др., 2014; Онищенко Г.Г., 2013).

В структуре больных хроническими гепатитами, состоящих на учете на 31.12.2013 года, 29,6 % приходится на больных ХГВ и 67,5 % – на больных ХГС.

Наибольшие уровни распространённости ХГВ и ХГС зарегистрированы в возрастных группах 30-39 лет (259,9 и 755,2 на 100 тыс. соответственно), 40-49 лет (226,1 и 516,8) и 20-29 лет (169,9 и 459,9 на 100 тыс.), показатели всего населения РФ – 147,5 и 335,8 на 100 тыс. населения соответственно.

В Республике Саха (Якутия) заболеваемость хроническими вирусными гепатитами с начала их регистрации (1999 г.) и до 2014 года увеличилась в 2,4 раза: с 28,3 (1999 г.) до 67,4 (2014 г.), что выше показателя (51,7) РФ на 24 %. Произошёл рост заболеваемости хроническим гепатитом С в 3,5 раза: с 11,3 (1999 г.) до 39,1 (2014 г.), хроническим гепатитом В в 1,6 раза с 15,2 (1999 г.) до 28,0 на 100 тыс. нас. (2014 г.). Показатели распространённости ХГВ в отдельных возрастных группах населения, состоящего на учете на 31.12.2013 года, были самыми высокими у больных 50- 59 лет (1197,6), 30-39 лет (1172,0), 40-49 лет (1012,2), показатель всего населения РС(Я) – 719,0 на 100 тыс. нас. У больных ХГС самые высокие показатели сместились в старшие возрастные группы: 60 лет

и старше (1143,2), 50-59 лет (1012,4), 30-39 лет (919,7), показатель всего населения – 568,8 на 100 тыс. населения.

3.1. Этиологическая структура хронических вирусных гепатитов в Республике Саха (Якутия). 1999-2014 гг.

Изменения этиологической структуры хронических вирусных гепатитов на протяжении анализируемого периода отражены на рис. 6.

С 1999 до 2004 года в структуре всех хронических вирусных гепатитов росла доля хронического гепатита В, достигшая максимума (62 %) в 2001 г.

В 2005-2006 гг. соотношение долей ХГВ и ХГС стало одинаковым, с 2007 г. хронический гепатит С преобладает в структуре хронических вирусных гепатитов. (61 % – 2013 г. и 58 % – 2014 г.). В этот же период произошло снижение доли хронических гепатитов неустановленной этиологии (ХГНЭ) в структуре всех хронических вирусных гепатитов с 11,3 % в 2000 г. до 0,3 % в 2014 г.

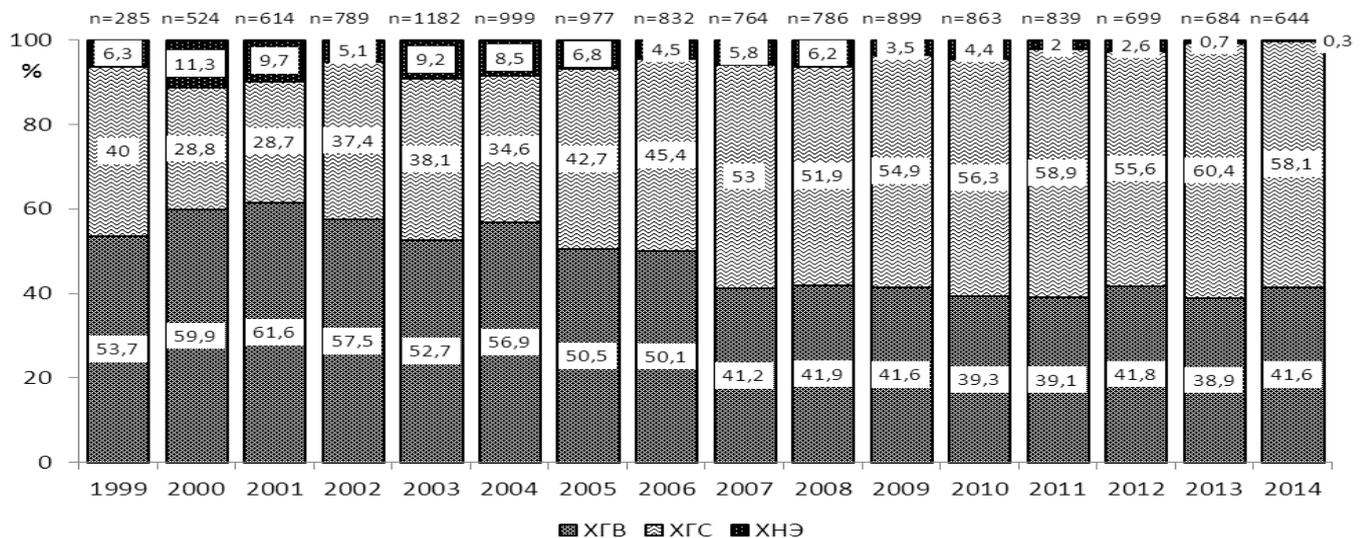


Рис. 6. Этиологическая структура хронических вирусных гепатитов в Республике Саха (Якутия) в 1999-2014 гг.

Аналогичные изменения произошли в динамике заболеваемости хроническим вирусным гепатитом В и хроническим вирусным гепатитом С.

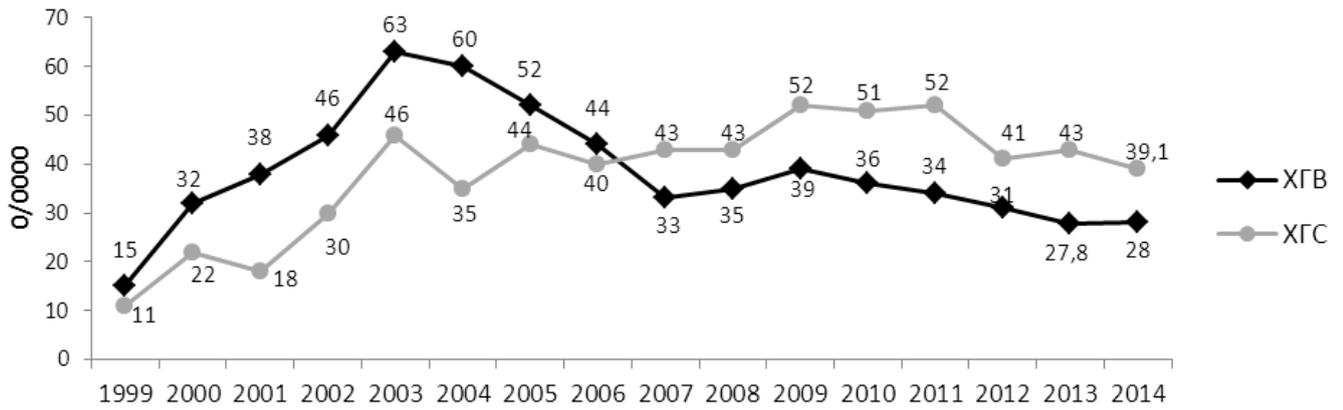


Рис. 7. Динамика заболеваемости хроническими вирусными гепатитами В и С в Республике Саха (Якутия) в 1999-2014 гг.

С 1999 до 2006 года заболеваемость хроническим гепатитом В была выше, чем хроническим гепатитом С, с 2007 года до настоящего времени число ежегодно выявляемых больных хроническим гепатитом С больше, чем больных хроническим гепатитом В (рис. 7).

В 2013 году в отдельных районах республики первичная регистрация ХГВ и ХГС варьировала в широких пределах (рис. 8, 9, 10). На территории республики заболеваемость ХГС (рис. 8) превышала заболеваемость ХГВ в 40 % районах, расположенных на юге и в центре республики, где проживает больше славянского населения, чем в других районах.

На 4 территориях (14,3 %) зарегистрировано больных ХГВ больше, чем ХГС (рис. 9). В четырех районах республики, заселенных в основном коренными жителями Крайнего Севера заболеваемость ХГВ и ХГС была практически одинаковой (рис. 10).

В пяти районах в 2013 году не зарегистрировано больных хроническими гепатитами (Эвено-Бытантайский, Алданский, Булунский, Усть-Майский, Жиганский).

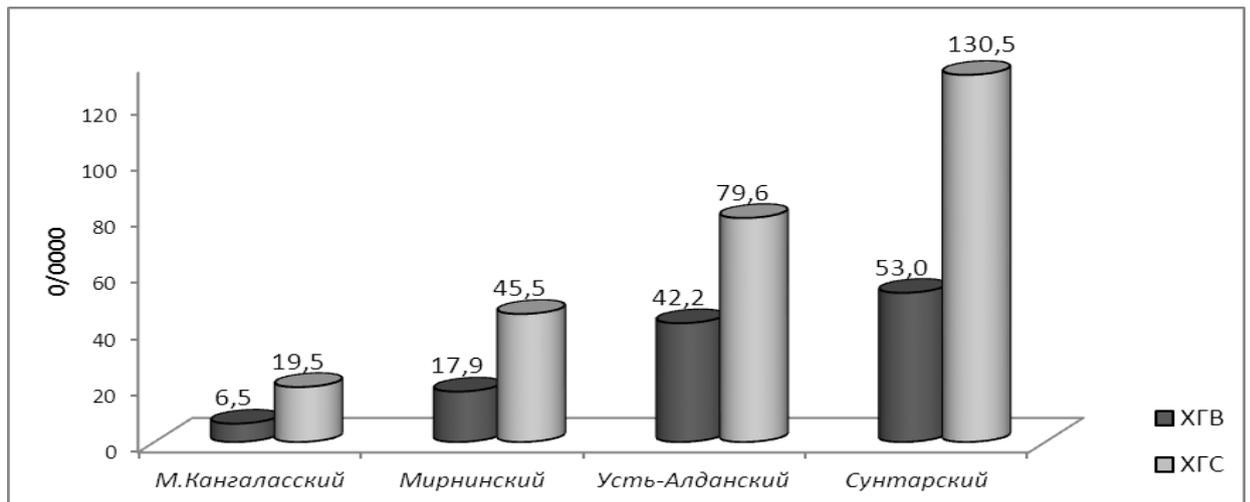


Рис. 8. Районы, в которых уровень заболеваемости XGS выше, чем XGV

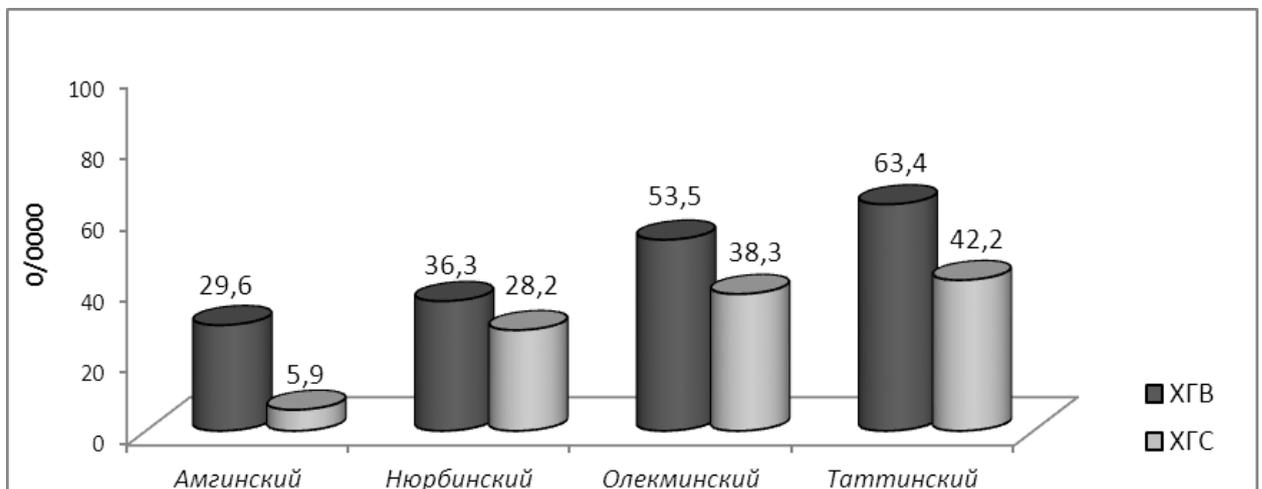


Рис. 9. Районы, в которых заболеваемость XGV выше, чем XGS

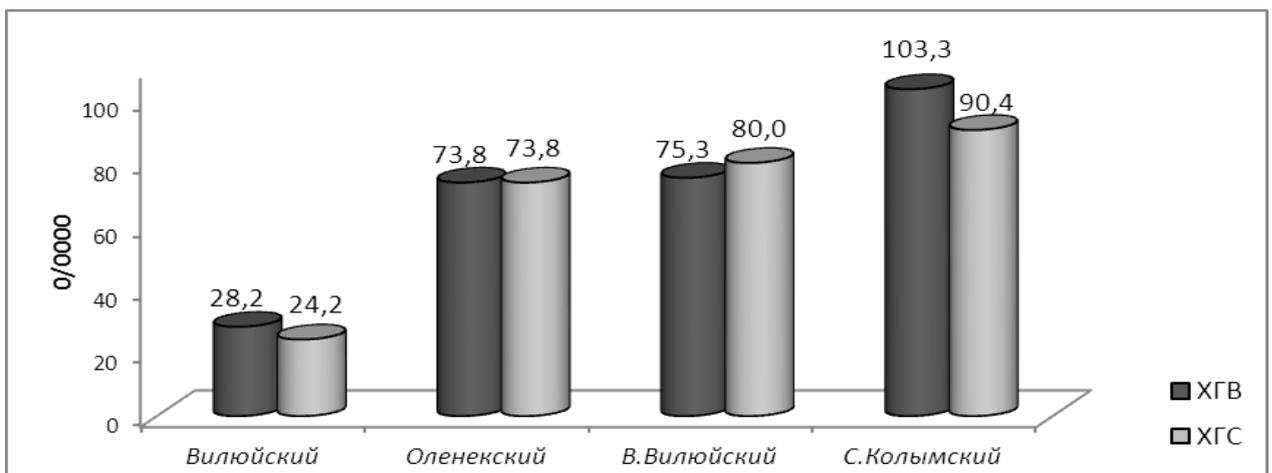


Рис. 10. Районы, в которых показатели заболеваемости XGV и XGS не имеют существенных различий

3.2. Эпидемиология хронического гепатита В в Республике Саха (Якутия)

В 1999 году на фоне активного распространения гепатита В в Российской Федерации началась официальная регистрация хронических гепатитов. В течение трёх лет (1999-2001 гг.) заболеваемость ХГВ в стране закономерно росла, отражая этапы диагностики и выявления скрытых хронических форм на территориях. В дальнейшем уровень регистрации вновь выявляемых случаев ХГВ был примерно на одном уровне – в пределах 14 на 100 тыс. населения. В 2014 году показатель заболеваемости впервые выявленным хроническим гепатитом В составил 11,3 на 100 тыс. Первичная регистрация ХГВ в отдельных возрастных группах населения РФ показывает наиболее высокий уровень заболеваемости в 30-39 лет – 21,6 на 100 тыс. населения. Показатели заболеваемости населения 20-29 лет (13,7 на 100 тыс.), 40-49 лет (13,4 на 100 тыс.), 50-59 лет (13,2 на 100 тыс.) находятся на одном уровне. В РС (Я) ХГВ в общей структуре хронических гепатитов в 2014 году составил 42 %. Показатель заболеваемости ХГВ (28,0 на 100 тыс. населения) в 2,5 раза выше, чем в Российской Федерации (11,3 на 100 тыс.). На протяжении всего анализируемого 15-летнего периода (1999-2014 гг.) заболеваемость ХГВ в РС (Я) была выше, чем в целом по стране, а в отдельные годы (2003-2004 гг.) эта разница достигала 4-кратного различия (рис. 11).

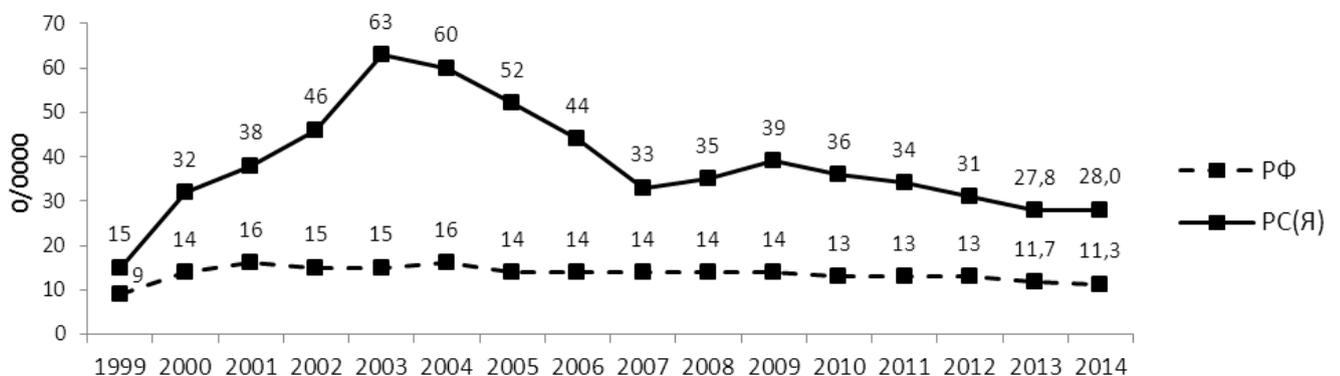


Рис. 11. Динамика заболеваемости хроническим вирусным гепатитом В в РС (Я) и в РФ в 1999-2014 гг.

В 2013 году показатели заболеваемости впервые выявленным хроническим гепатитом В на разных территориях республики имели существенные различия. На большинстве территорий (30 %) заболеваемость была в пределах от 20,0 до 50,0 на 100 тыс. населения. Показатели заболеваемости от 50,0 до 100,0 на 100 тыс. зарегистрированы на 20 % территорий. В то же время в 7 районах республики первичных случаев заболевания ХГВ не зарегистрировано, а в двух улусах (Среднеколымский, Чурапчинский) зарегистрированы самые высокие показатели заболеваемости (103,3 и 150,8 на 100 тыс. соответственно).

В отдельных возрастных группах взрослого населения в последние пять лет (2009- 2013 гг.) показатели заболеваемости ХГВ не имели резких различий (рис. 12) и находились в пределах 40,0-49,0 на 100 тыс. населения, кроме группы 30- 39 лет, показатель которой 51,7 на 100 тыс. оказался самым высоким.

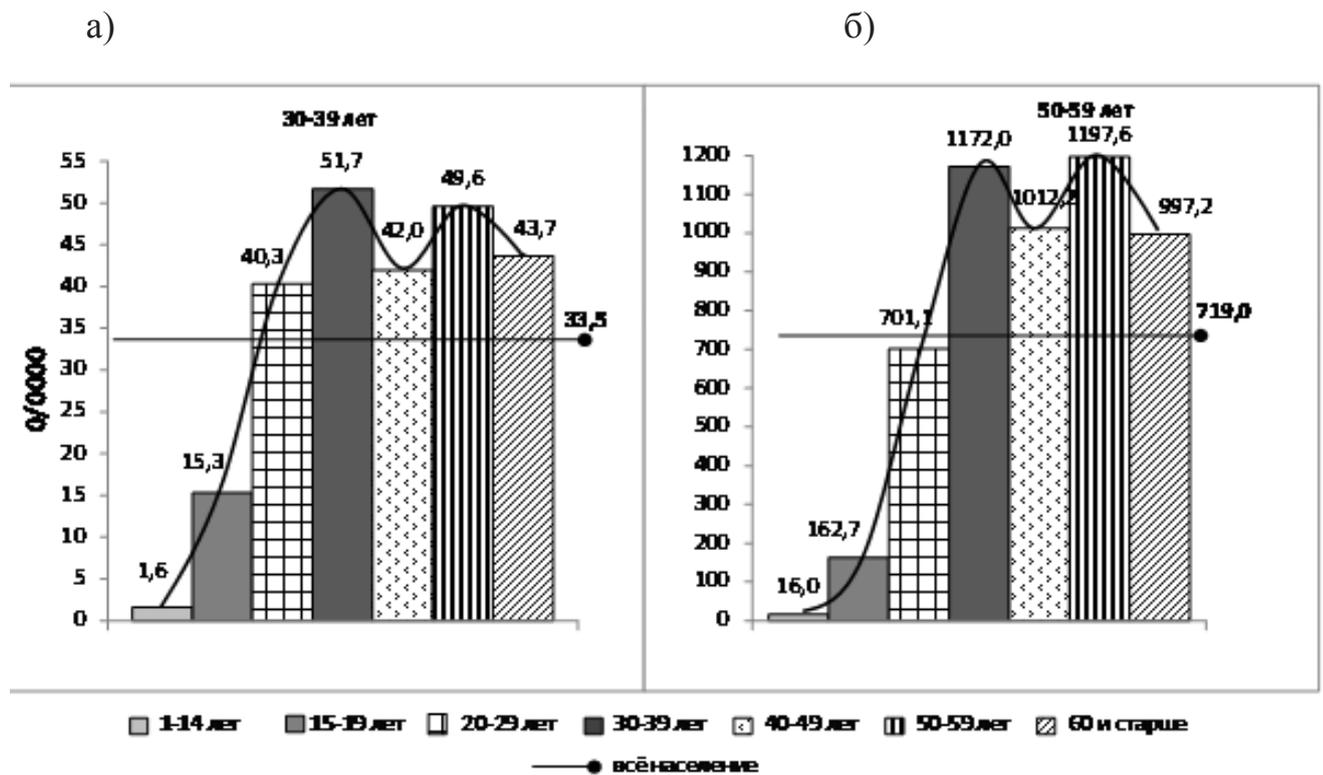


Рис. 12. Заболеваемость ХГВ в отдельных возрастных группах населения в 2009-2013 гг. (средние показатели) и общее число больных ХГВ (распространённость) в различных возрастных группах, состоящих на учёте на 31 декабря 2013 года в РС (Я)

Самые высокие показатели распространённости ХГВ у населения республики зарегистрированы в возрастных группах 50-59 лет (1197,6 на 100 тыс.) и 30-39 лет (1172,0 на 100 тыс.) (рис. 12).

3.3. Эпидемиология хронического гепатита С в Республике Саха (Якутия)

В общей структуре хронических вирусных гепатитов, зарегистрированных в РС (Я) в 2014 году, на долю хронического гепатита С приходится 58 %.

Динамика заболеваемости хроническим гепатитом С в РС (Я) и РФ в 1999-2014 гг. (рис. 13) показывает, что с 2002 года до настоящего времени заболеваемость ХГС в Якутии была выше, в 2012 году наметилась тенденция к её снижению, и впервые за все годы наблюдения в 2014 году уровни заболеваемости ХГС в РС (Я) и РФ (39,1 на 100 тыс. населения) одинаковы.

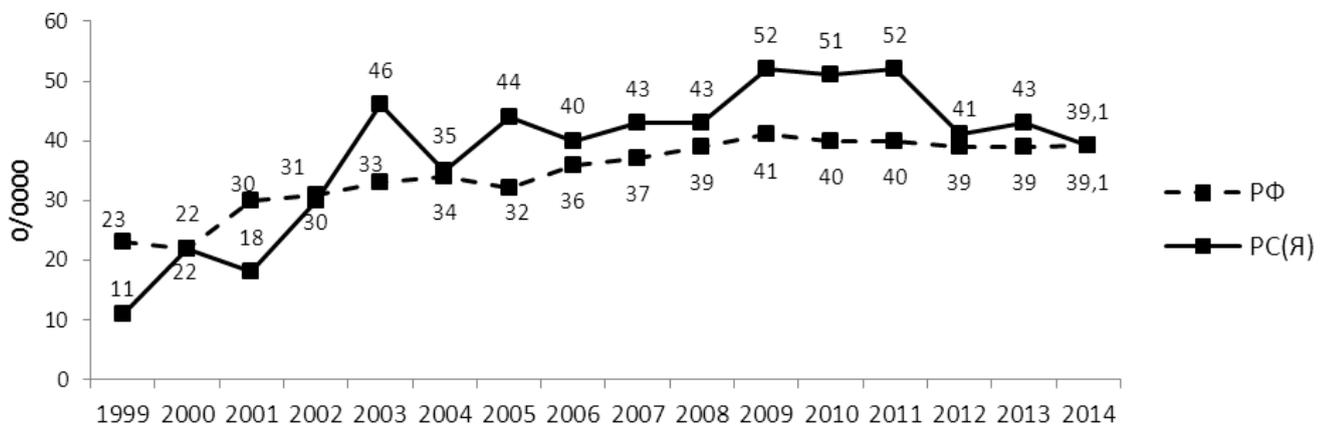


Рис. 13. Динамика заболеваемости хроническим вирусным гепатитом С в РС (Я) и в РФ в 1999-2014 гг.

На территориях отдельных районов республики в 2013 году показатели заболеваемости впервые выявленным ХГС существенно различаются: от отсутствия регистрации больных в северо-западных районах до очень высоких показателей в центральных районах (Чурапчинский – 184,9 на 100 тыс. населения), в западных (Сунтарский – 130,5 на 100 тыс.) и на северо-востоке РС (Я) (рис.15 Распределение районов на стр. 59).

Заболеваемость и распространённость ХГС в отдельных возрастных группах населения республики представлена на рис. 14.

Заболеваемость впервые выявленным хроническим гепатитом С последовательно увеличивается с возрастом больных, достигая наибольшего уровня у больных старше 60 лет. Выделяется возрастная группа больных 30-39 лет, в которой средний показатель заболеваемости выше, чем у больных 40-49 и 50-59 лет. Аналогичные данные получены в отношении возрастного распределения показателей распространённости ХГС: 60 лет и старше (1143,2), 50-59 лет (1012,4), 30-39 лет (919,7).

