

Безуглова Людмила Вячеславовна

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

1.5.6 - Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Акционерном Обществе «Вектор-Бест»

## **Научный**

**руководитель: Нетёсов Сергей Викторович**

доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии ФЕН ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

## **Официальные**

**оппоненты: Кузин Станислав Николаевич**

доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова»

**Щербаков Дмитрий Николаевич**

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

## **Ведущая**

**организация: ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ**

Защита состоится «12» декабря 2025 г. в 09:00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, тел. (383) 363-47-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
доцент

Т. Н. Ильичева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

HBsAg – главный серологический маркер инфекции ВГВ. Различия в аминокислотной последовательности поверхностного белка ВГВ HBsAg позволили в свое время разбить все изоляты вируса на 9 антигенных субтипов: ауw1, ауw2, ауw3, ауw4, ауr, адw2, адw4, адrq+, адrq-. Описаны аминокислотные вариации, определяющие принадлежность к какому-либо из субтипов. В последние два десятилетия таксономическая классификация ВГВ, основанная на различиях в последовательностях геномных ДНК вирусных изолятов, позволяет выделить не менее 9 генотипов (обозначаемых А-І). При этом тому или иному генотипу ВГВ могут соответствовать несколько субтипов HBsAg.

Встречаемость генотипов ВГВ и субтипов HBsAg в разных географических регионах варьирует. В частности, среди городского населения России и стран ближнего зарубежья доминирует генотип D ВГВ (с субтипами HBsAg ауw2 и ауw3) – его доля, в среднем, составляет 80-85% от всех циркулирующих изолятов; также на этой территории иногда встречаются генотипы А ВГВ (субтип адw2) на уровне 10-15% и С (адrq+) – до 5%. В некоторых областях России превалентность вариантов ВГВ имеет свои особенности, например, в Якутии высока встречаемость генотипа А (до 49,5%), а на Таймыре и Чукотке – генотипа С ВГВ (18-24%). При этом указанные субтипы HBsAg и генотипы ВГВ, циркулирующие на территории Российской Федерации, коррелируют друг с другом в следующих сочетаниях: субтипы HBsAg ауw2 и ауw3 – генотип D, субтип адw2 – генотип А, субтип адrq+ – генотип С, что было показано в работе (Чуланов, 2013) на выборке из 85 изолятов ВГВ.

Клиническое течение и исход ХГВ могут зависеть от генотипа ВГВ: ХГВ, вызванный вирусами генотипов С и D, имеет больший риск прогрессирования, а частота ремиссии после сероконверсии по HBeAg и спонтанной элиминации HBsAg ниже, чем при генотипе А ВГВ. Кроме того, при лечении препаратами пегилированного интерферона HBeAg-позитивных больных ХГВ наблюдается более высокая частота сероконверсии по HBeAg у пациентов с генотипом А, чем у пациентов с генотипами С и D.

Все эти данные в совокупности с глобальной стратегией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по элиминации вирусного гепатита В диктуют необходимость более пристального внимания к обнаружению HBsAg, - с одной стороны, при этом и более доступных способов изучения специфических характеристик ВГВ, - с другой, в том числе возможность типирования ВГВ в рутинной клинической практике. В то же время в современных реалиях отечественной лабораторной диагностики имеется весьма ограниченный выбор средств для целей типирования ВГВ. Определение субтипа HBsAg и генотипа ВГВ выполняют путем определения нуклеотидной последовательности S-гена ВГВ с последующим проведением филогенетического анализа и выведением аминокислотной последовательности HBsAg, определяющей субтип этого антигена. Использование такого метода предусматривает специальную пробоподготовку и наличие

дорогостоящего оборудования. Коммерческий набор для определения генотипа ВГВ «АмплиСенс® HBV-генотип-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва, Россия), позволяющий проводить генотипирование ВГВ (выявление генотипов А, В, С и D), также предусматривает определение генотипа путем работы с вирусной ДНК.