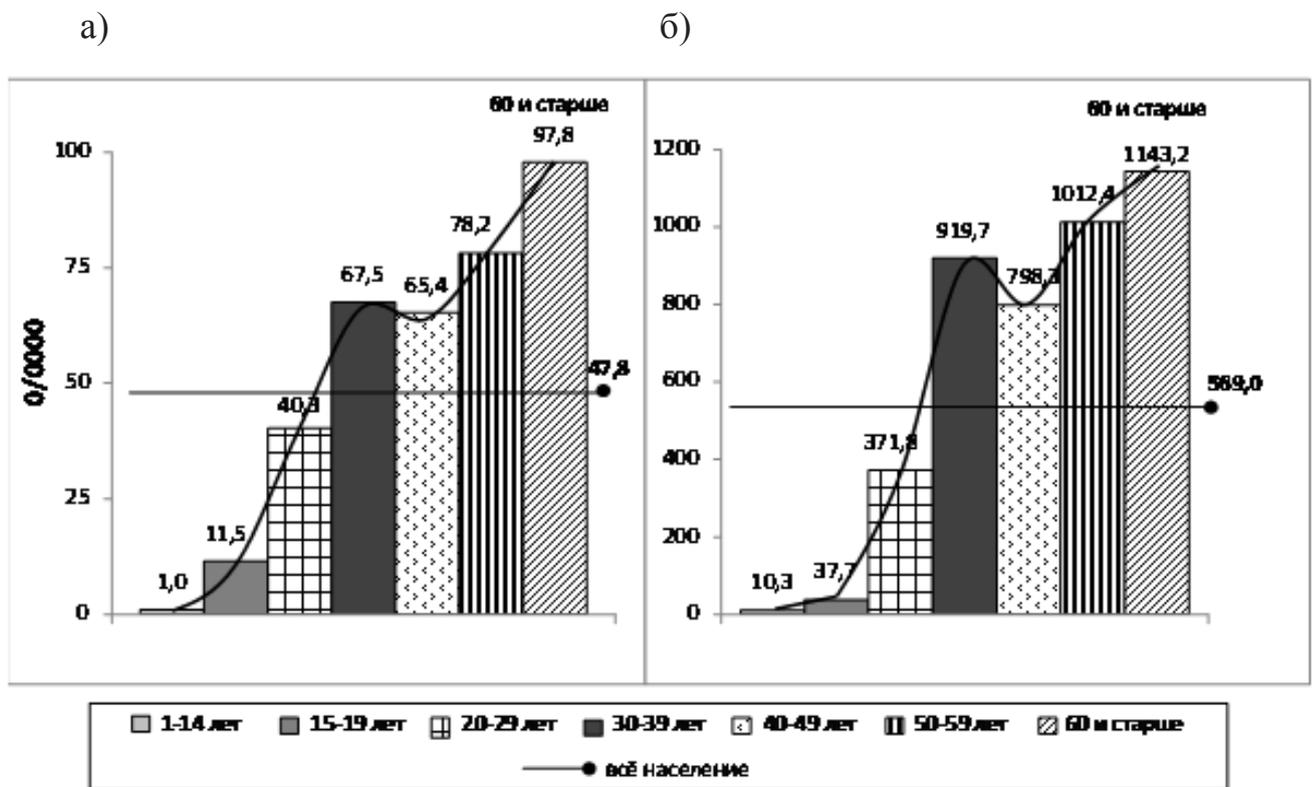


Рис. 14. Заболеваемость ХГС в отдельных возрастных группах населения в 2009-2013 гг. (средние показатели) и общее число больных ХГС в различных возрастных группах, состоящих на учёте на 31 декабря 2013 года в РС (Я)

Показатель распространённости – интенсивный показатель, характеризующий общую частоту распространения среди населения республики учтённых больных с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) на 100 тыс. населения (в просантимиях – 0/0000) по состоянию на 31 декабря календарного

года. Анализ этих показателей позволяет оценить уровень распространения хронической патологии и отражает не только регистрируемый уровень распространения ХГВ, но и уровень их диагностики, качество диспансеризации больных и учёта.

Таблица 6

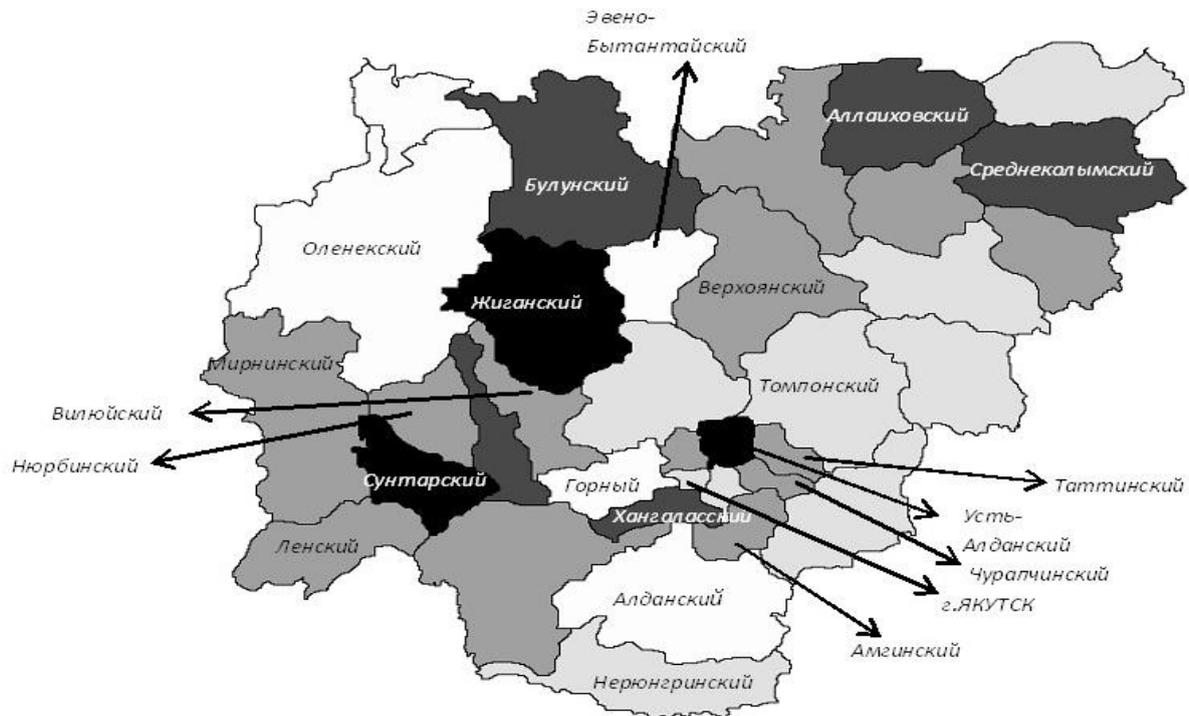
Общее число больных хроническими вирусными гепатитами (распространённость) в различных возрастных группах населения Республики Саха (Якутия), состоящих на учёте на 31 декабря 2013 г.

Возрастные группы	Общее число больных хроническими вирусными гепатитами								
	ХГВ			ХГС			ХГНЭ		
	Абс.	0/ 0000	%	Абс.	0/ 0000	%	Абс.	0/ 0000	%
Дети до года	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-14 лет	31	16,0	0,5	20	10,3	0,5	0	0	0
15-19 лет	121	162,7	1,8	28	37,7	0,5	0	0	0
20-29 лет	1235	701,1	17,9	655	371,8	12,0	10	5,7	9,5
30-39 лет	1649	1172,0	23,9	1294	919,7	23,7	23	16,4	19,8
40-49 лет	1368	1012,2	19,8	1079	798,3	19,8	19	14,1	16,4
50-59 лет	1578	1197,6	22,5	1334	1012,4	24,5	42	31,9	36,2
60 и старше	908	997,2	13,1	1041	1142,2	19,1	22	24,2	19,0
Всего абс. число	6890	719,0	100	5451	568,8	100	116	12,1	100

Как показывает анализ табл. 6, показатели распространённости хроническим гепатитом В выше, чем хроническим гепатитом С во всех возрастных группах населения, кроме лиц старше 60 лет. Это различие особенно велико в возрастных группах 15-19 лет – в 4 раза (ХГВ – 162,7 на 100 тыс., ХГС – 37,7) и 20-29 лет – в 2 раза, (ХГВ – 701,1 на 100 тыс., ХГС – 371,8 на 100 тыс.). Максимальные показатели распространённости ХГС зарегистрированы в старших возрастных группах: 50-59 лет – 1012,4 на 100 тыс. и 60 и старше лет – 1142,2 на 100 тыс. населения. Самые высокие показатели распространённости хроническими

гепатитами неустановленной этиологии зарегистрированы у населения старше 50 лет, доля которого составляет 54,2 % от всех больных ХГНЭ.

На рис. 15 территория Республики Саха (Якутия) разделена на 5 групп в зависимости от показателей распространённости хроническими вирусными гепатитами (по мере нарастания показателей).



- 1. группа – от 100,0 до 499,9 на 100 тыс. нас.
- 2. группа – от 500,0 до 999,9 на 100 тыс. нас.
- 3. группа – от 1000,0 до 1999,9 на 100 тыс. нас.
- 4. группа – от 2000,0 до 2999,9 на 100 тыс. нас.
- 5. группа – больше 3000,0 на 100 тыс. нас.

Рис. 15. Распределение районов РС (Я) по группам в зависимости от показателей распространённости хроническими вирусными гепатитами по состоянию на 31.12.2013 г.

Распространённость хронических вирусных гепатитов на территории республики имеет значительные различия от самого низкого (174,8 на 100 тыс.) в Эвено - Бытантайском улусе до самого высокого (3865,6 на 100 тыс. нас.) в Усть-Алданском. Очень высокие показатели зарегистрированы в центральных районах республики, северо-восточной арктической зоне, где проживает население

потомков русских переселенцев, и в западных районах, граничащих с Красноярским краем и Иркутской областью.

3.4. Лабораторные характеристики обследованных больных ХГВ

3.4.1. Количественное содержание HBsAg в сыворотке крови

Таблица 7

Взаимоотношение между вирусной нагрузкой и количеством HBsAg

Вирусная нагрузка	Число пациенто		<100 МЕ/мл		100-999 МЕ/мл		>1000МЕ/мл		Средняя концентрация HBsAg (МЕ/мл)
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
<150	40	46	13	32,5	23	57,3	4	10,0	261
150-10 ³	18	20,7	4	22,2	9	50	5	27,8	433
10 ³ -10 ⁴	27	31,0	8	29,6	12	44,4	7	26,0	364
10 ⁴ -10 ⁵	-		-		-		-		-
10 ⁵ -10 ⁶	2	2,3	-		1		1		554
10 ⁶ >	-		-		-		-		-
итого	87	100	25	28,7	45	51,8	17	19,5	403

По мере нарастания вирусной нагрузки средняя концентрация HBsAg (МЕ/мл) увеличивается пропорционально. Концентрация 100-999 МЕ/мл (57.3 %) обнаруживается при вирусной нагрузке менее 150 МЕ/мл (рис. 16).

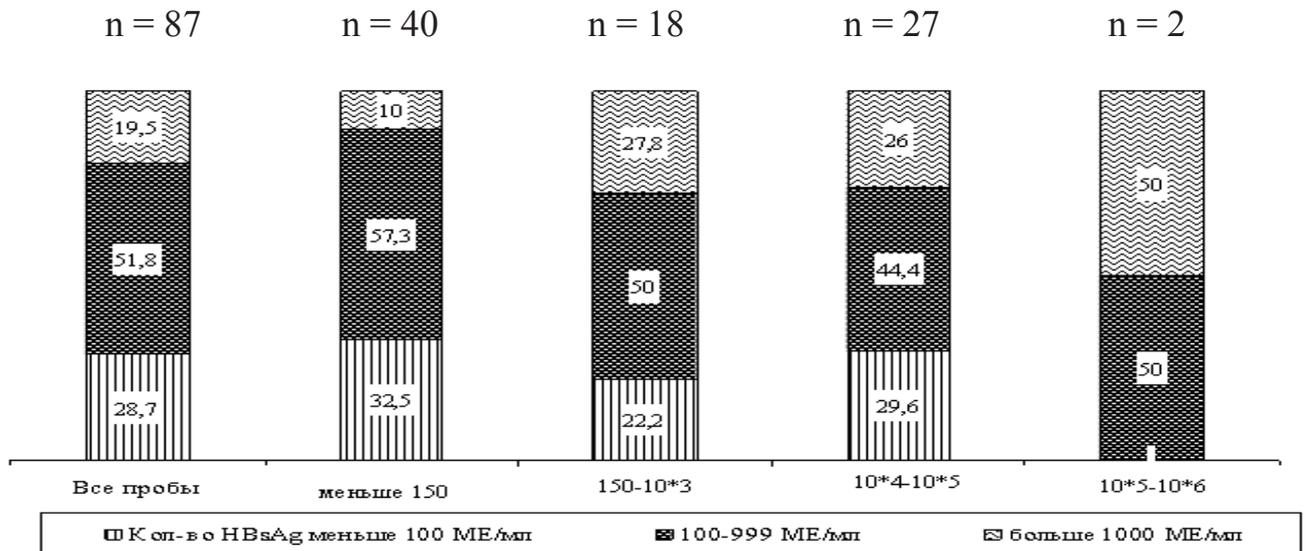


Рис. 16. Взаимоотношение между вирусной нагрузкой и количеством HBsAg

3.4.2. Выявление ДНК вируса ГВ (качественный и количественный анализ)

Обследовано 374 пациентов, средний возраст которых составлял 42 года (табл. 8).

Таблица 8

Характеристика пациентов, обследованных методом ПЦР по полу, возрасту и диагнозу на отдельных территориях Республики Саха (Якутия)

Территории	Количество пациентов			Средний возраст	Национальность		Диагноз				
	муж	жен	всего		азиат	европейские	ХГВ в стадии цирроз	ХГВ			«НОС» HBsAg
								В т.ч. ХГВ+ХГД	В т.ч. ХГВ+ХГС		
Алданский	6	1	7	45	1	6	-	-	-	-	-
Амгинский	6	9	15	41	14	1	-	4	4	1	-
Булунский	8	7	15	45	14	1	1	2	2	-	6
Верхоянский	4	4	8	40	5	3	-	-	-	1	-
Вилуйский	5	20	25	45	25	-	1	-	-	-	-
Жиганский	8	18	26	44	24	2	-	-	-	-	-
Ленский	9	16	25	37	11	14	2	1	1	4	-
Мегино-Кангаласский	2	2	4	32	4	-	-	-	-	-	-
Мирнинский	7	10	17	38	4	13	1	1	1	-	-
Нерюнгринский	36	49	85	41	20	65	-	-	-	-	-
Нюрбинский	6	7	13	41	13	-	-	4	4	-	-
Сунтарский	8	9	17	53	17	-	1	-	-	1	1
Таттинский	3	14	17	38	17	-	-	3	3	1	-
Томпонский	2	6	8	44	6	2	-	2	2	-	-
Хангаласский	9	13	22	44	19	3	5	7	7	2	1
Чурапчинский	9	12	21	40	21	-	-	1	1	1	-
г. Якутск	21	28	49	39	40	9	2	1	1	11	1
ВСЕГО	149	225	374	42	225	119	13	26	26	22	9

У большинства пациентов (94 %) диагностирован ХВГВ, в том числе у 13 из них (3,7 %) болезнь в стадии цирроза. Микст-инфекции ХГВ+ХД и ХГВ+ХГС имели 7,4 % и 6,3 % соответственно.

Таблица 9

Распределение уровней вирусной нагрузки в зависимости от пола больных ХГВ в Республике Саха (Якутия)

Вирусная нагрузка МЕ/мл	Муж		Жен		Всего	
	n	%	n	%	n	%
<150	79	55,7±4,2	109	53,7±3,5	188	54,5±2,7
150-10 ³	22	15,5±3,0	32	15,8±2,5	54	15,7±3,8
10 ³ -10 ⁴	25	17,6±3,2	38	18,7±2,7	63	18,3±2,1
10 ⁴ -10 ⁵	8	5,6±1,9	15	7,4±1,8	23	6,7±1,3
10 ⁵ -10 ⁶	4	2,8±1,4	3	1,5±0,9	7	2,0±0,8
10 ⁶ >	4	2,8±1,4	6	3,0±1,2	10	2,9±0,9
Всего	142	100 %	203	100 %	345	100 %

Распределение уровней вирусной нагрузки у мужчин и женщин почти одинаково. У 55,7 % мужчин и 53,7 % женщин вирусная нагрузка менее 150 МЕ/мл. Вирусная нагрузка 10⁴-10⁵ у женщин выше, 10⁵-10⁶ (различия не достоверны) выше у мужчин (табл. 9, рис. 17).

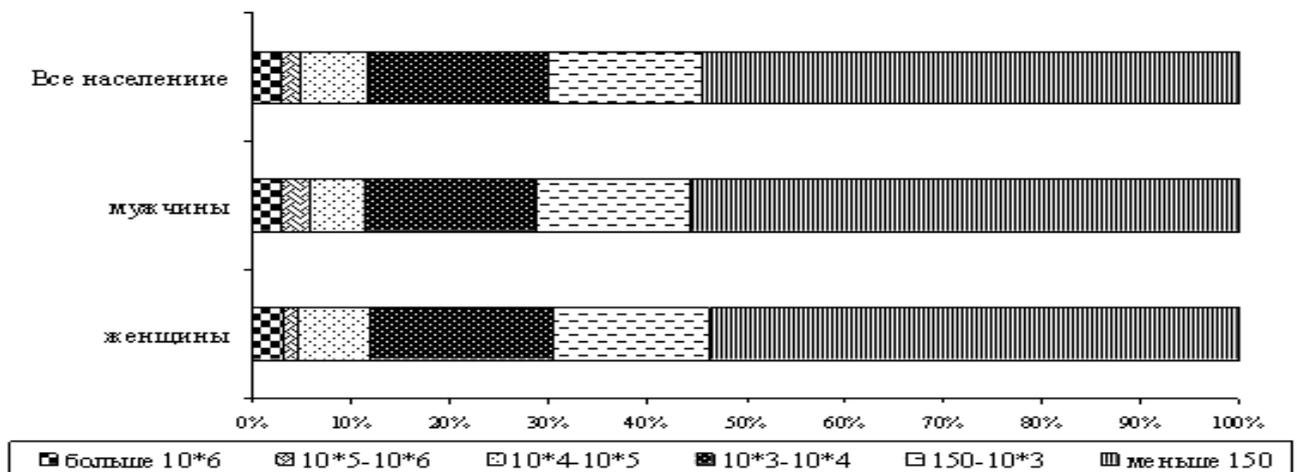


Рис. 17. Распределение уровней вирусной нагрузки в зависимости от пола больных ХГВ в Республике Саха (Якутия)

3.4.3. Выявление HBeAg и анти-HBe

У обследованных пациентов с геномом ВГВ «дикого типа» средний возраст составляет 37 лет, из них два случая HBeAg позитивные (табл. 10).

Таблица 10

Характеристика обследованных пациентов в зависимости от мутации в области pre-core/core и HBeAg/anti-HBe

Характеристика вирусного изолята по pre-core/core	Число пациентов	Средний возраст пациентов	HbeAg-позитивных		Anti-HBe-позитивных		Без HBeAg/anti-HBe	
			Число	Средний возраст	Число	Процент	Число	Процент
Дикий, wt.	28	37	2	7,1±4,9	23	82,2 %±7,2	3	10,7
Только PC-28 codon	20	49	-		18	90 %±6,7	2	10 %±6,7
Только ВСП	6	41	-		5	83,3 %±15,2	1	16,7
ВСП+PC-28	38	67	-		35	32,1 %±7,6	3	7,9
Итого	92	49	2	2,2±1,5	81	88,0 %±3,4	9	9,8±9,6

3.5. Некоторые лабораторные характеристики обследованных больных ХГС – выявление РНК вируса ГС (качественный и количественный анализ)

Вирусная нагрузка исследовалась у 249 больных с ХГС и была разделена на три категории, в зависимости от уровня: низкая ($<300-10^3$ МЕ/мл), промежуточная (10^3-10^5 МЕ/мл) и высокая ($10^5-10^6 >$ МЕ/мл). Существенных отличий по уровню вирусной нагрузки в зависимости от пола больных не наблюдалось (табл. 11).

**Распределение уровней вирусной нагрузки в зависимости от пола больных ХГС
в Республике Саха (Якутия)**

Вирусная нагрузка МЕ/мл	Муж.		Жен.		Всего	
	n	%	n	%	n	%
<300-10 ³	16	18,2	20	12,4	36	14,5
10 ³ -10 ⁵	23	26,1	39	24,2	62	24,9
10 ⁵ -10 ⁶ >	49	55,7	102	63,4	151	60,6
Всего	88	100	161	100	249	100

Таблица 12

**Распределение уровней вирусной нагрузки в зависимости от генотипа вируса
у больных с ХГС в Республике Саха (Якутия)**

Вирусная нагрузка МЕ/мл	Все генотипы	Генотип 1	Генотип 2	Генотип 3
<300-10 ³	0	0	0	0
10 ³ -10 ⁵	12(20,7 %)	7 (15 %)	1 (50 %)	4 (44,4 %)
10 ⁵ -10 ⁶ >	46(79,3 %)	40 (85, %)	1 (50 %)	5 (55,6 %)
Всего	58 (100 %)	47 (100 %)	2 (100 %)	9 (100 %)

Все генотипы, циркулирующие в Республике Саха (Якутия), были обнаружены в группе больных с промежуточной степенью вирусной нагрузки (10³-10⁵МЕ/мл) (табл. 12).

Глава 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

Молекулярно-генетические характеристики изолятов вируса ГВ, выделенных от пациентов с ХГВ из различных территорий Республики Саха (Якутия), изучались с помощью коммерческих тест-систем Inno-LiPA, которые позволяют определять генотип вируса ГВ (без субтипového деления), мутации в области pre-C/C, а также мутации в гене Р, ответственные за развитие устойчивости вируса к нуклеоз(т)идным аналогам. Более детальная характеристика субтиповой принадлежности изолятов производилась на основе секвенирования участков Р/pre-S/S генома длиной 1472 нуклеотида.

Полученные последовательности нуклеотидов подвергались филогенетическому анализу для уточнения субтиповой принадлежности изолята вируса и его генетической связи с другими изолятами.

4.1. Определение генотипов вируса ГВ с помощью теста Inno-LiPA

В основу генотипирования Inno-LiPA HBV положен метод гибридизации амплификационной ДНК ВГВ. В тесте используют праймеры, которые амплифицируют часть гена полимеразы ВГВ с конкретными олигонуклеотидными зондами, иммобилизованных как параллельные полосы на тестах на мембранной подложке.

С помощью указанного теста исследовано 20 образцов, полученных от пациентов с подтвержденной хронической ВГВ-инфекцией, проживающих на различных территориях РС (Я). Распределение выявленных генотипов показано на рис. 18.

Самая большая доля (15 образцов – 75 %) исследованных изолятов ВГВ принадлежала к генотипу D, у 15 % (3 образца) одновременно обнаружены смешанные генотипы A+ D. По одному изоляту (5 %) ВГВ принадлежали к генотипу A и варианту смешанных генотипов C+D. Таким образом, в образцах

20 % пациентов обнаружено одновременное присутствие двух генотипов вируса: A+D, либо C+D.

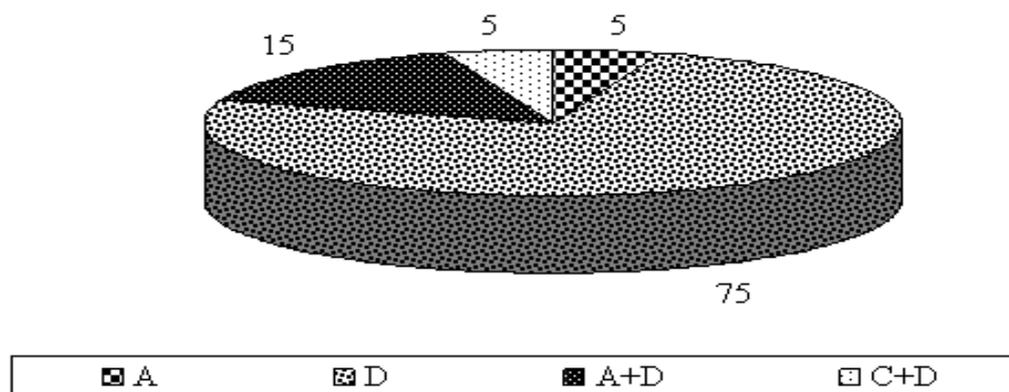


Рис. 18. Результаты определения генотипов вируса ГВ в изолятах, выделенных от пациентов с ХГВ в Республике Саха (Якутия), с помощью теста INNO-LiPA

Распределение генотипов вируса ГВ по районам показано в табл. 13. Повсеместно определяется генотип D.

Таблица 13

Распределение генотипов вируса ГВ по месту жительства больных в Республике Саха (Якутия)

№	Территории	Обследовано	Генотип ВГВ			
			A	D	A+D	C+D
1	Алданский	1		1		
2	Амгинский	1		1		
3	Мирный	1		1		
4	Томпонский	1		1		
5	Чурапчинский	1		1		
6	Вилуйский	1		1		
7	Ленский	2		2		
8	Нюрбинский	1		1		
9	Хангаласский	2		1	1	
10	Верхоянский	2	1	1		
11	г. Якутск	5		4	1	
13	Таттинский	1				1
14	Булунский	1			1	
	ВСЕГО	20	1	15	3	1

4.2. Определение мутаций в области pre-core/core генома ВГВ с помощью теста INNO-LiPA

В отличие от метода генотипирования, при определении мутаций в гене С, амплифицируются участки генома в области основного промотора гена ядерного белка (basal core promoter – BCP) и стоп-кодона Р28. По результатам теста изоляты классифицируются на две большие группы: не имеющие мутаций (так называемый, «дикий» вариант) и имеющие мутации в указанных областях.

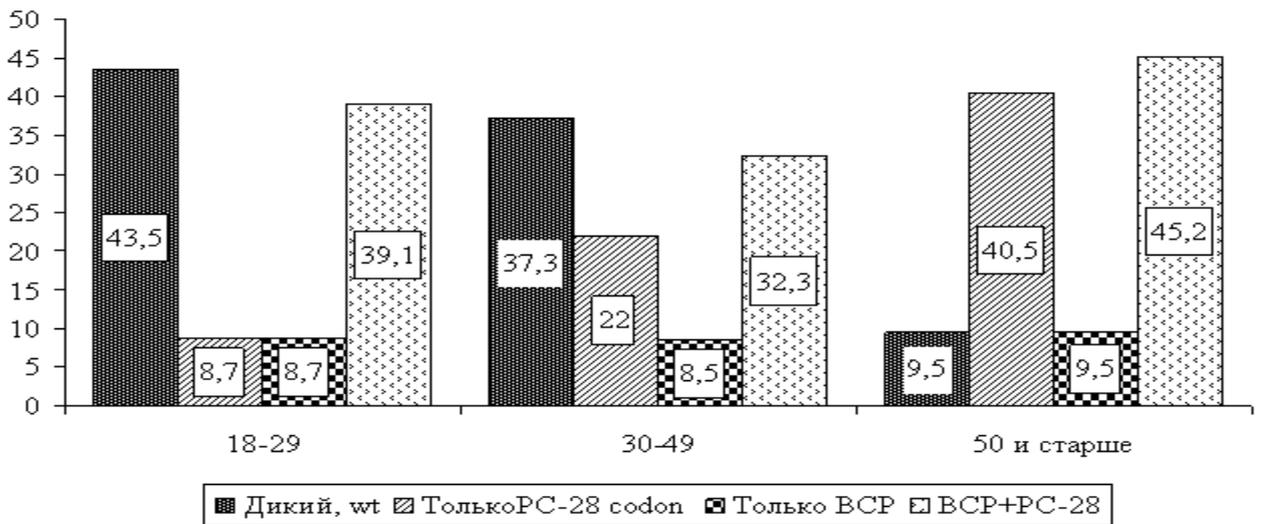


Рис. 19. Частота выявления мутаций в pre-core/core области в изолятах вируса ГВ, выделенных в Республике Саха (Якутия), в зависимости от возраста пациентов

Таблица 14

Частота выявления мутаций в pre-core/core области в изолятах вируса ГВ, выделенных в Республике Саха (Якутия), в зависимости от возраста у пациентов мужского пола

Характеристика вирусного изолята по pre-core/core	18–29 лет			30–49 лет			50+			Всего		
	абс.	%	m	абс.	%	m	абс.	%	m	абс.	%	m
«Дикий» wt. тип	7	53,8	±13,8	11	44,0	±9,9	0	0		18	31,6	±6,2
Только PC-28 codon	1	7,7	±7,4	3	12,0	±6,5	9	47,4	±11,5	13	22,8	±5,6
Только BCP	1	7,7	±7,4	1	4,0	±3,9	1	5,3	±5,1	3	5,3	±3,0
BCP+PC-28	4	30,8	±12,8	10	40,0	±9,8	9	47,4	±11,5	23	40,4	±6,5
Всего	13			25			19			57		

**Частота выявления мутаций в pre-core/core области в изолятах вируса ГВ,
выделенных в Республике Саха (Якутия), в зависимости от возраста
у пациентов женского пола**

Характеристика вирусного изолята по pre-core/core	18–29 лет			30–49 лет			50+			Всего		
	абс.	%	m	абс.	%	m	абс.	%	m	абс.	%	m
«Дикий» wt. тип	3	30,0	±14,5	11	32,3	±8,1	4	16,0	±7,3	18	26,1	±5,3
Только РС-28 codon	1	10,0	±9,5	10	29,4	±7,9	8	32,0	±9,3	19	27,5	±5,4
Только ВСР	1	10,0	±9,5	3	8,8	±4,9	3	8,8	±5,7	8	11,6	±3,9
ВСР+РС-28	5	50,0	±15,8	9	26,5	±7,7	10	26,5	±8,8	24	34,8	±5,7
Всего	10			33			25			69		

Таблица 16

**Частота выявления мутаций в pre-core/core области в изолятах вируса ГВ,
выделенных в Республике Саха (Якутия), в зависимости от возраста пациентов**

Наличие мутаций в pre-core/core области генома	Мужчины и женщины											
	15–29			30–49			50+			Всего		
	абс.	%	m	абс.	%	m	абс.	%	m	абс.	%	m
«Дикий» wt. тип	10	43,5	±10,3	22	37,3	±6,3	4	9,5	±4,4	36	28,6	±4,0
Только РС-28 codon	2	8,7	±5,9	13	22,0	±5,4	17	40,5	±7,4	32	25,0	±3,9
Только ВСР	2	8,7	±5,9	5	8,5	±3,6	4	9,5	±4,4	11	8,7	±2,5
ВСР+РС-28	9	39,1	±10,2	19	32,2	±6,1	19	45,2	±7,5	47	37,0	±4,3
Всего	23	100		59	100		42	100		126	100	

В Якутии чаще встречается мутация в области основного промотора гена С и мутация в области стоп-кодона 28 (ВСР+РС28), она составляет $37.3 \pm 4,3$ % и распространена в категории людей старше 50 лет, вирус дикого типа – $28,6 \pm 4,0$, и встречается у лиц 18-29 лет (43,5 %) и у лиц среднего возраста (37,3 %) (рис. 19). Вирус «дикого» типа встречается чаще у мужчин 18-29 лет (табл. 14), у женщин распространенной мутацией является ВСР+РС-28 и составляет 50 % (табл. 15). Как среди мужчин, так и среди женщин старше 50 лет наиболее распространенной мутацией является мутация в области стоп-кодона 28 (РС28) (табл. 16, рис. 19). В целом, как среди мужчин, так и среди женщин, независимо от возраста,

наиболее распространенной мутацией является мутация в области стоп-кодона 28 (VCP+PC28), она составляет в среднем 37,3 % (у мужчин – 40,3 %, у женщин – 34,8 %) (рис. 20).

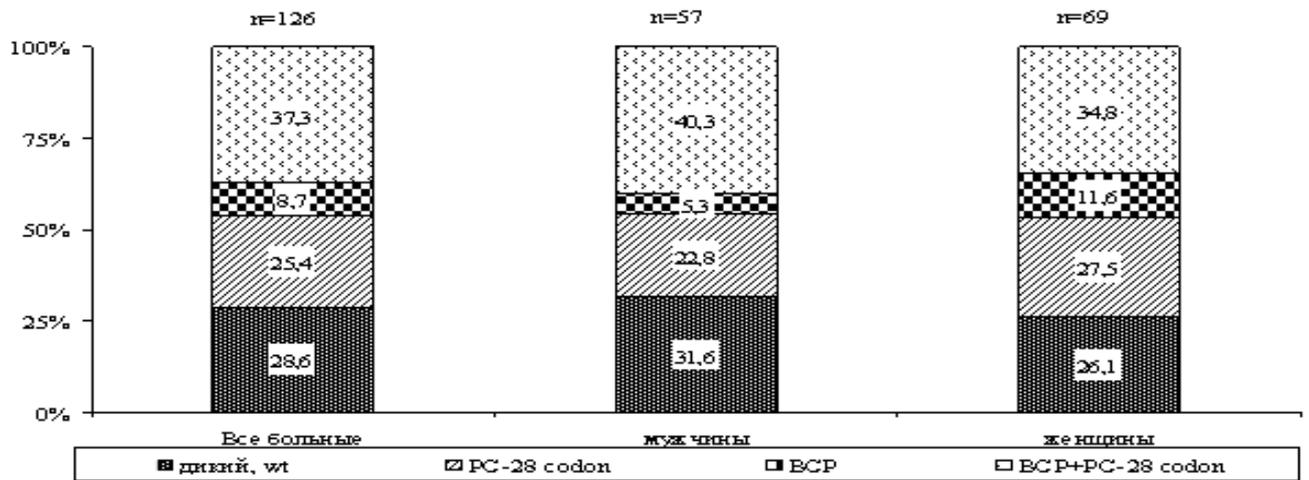


Рис. 20. Частота (%) выявления мутаций в pre-core/core области в изолятах вируса ГВ у больных разного пола в Республике Саха (Якутия)

У обследованных больных, независимо от возраста, наиболее часто выявляется изолят VCP+PC-28 codon – 47 мутаций, далее «дикий», wt тип – 36, PC-28 codon 32, реже других VCP – 11 выявленных мутаций.

Изолят VCP+PC-28 codon в равной степени выделяется в возрастных категориях 30–49 (32,2 %) и 50 и старше – по 19 мутаций, в меньшей степени данный изолят выделяется в возрастной группе 15-29 лет – 9 мутаций.

Вирусный изолят PC-28 codon чаще других встречается в возрастной категории 50 лет и старше – 17 выявленных мутаций, в возрастной группе от 30-49 лет – 13 мутаций, всего 2 мутации выявлено в возрастной категории 15-29 лет.

Наиболее низка во всех возрастных категориях выявляемость вирусного изолята VCP – 5 мутаций в возрастной категории 30-49 лет, 4 – в категории 50+ и 2 в категории 15-29 лет.

Вирусный изолят «дикий», wt тип наиболее часто выделяется у лиц в возрастной категории 30-49 лет – 22 выявленные мутации, 10 мутаций выявлено у лиц в возрастной категории 15-29 лет и 4 мутации выявлено в возрастной категории 50 лет и старше.

У обследованных больных, независимо от возраста, наиболее часто выявляется мутация в области основного промотора гена С и мутация в области стоп кодона 28 (ВСР+РС-28 codon) – 37,3 %, далее «дикий», wt тип – 28,6 %, РС-28 codon – 25,4 %, реже других ВСР – 7,1 % выявленных мутаций.

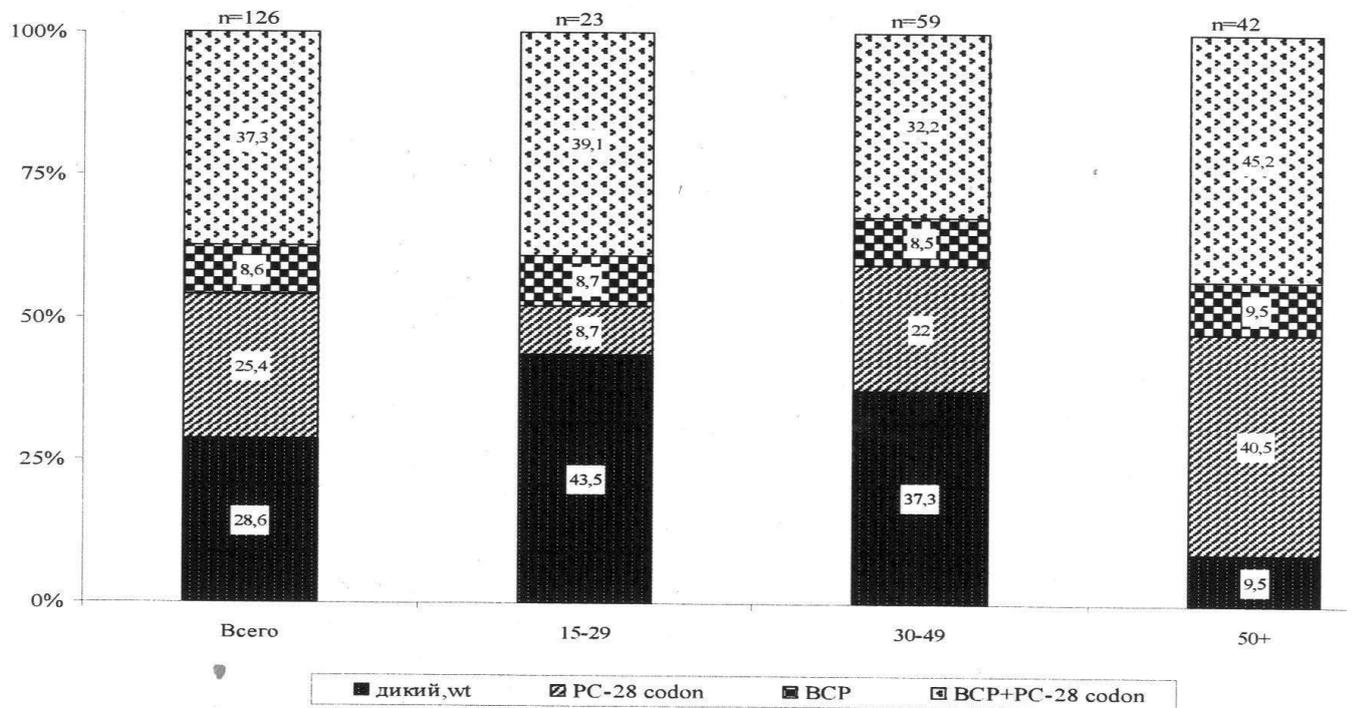


Рис. 21. Частота выявленных мутаций в pre-core/core области в изолятах вируса гепатита В в разных возрастных группах

В возрастной категории 15–29 лет наиболее высока частота выявления изолята без мутаций – 43,5 %, ВСР+РС-28 codon – 39,1 %, ВСР и РС-28 codon – по 8,7 %.

В группе 30–49 лет также высока частота выявления изолята без мутаций – 37,3 %, немногим менее частота выявления изолята ВСР+РС-28 codon – 32,2 %, частота выявления изолята РС-28 codon – 22 %, ВСР – 8,5 %.

В группе 50 лет и старше наиболее высока частота выявления изолята ВСР+РС-28 codon – 45,2 %, достаточно высока частота выявления изолята РС-28 codon – 40,5 %, по 9,5 % составляет частота выявления изолятов ВСР и дикий, wt. (рис. 21).

Наибольшее число изолятов – «дикий wt» выявлено у больных в возрастной категории 30-49 лет – у 22 больных; в группе 15-29 лет – у 10 больных и в группе 50 лет и старше – у 4 больных.

Изоляты «РС-28 codon» определялись чаще всего в группе больных 50+ – у 17 человек; в группе 30-49 лет они выявлены у 13 больных и в группе 15-29 лет – у 2 больных. Изоляты ВСР в наименьшем количестве выявлялись у больных в возрастной категории 15-29 лет – у 2 больных, в категории 50+ они выявлены у 4 больных и в группе 30-49 лет – у 5 больных. Изоляты «ВСР+РС-28 codon» в основном обнаруживались в возрасте 30-49 и 50+ – по 19 больных, в возрастной группе 15-29 лет – у 9 больных (табл. 16).

В выделенных изолятах дикий wt наблюдается в возрастной категории 30-49 лет – 61,1 %, 27,8 % составляет возрастная группа 15–29 лет и 11,1 % – группа 50 лет и старше.

В выделенных изолятах РС-28 codon наивысший процент составляют пациенты группы 50+ – 53,1 %, пациенты группы 30–49 лет составляют 40,6 % и категория 15-29 лет – 6,3 %. Наименьший удельный вес в выделенных изолятах ВСР составляют больные в категории 15-29 лет – 18,2 %, 36,4 % – в категории 30-49 лет и 45,5 % составляют пациенты группы 50 лет и старше.

В выделенных изолятах ВСР+РС-28 codon удельный вес пациентов возрастных групп 30–49 лет и 50+ составляет по 40,4 %, возрастная группа 15-29 лет составляет 19,1 %.

Распределение выделенных изолятов с мутациями в области pre-core/core по месту проживания больных (районами Республики Саха (Якутия)) показано в табл. 17.

Распределение выделенных изолятов с мутациями в области pre-core/core по месту проживания больных

Территории	Обследовано	Характеристика изолятов по pre-core/core				
		«Дикий»	Только РС-28	Только ВСР	ВСР + РС-28	ВСР+ дикий
г. Якутск	15	9	1	1	3	1
Хангаласский	10	2	5	1	2	-
Нерюнгринский	22	2	6	3	11	-
Таттинский	8	4	1	1	2	-
Нюрбинский	6	3	-	-	2	1
Чурапчинский	5	2	1	2	-	-
Сунтарский	5	-	1	1	3	-
Булунский	5	2	2	-	1	-
Вилуйский	9	4	3	-	2	-
Ленский	8	1	1	-	6	-
Мирный	8	2	1	-	5	-
Амгинский	5	3	2	-	-	-
Верхоянский	5	2	3	-	-	-
Алданский	7	-	1	-	6	-
Томпонский	7	-	3	-	4	-
Жиганский	1	-	1	-	-	-
ВСЕГО	126	36	32	9	47	2

4.3. Определение мутаций лекарственной устойчивости изолятов вируса ГВ с помощью теста Inno-LiPA

Нами была проанализирована частота выявления первичной лекарственной резистентности ВГВ в обследованных районах Республики Саха (Якутия) (табл. 18).

Таблица 18

Распределение изученных изолятов ВГВ в зависимости от наличия мутации в Р области генома и территории выделения

Территории	Наличие мутаций в гене Р	
	Дикий тип	Мутация
1	2	3
Алданский	5	1* Г. L-173 ВСР+РС cod 28 Му ДНК <150, НВсАб полож НВсАg-114 МЕ/мл
Амгинский	5	0
Булунский	4	0

1	2	3
Виллойский	4	0
г. Якутск	8	0
Ленский	4	0
Мирный	5	0
Нерюнгринский	12	0
Нюрбинский	5	0
Сунтарский	4	1** Ф. Т-194 ВСП+РС cod 28 Му ДНК 10 ³ HBsAg-122.6 ME/ml. HBeAg/HBcAb отр.
Таттинский	5	0
Томпонский	4	0
Хангаласский	9	0
Чурапчинский	5	0

*(лечение не получала) женщина 40–49 лет, армянка. ХВГ с 2011 г.

** (лечение не получала) женщина 20–28 лет, якутка. ХВГ с 2004 г.

Были найдены мутации в области гена полимеразы, отвечающие за развитие лекарственной устойчивости L-173 ВСП+РС codon 28 Му в Алданском улусе и Т-194 ВСП+РС codon 28 Му в Сунтарском. Компенсаторные мутации, как V173L, обнаруживаются в сайтах А и В домена обратной транскриптазы ДНК-полимеразы (Li, MW, 2007) и впервые были обнаружены у пациентов с рецидивом ВГВ-инфекции после трансплантации печени на фоне приема ламивудина (Ling, R., 1996; Villeneuve, J., 2003). Не так давно была описана резистентность к тенофовиру. Она ассоциирована с мутациями, локализованными в В- и С-сайтах домена ДНК-полимеразы ВГВ (A194Т, L180М, M204V). По результатам исследований G. Schmutz выявлено, что чаще всего указанные мутации встречаются у ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов, прошедших лечение тенофовиром (Guenther S. et al., 2006).

Полученные данные свидетельствуют о циркуляции на территории Якутии изолятов вируса ГВ резистентных к ламивудину и тенофовиру. В обоих случаях мутации в гене полимеразы сочетались с мутациями в pre-C/C области генома (табл. 19).

Взаимоотношения между изолятами с мутациями в pre-core/core области и мутациями в области Р области генома, отвечающих за резистентность к нуклеоз(т)идным аналогам

Мутации в области pre-core/core генома	Мутации в области Р генома	
	Дикий тип	Мутация
Дикий, wt.	22	-
Только РС- 28 codon	19	-
Только ВСП	5	-
ВСП+РС-28	23	2 (лечение не получали)
ВСП+ дикий	2	-
ВСЕГО	72	2 (лечение не получали)

4.4. Секвенирование изолятов вируса ГВ, выделенных от больных ХГВ из разных районов Республики Саха (Якутия), и их филогенетический анализ

Секвенирование 35 изолятов вируса ГВ, полученных от больных ХГВ из 12 территорий республики, проведено на участке генов Р и pre-S/S длиной 1472 нуклеотида. Филогенетический анализ всех нуклеотидных последовательностей изученных изолятов показал, что в подавляющем большинстве случаев (85,7 %) изоляты вируса представлены субгенотипом D2. В остальных случаях (14,3 %) изоляты принадлежали к субгенотипу D3. Обращает внимание, что изоляты группируются в крупные и более мелкие кластеры (рис. 22), что свидетельствует о том, что близкородственные вирусы вовлекались в одну эпидемическую цепь распространения ВГВ. При этом эти близкородственные изоляты ВГВ были привязаны к одной или нескольким близлежащим территориям. Например, достаточно большой кластер сформирован изолятами 591, 562, 541, 546, 558, 785, 564, 569 и 584, большая часть которых выделена в Вилюйском улусе и в Таттинском улусе. Кластер изолятов, принадлежащих к субтипу D3, также сформирован образцами из, в основном, одного улуса – Чурапчинского. В этом улусе не было изолятов субтипа D2, что позволяет предполагать об определенной автономности распространения ВГВ субтипа D3 и внедрении его в циркуляцию. Следующее

важное заключение, которое можно сделать, анализируя филогенетическое дерево, касается длительности циркуляции одного и того же изолята вируса. Например, все в том же кластере из изолятов Вилюйского улуса первые пациенты с ХГВ, вставшие на диспансерный учет, относятся к 1994-1996 гг., а последние – к 2012 г. Наиболее близкородственные изоляты субтипа D3 из Чурапчинского района выделены от пациентов, выявленных в 1984 г. (№48) и 2009 г. (№10) соответственно. Таким образом, выявлено несколько групп изолятов ВГВ, которые обладают высокой степенью генетического родства, и они встречаются в различных районах республики. Это указывает на то, что на территориях республики происходило распространение нескольких штаммов вируса одного субтипа.

Естественным вопросом, который возникает при проведении филогенетического анализа изолятов, является вопрос о происхождении выявленных вирусов. Для этих целей в анализ включены и изоляты ВГВ того же самого субтипа из базы данных GenBank. На рис. 23 представлена дендрограмма, в которой объединены в большей степени изоляты субтипа D2. На филогенетическом дереве четко выделяется кластер изолятов из Вилюйского и Таттинского районов. Наиболее близкими к ним являются вирусы, выделенные ранее в Хабаровском крае и Ямало-Ненецком АО. Имеются кластеры изолятов, которые близки к вирусам этого субтипа выделенных в Эстонии (EU594413), Польше (GQ477512), Кемерово (EU594417) и Санкт-Петербурге (неопубликованные данные лаборатории вирусных гепатитов «2102 10 SPb»). В то же время на филогенетическом дереве видны значительные различия между циркулирующими изолятами субтипа D2 на территории разных районов.

И, наконец, рис. 24 отражает филогенетическое дерево, построенное с привлечением данных об изолятах ВГВ субтипа D3. Важно отметить, что изоляты, выделенные от пациентов Чурапчинского улуса и Хангаласского улуса и на этом дереве группируются вместе и оказываются наиболее близкими к вирусу, обнаруженному ранее в Индонезии (AB644325). Кроме этого, достаточно генетически близки к этим изолятам, вирусы выделенные ранее в Санкт-Петербурге (изолят №2096 10, неопубликованные данные лаборатории вирусных гепатитов) и изолят 2006 г. из США (JN604318).

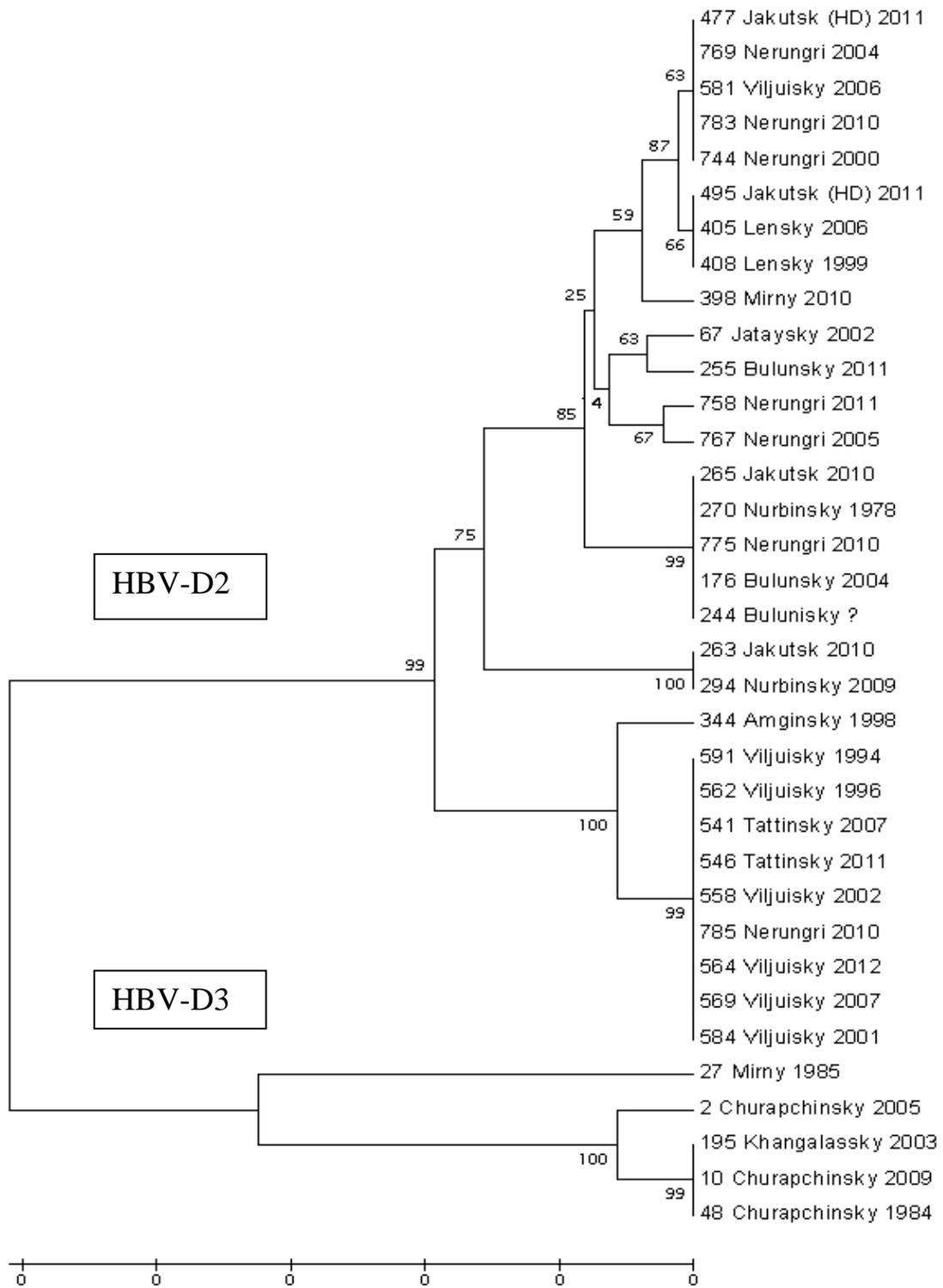


Рис. 22. Дендрогамма, полученная на основе секвенирования участков P/pre-S/S (1472 нуклеотида) изолятов ДНК ВГВ от пациентов с хроническим ГВ из Якутии.