Очевидно, что если ДНК ВГВ не удастся выявить в крови пациента, то определить генотип ВГВ молекулярно-генетическими методами невозможно, а такое нередко случается в практике. В то же время наличие HBsAg в данных образцах дает возможность изучать их характеристики с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с применением высокоспецифичных моноклональных антител (МАТ). В частности, в более ранних исследованиях субтип HBsAg определяли по методике Dr. P.Swenson с использованием высокоспецифичных МАТ (Swenson et al, 1991). Благодаря данной методике в АО «Вектор-Бест» была создана коллекция образцов крови человека с разными субтипами HBsAg (ayw2, ayw3varA, ayw3varB, adw2, adrq+). Существуют также коммерческие наборы реагентов производства Японии (Institute of Immunology Co. Ltd, Tokyo, Japan) для определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах методом ИФА. При этом высокая стоимость данных наборов является существенным барьером для применения в российских лабораториях.

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

#### **Задачи исследования:**

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

#### **Научная новизна**

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

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

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

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

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

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Обнаруженный в ходе данной работы образец с субтипом ауw4 был включен в состав Стандартной панели сывороток крови<sup>1</sup>, содержащей разные субтипы и мутантные формы HBsAg вируса гепатита В АО «Вектор-Бест», предназначенной для оценки возможности коммерческих иммуноферментных наборов реагентов выявлять циркулирующие на территории РФ субтипы этого антигена.

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

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнена с помощью общенаучных методов исследования и специальных методов, в частности метод иммуноферментного анализа, молекулярно-генетические методы.

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

1. Разработанная методика с применением высокоспецифичных МАТ позволяет специфически различать 4 субтипа HBsAg (ауw2, ауw3, адw2, адrq+) и 3 генотипа ВГВ (А, С, D);
2. Показана высокая степень совпадения при сопоставлении результатов субтипирования HBsAg (88,4%) / генотипирования ВГВ (98,9%), полученных с применением разработанной методики и молекулярно-генетическими методами;
3. Показана высокая степень совпадения при сопоставлении результатов субтипирования HBsAg (95,6%) / генотипирования ВГВ (98,2%), полученных с применением разработанной методики и с помощью методики Dr. P.Swenson;
4. Разработанная методика с применением высокоспецифичных МАТ позволяет определять генотипы ВГВ в образцах сывороток и плазм крови больных с моноинфекцией ВГВ, а также с сочетанной инфекцией ВГВ + ВГД, в том числе при недетектируемом уровне ДНК ВГВ.

### **Апробация результатов**

Результаты диссертационной работы были представлены на VI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2014), VIII

---

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

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

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

### **Структура и объем диссертации**

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

### **Личный вклад автора**

Работа выполнена в АО «Вектор-Бест». Все исследования, проведенные методом ИФА, и анализ полученных данных выполнены автором. Автором отобраны МАТ анти-НВs для субтипирования НВsAg и разработана методика определения субтипов НВsAg и генотипов ВГВ в НВsAg+ образцах сывороток и плазм крови человека; написаны инструкции по подготовке комплектов реагентов и по применению разработанной методики; проведена апробация методики на представительной выборке НВsAg+ образцов сывороток и плазм крови; полученные данные сопоставлены с результатами субтипирования НВsAg и генотипирования ВГВ по методике Dr. P.Swenson и с молекулярно-генетическим определением субтипов НВsAg и генотипов ВГВ выделенных изолятов. Обсуждение и анализ результатов, полученных во внешних организациях при валидации методики, были проведены совместно с коллегами. Автором представлены лично большинство полученных результатов диссертационной работы на международных и российских конференциях.