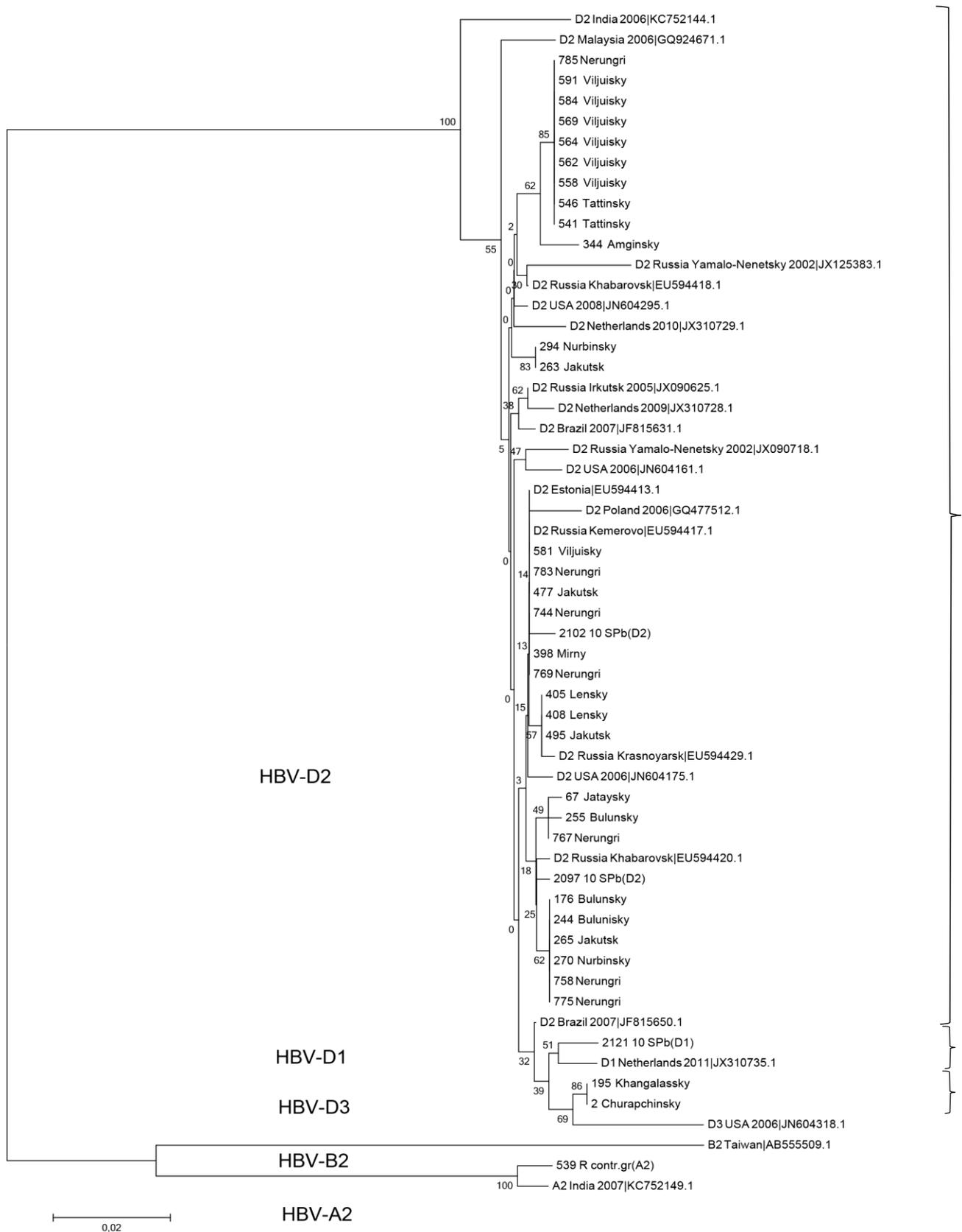


Рис. 23. Дендрограмма, полученная на основе секвенирования участков P/pre-S/S (1472 нуклеотида) изолятов ДНК ВГВ от пациентов с хроническим ГВ из Якутии и референтных изолятов субтипа D2 из базы данных GenBank. Указаны номера изолятов и их территориальное происхождение

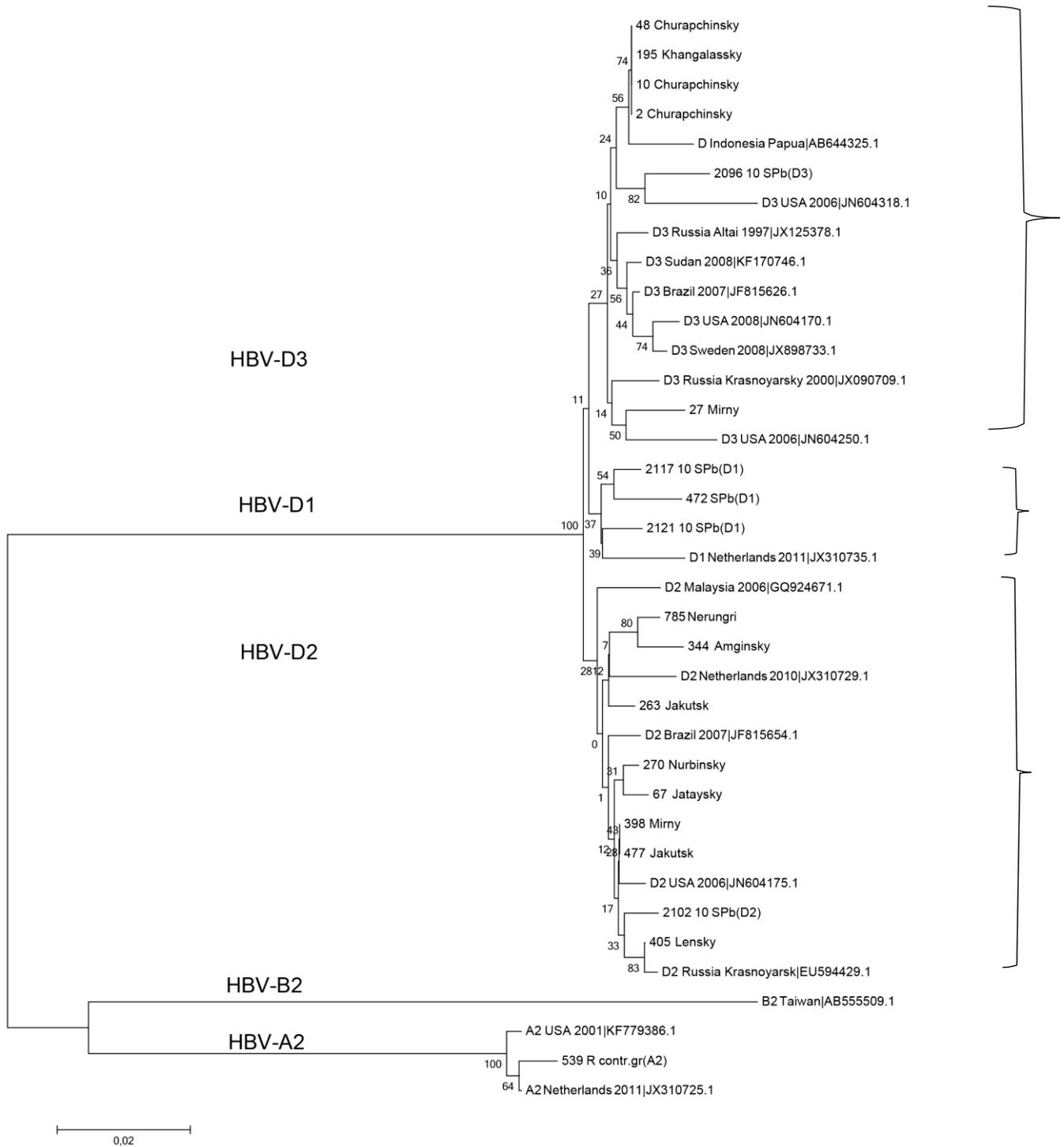


Рис. 24. Дендрограмма, полученная на основе секвенирования участков P/pre-S/S (1472 нуклеотида) изолятов ДНК ВГВ от пациентов с хроническим ГВ из Якутии и референтных изолятов субтипа D2 из базы данных GenBank. Указаны номера изолятов и их территориальное происхождение

**Глава 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ИЗОЛЯТОВ
ВИРУСА ГЕПАТИТА С, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ РАЙОНАХ
РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)**

Молекулярно-генетические характеристики циркулирующих изолятов вируса ГС изучались с помощью двух общепринятых методов: ПЦР с типоспецифическими праймерами и секвенирования ограниченных участков генома. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика выделенных изолятов вируса ГС оценивалась с помощью филогенетического анализа последовательностей нуклеотидов в этих изолятах.

5.1. Определение генотипов вируса ГС с помощью ПЦР с типоспецифическими праймерами

ПЦР с типоспецифическими праймерами позволяет установить принадлежность выделенного изолята РНК вируса к определенному генотипу и наиболее распространенным субтипам. В настоящем исследовании проводилось определение только принадлежности к определенному генотипу выделенной РНК от 58 пациентов с ХГС с помощью тест-системы производства Вектор-Бест (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Возможности этой тест-системы ограничивались генотипами 1, 2 и 3.

Таблица 20

**Распределение генотипов в зависимости от пола больных ХГС
в Республике Саха (Якутия)**

Генотип	Мужчины		Женщины		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	17	77,3	30	83,3	47	81,0
2	-	-	2	5,6	2	3,5
3	4	18,2	4	11,1	8	13,8
1+3	1	4,5	-	-	1	1,7
Всего	22	100	36	100	58	100

Результаты определения генотипов суммированы в табл. 20. Данные представляют структуру выявленных генетических вариантов, как в целом, так и в зависимости от пола. Генотип 1 обнаружен у 47 пациентов (81 %), генотип 2 – у 2 больных (3,5 %) и генотип 3 – у 8 (13,8 %). У одного (1,7 %) пациента были идентифицированы два генотипа (1+3) одновременно. Подобное распределение генотипов с абсолютным доминированием генотипа 1 было примерно одинаковым у мужчин и женщин.

При анализе выявляемости отдельных генотипов вируса ГС в различных возрастных группах установлено, что с наибольшей частотой во всех группах определялся генотип 1 – от 57,1 % в возрастной группе 30-39 лет до 90,9 % – в группе 40-49 лет. Обе находки генотипа 2 были обнаружены у лиц старше 40 лет, а большинство случаев генотипа 3 (6 из 8) были выявлены у лиц моложе 40 лет (табл. 21). В итоге, если всех обследованных объединить в две возрастные группы до 40 лет и старше 40 лет, то обнаруживается достаточно четкая тенденция к большей частоте генотипов 1 и 2 у лиц старше 40 лет (рис. 25) и относительно высокая частота генотипа 3 у лиц моложе 40 лет.

Таблица 21

Частота отдельных генотипов ВГС в различных возрастных группах обследованных пациентов с ХГС в Республике Саха (Якутия)

Генотип	Возрастные группы (в годах)			
	18-29	30-39	40-49	Старше 50
1 (n=47)	5 (83,3 %)	8 (57,1 %)	10 (90,9 %)	24 (88,9 %)
2 (n=2)	0	0	1 (9,1 %)	1 (3,7 %)
3 (n=8)	1 (16,7 %)	5 (35,7 %)	0	2 (7,4 %)
1+3 (n=1)	0	1 (7,2 %)	0	0
Не 1 (n=11)	1 (16,7 %)	6 (42,9 %)	1 (9,1 %)	3 (11,1 %)
Всего	6	14	11	27

Территориальное распределение выявленных генотипов демонстрирует превалирование генотипа 1 ВГС во всех обследованных районах республики за исключением Томпонского района, в котором обнаружены пациенты, инфицированные вторым генотипом вируса. Находки генотипа 3 обнаружены, в

основном, в Южной части Якутии (Алданский, Ленский, Нерюнгринский улусы и г. Мирный), а также в г. Якутске и в Томпонском районе. Пациент, инфицированный одновременно вирусами двух генотипов 1+3, выявлен в Амгинском районе (табл. 22).

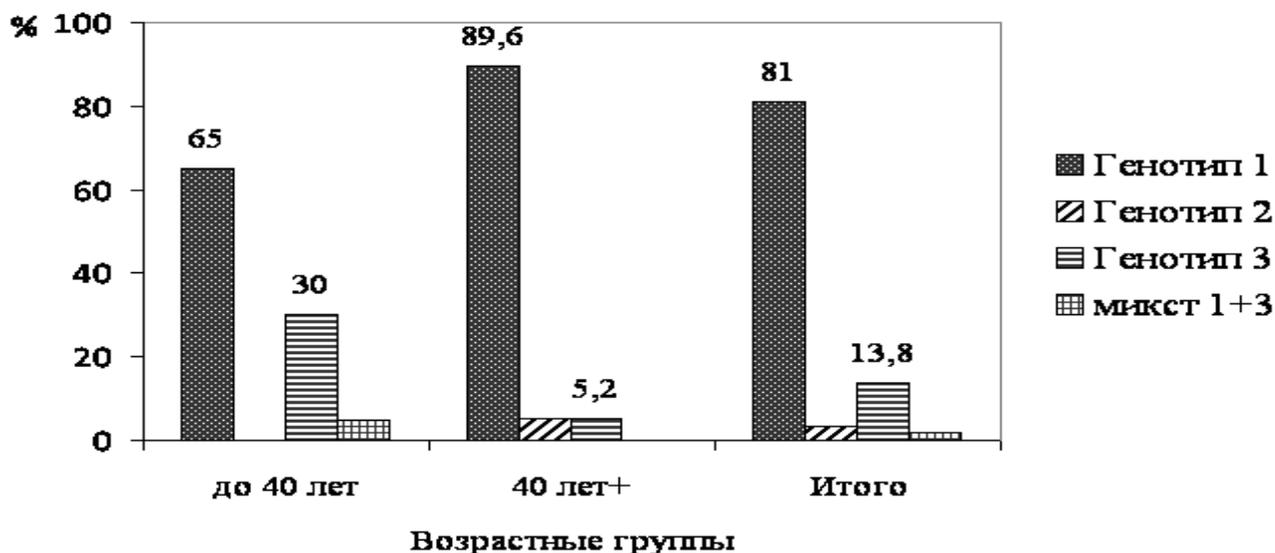


Рис. 25. Частота отдельных генотипов ВГС в двух возрастных группах (до 40 лет и старше 40 лет) у обследованных больных с ХГС в Республике Саха (Якутия)

Таблица 22

Территориальное распределение генотипов вируса ГС, установленных с помощью ПЦР с типоспецифическими праймерами в Республике Саха(Якутия)

Территория	1 генотип	2 генотип	3 генотип	1+3 генотип	Всего
Алданский	1	0	3	0	4
Амгинский	3	0	0	1	4
Верхоянский	3	0	0	0	3
Вилуйский	2	0	0	0	2
Ленский	3	0	1	0	4
Мирный	2	0	1	0	3
Нерюнгринский	5	0	1	0	6
Нюрбинский	3	0	0	0	3
Сунтарский	3	0	0	0	3
Татгинский	2	0	0	0	2
Томпонский	0	2	1	0	3
Хангаласский	3	0	0	0	3
Чурапчинский	3	0	0	0	3
г. Якутск	13	0	1	0	14
РС (Я)	47	2	8	1	58

5.2. Секвенирование изолятов вируса ГС, выделенных от больных ХГС из разных районов Республики Саха (Якутия), и их филогенетический анализ

Согласно плану исследования, в 59 изолятах вируса ГС, выделенных от больных с диагнозом хронический ГС, были определены последовательности нуклеотидов в области NS5b (РНК зависимая РНК полимеразы). Этот регион генома используется многими исследователями для уточнения взаимосвязи между отдельными изолятами вируса ГС. Филогенетический анализ проводился после выравнивания сиквенсов длиной 377 нуклеотидов. Изоляты вируса были выделены в 15 различных улусах и городах республики (Нюрбинский, Томпонский, Амгинский, Верхоянский, Ленский, Сунтарский, Хангаласский, Чурапчинский, Вилуйский, Таттинский, Алданский, г. Якутск, Мирный, Нерюнгри). Взаимоотношение выделенных изолятов между собой в пределах республики показано на филогенетическом дереве (рис. 26). Согласно филогенетическому анализу, выделенные изоляты вируса ГС относились к трем генотипам (ВГС-1, ВГС-2, ВГС-3) и пяти субтипам (1a, 1b, 2a, 3a, 3g). В структуре выделенных субтипов вируса ГС доминировали изоляты, относящиеся к субтипу 1b (52 изолятов - 88,1 %). Остальные субтипы выявлены в единичных случаях (субтип 1a – 1,7 %, 2a – 6,8 %, 3a – 1,7 %, 3g – 1,7 %). Важно отметить, что впервые на территории России у пациента, получающего лечение гемодиализом в г. Якутске, выявлен субтип вируса ГС 3g, циркуляция которого ранее выявлена в Великобритании (больной с Пакистана) и Северной Америке. От пациентов в возрасте до 40 лет (22 человека) выделены изоляты вируса только субтипа 1b, а у больных старше 40 лет (37 человек) также определялись изоляты субтипов 1a, 2a, 3a, 3g. На этой же дендрограмме видно данные о постановке на диспансерный учет больных хроническим гепатитом, из которых следует, что близкородственные изоляты вируса ГС определялись у пациентов, выявленных в широкий интервал времени, начиная с 1973 г. с диагнозом «ни А ни В» (изолят № 14, г. Мирный), 1977 г. (изолят №239, Амгинский улус) и заканчивая 2011 г. (изоляты № 144, Верхоянский улус, № 347, Ленский улус и еще 12 изолятов разных субтипов).

В связи с этим особый интерес представляет определение местоположения указанных штаммов на филогенетическом дереве при их сравнении с изолятами,

выделенными в разных странах мира. Такое сравнение может дать ценную информацию об импортировании штаммов вируса ГС на территорию республики.

Филогенетическое дерево, представленное на рис. 27, построено с акцентом на изолятах субтипа 1b. На дендрограмме показаны не только изоляты, выделенные в Якутии, но также и изоляты из других стран. Обращает на себя внимание, что две большие группы изолятов из Якутии группируются вместе и не перемешиваются на дереве с изолятами из других стран. Это свидетельствует о том, что существует, по крайней мере, две эпидемические цепи связанных между собой случаев ГС на разных территориях Республики Саха (Якутия) в период с 1992 по 2011 г. (изоляты №№ 287, 285, 254, 227, 298, 295, 148, 144, 207, 211, 209, 206, 200, 347, 239, 203, 130, 488, 511, 581, 563, 527, 111, 53, 14, 5, 289, 271, 378, 462, 444) – табл. 23. На дендрограмме они показаны фигурными скобками.

Эти штаммы вируса ГС циркулировали прежде и, по-видимому, продолжают циркулировать на обширных пространствах Республики Саха, поскольку они выявлялись у пациентов из разных улусов, выявленных еще в 90-е годы и вплоть до 2012 г. (последний год наблюдения в настоящем исследовании). Наряду с этим, на филогенетическом дереве видны и другие связанные между собой изоляты вируса ГС субтипа 1b, также группирующиеся вместе, но отличающиеся от изолятов, сформировавших вышеописанную эпидемическую цепь. Как правило, эти более мелкие кластеры включают и изоляты, выделенные в других странах, в основном, в США и Японии. Например, изоляты, выделенные в 2013 году в г. Нерюнгри (№ 857, 854, 853, 820), близкородственны изоляту, выделявшемуся в США (EU482849) еще в 1989 г. Изолят №171 от пациента из Хангаласского улуса наиболее близок к изолятам, выделенным в Германии в 2003 и 2004 гг., а также в США в 2005 г. Изоляты №286 из Якутска и 228 из Нюрбинского района также не группировались с другими изолятами из Якутии, что свидетельствует о существовании и других эпидемических цепей распространения изолятов вируса субтипа 1b.

Единственный изолят субтипа 1a был выделен от больного, получающего лечение гемодиализом в г. Якутске (изолят №395). Он группировался с изолятами, выделенными в США, где субтип 1a является эндемичным.

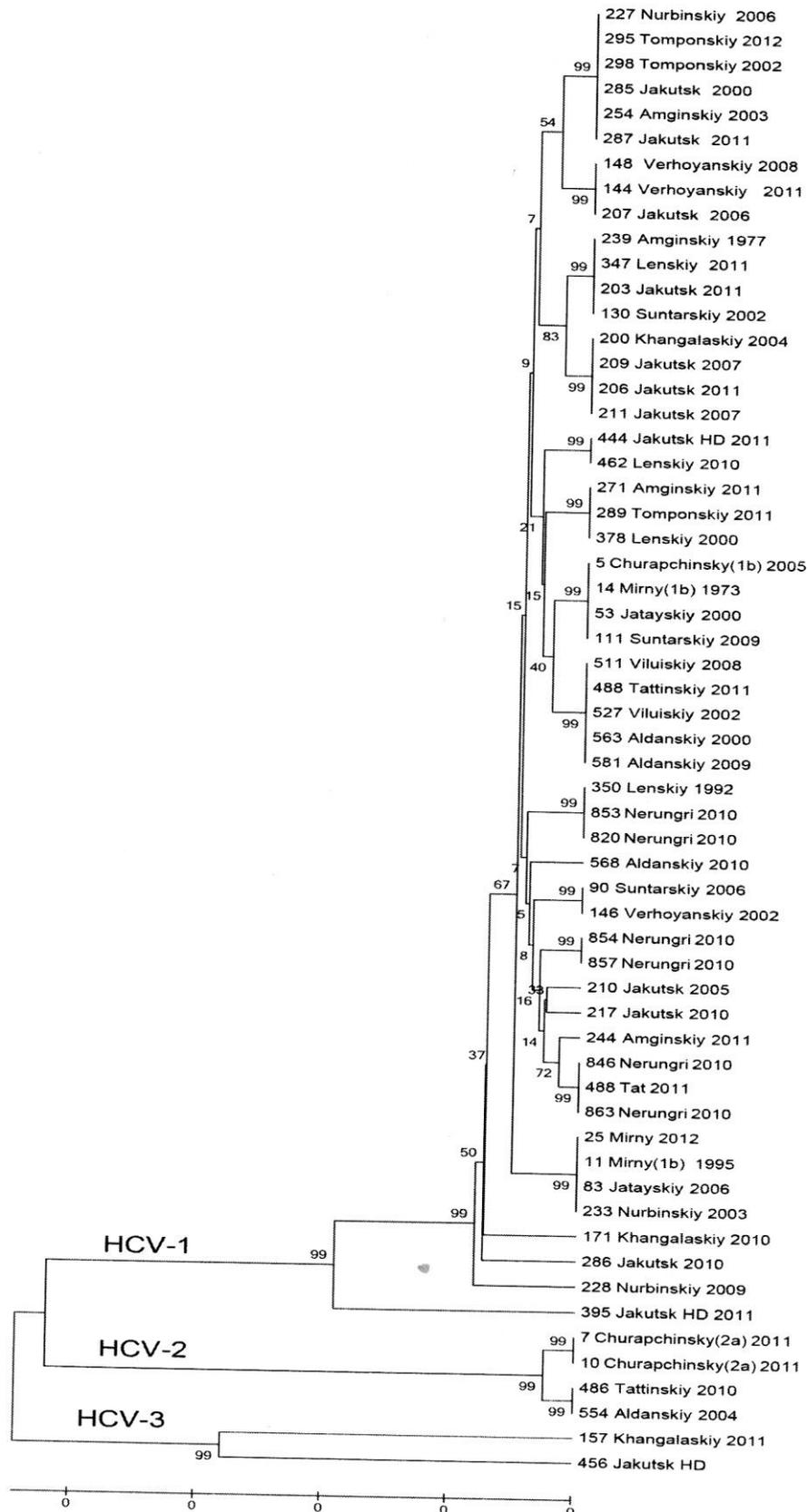


Рис. 26. Дендрограмма, полученная на основе секвенирования участков NS5b (377 нуклеотида) изолятов РНК ВГС от пациентов с хроническим гепатитом С из Якутии. Указаны номера изолятов и их территориальное происхождение и год постановки пациента на диспансерный учет (выявления хронического гепатита)

Близкородственные изоляты вируса ГС субтипа 1b, сформировавшие одну эпидемическую цепь передачи (филогенетическое дерево на рис. 26)

№ изолята на дендрограмме	Территория выделения изолята	Год выявления пациента с ХГС
287	г. Якутск	2011
285	г. Якутск	2000
207	г. Якутск	2006
211	г. Якутск	2007
209	г. Якутск	2007
206	г. Якутск	2011
203	г. Якутск	2011
444	г. Якутск	2011 (ОГД)
53	г. Якутск (п. Жатай)	2000
254	Амгинский улус	2003
239	Амгинский улус	1977 (с диагнозом «ни А ни В)
271	Амгинский улус	2011
227	Нюрбинский улус	2006
298	Томпонский улус	2002
295	Томпонский улус	2012
289	Томпонский улус	2011
148	Верхоянский улус	2008
144	Верхоянский улус	2011
200	Хангаласский улус	2004
347	Ленский улус	2011
378	Ленский улус	2000
462	Ленский улус	2010
130	Сунтарский улус	2002
111	Сунтарский улус	2009
488	Таттинский улус	2011
511	Вилуйский улус	2008
527	Вилуйский улус	2002
14	г. Мирный	1973(с диагнозом «ни А ни В)
5	Чурапчинский улус	2005

Четыре изолята вируса ГС, выделенные в Чурапчинском, Таттинском и Алданском улусах (изоляты № 7, 10, 486, 554) не группировались на филогенетическом дереве с изолятами субтипа 1b, что позволило предположить их принадлежность к другому генотипу/субтипу вируса ГС. Сравнение их последовательностей нуклеотидов с базой данных GenBank подтвердило это предположение. Наиболее близкими в базе данных оказались изоляты субтипа 2a. На рис. 28 представлена дендрограмма, полученная на основе секвенирования участка NS5b изолятов РНК ВГС от пациентов из Якутии и референтных изолятов субтипов 2a, 2b и 2c из базы данных GenBank. На дереве четко видно, что выделенные в Якутии изоляты 2 генотипа не группируются с изолятами субтипов 2b и 2c, но близкородственны изолятам субтипа 2a, обнаруженным в Китае и Японии (на рисунке обозначено фигурной скобкой). Учитывая обширные торгово-экономические связи Якутии со странами Восточной Азии, можно предполагать импортирование указанных изолятов. Важно отметить, что вирусы субтипа 2a, в отличие от субтипа 1b, не получили широкого распространения на территории Якутии.

И, наконец, два изолята из Якутии не группировались вместе с изолятами генотипов 1 и 2. Поиск близкородственных изолятов в базе GenBank показал, что они относятся к генотипу 3 вируса ГС. На рис. 29 представлена дендрограмма, демонстрирующая генетическое взаимоотношение двух изолятов генотипа 3, обнаруженных в настоящем исследовании, с изолятами субтипов 3a, 3b, 3g, 3h из международной базы данных. Изолят №157, выделенный в Хангаласском районе, оказался наиболее близким к изолятам субтипа 3a, ранее обнаруженным в Индии, Китае и Пакистане. В то же время изолят №456, выделенный от пациента из г. Якутска, получающего лечение гемодиализом, не группировался с изолятами субтипа 3a, но был генетически близок к изоляту субтипа 3g, обнаруженному в Великобритании. На рисунке указанные небольшие кластера показаны стрелками.

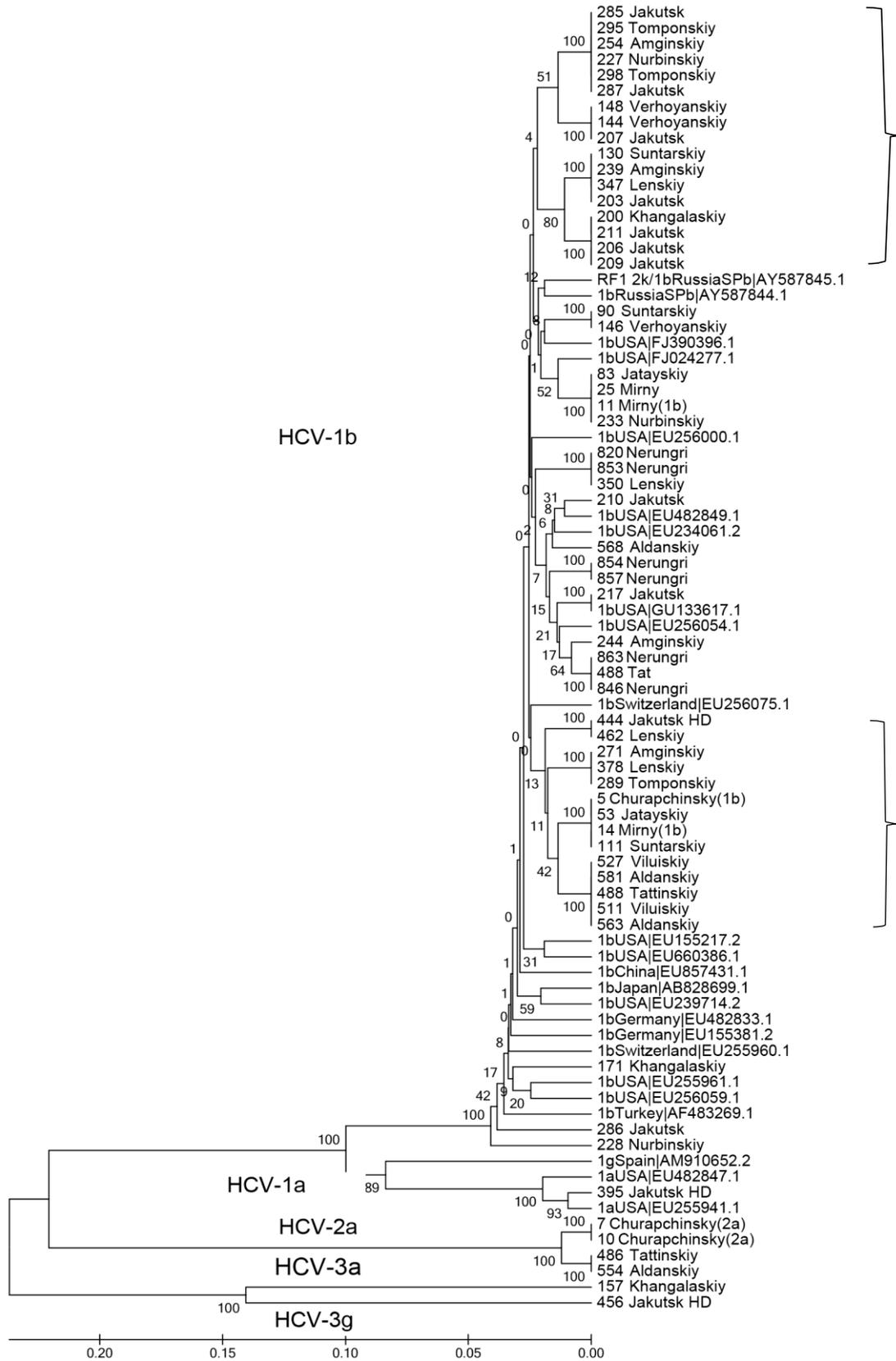


Рис. 27. Дендрограмма, полученная на основе секвенирования участков NS5b (377 нуклеотида) изолятов РНК ВГС от пациентов с хроническим гепатитом С из Якутии и референтных изолятов субтипа 1b из базы данных GenBank. Указаны номера изолятов и их территориальное происхождение

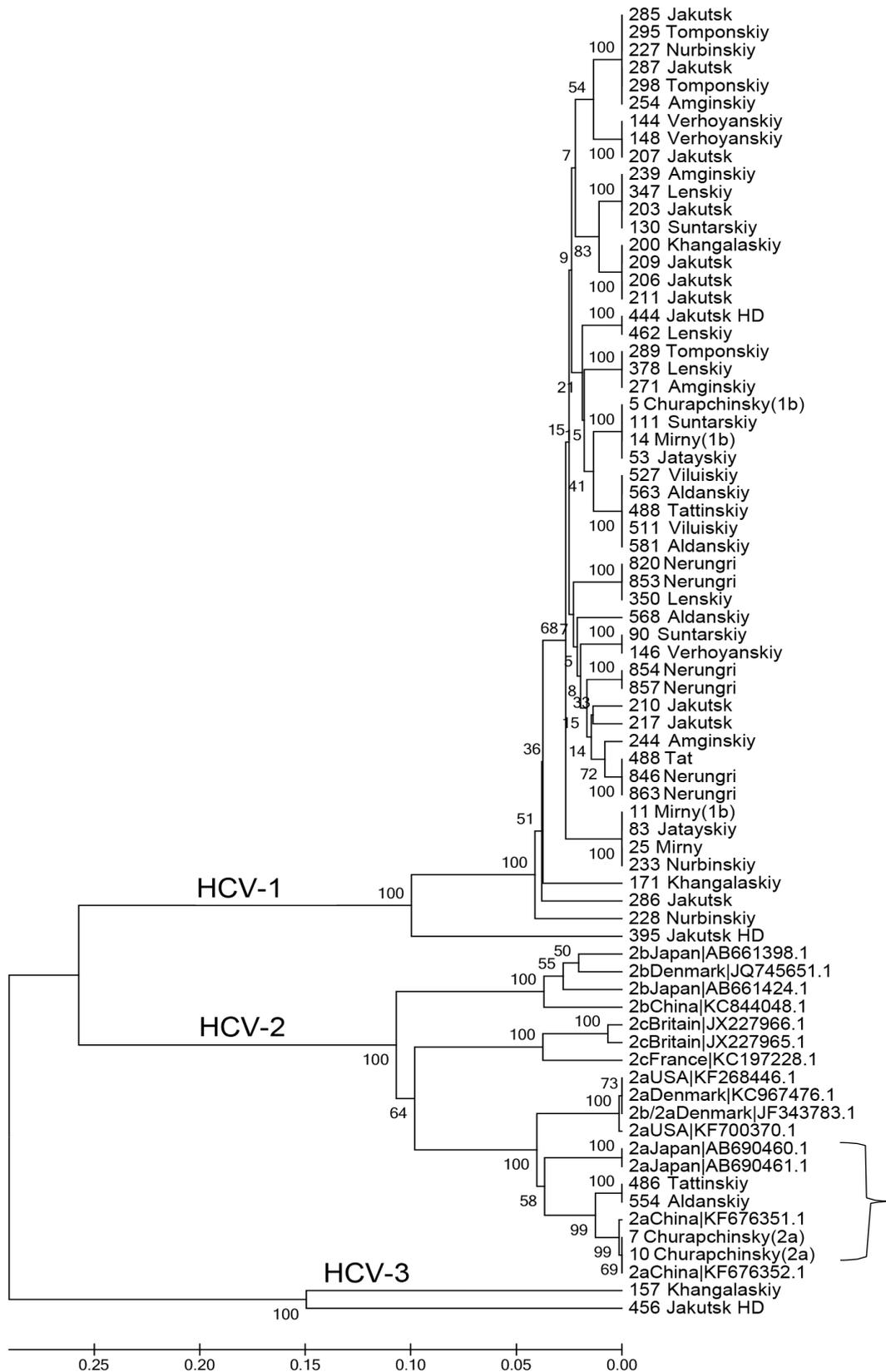


Рис. 28. Дендрограмма, полученная на основе секвенирования участков NS5b (377 нуклеотида) изолятов РНК ВГС от пациентов с хроническим гепатитом С из Якутии и референтных изолятов субтипа 2a, 2b, 2c из базы данных GenBank. Указаны номера изолятов и их территориальное происхождение

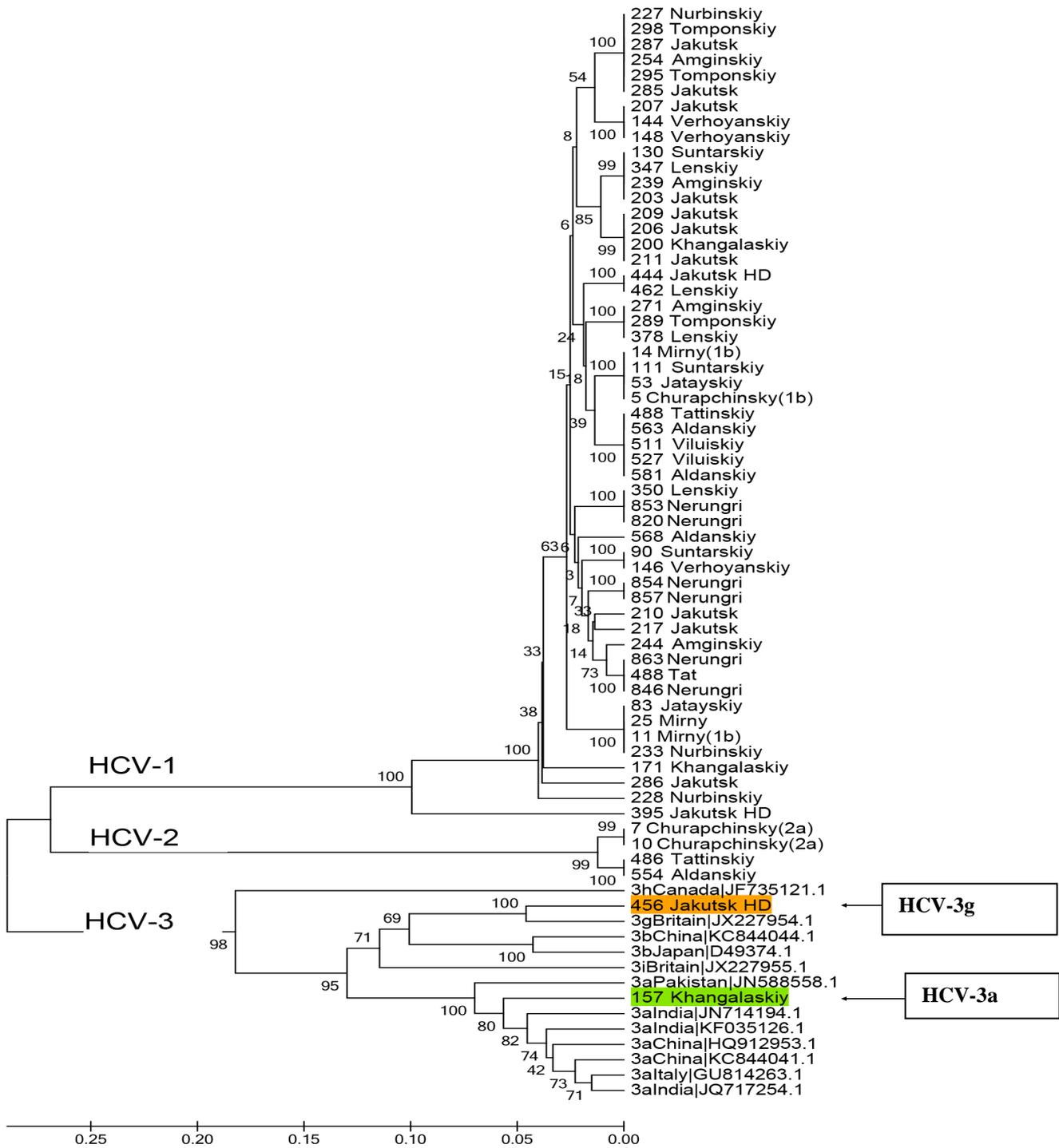


Рис. 29. Дендрограмма, полученная на основе секвенирования участков NS5b (377 нуклеотидов) изолятов РНК ВГС от пациентов с хроническим гепатитом С из Якутии и референтных изолятов субтипов генотипа 3 из базы данных GenBank. Указаны номера изолятов и их территориальное происхождение

Так как мы исследовали группу больных ХВГС с умеренной и высокой вирусной нагрузкой, низкая встречаемость генотипа 3 ВГС в данной группе не противоречит вышеизложенным данным. Однако нуклеотидная последовательность наших изолятов отличается от представленных в базе данных изолятов, выявленных на территории РФ ранее, и изолятов из других стран (максимальный процент нуклеотидной идентичности составил 97%) (рис.30).

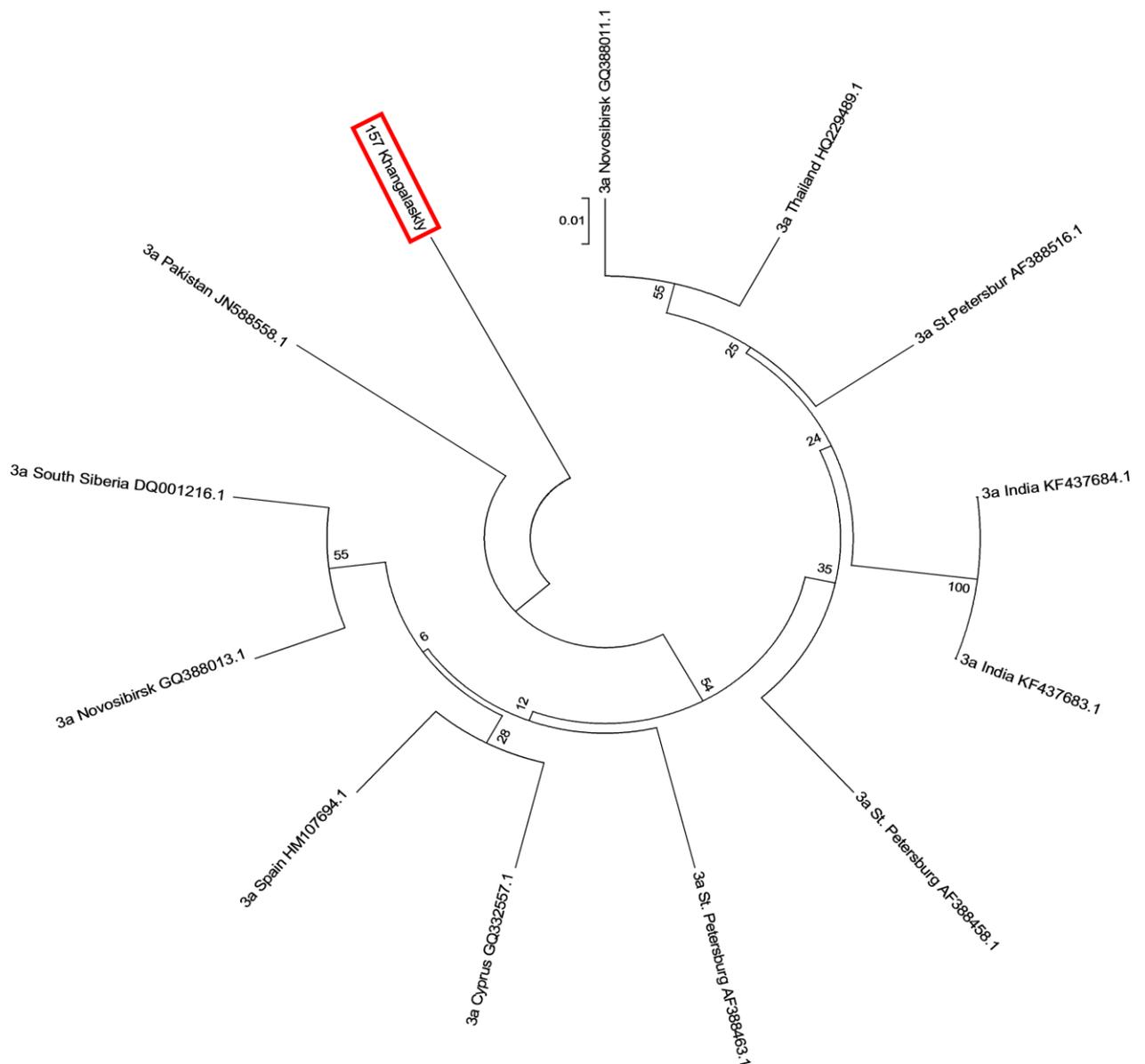


Рис.30. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолята ВГС субтипа 3а выделенного от пациента с ХВГС из Хангаласского региона Якутии в сравнении с представленными в международной базе данных Genbank последовательностями максимально идентичных штаммов ВГС из РФ и других стран.

Можно предположить, что обнаруженный в данном исследовании изолят ВГС субтипа 3a импортирован из стран Индостана или других экзотических стран, где эволюция и эпидемиология гепатита С могут отличаться от тех, что представлены в европейских странах.

Тем не менее, процент идентичности нуклеотидной последовательности между изолятом №157 и штаммом GQ388011.1 из Новосибирска составил 91%. Поскольку, как уже было упомянуто, нуклеотидные последовательности ВГС из России слабо представлены в международной базе данных, различия между штаммами 9% для таких крупных регионов не является существенной. Масштабное скринирование ВГС в Российской Федерации позволило бы оценить пути распространения и время эволюционного разделения изолятов вируса.

Особенно интересным нам представляется впервые выявленный на территории РФ ВГС субтип 3g. Хочется отметить, что выбранная нами для генотипирования область NS5B охватывает достаточно обширный фрагмент срединного гипервариабельного участка гена NS5B для обеспечения правильной идентификации субтипов выделенных нами штаммов.

Максимальный процент идентичности выявленного изолята субтипа 3g составил 97% и 100% с представленными в международной базе данных штаммами от пациентов иммигрировавших из Пакистана (EF116087.1) и Ливана (JF735123.1), проживающих в Канаде (рис. 31).

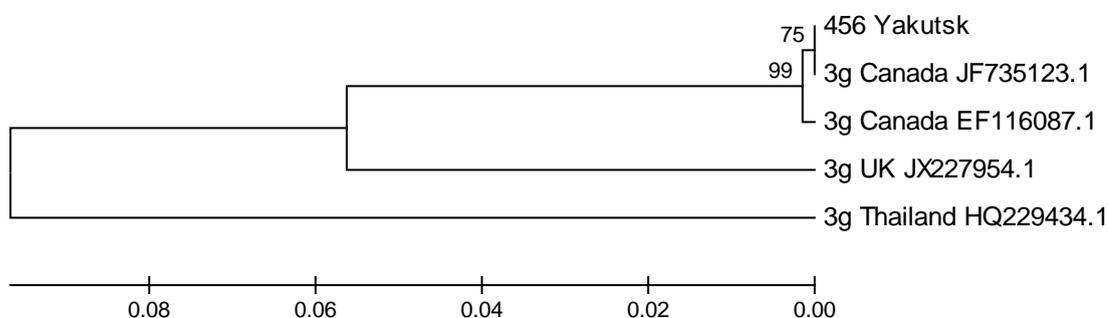


Рис.31. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолята ВГС субтипа 3g, выделенного от пациента с ХВГС из Якутска в сравнении с представленными в международной базе данных Genbank последовательностями максимально идентичных штаммов ВГС из РФ и других стран.

ОБСУЖДЕНИЕ

Актуальность проблемы парентеральных вирусных гепатитов объясняется, прежде всего, повсеместным распространением хронических форм и их значимой ролью в формировании неблагоприятных исходов (цирроз печени и первичная гепатокарцинома (рак), а также увеличивающейся частотой регистрации среди лиц молодого возраста. В Российской Федерации хронические гемоконтактные вирусные гепатиты В и С широко распространены. Общее число больных хроническим гепатитом В и носителей HBsAg составляет около 5 млн., число больных хроническим гепатитом С и носителей вируса гепатита С – не менее 2 млн. человек [Рахманова А.Г., Яковлев А.А., Виноградова Е.Н., 1997; Балаян М.С., Михайлов М.И., 1999; Лобзин Ю.В., Жданов К.В., Волжанин В.М., 1999; Онищенко Г.Г., Шахгильдян И.В., 2000; Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г., 2000; Жданов К.В., Лобзин Ю.В., Гусев Д.А., 2011; Рахманова А.Г., Яковлев А.А., 2011; Мукомолов С.Л., 2013; Юшук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О., 2014].

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что гемоконтактные хронические гепатиты В и С являются серьезной проблемой мирового масштаба и представляют угрозу для здоровья населения. Достижения молекулярной биологии позволили получить дополнительные сведения о биологических свойствах и качествах возбудителей ГВ и ГС. На сегодняшний день расшифрована структура популяции вируса гепатита В, интенсивно изучается географическое распределение его генотипов и субтипов. Определенные генотипы могут способствовать более тяжелому течению заболеваний печени, в том числе формированию цирроза и ГЦК. Так, было описано 10 генотипов вируса ГВ (ВГВ), каждый из которых подразделяется на целый ряд субтипов и имеет характерные особенности географического распространения (Okamoto H. et al., 1988; Norder H. et al., 1993, 2004; Olinger M. et al, 2008; Tatematsu K. et al. 2009) и по различным классификациям определяется 7 и более генотипов вируса гепатита С и более 90 субтипов (Smith D.B. et al., 2014).

Данные филогеографических исследований указывают на наличие связи генотипов ВГВ с определенными географическими зонами и этническим составом населения: ВГВ генотипы В и С связаны с населением азиатских стран, а генотипы А и D распространены среди европейских стран и в США, генотипы Е и F обнаруживаются в странах Африканского континента и Америки (Центральная и Южная Америка).

В Китае генотипы В, С и D ВГВ. Генотип А широко распространен в странах Африки южнее Сахары (подтип А1), Северной Европе (подтип А2) и Западной Африке (подтип А3).

Генотип В вируса ГВ широко распространен в странах Азии: шесть подтипов генотипа В-В1 в Японии, В2-В5, В7 – в Восточной Азии, В6 – среди коренных народов, проживающих в арктических регионах, в том числе на Аляске, севере Канады и в Гренландии.

Генотип С (С1-С5) находят в Восточной и Юго-Восточной Азии.

Генотип D (D1-D5) распространен в Африке, Индии, Средиземноморском регионе, Европе.

Генотип Е ограничивается регионом Западной Африки.

Генотип F (F1-F4) находится в Центральной и Южной Америке.

Генотип G – во Франции, Германии, США, Мексике.

Генотип H – в Центральной Америке.

Генотип I был выделен во Вьетнаме и Лаосе. Генотип J – в Японии.

Одним из важных моментов в лечении пациентов, нуждающихся в терапии аналогами нуклеоз(т)идов, является выявление вариантов ВГВ с мутациями в геноме полимеразы (Р-ген), связанных с развитием лекарственной устойчивости, еще до начала лечения. Выявлено, что мутациями, влияющими на первичную резистентность к ламивудину, являются M204V, M204S, M204I (С-сайт), L80M (В-сайт). Первичная резистентность к адефовиру ассоциирована с мутациями, локализованными в В (A181T) и D (N236T, I233V) сайтах домена ДНК-полимеразы. Связанные с появлением резистентности к энтекавиру мутации локализуются в В-сайте (T184S/A/I/L), С-сайте (S202G/C) и Е-сайте (M250I/V)

домена ДНК- полимеразы. Не так давно была описана резистентность к тенофовиру. Она ассоциирована с мутациями, локализованными в В- и С-сайтах домена ДНК-полимеразы ВГВ (A194T, L180M, M204V).

Преимущественное распространение в мире имеют 1, 2 и 3 генотипы ВГС. Генотип 1 ВГС распространен по всему миру, в том числе в развитых регионах, таких как Северная Америка и Европа. Генотип 2 ВГС имеет высокую распространенность в Центральной и Западной Африке, а также в некоторых западных странах, в то время как генотип 3 ВГС циркулирует преимущественно на Дальнем Востоке и в Индийском субконтиненте. Между тем, генотипы ВГС 4, 5 и 6 являются эндемичными для конкретных географических точек: генотип 4 ВГС, в основном, встречается в Египте и странах Африки, южнее Сахары; генотип 5 ВГС – в Южной Африке (Antaki N. et al., 2010) и генотип 6 ВГС – в Южном Китае и Юго-Восточной Азии.

На территории Республики Саха (Якутия) расположены зоны как промышленные, так и сельскохозяйственные, среди населения представлены различные этнические группы, каждая со своими обычаями и культурой. Регион относится к зоне повышенного риска носительства возбудителей гемоконтактных вирусных гепатитов и заболеваемости с постоянным ростом аналогичных данных по России в 2-3 раза (Алексеева М.Н., 2002; Зотова А.В., 2007; Семенов С.И., 2009).

По итогам 2013 года, в Республике Саха (Якутия) заболеваемость хроническим ГВ составила 27,8 на 100 тысяч население, а хроническим ГС 43,2 на 100000 население, а их доли в структуре хронических вирусных гепатитов распределилась следующим образом: 38,9 % – ХГВ, 60,4 % – ХГС. У небольшой доли пациентов (0,7 %) установить этиологию хронического поражения печени не удалось (Государственный доклад., 2013).

Исследования молекулярной варибельности ВГ в Российской Федерации проводятся с середины 1990-х гг. (Львов Д.К. и Дерябин П.Г., 1997; Lvov et al., 1996; Favorov et al., 1996; Viazov et al., 1997) и охватили, в основном, население европейской части страны, тогда как популяции регионов России, расположенных

за Уралом, в том числе Республика Саха (Якутия) до недавнего времени были исследованы в этом отношении недостаточно. Сравнение молекулярной variability изолятов, выявляемых в разных популяционных группах, в различных регионах мира используется для нужд эпидемиологического надзора.