**Автор выражает благодарность** к.б.н. Осиповой Л. П., Воеводской Л. Ю., Половице Н. В., к.м.н. Лысых Е. Е. за предоставленные образцы сывороток и плазм крови; Порываевой В. А. за предоставленные МАТ анти-НВs; Вторушиной И. А. за синтез конъюгатов МАТ-ПХ; к.б.н. Сорокину М. А. за предоставленный рекомбинантный НВsAg; к.б.н. Мануйлову В. А. и к.б.н. Сергеевой Е. И. за предоставленные данные молекулярно-генетических исследований; сотрудникам научной группы под руководством д.б.н. Кюргян К. К. за проведение валидации методики в образцах крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и с сочетанной

инфекцией ВГВ+ВГД; д.б.н. Потаповой А. А. за оценку возможности применения разработанной методики в клинической лабораторной практике. Автор выражает огромную благодарность к.б.н. Нетесовой И. Г. за консультации и ценные советы и своему научному руководителю д.б.н., проф., академику РАН Нетесову С. В. за наставничество и бесценный опыт.

### ОСНОВНЫЕ ЗНАЧИМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.

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

**Подбор анти-HBs МАТ.** С помощью внутренних контрольных образцов (ВКО1-5) панели АО «Вектор-Бест», отобранных и охарактеризованных ранее по методике Dr. P.Swenson (содержащих субтипы HBsAg/ генотипы ВГВ: Ауw2/D, Ауw3varA/D, Ауw3varB/D, Адw2/A, Адrq+/C в концентрации 100 МЕ/мл, аттестованы против международного стандарта ВОЗ 12/226), было исследовано 33 МАТ анти-HBs в виде асцитических жидкостей (АЖ) в ИФА.

Выбирали МАТ, для которых реакции с образцами ВКО1-ВКО5 отличались следующим образом: отношение минимального значения  $K_{\text{поз}}$  положительных реакций образцов ВКО1-5 к максимальному значению  $K_{\text{поз}}$  отрицательных реакций этих образцов с этим же МАТ составляло хотя бы 2; иными словами, искали те МАТ, которые лучше всего позволяли «дифференцировать» положительные и отрицательные реакции при взаимодействии образцов, содержащих разные субтипы HBsAg, с МАТ, то есть различать субдетерминанты HBsAg, а значит, и эпитопы данного поверхностного белка. При необходимости исследовали АЖ повторно, изменив разведение в большую или меньшую сторону.

Было отобрано 4 МАТ анти-HBs, продемонстрировавших специфические реакции при взаимодействии с образцами ВКО1-5, содержащих разные субтипы HBsAg, в качестве главных кандидатов для разрабатываемой методики субтипирования HBsAg (Таблица 1).

**Таблица 1.** Отобранные МАТ анти-HBs (n=4), результаты представлены в виде  $K_{\text{поз}}$ . Первая версия панели МАТ для субтипирования HBsAg

Субтип HBsAg	Образец	МАТ			
		3E1	16F8	17H2	13D4
ayw2	ВКО1	<b>1,6</b>	0,1	<b>1,7</b>	0,2
ayw3varA	ВКО2	<b>2,9</b>	0,3	0,0	0,3
ayw3varB	ВКО3	<b>2,9</b>	0,3	0,0	0,3
adw2	ВКО4	0,1	<b>1,3</b>	<b>3,6</b>	<b>1,4</b>
adrq+	ВКО5	0,1	<b>1,3</b>	0,3	0,1

*Примечание: 3E1 (далее по тексту E1) и 16F8 (далее по тексту F8) для отличия детерминант «у» и «d»; 17H2 (далее по тексту H2) для отличия субдетерминант «w2» и «w3» (применительно к «ay»); 13D4 (далее по тексту D4) для отличия субдетерминант «w» и «r» (применительно к «ad»).*

Специфические реакции отобранных МАТ с пятью субтипами HBsAg были подтверждены также результатами исследования разведенных до 100 МЕ/мл 48 образцов «расширенной» панели HBsAg+ образцов, в которых субтип HBsAg был установлен ранее по методике Dr. P.Swenson (7 образцов ayw2, 11 образцов ayw3, 12 образцов adrq+, 18 образцов adw2). Результаты, полученные с помощью выбранных МАТ анти-HBs совпали в 100% случаев с полученными ранее по методике Dr. P.Swenson результатами определения субтипов HBsAg.