На территории Российской Федерации циркулируют 3 генотипа вируса гепатита В (D, A, C) и 4 субтипа вируса гепатита С (1a, 1b, 2 и 3a). Из трёх генотипов вируса ГВ, встречающихся на территории страны во всех федеральных округах, с разными популяционными частотами доминирует генотип D (так же, как и в Европе, Украине, Средней Азии), распространённость которого в целом по России составляет около 88 %. На территории Чукотского АО у большинства больных гепатитом В выделяли вирус генотипа D и у четверти больных – генотипа С. Данные, полученные при изучении генотипов ВГВ у коренных народностей Сибири, показали, что генотип D встречается у 96 % населения, генотипы А и С по 2 % каждый. Превалирующим генотипом вируса ГС в России является генотип 1b, циркулирующий в Центральной России и на Дальнем Востоке. Вторым по частоте субтипом вируса гепатита С является субтип 3a.

В настоящее время в Республике Саха (Якутия) циркулируют три основных генотипа ВГВ: А, С и D, причем генотип D доминирует.

Генотипическая гетерогенность вируса гепатита С характеризуется преобладанием генотипов 1b и 3a.

Для уточнения основных эпидемиологических характеристик хронических вирусных гепатитов В и С в Республике Саха (Якутия) в 1999–2014 гг. провели ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости, включая анализ по половому признаку в отдельных возрастных группах населения в этот период. Заболеваемость хроническими вирусными гепатитами в республике за период с начала их регистрации (1999 г.) до настоящего времени (2014 г.) увеличилось в 2,4 раза и составила 67,4 на 100 тыс. нас, против 28,7 – в 1999 г.

В динамике этиологической структуры ХВГ с 1999 по 2004 год преобладал ХГВ (до 62 % – 2001 г.), в 2005-2006 гг. соотношение ХГВ и ХГС сравнялось, а с 2007 г. регистрируется преобладание ХГС, на долю которого в структуре всех

ХВГ в 2014 году приходится 58,1 %. На большинстве территорий (40 %): в Мегино-Кангаласском, Мирнинском, Усть-Алданском и Сунтарском районах, расположенных на юге и в центре республики, – заболеваемость ХГС очевидно превышала заболеваемость ХГВ. Больных ХГВ больше, чем ХГС зарегистрировано на 4 территориях (Амгинский, Нюрбинский, Олекминский и Таттинский) (14,3 %); в четырех районах заболеваемость ХГВ и ХГС была практически одинаковой (Вилуйский, Верхневилуйский, Оленекский, Среднеколымский), это районы, где проживают якуты и представители коренных народов Крайнего Севера. В пяти районах республики больных хроническими гепатитами в 2013 году не зарегистрировано.

В исследование, проводившееся в 2011–2013 гг. на базе вирусологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия), в лаборатории вирусных гепатитов Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», было включено 1304 пациента, состоящих на диспансерном наблюдении на различных территориях Республики Саха (Якутия) (485 мужчин и 819 женщин) в возрасте от 18 до 80 лет (средний возраст 43,2 года).

С целью установления особенностей проявления хронических вирусных инфекций, вызванных вирусами гепатитов В и С, было проведено определение серологических и молекулярно-генетические маркеров.

Корреляционная связь титра HBsAg, проявленные патологические изменения тканей печени и наличие в сыворотке крови антигена вируса ГВ HBeAg, ассоциирующегося с вирусной репродукцией, была зафиксирована исследователями, проведенными еще в 1980-х гг. (Мукомолов С.Л., 1984). В связи с чем широкое внимание было направлено на выявление в клинической практике титра HBsAg. По данным исследователей различных стран зафиксировано что, количественные характеристики HBsAg у больных хронической ГВ- инфекцией широко варьируются при естественном развитии и достаточно сильную взаимосвязь уровней поверхностного антигена, проявления HBeAg и уровнем

ДНК вируса в крови (Chan H.L., 2010; Jaroszewicz J., 2010; Kim Y.J., 2011; Lee J.H., 2010; Su T.H., 2010).

Современная практика исследований маркеров ГВ показала, что предпочтительным маркером при мониторинге течения хронического ГВ и его терапии является количественное определение HBsAg. Установлено значительное снижение уровней поверхностного антигена при сероконверсии HBeAg в anti-HBe, что является одним из критериев успешности терапии (Andersson K.L., 2009; Brunetto M.R., 2009; Lee M.H., 2011).

Для определения количественного содержания HBsAg нами было исследовано 87 сывороток от больных ХГВ.

Взаимоотношение количества HBsAg и вирусной нагрузки показало, что средняя концентрация HBsAg (МЕ/мл) увеличивается пропорционально росту вирусной нагрузки, которая, в свою очередь, взаимосвязана с количественным содержанием HBsAg. При вирусной нагрузке, не достигавшей 150 МЕ/мл, был обнаружен наименьший уровень HBsAg в сыворотке, что составило 261 МЕ/мл. У пациентов, с мутациями PC-28 и BCP симультанно, был отмечен более высокий уровень концентрации HBsAg.

Необходимо подчеркнуть, что HBeAg зафиксирован исключительно среди пациентов, не имеющих мутаций в С геноме вируса ГВ, т.е. диким.

Таким образом, широкое использование количественного определения HBsAg у пациентов с ГВ является весьма полезным для прогноза естественного течения инфекции и оценки эффективности лечения.

Обследовано 374 пациента, средний возраст которых составлял 42 года, из них 9 были «носителями» HBsAg, 6 из них – жители Булунского района.

У большинства пациентов (94 %) диагностирован ХВГВ, в том числе у 13 – 3,7 % из них в стадии цирроза. Микст-инфекции ХГВ+ХД и ХГВ+ХГС имели 7,4 % и 6,3 % соответственно. Различий в распределении уровней вирусной нагрузки у пациентов с ХГВ, в зависимости от пола, не выявлено. У 55,7 % мужчин и 53,7 % женщин вирусная нагрузка оказалась менее 150 МЕ/мл.

Сравнительно высокая вирусная нагрузка, превышающая 105 МЕ/мл, имела место лишь у 5,6 % пациентов-мужчин и 4,5 % – женщин.

Вирусная нагрузка исследовалась у 249 больных с ХГС и была разделена на три категории, в зависимости от уровня: низкой (<300-103 МЕ/мл), промежуточной (103-105 МЕ/мл) и высокой (105-106> МЕ/мл). Существенных отличий по уровню вирусной нагрузки в зависимости от пола больных не наблюдалось.

Для определения распространенности первичной лекарственной устойчивости вируса ГВ, то есть резистентности к нуклеоз(т)идным аналогам у больных с ХГВ, ранее не получавших этиотропное лечение, нами были проанализированы последовательности ДНК изолятов из разных районов республики. В исследование было включено 79 ДНК-положительных образцов сывороток крови ВГВ-инфицированных больных. Были найдены мутации в области гена полимеразы, отвечающие за развитие лекарственной устойчивости L-173 VSP+PC codon 28 Mu в Алданском улусе и T-194 VSP+PC codon 28 Mu в Сунтарском.

Компенсаторные мутации, как V 173L, обнаруживаются в сайтах А и В домена обратной транскриптазы ДНК-полимеразы (Li, MW, 2007) и впервые были обнаружены у пациентов с рецидивом ВГВ-инфекции после трансплантации печени на фоне приема ламивудина (Ling R., 1996; Villeneuve J., 2003). Резистентность к тенофовиру была описана сравнительно недавно и связана с мутациями, локализованными в В- и С-сайтах домена ДНК-полимеразы ВГВ (A194T). Исследования, проведенные G. Schmutz с соавт., показывают, что данная мутация наиболее часто выявляется среди ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов, получавших терапию тенофовиrom (Guenther S. et al., 2006).

Это свидетельствует о циркуляции на территории Якутии изолятов вируса ГВ, резистентных к ламивудину и тенофовиру. В обоих случаях мутации в гене полимеразы сочетались с мутациями в pre-C/C области генома.

Важно, что частота первичной устойчивости к нуклеозидным аналогам была чрезвычайно низкой и составляла 2,2 %.

Таким образом, выявленные мутации могут рассматриваться как потенциально значимые, и при назначении таким больным нельзя исключить риск формирования лекарственной устойчивости ВГВ.

Следующей задачей данного этапа исследований было определение генотипа ВГВ с помощью теста Inno-LiPA. Среди 20 образцов, полученных от пациентов с подтвержденной ВГВ-инфекцией, получили следующие данные. Среди выделенных изолятов ВГВ доминировал генотип D, генотипы A, микст A+C и A+ D единичные. Таким образом, проведенные исследования показали, что в республике доминирующим генотипом у пациентов с ХГВ является генотип D.

Впервые было выявлено, что достаточно большая доля пациентов заражена одновременно двумя генотипами возбудителя, наиболее интенсивно циркулирующих на территории Республики Саха (Якутия) (A, D, C). При анализе распределения генотипов ВГВ в зависимости от места жительства пациентов оказалось, что изоляты ВГВ генотипа D обнаруживались повсеместно, генотипа A – в Верхоянском районе и г. Якутске, генотипов A+D в Булуновском районе, генотипов C+D – в Таттинском районе.

Такое распределение генотипов ВГВ совпадает с ранее опубликованными данными о преобладании на территории Российской Федерации генотипа D (Schaefer S., 2007).

Генотипирование проводилось у 58 больных с диагнозом ХГС, с положительными анти-ВГС и РНК ВГС.

При исследовании изолятов ВГВ от 126 человек на мутации в областях pre-core и Р генома вируса подтверждено наличие мутации в областях pre-core (РС-28) и ВСР у большей части обследованных больных ХГВ с генотипом D ВГВ. Обнаружена более высокая концентрация HBsAg у больных ХГВ, имеющих одновременно мутации ВСР и РС-28.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости обследовать больных хроническими формами ГВ с применением молекулярно-биологических методов для принятия решений об адекватной терапии, учитывая особенности выделенных изолятов.

Филогенетический анализ последовательностей 35 изолятов ВГВ, выделенных от жителей Республики Саха (Якутия), установил преобладание в регионе генотипа D ВГВ, субтипов D2 и D3 и секвенирование области NS5b генома 59 изолятов вируса, выделенных от больных ХГС на 19 территориях республики, позволило установить 5 различных субтипов вируса 1a, 1b, 2a, 3a и 3g с абсолютным доминированием изолятов вируса субтипа 1b (89 %).

Таким образом, в Республике Саха (Якутия) распределение субтипов ВГВ среди изученных изолятов вируса, выделенных от пациентов с хроническим гепатитом В на 12 территориях, в подавляющем большинстве случаев (85,7 %) изоляты вируса представлены субгенотипом D2. В остальных случаях (14,3 %), по данным филогенетического анализа, изоляты принадлежали к субтипу D3. Обращает внимание, что ряд изолятов обладает высокой степенью генетического родства, и они встречаются в различных районах республики. В то же время изоляты внутри одного и того же субтипа (D2) группируются в несколько кластеров. Это указывает на то, что на территориях республики происходило распространение нескольких штаммов вируса одного субтипа. Важно отметить, что от пациентов с ХГВ, проживающих в Чурапчинском и Хангаласском районах, выделен идентичный вирус, который относится к редкому в Якутии субтипу D3.

Проведенные исследования по изучению генетических взаимоотношений выделенных в Республике Саха (Якутия) изолятов вируса ГС от пациентов с хроническим гепатитом С продемонстрировали циркуляцию на территории вирусов, относящихся к трем генотипам (1, 2, 3) и пяти субтипам (1a, 1b, 2a, 3a, 3g). Наибольшее распространение имеет вирус субтипа 1b, изоляты которого длительно циркулируют на территории республики (начало заболевания у некоторых пациентов датируется семидесятыми годами прошлого столетия) и формируют большие кластеры, указывающие на обширные эпидемические цепочки в распространении вируса. Необходимо отметить, что близкородственные вирусы этого субтипа обнаруживались на территориях, значительно удаленных друг от друга. Можно считать эти изоляты вируса уникальными, характерными для Якутии, поскольку они не группируются с

изолятами из других стран и территорий России. Редкие изоляты вируса ГС субтипов 1a и 3g обнаружены у пациентов, получающих лечение гемодиализом, что не исключает значение медицинских манипуляций в распространении вируса ГС. Изоляты вируса субтипа 3g ранее на территории Российской Федерации не обнаруживались.

Изоляты субтипа 2a, по всей видимости, имеют азиатское происхождение, поскольку в базе данных имеются сведения о близкородственных вирусах, выделенных в Китае и Японии. Они не получили широкого распространения в Якутии, поскольку обнаружены лишь в трех улусах.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием лицензионного пакета программ SPSS Statistica 17.0 в два этапа. На первом оценивался вид распределения признаков в выборках, на втором этапе рассчитывали среднее значение и его стандартное отклонение ($M \pm SD$), оценивали значимость различий между группами, проводили корреляционный анализ.

Молекулярно-генетические и молекулярно-эпидемиологические исследования возбудителей гепатитов В и С совершенно необходимы для планирования и проведения адекватных терапевтических и противоэпидемических мероприятий в отношении больных хроническими гепатитами В и С.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Учитывая эпидемиологическую значимость хронических вирусных гепатитов, можно предложить следующие рекомендации:

– продолжить повсеместное, особенно в отдалённых районах республики, скрининговое обследование населения на маркеры гемоконтактных вирусных гепатитов, в первую очередь, из групп риска;

– шире использовать молекулярно-генетические методы, что позволит:

а) выявлять преимущественную циркуляцию определённых генотипов вирусов В и С в разных социальных группах населения и на различных территориях;

б) раскрывать причины формирования очагов этих инфекций в эпидемически значимых учреждениях, особенно, занятых оказанием медицинских услуг;

в) расширить информационную базу существующего регистра больных с диагностированными хроническими вирусными гепатитами.

Результаты, полученные в процессе работы, позволяют рекомендовать для использования в клинической практике алгоритм выявления мутаций в Р-гене полимеразы ВГВ, ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости, который позволит оптимизировать выбор противовирусного препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что гемоконтактные хронические гепатиты В и С являются серьезной проблемой мирового масштаба и представляют угрозу для здоровья населения. На сегодняшний день расшифрована структура вируса гепатита В, известны генотипы и субтипы вируса в зависимости от географического распределения. Определенные генотипы могут способствовать более тяжелому течению заболеваний печени, в том числе формированию цирроза и ГЦК. В настоящее время идентифицированы 10 генотипов ВГВ и определяется 7 генотипов вируса гепатита С и обширные спектры субтипов обоих вирусов.

Данные филогеографических исследований указывают на наличие связи генотипов ВГВ с определенными географическими зонами и этническим составом населения: ВГВ генотипы В и С связаны с населения азиатских стран, а генотипы А и D распространены среди европейских стран и в США, генотипы Е и F обнаруживаются в странах Африканского континента и Америки (Центральная и Южная Америка). Для Китая характерны генотипы В, С и D ВГВ. Генотип А широко распространен в странах Африки южнее Сахары (подтип А1), Северной Европе (подтип А2) и Западной Африке (подтип А3).

Генотип В вируса ГВ широко распространен в странах Азии: шесть подтипов генотипа В1-В6 в Японии, В2-В5, В7 – в Восточной Азии, В6 – среди коренных народов, проживающих в арктических регионах, в том числе на Аляске, севере Канады и в Гренландии.

Генотип С (С1-С5) находят в Восточной и Юго-Восточной Азии.

Генотип D (D1-D5) распространен в Африке, Индии, Средиземноморском регионе, Европе.

Генотип Е ограничивается регионом Западной Африки.

Генотип F (F1-F4) находится в Центральной и Южной Америке

Генотип G – во Франции, Германии, США, Мексике.

Генотип Н – в Центральной Америке. Генотип I был выделен во Вьетнаме и Лаосе.

Генотип J – в Японии.

Выявление до начала проведения лечения вариантов ВГС с мутациями в гене полимеразы (Р-ген), ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости, является клинически важным моментом при ведении пациентов, нуждающихся в терапии аналогами нуклеоз(т)идов. Показано, что мутациями, связанными с развитием первичной резистентности к ламивудину, являются M204V, M204S, M204I (С-сайт), L80M (В-сайт). Первичная резистентность к адефовиру ассоциирована с мутациями, локализованными в В (A181T) и D (N236T, I233V) сайтах домена ДНК- полимеразы. Мутации, ассоциированные с появлением резистентности к энтекавиру, локализованы в В-сайте (T184S/A/I/L), С-сайте (S202G/C) и Е-сайте (M250I/V) домена ДНК-полимеразы. Возможная резистентность к тенофовиру была описана сравнительно недавно и связана с мутациями, локализованными в В- и С-сайтах домена ДНК-полимеразы ВГС (A194T, L180M, M204V).

Преимущественное распространение в мире имеют 1, 2 и 3 генотипы ВГС. Генотип 1 ВГС распространен по всему миру, в том числе в развитых регионах, таких как Северная Америка и Европа. Генотип 2 ВГС имеет высокую распространенность в Центральной и Западной Африке, а также в некоторых западных странах, в то время как генотип 3 ВГС циркулирует преимущественно на Дальнем Востоке и в Индийском субконтиненте. Между тем, генотипы ВГС 4, 5 и 6 являются эндемичными для конкретных географических точек: генотип 4 ВГС, в основном, встречается в Египте и странах Африки, южнее Сахары; генотип 5 ВГС – в Южной Африке (Antaki N. et al., 2010) и генотип 6 ВГС – в Южном Китае и Юго-Восточной Азии.

На территории Российской Федерации циркулируют 3 генотипа вируса гепатита В (D, A, C) и 4 субтипа вируса гепатита С (1a, 1b, 2 и 3a). Из трёх генотипов вируса ГВ, встречающихся на территории страны во всех федеральных округах с разными популяционными частотами доминирует генотип D (так же,

как и в Европе, Украине, Средней Азии), распространённость которого в целом по России составляет около 88 %. На территории Чукотского АО у большинства больных гепатитом В выделяли вирус генотипа D и у четверти больных – генотипа С. Данные, полученные при изучении генотипов ВГВ у коренных народностей Сибири, показали, что генотип D встречается у 96 % населения, генотипы А и С – по 2 % каждый. Превалирующим генотипом вируса ГС в России является генотип 1b, циркулирующий в Центральной России и на Дальнем Востоке. Вторым по частоте субтипом вируса гепатита С является субтип 3a.

Несмотря на проводившиеся ранее исследования по молекулярной эпидемиологии ВГВ и ВГС в Якутии, до настоящего времени отсутствуют четкие данные о частоте мутаций в pre-C/C области генома циркулирующих изолятов ВГВ, встречаемости изолятов с первичной устойчивостью к нуклеоз(т)идным аналогам, субтиповой принадлежности циркулирующих штаммов ВГВ и ВГС, взаимосвязи отдельных изолятов указанных вирусов, выделяемых от пациентов на разных территориях республики.

Высокие уровни заболеваемости населения хроническими вирусными гепатитами в Республике Саха (Якутия) позволяют отнести её к эндемичным территориям по данным инфекциям. На протяжении 15-летнего периода наблюдения регистрируемая заболеваемость была и остается выше показателей РФ. Это относится, в первую очередь, к ХГВ, заболеваемость которым в РС (Я) в 2014 году в 2.5 раза выше, чем в РФ.

Анализ динамики заболеваемости ХГВ и ХГС в РС (Я) с 1999 по 2014 год показывает 2 периода: первый (1999–2005 гг.), когда лидером был ХГВ, доля которого в структуре ХВГ достигала 61 %, и второй (2007-2014 гг.), когда лидерство перешло к ХГС.

Заболеваемость хроническими гепатитами В и С в отдельных возрастных группах населения имеет различия: так, максимальный показатель заболеваемости хроническим гепатитом В регистрируется у больных 30-39 лет, а хроническим гепатитом С – у лиц старше 60 лет.

Распространённость хроническими вирусными гепатитами в отдельных районах РС (Я) варьирует в очень широких пределах – от показателей менее 20,0 на 100 тыс. населения до 4000,0 на 100 тыс. населения.

Различий в распределении уровней вирусной нагрузки, пациентов с ХГВ, в зависимости от пола пациентов не выявлено. У 55,7 % мужчин и 53,7 % женщин вирусная нагрузка оказалась менее 150 МЕ/мл. Сравнительно высокая вирусная нагрузка, превышающая 105 МЕ/мл, имела место лишь у 5,6 % пациентов-мужчин и 4,5 % – женщин. Вирусная нагрузка коррелировала с количественным содержанием HBsAg.

Самое низкое содержание HBsAg в сыворотке – 261 МЕ/мл обнаружилось при вирусной нагрузке менее 150 МЕ/мл. По мере увеличения вирусной нагрузки средняя концентрация HBsAg пропорционально увеличивалась. Так, концентрация поверхностного антигена в пробах с вирусной нагрузкой 104 и выше МЕ/мл составила 459 МЕ/мл. Обнаружена более высокая концентрация HBsAg у пациентов, имеющих одновременно мутации ВСР и РС-28.

Важно отметить, что HBeAg выявлялся только у пациентов с диким вариантом ВГВ, т.е. без мутаций в области С генома вируса.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в республике доминирующим генотипом у пациентов с ХГВ является генотип D, представленный субтипами D2 и D3.

Подтверждено, что достаточно большая доля пациентов (20 %) заражена одновременно двумя генотипами возбудителя, наиболее интенсивно циркулировавшими на территории Республики Саха (Якутия) (A+ D, D+C).

У обследованных больных наиболее часто выявлялись изоляты с одновременными мутациями в области базового кор промотора и стоп-кодона Р-28 (ВСР+РС-28 codon) – 37 %. Этот вариант изолятов ВГВ наиболее распространен у пациентов старше 50 лет. В то же время вирус «дикого» типа чаще встречался у пациентов 18–29 лет (43,5 %) и у лиц среднего возраста (37,3 %).

У двух пациентов с ХГВ были обнаружены мутации в области гена полимеразы ВГВ, отвечающие за развитие лекарственной устойчивости. В одном

случае у пациента из Алданского улуса эта мутация имелась в позиции L-173 и сочеталась с мутацией в области гена С (BCP+PC-28 codon). Во втором случае у пациента из Сунтарского улуса такая мутация выявлена в позиции T-194 и также сочеталась с мутацией в области гена С (BCP+PC-28 codon). В обоих случаях пациенты с мутациями резистентности специфического антивирусного лечения не получали, поэтому обнаруженные изоляты ВГВ могут квалифицироваться как обладающие первичной резистентностью к нуклеоз(т)идным аналогам.

Филогенетический анализ изолятов ВГВ продемонстрировал одновременную циркуляцию нескольких вирусов одного и того же субтипа и разных субтипов. По всей видимости изоляты вируса ГВ в неизменном виде могут циркулировать длительное время, поскольку они выявлялись у пациентов, вставших на диспансерный учет с 80-х годов прошлого столетия до 2012 г. (Герасимова В.В. и др. 2014).

Проведенные исследования по изучению генетических взаимоотношений выделенных в Республике Саха (Якутия) изолятов вируса ГС от пациентов с хроническим гепатитом С продемонстрировали циркуляцию на территории Республики Саха (Якутия) вирусов, относящихся к трем генотипам (1, 2, 3) и пяти субтипам (1a, 1b, 2a, 3a, 3g). Циркуляция трех основных генотипов установлена как методом ПЦР с типоспецифическими праймерами, так и при секвенировании области NS5b генома. При этом пропорции долей каждого выявленного генотипа оказались близкими. Выявлена тенденция увеличения частоты генотипа 1 у лиц старше 40 лет по сравнению с пациентами моложе 40 лет, у которых обнаруживалась более высокая частота генотипа 3.

Наибольшее распространение имеет вирус субтипа 1b, изоляты которого длительно циркулируют на территории республики (начало заболевания у некоторых пациентов датируется семидесятыми годами прошлого столетия) и формируют большие кластеры, указывающие на обширные эпидемические цепочки в распространении вируса. Необходимо отметить, что близкородственные вирусы этого субтипа обнаруживались на территориях, значительно удаленных друг от друга. Можно считать эти изоляты вируса

уникальными, характерными для Якутии, поскольку они не группируются с изолятами из других стран и территорий России. Редкие изоляты вируса ГС субтипов 1a и 3g обнаружены у пациентов, получающих лечение гемодиализом, что не исключает значение ятрогенного фактора в распространении вируса ГС. Изоляты вируса субтипа 3g ранее на территории Российской Федерации не обнаруживались.

Изоляты субтипа 2a по всей видимости имеют азиатское происхождение, поскольку в базе данных имеются сведения о близкородственных вирусах, выделенных в Китае и Японии. Они не получили широкого распространения в Якутии, поскольку обнаружены лишь в трех улусах.

В результате исследований, выполненных в ходе работы над диссертацией, получены новые научные знания о структуре популяций вирусов гепатита В и гепатита С, циркулирующих в Республике Саха (Якутия), впервые определены спектры субтипов указанных вирусов по республике в целом и в разрезе административных территорий, впервые охарактеризована частота мутаций в геноме ВГВ, включая мутации, ассоциированные с резистентностью к противовирусной терапии. Полученные сведения могут быть использованы, при контроле за дальнейшей динамикой популяций вирусов гепатитов В и С, слежении за экспортом-импортом их генетических вариантов, выявлении источников, факторов и путей передачи указанных вирусов при осуществлении мероприятий эпидемиологического надзора.

ВЫВОДЫ

1. Хронические вирусные гепатиты представляют значительную проблему для здравоохранения Республики Саха (Якутия). Распространённость хроническим гепатитом В достигает 719,0 на 100000, а хроническим гепатитом С – 569,0 на 100000 населения. У лиц старше 30 лет этот показатель (ХГВ) превышает значения 1000 и более на 100000 (1% населения и более), а аналогичные по уровню показатели ХГС зарегистрированы у лиц старше 50 лет.

2. У пациентов с хроническим гепатитом В в Якутии выявлялись низкая или умеренная вирусная нагрузка, низкая частота HBeAg (2,2 %), с умеренным значением содержания HBsAg (в среднем 403 МЕ/мл), изоляты с высокой частотой (71,4 %) мутаций в области pre-C/C генома.

3. Первичная резистентность изолятов вируса ГВ, выявленных в двух районах, к нуклеоз(т)идным аналогам составила 2,3 %, они выявлены в гене Р в позиции А194Т (устойчивость к тенофовиру) и V173L (устойчивость к ламивудину).

4. Молекулярно-гибридизационный анализ изолятов вируса гепатита В показал наличие трех генотипов вируса – А, D и С в соотношении 20 %, 75 % и 5 %. Секвенирование изолятов вируса из различных регионов Республики Саха (Якутия) в областях Р, pre-S/S генома выявило только один генотип вируса D, представленный двумя субтипами D2 - 86% и D3 - 14 % соответственно. При этом близкородственные вирусы циркулировали на всех изученных территориях Республики Саха (Якутия).