**Протокол ИФА и внесенные изменения.** При повторной проверке 4 выбранных ранее МАТ оказалось, что при исследовании образцов крови, содержащих разные субтипы HBsAg, разведенных стандартным способом в 10 раз (а не до 100 МЕ/мл), а значит, с разным конечным содержанием HBsAg в исследуемой пробе, получаемые в ИФА реакции МАТ 16F8, отобранного в первой версии методики для специфического распознавания детерминанты «d», не подтвердили его высокую специфичность. В связи с этим был пересмотрен состав панели МАТ, а для отличий «у» и «d» было решено оставить только высокоспецифичное МАТ 3E1 (положительная реакция с «у», отрицательная – с «d»). Кроме того, для удобства проведения анализа предпочтительнее использование МАТ в виде конъюгата с пероксидазой хрена (МАТ-ПХ), а не в виде АЖ, а во избежание проявления «hook-effect» высоких концентраций необходим двухстадийный протокол проведения ИФА. Поэтому первая версия разрабатываемой методики была дополнена МАТ 9C4 (реагировал со всеми серотипами HBsAg), который в смеси с МАТ 16F8 был назван SM (смесь) и определял одно из ключевых условий валидности результата исследуемого образца: для всех вариантов субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ наличие положительной реакции, а для образцов субтипа adrq+/ генотипа С величина  $K_{\text{поз}}$ , вычисленная как  $\frac{\text{ОП}_{\text{обр}}\text{SM}}{\text{ОП}_{\text{крит}}\text{SM}}$ , должна превышать 2. Связано это было с тем, что реакции HBsAg субтипа adrq+ с остальными МАТ отрицательные (Таблица 1), поэтому мы усугубили требование валидности результата по конъюгату SM для образцов с данным типом ВГВ. В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) брали отрицательный пул сывороток, не содержащий HBsAg и антител к нему.

**Окончательный алгоритм.** Итоговый формат проведения ИФА, по протоколу которого и была в дальнейшем проведена апробация методики в АО «Вектор-Бест», а также валидация разработанной методики независимыми исследователями, выглядит следующим образом:

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

Регистрацию результатов осуществляют в двухволновом режиме измерения оптического поглощения: основная длина волны - 450 нм, референсная - 620 нм. Подсчет значения  $\text{ОП}_{\text{крит}}$  проводят для каждого конъюгата МАТ-ПХ отдельно:  $\text{ОП}_{\text{крит}}$  равняется полученной оптической плотности отрицательного контрольного образца ОП (ОКО) + 0,1. Реакцию считают положительной, если отношение  $\frac{\text{ОП}_{\text{обр}}}{\text{ОП}_{\text{крит}}} \geq 1$ . Результаты оценивают согласно Таблице 2.

Образцы необходимо развести в 10 раз в отрицательном пуле донорских сывороток, не содержащих HBsAg и антител к нему. Если при исследовании разведенного в 10 раз образца получена отрицательная реакция с конъюгатом SM, то образец исследовать повторно без разведения. Если образец без разведения также не

демонстрирует реакций, результаты исследований данного образца признать не валидными.

**Таблица 2.** Результаты реакций конъюгатов МАТ-ПХ с образцами сывороток/плазм крови, содержащими HBsAg разных субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ

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

*Примечание:* серым цветом показаны реакции, обязательные для интерпретации; \*результат не учитывать

Если среди значений ОП образца, превышающих ОП<sub>крит</sub>, есть значения ОП, отличающиеся более чем в 10 раз, такой образец развести в отрицательном пуле донорских сывороток дополнительно в 10 и 100 раз, провести анализ заново.

**Определение генотипов ВГВ.** С учетом того, что в РФ встречаются определенные сочетания субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ (Чуланов, 2013), а именно: ayw2/D, ayw3/D, adw2/A, adrq+/C, для определения генотипов ВГВ возможно применить данную методику с некоторой модификацией. Как было показано выше, МАТ H2 позволяет дифференцировать серотипы HBsAg ayw2 и ayw3 друг от друга в пределах одного генотипа D, и поэтому реакция с ним не является информативной для установления генотипа ВГВ. Таким образом, исследование HBsAg-положительных образцов сывороток/плазм крови с тремя конъюгатами МАТ-ПХ (SM, E1, D4) позволит сделать вывод о генотипе ВГВ: А, С или D (Таблица 3). Определяемые таким образом генотипы ВГВ будут являться ассоциированными с серотипами HBsAg.

Расчет ОП<sub>крит</sub> и К<sub>поз</sub> в этом случае проводится аналогично ранее приведенному алгоритму, для каждого конъюгата МАТ-ПХ значение ОП<sub>крит</sub> вычисляется отдельно.

Таким образом, с помощью данной методики возможно определение четырех субтипов HBsAg (ayw2, ayw3, adw2, adrq+), а также ассоциированных с ними генотипов ВГВ (А, С, D).

**Таблица 3.** Результаты реакций конъюгатов МАТ-ПХ с образцами сывороток/плазм крови, содержащими разные генотипы ВГВ

Генотип ВГВ/ субтип HBsAg	МАТ-ПХ		
	SM	E1	D4
D (HBsAg ayw2, ayw3)	+	+	*
A (HBsAg adw2)	+	-	+
C (HBsAg adrq+)	+	-	-

*Примечание:* серым цветом показаны реакции, обязательные для интерпретации; \*результат не учитывать

### Дизайн апробации методики

В исследование по апробации методики вошли две группы образцов. Тремя методами (разработанная методика, Dr. P.Swenson и молекулярно-генетические) были исследованы образцы крови представителей коренного населения Сибири. Для другой части образцов (пациенты с ХГВ из трех других регионов РФ) представлены результаты только двух методов (разработанная методика и молекулярно-генетические). Для попарного сопоставления результатов субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ, полученных разными методами, были использованы результаты тех образцов, которые были валидны одновременно в двух сравниваемых

методиках. Именно по этой причине количество образцов при сопоставлении всегда меньше исходного массива данных и количества результатов, полученных в каждой из методик. Краткая информация о количестве исследуемых образцов, валидных результатов, сопоставлении результатов отображена в Таблице 4.

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

Метод типирования ВГВ	Количество образцов, взятых в исследование	Количество образцов с невалидными результатами	Количество образцов с валидными результатами	Сопоставление результатов (методы: количество образцов)	
<i>группа 1 (коренные народности Сибири)</i>					
А	146	38	108	А и Б: 91 обр	Б и В: 113 обр
Б	146	17	129		
В	142	28	114		
<i>группа 2 (пациенты с ХГВ из 3 регионов РФ)</i>					
А	126	28	98	А и Б: 98 обр	
Б	127	0	127		
<b>ИТОГО</b>					
А	272	66	206	А и Б: 189 обр	Б и В: 113 обр
Б	273	17	256		
В	142	28	114		

*Примечания: А - молекулярно-генетические исследования; Б - разработанная нами методика с применением МАТ; В - методика Dr. P.Swenson*