5. По данным ПЦР с типоспецифическими праймерами, в Якутии циркулируют вирусы ГС трех генотипов 1, 2, 3: 81 %, 3,5 % и 15,5 % соответственно. Секвенирование области NS5b генома изолятов вируса, выделенных от больных ХГС, позволило установить 5 различных субтипов вируса 1a, 1b, 2a, 3a и 3g с абсолютным доминированием изолятов вируса субтипа 1b (89 %). У 60 % больных ХГС с высокой вирусной нагрузкой (10^6 МЕ/мл) выделялся субтип 1b.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Валидность – является внешней характеристикой, определяющей степень вероятности применения результатов исследования к иным группам пациентов.

Восприимчивость организма – его способность проявлять реакцию на внедренный в него возбудитель посредством развития заболевания или носительства вируса. Поскольку на ее проявления могут влиять состояние макроорганизма, доза возбудителя и его вирулентность, то характер восприимчивости всегда является потенциальным.

Вспышка эпидемическая – выявление групповых заболеваний, вызванных с единым источником (способы передачи и ее факторы) инфекции, среди членов только одной группы.

Гиперэндемичная территория – местность, в пределах которой регулярно на протяжении продолжительного периода заболеваемость какой-либо инфекционной (паразитарной) болезнью фиксируется неизменно на высоком уровне, что обусловлено присутствием социальных и / или природных условий / факторов, оказывающих влияние на сохранение эпидемического / эпизоотического процесса.

Динамика эпидемического процесса – изменение уровня заболеваемости людей инфекционными болезнями по годам за многолетний период (цикличность), по месяцам в течение года (сезонность).

Доля этиологическая (атрибутивная фракция) – доля случаев заболеваемости, которых можно было бы избежать, в случаях факторов риска.

Заболеваемость – интенсивность эпидемического процесса, выраженная количественным показателем частоты регистрации болезни среди населения как в отдельных группах (половых, возрастных, профессиональных и пр.), так и в целом. Показатель отражает количество случаев заболевания, по отношению к числу случаев за аналогичный период, а также численность больных по отношению к конкретному числу населения.

«Золотой стандарт» – это метод, при помощи которого выдвинутая гипотеза (диагноз болезни) подтверждается с наивысшей степенью вероятности.

Иммуноферментный анализ (ИФА) – метод лабораторной диагностики, при котором антитела ферментов, способных разрушать субстрат и способствующих формированию окрашенных продуктов (хромогена), используются в качестве метки. Количество образовавшихся комплексов «антиген-антитело+фермент» характеризуются насыщенностью окраски хромогена.

Инфекция – биологический процесс внедрения и размножения микроорганизмов в макроорганизме, который служит причиной развития разнообразных видов их корреляции от носительства до клинически выраженного заболевания.

Инфицированность – состояние организма, характеризующееся зараженностью, вызванной попаданием в него возбудителя, приводящего организм в состояние выраженной болезни либо носительства вируса.

Показатель инцидентности – показатель заболеваемости – коэффициент вновь зафиксированных за определенный момент (период) случаев выявления конкретного заболевания среди членов группы риска (определенной группы населения) в пределах одной географической зоны; степень риска заболеваемости исследуемой болезнью в пределах той же группы при идентичных условиях, а также долю заболевших (новых случаев) при тех же условиях.

Показатель превалентности – распространенности – отношение числа индивидуумов, зараженных возбудителем или заболевших (случаев заболевания), к численности определенной популяции в определенный момент времени, независимо от того, когда процесс или заболевание началось.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – реакция, направленная на увеличение копий молекул ДНК (РНК) микроорганизмов в пробе исследуемого материала. Основана на возможности синтеза в искусственных условиях молекул нуклеиновой кислоты из праймера и необходимых нуклеотидов с помощью полимеразы. Полученные молекулы нуклеиновой кислоты идентифицируют в реакции молекулярной гибридизации.

Профилактические мероприятия – совокупность научно обоснованных и оправданных практической деятельностью мероприятий, предназначенных для предотвращения возникновения и распространения любых патологических состояний среди людей.

Секвенирование (белков и нуклеиновых кислот – ДНК и РНК) – определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. sequentum – последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generationsequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов.

Эндемичная территория – географическая зона, в пределах которой постоянно в течение длительного времени регистрируется заболеваемость какой-либо инфекционной (паразитарной) болезнью в связи с наличием на данной территории природных и/или социальных предпосылок (условий), необходимых для поддержания эпидемического (эпизоотического) процесса.

Эпидемиологический метод – совокупность методических приемов, позволяющих оценить структуру заболеваемости по группам населения и нозологическим формам, а в отношении отдельных болезней – по территории, среди разных групп населения – и по времени, а также вскрыть конкретные элементы социальных и природных условий, определяющих причинно-следственные связи в развитии и проявлении заболеваемости.

Эпидемиологический надзор – система постоянного динамического и многоаспектного слежения за эпидемическим процессом конкретной инфекционной болезни или за эпидемиологической ситуацией в целом среди определенных групп или всего населения на определенной территории в

конкретный период времени, в целях рационализации и повышения эффективности профилактических мероприятий.

Эпидемический процесс – процесс взаимодействия возбудителя-паразита и организма людей на популяционном уровне, проявляющийся при определенных социальных и природных условиях единичными и/или множественными заболеваниями, а также бессимптомными формами инфекции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- анти-НВс IgG – антитела к ядерному антигену вируса гепатита В класса Jg G
- анти-НВс IgM – антитела к ядерному антигену вируса гепатита В класса JgM
- анти-НВе – антитела к антигену вируса гепатита В
- анти-НВс – антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В
- анти-ВГС – антитела к вирусу гепатита С
- анти-ВГD – антитела к вирусу гепатита D
- ВГВ – вирус гепатита В
- ВГС – вирус гепатита С
- ВГD – вирус гепатита D
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИОТ – ингибиторы обратной транскриптазы
- ОТ-ПЦР – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РС (Я) – Республика Саха (Якутия)
- РФ – Российская Федерация
- ХГ – хронический гепатит
- ХГВ – хронический гепатит В
- ХГС – хронический гепатит С
- ЦП – цирроз печени
- НВеAg – антиген е вируса гепатита В
- НВсAg – поверхностный антиген вируса гепатита В

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева, М. Н. Вирусные гепатиты в Республике Саха (Якутия) : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.00.10 / Алексеева Марфа Николаевна. – Санкт-Петербург, 2002. – 37 с.
2. Балаян, М. С. Энциклопедический словарь «Вирусные гепатиты» / М. С. Балаян, М. И. Михайлов. – 2-е изд. – Москва : Амипресс, 1999. – 302 с.
3. Балюбаш, В. В. Роль количественного определения HBsAg в сыворотке крови у больных гепатитом В // Лаборатория. – 2002. – № 4. – С. 23-24.
4. Бахлыкова, Н. Ю. Широта распространения маркеров гепатитов В и С среди населения и отдельных «группах риска» в среднем Приобье : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.00.10 / Бахлыкова Наталья Юрьевна. – Москва, 1998. – 29 с.
5. Белозеров, Е. С. Вирусный гепатит / Е. С. Белозеров, Е. А. Иоанниди. – Элиста : Джангар, 2005. – 160 с.
6. Бююль, А. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей / А. Бююль, П. Цефель. – Санкт-Петербург : Диасофт, 2005. – 608 с.
7. Вашукова, С. С. Лабораторная диагностика гепатита / С. С. Вашукова, Т. Е. Медведева, А. Н. Никонова и др. // Лабораторная диагностика инфекционных вирусных заболеваний. – Санкт-Петербург, 2002. – С. 78.
8. Гураль, А. Л. Серологическая диагностика гепатита В : практическое пособие / А. Л. Гураль, В. Р. Шагинян, Т. А. Сергеева и др. – Киев : Диаприв-Мед, 2004. – С. 38.
9. Герасимова, В. В. Молекулярная эпидемиология вируса гепатита В в Якутии / В. В. Герасимова, Н. Р. Максимова, И. А. Левакова и др. // Якутский медицинский журнал. – 2014. – № 3(47). – С. 54-57.
10. Дудина, К. Р. Динамическое определение количественного содержания HBsAg в крови в сопоставлении с уровнем вирусной нагрузки у пациентов с хронической HBV-моноинфекцией / К. Р. Дудина, О. О. Знойко, С. А. Шутько и др. // РЖГГК. – Т. 21. – № 4. – С. 37-42.

11. Ершова, О. Н. Характеристика современных эпидемиологических особенностей НС-вирусной инфекции и активность перинатальной передачи вируса гепатита С : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.00.30 / Ершова Ольга Николаевна. – Москва, 2000. – 29 с.

12. Зотова, А. В. Распространенность вирусных гепатитов В и С среди оленеводов-кочевников в Республике Саха (Якутия) / А. В. Зотова, О. Е. Попова, К. К. Кюрегян и др. // Вирусные гепатиты – эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика : материалы 7-й научно-практической конференции. – Москва, 2007. – С. 28-29.

13. Ильина, Е. Н. Новые перспективы генодиагностики в установлении диагноза и мониторинге вирусных гепатитов В и С / Е. Н. Ильина, А. Е. Гущин, В. М. Говорун // Сборник тезисов докладов 3-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика в современной медицине». – Москва, 2000. – С. 216-218.

14. Индеева, Л. Д. Эпидемиологическая и клиничко-морфологическая характеристика гепатитов В и С и гетерогенность их возбудителей в Республике Саха (Якутия) : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.02.02, 14.01.09 / Индеева Любовь Дмитриевна. – Москва, 2010. – 25 с.

15. Калинина, О. В. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов вируса гепатита С, циркулирующих в Санкт-Петербурге : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.06 / Калинина Ольга Викторовна. – Санкт-Петербург, 2000. – 23 с.

16. Кириллова, И. Л. Закономерности распространения вирусов гепатитов с парентеральным механизмом передачи среди населения Северного района России : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.30 / Кириллова Ирина Львовна. – Москва, 2003. – 24 с.

17. Кожанова, Т. В. Проблема лекарственной резистентности HBV у HBV/ВИЧ-коинфицированных пациентов / Т. В. Кожанова, Л. Ю. Ильченко, О. В. Исаева // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2009. – № 5. – С. 23-28.

18. Кожанова, Т. В. Первичная лекарственная резистентность вируса гепатита В : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 03.02.02 / Кожанова Татьяна Викторовна. – Москва, 2010. – 24 с.

19. Кожанова, Т. В. Циркуляция вариантов вируса гепатита В, несущих мутации в гене полимеразы, среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов / Т. В. Кожанова, Л. Ю. Ильченко, О. В. Исаева и др. // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т. 5(№2). – С. 60-64.

20. Кузин, С. Н. Структура генотипов вируса гепатита у пациентов с хроническим гепатитом С / С. Н. Кузин, П. Е. Крель, Т. М. Игнатова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 3. – С. 33-38.

21. Кузнецова, И. О. Оценка влияния вакцинации против гепатита В подростков, новорожденных детей и лиц из групп риска на активность эпидемического процесса НВ-вирусной инфекции : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Кузнецова Ирина Олеговна. – Москва, 1999. – 25 с.

22. Ланг, Т. А. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т. А. Ланг, М. Сесик ; пер. с англ. ; под ред. В. П. Леонова. – Москва : Практическая медицина, 2011. – 480 с.

23. Лобзин, Ю. В. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение / Ю. В. Лобзин, К. В. Жданов, В. М. Волжанин и др. – Санкт-Петербург, 2003. – С. 182.

24. Львов, Д. К. Закономерности распространения вируса гепатита и его генотипов в России и странах СНГ / Д. К. Львов и др. // Вопросы вирусологии. – 1997. – № 4. – С. 157-161.

25. Львов, Д. К. Медицинская вирусология / Д. К. Львов. – Москва : МИА, 2008. – 656 с.

26. Львов, Д. К. Географическое распространение вируса гепатита и его генотипов / Д. К. Львов, П.Г. Дерябин // Вопросы вирусологии. – 1997. – № 5. – С. 196-199.

27. Львов Д. К. Распространение генотипов вируса гепатита С, циркулирующих на территории Северо-Западной и Центральной частей России /

Д. К. Львов, С. Миширо, Н. А. Селиванов и др. // Вопросы вирусологии. – 1995. – № 6. – С. 251-253.

28. Максютков, Р. А. Генетическая вариабельность вируса гепатита В в регионах РФ / Р. А. Максютков, А. Н. Канаев // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2010. – С. 187.

29. Мануйлов, В. А. Различная встречаемость субгенотипов вируса гепатита В и субтипов HBsAg у коренного населения Сибири / В. А. Манулов, Е. В. Чуб, И. Г. Нетесова и др. // Мир вирусных гепатитов. – 2007. – № 4. – С. 9-10.

30. Мерков, А. М. Санитарная статистика : пособие для врачей / А. М. Мерков, Л. Е. Поляков. – Москва : Медицина, 1974. – 384 с.

31. Михайловская, Г. В. Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов В и D на территории Чукотского АО / Г. В. Михайловская, И. В. Карандашова, А. Д. Неверов и др. // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2010. – С. 206.

32. Михайлов, М. И. Гепатит В – проблема здравоохранения, которую можно решить / М. И. Михайлов // Вакцинация. – 2001. – № 6 (18). – С. 18-20.

33. Михайлов, М. И. Лабораторная диагностика / М. И. Михайлов // Медицина для всех. – 1996. – № 1. – С. 6-8.

34. Мукомолов, С. Л. Эпидемиологическая и клинико-лабораторная характеристика хронических носителей HBsAg в зависимости от выраженности патологического процесса : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ленинград, 1984. – С. 24.

35. Мукомолов, С. Л. К вопросу о сочетанной HB- и HС-вирусной инфекции / С. Л. Мукомолов, Н. П. Гуленкова, Е. А. Васильева // Актуальные вопросы инфекционной патологии. – 1993. – Ч. 1. – С. 95-96.

36. Мукомолов, С. Л. Профилактика вирусного гепатита С / С. Л. Мукомолов // Здоровье населения и среда обитания. – 1996. – № 3. – С. 4-7.

37. Мукомолов, С. Л. Современные эпидемиологические особенности вирусного гепатита В / С. Л. Мукомолов, И. А. Левакова, В. А. Васильева и др. // Материалы VIII Российской научно-практической конференции с

международным участием «Вирусные гепатиты – эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика». – Москва, 2009. – С. 19-20.

38. Мукомолов, С. Л. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999- 2009 гг. / С. Л. Мукомолов, И. А. Левакова // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1 (№ 3). – С. 255-262.

39. Мукомолов, С. Л. Вирусные гепатиты в Российской Федерации / С. Л. Мукомолов, Н. В. Железнова, И. А. Левакова и др. // Аналитический обзор. 9 выпуск. – Санкт-Петербург : ФБУН НИИЭМ им. Пастера – 2013. – С. 168.

40. Неверов, А. Д. Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов в Якутии / А. Д. Неверов, И. В. Карандашова, С. Г. Орлов и др. // Сборник трудов 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2007. – Т. 1. – С. 315-317.

41. Орлова, И. И. Хронический гепатит С / И. И. Орлова, З. М. Зайнудинов, Б. С. Каганов // Вопросы современной педиатрии. – 2004. – № 4. – С. 59-65.

42. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Саха (Якутия) в 2013 г. : госуд. доклад. – Якутск : Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), 2013. – С. 282.

43. Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации : [Федер. закон: принят Гос. думой 1 ноября 2011 г.]. – Режим доступа: <http://old.rosminzdrav.ru/docs/laws/104>.

44. Онищенко, Г. Г. О мероприятиях, направленных на стабилизацию заболеваемости парентеральными вирусными гепатитами в Российской Федерации / Г. Г. Онищенко // Постановление Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации. – 2013. – № 9.

45. Онищенко, Г. Г. Заболеваемость инфекциями, управляемыми средствами специфической профилактики, в Российской Федерации и задачи по ее снижению и ликвидации / Г. Г. Онищенко // ЖМЗИ. – 2003. – № 2. – С. 16-28.

46. Шахгильдян, И. В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И. В. Шахгильдян, М. И. Михайлов, Г. Г. Онищенко. – Москва : ФГОУ «ВУНМИЦ Росздрава», 2003. – С. 384.

47. Писарева, М. М. Молекулярно-биологические особенности вируса гепатита В дикой и мутантной форм в трех регионах Российской Федерации : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.06 / Писарева Мария Михайловна. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 19.

48. Писарева, М. М. Генетическое разнообразие вирусов гепатита В, С и D в различных регионах Российской Федерации / М. М. Писарева, В. М. Морозов, К. В. Тарасов и др. // Материалы международной научной конференции «Актуальные вирусные инфекции – теоретические и практические аспекты». – Санкт-Петербург, 2004. – С. 68.

49. Писарева, М. М. Генетическое разнообразие вирусов гепатита В, С и D в различных регионах Российской Федерации / М. М. Писарева, В. М. Морозов, К. В. Тарасов и др. // Актуальные вирусные инфекции – теоретические и практические аспекты. Микробиоциды для здоровья и репродукции человека. Медико-социальные проблемы сексуально передаваемых инфекций». – Санкт-Петербург, 2004. – № 1. – С. 18-22.

50. Подымова, С. Д. Острый вирусный гепатит: эпидемиология, клинические проявления, диагностика различных эпидемиологических вариантов / С. Д. Подымова // Русский медицинский журнал. – 1988. – Т. 6. – № 7. – С. 449-457.

51. Покровский, В. И. Лабораторная диагностика инфекционных болезней / В. И. Покровский, М. Г. Творогова, Г. А. Шипулин. – Москва : БИНОМ, 2014. – С. 648.

52. Радченко, В. Г. Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического вирусного гепатита С: пособие для врачей-терапевтов, гастроэнтерологов, гепатологов, инфекционистов / В. Г. Радченко, В. В. Стельмах, В. К. Козлов. – Санкт-Петербург : СПбГМА, 2004. – С. 168.

53. Рахманова, А. Г. Хронические вирусные гепатиты / А. Г. Рахманова, А. А. Яковлев, Е. Н. Виноградова. – Санкт-Петербург, 1997. – С. 38.

54. Саввин, Р. Г. Мониторинг и эпидемиологическая значимость географического распространения маркеров парентеральных вирусных гепатитов

в условиях (на территории) Республики Саха(Якутия) : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.00.30 / Саввин Реворий Григорьевич. – Иркутск, 2008. – С. 37.

55. Семенов, С. И. Заболеваемость вирусными гепатитами в Республике Саха (Якутия) / С. И. Семенов, Р. Г. Саввин, В. Г. Кривошапкин [и др.] // Материалы II Восточно-Сибирской гастроэнтерологической конф. «Клинико-эпидемиологические и этно-экологические проблемы заболеваний органов пищеварения», 15-17 мая 2002 г.– Абакан, 2002. – С. 123-124.

56. Семенов, С. И. Генотипы вируса гепатита В и субтипы HBsAg в Якутии / С. И. Семенов, Н. Н. Павлов, В. Г. Кривошапкин и др. // Якутский медицинский журнал. – 2009. – 2 (26). – С. 114-117.

57. Семенов, С. И. Распространенность и генетическая характеристика вируса гепатита С в Якутии / С. И. Семенов, М. В. Терехова, Л. Д. Индеева и [др.] // Якутский медицинский журнал. – 2009. – 2 (26). – С. 129-132.

58. Слепцова, С. С. Генотипы вирусов гепатитов В, С и D и первичный рак печени в Якутии / С. С. Слепцова, А. Г. Рахманова, Т. Т. Бугаева и [др.] // Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2013. – С. 369.

59. Соринсон, С. Н. Вирусные гепатиты / С. Н. Соринсон. – Санкт-Петербург : Теза, 1998. – С. 306.

60. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчных путей : практическое руководство / Ш. Шерлок, Дж. Дули ; пер. с англ. ; под ред. З .Г. Апросимовой, Н.А. Мухиной. – Москва : Гэотар Медицина, 1999. – С. 859.

61. Широкова, Е. Н. Современная терапия хронического вирусного гепатита С / Е. Н. Широкова, В. Т. Ивашкин // Русский медицинский журнал. – 2002. – № 16. – С. 694-697.

62. Шувалова, Е. П. Инфекционные болезни : учебник для вузов / Е. П. Шувалова. – Москва : Медицина, 1999. – С. 654.

63. Шустов, А. В. Генетическое разнообразие изолятов и молекулярная вари- абельность вируса гепатита С у населения Новосибирской области :

автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.03 / Шустов Александр Вячеславович. – Кольцово, 2003. – С. 22.

64. Ющук, Н. Д. Вирусные гепатиты: Клиника, диагностика, лечение / Н. Д. Ющук, Е. А. Климова, О. О. Знойко и др. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – С. 160.

65. Ющук, Н. Д. Проблема вирусного гепатита С в Российской Федерации / Н. Д. Ющук, О. О. Знойко, К. Р. Дудина и др. // Терапевтический архив –2014. – №10. – С. 77-81.

66. Юнкеров, В. И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В. И. Юнкеров, С. Г. Григорьев. – 2-е изд., доп. – Санкт-Петербург : ВМедА, 2005. – 292 с.

67. Ястребова, О. Н. Гепатит С : информационно-методическое пособие / О. Н. Ястребова. – Кольцово : Вектор Бест, 2005. – 36 с.

68. Abid, K. A novel hepatitis C virus (HCV) subtypes from Somalia and its classification into HCV clade 3 / K. Abid, R. Quadri, AL. Veuthey et al. // J. Gen. Virol. – 2000. – Vol. 81. – P. 1485-1493.

69. Afridi, SQ. Prevalence of HCV genotypes in district Mardan / SQ. Afridi, MN. Zahid, MZ. Shabbir et al. // Virol. J. – 2013. – Vol. 10. – P. 90.

70. Aggarwal, R. Preventing and treating hepatitis B infection / R. Aggarwal, P. Ranjan // BMJ. – 2004. – Vol. 329. – P. 1080-1086.

71. Ahmad, W. HCV genotype distribution and possible transmission risks in Lahore, Pakistan / W. Ahmad, B. Ijaz, TF. Javed et al. // World J. Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16. – P. 4321-4328.

72. Akkarathamrongsin, S. Molecular epidemiology and genetic history of hepatitis C virus subtype 3a infection in Thailand / S. Akkarathamrongsin, P. Hacharoen, P. Tangkijvanich et al. // Intervirology. – 2013. – Vol. 56 (5). – P. 284-294.

73. Ali, A. Determination of HCV genotypes and viral loads in chronic HCV infected patients of Hazara Pakistan / A. Ali, M. Nisar, H. Ahmad et al. // Virol. J. – 2011. – Vol. 8. – P. 466.

74. Ali, S. Frequency distribution of HCV genotypes among chronic hepatitis C patients of Khyber Pakhtunkhwa / S. Ali, I. Ali, S. Azam et al. // *Viol. J.* – 2011. – Vol. 8. – P. 193.
75. Alter, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection / M. J. Alter // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13. – P. 2436-2441.
76. Andersson K. L. Monitoring during and after antiviral therapy for hepatitis B / K. L. Andersson, R. T. Chung // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49. – P. 166-173.
77. Ansaldi, F. Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy / F. Ansaldi, B. Bruzzone, S. Salmaso et al. // *J. Med. Virol.* – 2005. – Vol. 76 (3). – P. 327-332.
78. Antaki, N. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report / N. Antaki, A. Craxi, S. Kamal et al. // *Liver Int.* – 2010. – Vol. 30. – P. 342-355.
79. Arauz-Ruiz, P. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America / P. Arauz-Ruiz, H. Norder, BH. Robertson et al. // *J. Gen. Virol.* – 2002. – Vol. 83. – P. 2059-2073.
80. Baha, W. HBV genotypes prevalence, precore and basal core mutants in Morocco/ W. Baha, MM. Ennaji , F. Lazar et al. // *Infect Genet. Evol.* – 2012. – Vol. 12 (6). – P. 1157-62.
81. Brunetto, M. R. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B / Brunetto M. R., Moriconi F., Bonino F. et al. // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49(4). – P. 1141-1150.
82. Bartholomeusz, A. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspect / A. Bartholomeusz, SA. Locarnini // *Semin. Liver Dis.* – 2006. – Vol. 26. – P. 162-170.
83. Ben-Ari, Z. Genotypic and phenotypic resistance: longitudinal and sequential analysis of hepatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation / Z. Ben-Ari, N. Daudi, A. Klein et al. // *J. Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 98. – P. 151-159.

84. Bozdayi, A. A novel pattern (sW195a) in surface gene of HBV DNA due to YSDD (L180M plus M204S) mutation selected during lamivudine therapy and successful treatment with adefovir dipivoxil / A. Bozdayi, C. Eyigun, A. Turkyilmaz et al. // *J. Clin. Virol.* – 2004. – Vol. 31. – P. 76-77.

85. Bozdayi, A. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine / A. Bozdayi, O. Uzunalimog, A.R. Turkyilmaz et al. // *J. Viral Hepat.* – 2003. – Vol. 10. – P. 256-265.

86. Brichler, S. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique / S. Brichler, G. Lagathu, M.A. Chekaraou et al. // *J. Gen. Virol.* – 2013. – Vol. 94 (Pt 10). – P. 2318-2329.

87. Brunetto, M. R. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B / M. R. Brunetto, F. Moriconi, F. Bonino et al. // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49. – № 4. – P. 1141-1150.

88. Bukh, J. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes / J. Bukh, R.H. Purcell, R.H. Miller // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 8239-8243.

89. Butt, S. The changing epidemiology pattern and frequency distribution of hepatitis C virus in Pakistan / S. Butt, M. Idrees, H. Akbar et al. // *Infect. Genet. Evol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 595–600.

86. Bréchet, C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms / C. Bréchet // *Gastroenterology.* – 2004 ; 127 : S56-S61.

87. Benn, J. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade / J. Benn, R. J. Schneider // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1994; 91:10350–10354. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

88. Candotti, D. Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana, West Africa / D. Candotti, J. Temple, F. Sarkodie et al. // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 7914-7923.

89. Chamberlain, RW. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East / RW. Chamberlain, N. Adams, AA. Saeed et al. // *J. Gen. Virol.* – 1997. – Vol. 78. – P. 1341-1347.
90. Chamberlain, RW. The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa / RW. Chamberlain, NJ. Adams, LA. Taylor et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – Vol. 236. – P. 44-49.
91. Chan, H. L. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B / Chan H .L., Wong V. W., Wong G. L. et al. // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 52. – № 4. – P. 1232-1241.
92. Chao, D.T. Systematic review: epidemiology of hepatitis C genotype 6 and its management / D.T. Chao, K. Abe, M.H. Nguyen // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 34. – P. 286–296.
93. Carman, W. F. LT. Pre-S/S gene variants of hepatitis B virus. Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verne G, editors. *Viral hepatitis and liver disease* / W. F. Carman, Mimms L. T. – Turin : Edizioni Minerva Medica, 1997. – Pp. 108-115.
94. Choo, Q-L. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus / Q-L. Choo, K.H. Richman, J.H. Han et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88 (6). – P. 2451-2455.
95. Choo, Q.-L. Isolation of a c DNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome / Q.-L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner // *Science.* – 1989. – V. 244. – P. 359-362.
96. Ciccozzi, M. Hepatitis C virus genotype 4d in Southern Italy: reconstruction of its origin and spread by a phylodynamic analysis / M. Ciccozzi, M. Equestre, A. Costantino et al. // *J. Med. Virol.* – 2012. – Vol. 84 (10). – P. 1613-1699.
97. Colonno, R. Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B / R. Colonno, R. Rose, C. Baldick // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1656-1665.
98. Cui, C. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid / C. Cui, J. Shi, L. Hui et al. // *J. Gen. Virol.* – 2002. – Vol. 83. – P. 2773-2777.

99. Dalgard, O. Treatment with pegylated interferon and ribavirin in HCV infection with genotype 2 or 3 for 14 weeks: a pilot study / O. Dalgard, K. Bjoro, KB. Hellum // *Hepatology*. – 2004. – Vol. 40. – P. 1260-1265.
100. Dan, Y. Outcome of lamivudine-resistant hepatitis B virus is generally benign except in cirrhotics / Y. Dan, C. Wai, Y. Lee // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 4344-4350.
101. Datta, S. An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India / S. Datta // *Virol. J.* – 2008. – Vol. 5. – P. 156.
102. Dore, G. J. Hepatitis C disease burden and strategies to manage the burden (Guest Editors Mark Thurse, Gregory Dore and John Ward / G. J. Dore, J. Ward, M. Thursz // *J. Viral Hepat.* – 2014. – Vol. 21. – P. 1-4.
103. Durantel, D. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotyping to phenotyping testing / D. Durantel, M. Brunelle, E. Gros et al. // *J. Clin. Virol.* – 2005. – Vol. 34. – P. 34-43.
104. El Chaar, A. Hepatitis B virus DNA splicing in Lebanese blood donors and genotype A to E strains: implications for hepatitis B virus DNA quantification and infectivity / A. El Chaar, T. El Jisr, JP. Allain // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50 (10). – P. 3159-3167.
105. Emekdas, G. Determination of hepatitis B virus genotypes in chronic hepatitis B patients in Mersin province, Turkey / G. Emekdas, S. Tezcan, G. Aslan et al. // *Mikrobiyol. Bul.* – 2012. – Vol. 46 (3). – P. 432-445.
106. Ezzikouri, S. Hepatitis B virus in the Maghreb region: from epidemiology to prospective research / S. Ezzikouri, P. Pineau, S. Benjelloun // *Liver Int.* – 2013. – Vol. 33(6). – P. 811-819.
107. Ferns, R.B. Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard / R.B. Ferns, E. Nastouli, J.A. Garson // *Journal of Virological Methods*. – 2012. – Vol. 179 (1). – P. 189-194.

108. Ferraro, D. Phylogenetic analysis of isolates from new cases of HBV infection in Southern Italy / D. Ferraro, N. Urone, P. Pizzillo et al. // *Infect Genet. Evol.* – 2012. – Vol. 12 (8). – P. 1591.
109. Forbi, J. C. Disparate distribution of hepatitis B virus genotypes in four sub-Saharan African countries / J. C. Forbi, Y. Ben-Ayed, G. L. Xia et al. // *J. Clin. Virol.* – 2013. – Vol. 58 (1). – P. 59-66.
110. Fretz, C. HCV infection in a rural population of Central African Republic (CAR): epidemiology and evidence for two new subtypes of genotype 4 / C. Fretz, D. Jeannel, L. Stuyver et al. // *J. Med. Virol.* – 1995. – Vol. 47. – P. 435-437.
111. Ghany, M. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B / M. Ghany, T. Liang // *J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 132. – P. 1574-1585.
112. Glebe, D. The molecular virology of hepatitis B virus / D. Glebe, Bremer CM. // *Semin. Liver. Dis.* – 2013. – Vol. 33 (2). – P. 103-112.
113. Gomes-Gouvea, MS. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region / MS. Gomes-Gouvea, MC. Soares, G. Bensabath et al. // *Journal of General Virology.* – 2009. – Vol. 90 (11). – P. 2638-2643.
114. Glebe, D. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes / Glebe D, Urban S, Knoop EV. et al. // *Gastroenterology.* – 2005 ; 129 : 234. – 245.
115. Guenther, S. Combination of tenofovir and lamivudine versus tenofovir after lamivudine failure for therapy of hepatitis B in HTV-coinfection / S. Guenther, N. Mark, L. Thomas et al. // *AIDS.* – 2006. – Vol. 20. – P. 1951-1954
116. Hadinedoushan, H. Hepatitis C virus genotypes and association with viral load in Yazd, central province of Iran / H. Hadinedoushan, H. Salmanroghani, M. K. Amirbaigy et al. // *Hepatitis Monthly.* – 2014. – Vol. 14 (3). – P. 11705.
117. Hayashi, J. Comparison of HCV RNA levels by branched DNA probe assay and by competitive polymerase chain reaction to predict effectiveness of interferon

treatment for patients with chronic hepatitis C virus / J. Hayashi, Y. Kawakami, A. Nabeshima // *Dig. Dis. Sci.* – 1998. – Vol. 43. – P. 384-391.

118. Hie-Won, H. A review of the one-year incidence of resistance to lamivudine in the treatment of chronic hepatitis B / H. Hie-Won, J. Dixon // *Hepatology Int.* – 2008. – Vol. 2. – P. 440-456.

119. Honkoop, P. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns / P. Honkoop, H.G. Niesters, R.A. De Man et al. // *J. Hepatology*. – 1997. – Vol. 26 (6). – P. 1393-1395.

120. Huang, Z. M. YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B untreated with antiviral medicines / Z. M. Huang, Q. W. Huang, Y. Q. Qin // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 867-870.

121. Hussain, M. Sensitive Line Probe Assay That Simultaneously Detects Mutations Conveying Resistance to Lamivudine and Adefovir / M. Nussain, S. Fung, E. Libbrtcht // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1094-1097.

122. Idrees, M. High prevalence of hepatitis C virus infection in the largest province of Pakistan / M. Idrees, A. Lal, M. Naseem et al. // *J. Dig. Dis.* – 2008. – Vol. 9. – P. 95-103.

123. Inchauspe, G. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates / G. Inchauspe, S. Zebedee, DH. Lee et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88 (22). – P. 10292-20296.

124. Jaroszewicz J., Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV) – infection: a European perspective / Jaroszewicz J., Calle Serrano B., Wursthorn K. et al. // *J. Hepatology*. – 2010. – Vol. 52. – № 4. – P. 514-522.

125. Jeannel, D. Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa / D. Jeannel, C. Fretz, Y. Traore et al. // *J. Med. Virol.* – 1998. – Vol. 55. – P. 92-97.

126. Jimenez, M.R. Distribution of HCV genotypes and HCV RNA viral load in different geographical regions of Mexico / M.R. Jimenez, S.F. Urbie, L.P. Guillen et al. // *Annals. Hepatology*. – 2010. – Vol. 9. – P. 33-39.

127. Jones, R. Novel anti-hepatitis B agents: a focus on telbivudine / R. Jones, M. Nelson // *Int. J. Clin. Pract.* – 2006. – Vol. 60. – P. 1295-1299.
128. Kao, J. H. HBV genotypes: epidemiology and implications regarding natural history / J. H. Kao, D. S. Chen // *Curr. Hepat. Rep.* – 2006. – Vol. 5. – P. 5–13.
129. Kao, J. N. Molecular epidemiology of hepatitis B virus / J. N. Kao // *Korean J. Intern. Med.* – 2011. – Vol. 26 (3). – P. 255-261.
130. Kim, B. K. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B / B. K. Kim, P. A. Revill, Sh. Ahn // *Antivir. Ther.* – 2011.– Vol. 16 (8). – P. 1169-1186.
131. Kim, Y. J. The change of the quantitative HbsAg level during the natural course of chronic hepatitis B / Y. J. Kim, H. C. Cho, M. S. Choi et al. // *Liver Int.* – 2011. – Vol. 31. – № 6. – P. 819-825.
132. Kramvis, A. Hepatitis B virus genotypes / A. Kram, M. Kew, G. Francois // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23. – P. 2409-2423.
133. Kurbanov, F. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus/ F. Kurbanov, Y. Tanaka, M. Mizokami // *Hepatol. Res.* – 2010. – Vol. 40. – P. 14-30.
134. Ladner, S. The M539V Polymerase Variant of Human Hepatitis B Virus Demonstrates Resistance to 29-Deoxy-39-Thiacytidine and a Reduced Ability to Synthesize Viral DNA / S. Ladner, T. Miller, R. King et al. // *Antimicrob. Agents Chem.*– 1998. – Vol. 42. – P. 2128-2131.
135. Liaw, Y. F. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group / Y. F. Liaw, N. W. Leung, T. T. Chang et al. // *Gastroenterology.* – 2000; 119:172-180. [[PubMed](#)]
136. Le Gal, F. Eighth major clade for hepatitis delta virus / F. Le Gal, E. Gault, MP. Ripault et al. // *Emerging Infectious Diseases.* – 2006. – Vol. 12 (9). – P. 1447–1450.
137. Lee J. H., Correlation between quantitative serum HBsAg and HBV DNA test in Korean patients who showed high level of HBsAg / Lee J. H., Kim S. J., Ahn S. H. et al. // *J. Clin. Pathol.* – 2010. – Vol. 63. – № 11. – P. 1027–1031.

138. Lee, Y. S. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy / Y. S. Lee, Y. S. Lim // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 43. – P. 1385-1391.
139. Lemon, S. M. Hepatitis C virus / S. M. Lemon, C. M. Walker, M. J. Alter // Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins. – 2007. – P. 1253-1304.
140. Leon, P. Detection of hepatitis B virus variants resistant to lamivudine and famciclovir among randomly selected chronic carriers from Spain / P. Leon, F. Pozo, J. Echevarria // *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* – 2004. – Vol. 22. – P. 133-137.
141. Li, H. C. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products/ H. C. Li, H. C. Ma, C. H. Yang et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20(23). – P. 104-7122.
142. Li, M. W. Character of HBV (hepatitis B virus) polymerase gene rtM204V/I and rtL180M mutation in patients with lamivudine resistance / M. W. Li, W. How, K. Z. Liu // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2007. – Vol. 6. – P. 664-667.
143. Libbrecht, E. Evolution of Primary and Compensatory Lamivudine Resistance Mutations in Chronic Hepatitis B Virus-Infected Patients during Long-Term Lamivudine Treatment, assessed by a Line Probe Assay / E. Libbrecht, J. Doutreloigne, H. Van De Velde // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 3935-3941.
144. Lin, CL. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B / CL. Lin, JH. Kao. // *J. Biomed. Sci.* – 2008. – Vol. 15. – P. 137-145.
145. Lin, CL. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances/ CL. Lin, JH. Kao // *J. Gastroenterol. Hepatology*. – 2011. – Suppl. 1. – P. 123-130.
146. Lindh, M. Treatment of chronic hepatitis B infection: An update of Swedish recommendations / M. Lindh, I. Uhnoo, J. Blackberg // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 40. – P. 436-450.
147. Ling, R. Selection of mutation in hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine / R. Ling, M. Ahmed // *J. Hepatology*. – 2006. – Vol. 24. – P. 711-713.

148. Ling, R. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine / R. Ling, D. Mutimer, M. Ahmed et al. // *Hepatology*. – 1996. – Vol. 24. – P. 711-713.
149. Locarnini, S. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance / S. Locarnini, W. S. Mason // *J. Hepatology*. – 2006. – Vol. 44. – P. 422-431.
150. Lok, A. Chronic Hepatitis B / A. Lok, J. Brian, L. McMahon // *J. Hepatology*. – 2007. – Vol. 45. – P. 1225-1241.
151. Lupinacci, R. M. Hepatocellular carcinoma, from monitoring to treatment / R. M. Lupinacci, F. Menegaux, C. Tresallet // *Soins*. – 2013. – Vol. 3. – P. 5-7.
152. Lvov, D.K. Prevalence of Hepatitis C virus and distribution of genotypes in Northern Eurasia / D. K. Lvov, E. L. Samokhvalov, F. Tsuda et al. // *Arch. Virol.* – 1996. – Vol. 141. – P. 1613-1622.
153. Ma, M. Molecular epidemiology and population dynamics of hepatitis B virus in Dianjiang County, Chongqing, China / M. Ma, M. He, L. Liao et al. // *Arch. Virol.* – 2014. – Vol. 159 (1). – P. 117-124.
154. Marshall, D. J. Determination of hepatitis C virus genotypes in the United States by cleavase fragment length polymorphism analyses / D. J. Marshall, L. M. Heisler, V. Lyamichev // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 3156-3162.
155. Mellor, J. Investigation of the pattern of hepatitis C sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification / J. Mellor, E.C. Holmes, L.M. Jarvis et al. // *J. Gen. Virol.* – 1995. – Vol. 76. – P. 2493-2507.
156. Melegari, M. Properties of hepatitis B virus pre-S1 deletion mutants / M. Melegari, S. Bruno, Wands // *JR. Virology*. – 1994; 199:292–300. [[PubMed](#)]
157. Miyakawa, Y. Classifying hepatitis B virus genotypes / Y. Miyakawa, M. Mizokami // *Intervirology*. – 2003. – Vol. 46. – P. 329-338.
158. Moradpour, D. Viral hepatitis / D. Moradpour, H. E. Blum // *Ther Umsch.* – 2011. – Vol. 4. – P. 175-181.
159. Moriconi, F. Emergence of hepatitis B virus quasi-species with lower susceptibility to nucleos(t)ide analogues during lamivudine treatment / F. Moriconi, P. Colombatto, B. Coco // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 60. – P. 341-349.

160. Nagasaki, F. The high of the emergence of entecavir-resistance mutants among patients infected with lamivudine-resistance hepatitis virus / F. Nagasaki, H. Nitsuna // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 213. – P. 181-186.

161. Ndjomou, J. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon / J. Ndjomou, OG. Pybus, B. Matz // *J. Gen. Virol.* – 2003. – Vol. 84. – P. 2333-2341.

162. Nelson, M. An open-label study of tenofovir in HIV-1 and hepatitis B virus coinfecting individuals / M. Nelson, S. Portsmouth, J. Stebbing // *AIDS.* – 2003. – Vol. 17. – P. 7-10.

163. Norder, H. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains / H. Norder, B. Hammas, S. Lofdahl, AM. Courouce et al. // *Journal of General Virology.* – 1992. – Vol. 73(Pt 5). – P. 1201-1208.

164. Norder, H. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes / H. Norder, AM. Courouce, LO. Magnius // *Virology.* – 1994. – Vol. 198. – P. 489-503.

165. Ni, Y. The pre-s2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly / Ni Y, Sonnabend J, Seitz S // *J Virol.* – 2010;84:3879-3888. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

166. Okamoto, H. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes / H. Okamoto, F. Tsuda, H. Sakugawa et al. // *J. Gen. Virol.* – 1988. – Vol. 69 (Pt 10). – P. 2575-2583.

167. Olivero, A. Hepatitis delta virus diagnosis / A. Olivero, A. Smedile // *Seminars in Liver Disease.* – 2012. – Vol. 32. – P. 220-227.

168. Ono, S. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding- site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance / S. Ono, Y. Shiratori // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 107. – P. 449-455.

169. Pastor, R. Hepatitis B virus mutations potentially conferring adefovir/tenofovir resistance in treatment-naive patients / R. Pastor, F. Habersetzer, S. Faf-Kremer // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15. – P. 753-755.

170. Pawlotsky, J. M. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C / J. M. Pawlotsky, L. Tsakiris, F. Roudot-Thoraval, C. Pellet et al. // *J. Infect. Dis.* – 1995. – Vol. 171. – P. 1607-1610.

171. Phung, T. B. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam: genotypes B4 and C1 predominate / T. B. Phung, E. Alestig, T. L. Nguyen et al. // *J. Med. Virol.* – 2010. – Vol. 82. – P. 1327-1333.

172. Pourkarim, M. R. Evolutionary analysis of HBV “S” antigen genetic diversity in Iranian blood donors: a nationwide study / Pourkarim M. R., Sharifi Z, Soleimani A. et al. // *J Med Virol.* – 2014; 86:144-155. [[PubMed](#)]

173. Pollicino T. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels / Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A. et al. // *Hepatology.* – 2012; 56:434-443. [[PubMed](#)]

174. Pang, R. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma / R. Pang, E. Tse, R.T. Poon // *Cancer Lett.* – 2006; 240:157-169. [[PubMed](#)]

175. Ramia, S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in the Middle East / S. Ramia, J. Eid-Fares // *Int. J. Infect. Dis.* 2006. – Vol. 10. – P. 272-277.

176. Ray, S. C. Genetic epidemiology of hepatitis C throughout Egypt / S. C. Ray, R. R. Arthur, A. Carella et al. // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 182. – P. 239-244.

177. Robertson, N. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization / N. Robertson, G. Myers, C. Howard et al. // *Arch. Virol.* – 1998. – Vol. 143. – P. 2493-2503.

178. Roman, S. HBV endemicity in Mexico is associated with HBV genotypes H and G / S. Roman, A. Panduro // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19 (33). – P. 5446-5453.

179. Ruggieri, A. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 2 variants in West Central Africa (Guinea Conakry) / A. Ruggieri, C. Argentini, K. Kourouma et al. // *J. Gen. Virol.* – 1996. – Vol. 77. – P. 2073-2076.

180. Sanders-Buell, E. Hepatitis C genotype distribution and homology among geographically disparate injecting drug users in Afghanistan / E. Sanders-Buell, W. Rutvisuttinunt, C.S. Todd et al. // *J. Med. Virol.* – 2013. – Vol. 85(7). – P. 1170-1179.

181. Schaefer, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes / S. Schaefer // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – N13. – P. 14-21.

182. Seeger, C., Mason W.S. Hepatitis B virus biology / C. Seeger, W.S. Mason // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2000 ; 64 : 51-68.

183. Schmitt, S. Analysis of the pre-S2 N - and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus / Schmitt S, Glebe D, Alving K et al. // *J Biol Chem.*– 1999 ; 274 : 11945-11957. [[PubMed](#)]

184. Sayiner, A. A. Naturally occurring MHR variants in Turkish patients infected with hepatitis B virus / Sayiner AA., Ozcan A, Sengonul A. // *J Med Virol.* – 2008; 80:405-410. [[PubMed](#)]

185. Suwannakarn, K. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of pre-S and S genes / K. Suwannakarn, P. Tangkijvanich, N. Thawornsuk N. et al. // *Hepato Res.* – 2008; 38: 244-251. [[PubMed](#)]

186. Schaefer, S. Hepatitis B virus genotypes in Europe / S. Schaefer // *Hepatology Res.* – 2007. – Vol. 37. – P. 520-526.

187. Schaefer, S. Under construction: classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes / S. Schaefer, L. Magnius, H. Norder // *Intervirology.* – 2009. – Vol. 52. – P. 323-325.

188. Schildgen, O. Variant of Hepatitis B Virus with Primary Resistance to Adefovir / O. Schildgen, H. Sirma, A. Funk // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 354. – P. 1807-1812.

189. Scholtes, C. Standardized one-step real-time reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of hepatitis delta virus from clinical samples

in the presence of a heterologous internal-control RNA / C. Scholtes, V. Icard, M. Amiri, P. et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50. – P. 2126-2128.

190. Sherlock, S. *Diseases of the liver and biliary system* 10th ed. / S. Sherlock. – London : Blackwell Science Ltd., 1997.

191. Simmonds, P. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes / P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet et al. // *Hepatology*. – 2005. – Vol. 42. – P. 962-973.

192. Simmonds, P. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity / P. Simmonds, J. Mellor, T. Sakuldamrongpanich et al. // *J. Gen. Virol.* – 1996. – Vol. 7. – P. 3013-3024.

193. Simmonds, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus–15 years on / P. Simmonds // *J. Gen. Virol.* – 2004. – Vol. 85. – P. 3173-3188.

194. Smith, D. B. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment WEB resource / Smith D. B., Bukh J., Kuiken C. et al. // *Hepatology*. – 2014. – Vol. 59 (1) – P. 318-327.

195. Smuts, H. E. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa / H. E. Smuts, J. Kannemeyer // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33. – P. 1679-1681.

196. Statement, P. National Institutes of Health Consensus Development Panel Statement: management of hepatitis C / P. Statement // *Hepatology*. – 1997. – Vol. 26 (suppl 1). – P. 25-105.

197. Stuyver, L. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness / L. Stuyver, S. De Gendt, C. Van Geyt et al. // *J. Gen. Virol.* – 2000. – Vol. 81. – P. 67-74.

198. Stuyver, L. Line Probe Assay for Monitoring Drug Resistance in Hepatitis B Virus-Infected Patient during Antiviral Therapy / L. Stuyver, C. Van Geyt, S. De Gendt // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38. – P. 702-707.

199. Stuyver, L. Classification of hepatitis C virus based on phylogenetic analysis of envelope 1 and nonstructural 5b regions and identification of five additional subtypes

/ L. Stuyver, W. van Arnhem, A. Wyseur et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 10134-10138.

200. Su, C.W. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients / C.W. Su, Y.H. Huang, T.I. Huo et al. // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 130 (6). – P. 1625-1635.

201. Su T.H., Serum hepatitis B surface antigen concentration correlates with HBV DNA level in patients with chronic hepatitis B / Su T.H., Hsu C.S., Chen C.L. et al. // Antivir. Ther. – 2010. – Vol. 15. – № 8. – P. 1133-1139.

202. Tatematsu, K. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J / K. Tatematsu, Y. Tanaka, F. Kurbanov et al. // J. Virol. – 2009. – Vol. 83. – P. 10538-10547.

203. Tang, H. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein/ H. Tang, N. Oishi, S. Kaneko. – Cancer Sci. – 2006; 97:977–983. [[PubMed](#)]

204. Thong, V. D. Hepatitis C virus genotype 6: Virology, epidemiology, genetic variation and clinical implication / V. D. Thong, S. Akkarathamrongsin, K. Poovorawan et al. // World J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20 (11). – P. 2927-2940.

205. Tillmann, HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection/ HL. Tillman // World J. Gastroenterol. – 2007. – Vol. 13. – P. 125-140.

206. Tokita, H. Hepatitis C virus variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group / H. Tokita, S.M. Shrestha, H. Okamoto et al. // J. Gen. Virol. – 1994. – Vol. 75. – P. 931-936.

207. Tokita, H. Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups / H. Tokita, H. Okamoto, P. Luengrojankul et al. // J. Gen. Virol. – 1995. – Vol. 76. – P. 2329-2335.

208. Tsatsralt-Od, B. High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia / B. Tsatsralt, M. Takahashi, T. Nishizawa et al. // Journal of Medical Virology. – 2005. – Vol. 77 (4). – P. 491-499.

209. Uchida, Y. Novel hepatitis B virus strain developing due to recombination between genotypes H and B strains isolated from a Japanese patient / Y. Uchida, J. I. Kouyama, K. Naiki et al. // *Hepatology Res.* – 2014. – Vol. 44 (11). – P. 1130-1141.
210. Villeneuve, J. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient / J. Villeneuve, D. Durantel, S. Durantel et al. // *J. Hepatology.* – 2003. – Vol. 39. – P. 1085-1089.
211. Von Wagner, M. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C / M. Von Wagner, M. Huber, T. Berg // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 129. – P. 522-527.
212. Vrolijk, J. M. The treatment of hepatitis C: history, presence and future / J. M. Vrolijk, R.J. de Knegt, B.J. Veldt et al. // *Neth. J. Med.* – 2004. – Vol. 62. – P. 76-82.
213. Wallace, MC. The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective / MC. Wallace, D. Preen, GP Jeffrey, LA. Adams // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2015. – Vol.1. – P. 1-15.
214. Wang, Y. RtL164V, a mutation possibly associated with lamivudine resistant HBV / Y. Wang, Y. Yan, J. Jiang et al. // *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* – 2008. – Vol. 16. – P. 490-493.
215. Wang, Z. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China / Z. Wang, Z. Liu, G. Zeng et al. // *J. Gen. Virol.* – 2005. – Vol. 86. – P. 985-990.
216. Wedemeyer, H. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead / H. Wedemeyer, MP. Manns // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* – 2010. – Vol. 7 (1). – P. 31-40.
217. Weekly epidemiologique hebdomadaire: [www.who/int/wer](http://www.who.int/wer) // –2009. – Vol. [40](#). – P. 405-420.
218. Wightman, F. Comparison of Sequence Analysis and a Novel Discriminatory Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Strains / F. Wightman, T. Walters, A. Ayres et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol.42. – P. 3809-3812.

219. Yamazhan, T. A case of chronic hepatitis B with primary adefovir resistance / T. Yamazhan, R. Sertoz, H. Pullukcu // Mikrobiyol. Bul. – 2007. – Vol. 41. – P. 297-301.
220. Yano, Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics / Y. Yano, T. Azuma, Y. Hayashi // World J Hepatol. – 2015. – Vol. 7(3). – P. 583-92.
221. Zachou, K. Significance of HDV-RNA and HBsAg levels in delta hepatitis: first data of the Hep-Net/international HDV intervention trial / K. Zachou, C. Yurdayin, H. Dienes et al. // Journal of Hepatology. – 2006. – Vol. 44 (Suppl. 2). – P. S178.
222. Zhang, S. H. Clinicopathological significance of loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in China / Zhang SH, Cong WM, Xian ZH. // World J Gastroenterol. – 2005 ; 11 : 3034–3039. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
223. Zhi-ying, O. YVDD Mutation of Hepatitis B Virus, a Dominant Lamivudine- Resistant Type in Guangzhou, South China / O. Zhi-yuig, R. Zhou, Y. He // Virol. Sinica. – 2008. – Vol. 23. – P. 218-225.
224. Zoulim, F. Antiviral-resistant hepatitis B virus: can we prevent this monster from growing? / F. Zoulim, M. Buti, A. Lok // J. Vir. Hepat. – 2007. – Vol. 14. – P. 29-36.