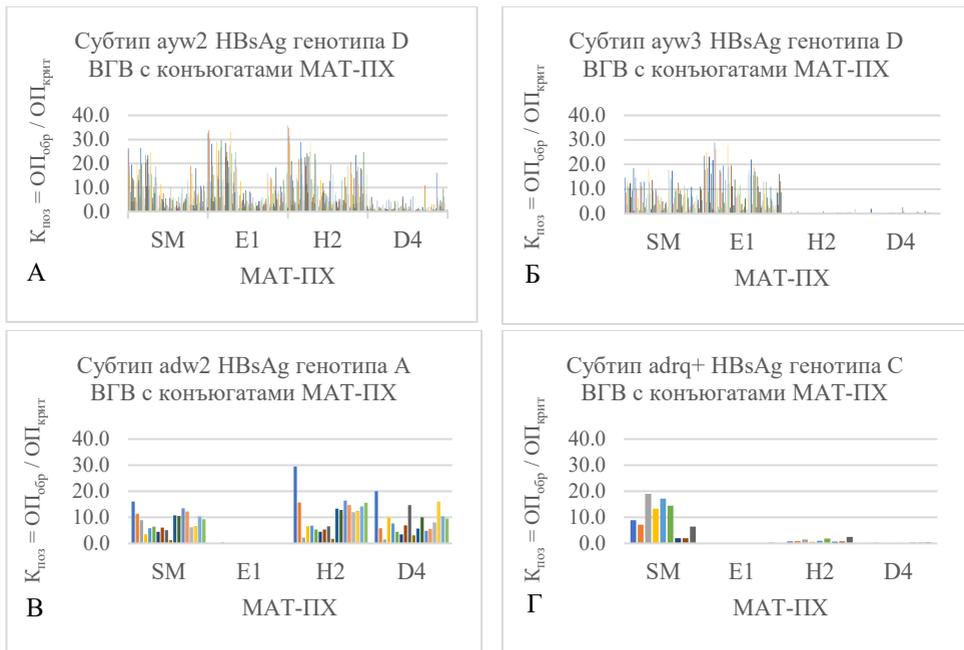
#### **Определение субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg+ образцах сывороток и плазм крови человека с помощью разработанной методики**

С использованием разработанных реагентов результаты субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ были получены для 256 (93,8%) из 273 HBsAg-положительных образцов крови, взятых в исследование. Для одного из этих образцов (АЛ396, образец закончился) установленный с помощью разработанных реагентов генотип D ВГВ и субтип ау- совпал с характеристиками ВГВ, полученными двумя другими методами (Dr. P.Swenson и молекулярно-генетические методы). Результаты исследований 17/273 образцов (6,2%) с помощью разработанной методики были признаны не валидными, что связано с концентрацией HBsAg в них менее 20 МЕ/мл.

Для 256 образцов с валидным результатом тестирования в разработанной методике были сделаны следующие выводы (субтип HBsAg/ генотип ВГВ): ауw2/D – 139 (54,3%), ауw3/D – 89 (34,8%), адw2/A – 18 (7,0%), адrq+/C – 9 (3,5%), ау-/D – 1 (0,4%) (АЛ396).

«Серологические портреты» (типичные реакции образцов с использованными МАТ SM, E1, H2, D4 в зависимости от субтипов HBsAg и генотипов ВГВ) представлены на Рисунке 1.

Результаты встречаемости генотипов ВГВ в исследованной выборке из 256 образцов совпадают с опубликованными ранее расширенными данными по генетическому разнообразию ВГВ у коренного населения Сибири, полученными на материале 143 изолятов ВГВ (Мануйлов, 2015), что свидетельствует о пригодности разработанной методики, как минимум, для проведения скринингового генотипирования ВГВ в эпидемиологических целях.



**Рисунок 1.** «Серологические портреты» образцов, определенные с помощью разработанной методики. Показаны индивидуальные значения  $K_{1003}$  образцов. Воспроизводимость метода была оценена в отдельном эксперименте: среднее значение коэффициента вариации (КВ) составило 10,0% (95% ДИ: от 8,8% до 11,1%).

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

### **Субтипы HBsAg/ генотипы ВГВ в HBsAg+ образцах плазм крови, определенные по методике Dr. P.Swenson**

Результаты определения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах плазм крови по методике Dr. P.Swenson были получены для группы представителей коренных народностей Сибири (см. Дизайн апробации методики). Из 142 образцов плазм, исследованных этим методом, 10 (7%) не реагировали с МАТ, то есть были признаны не валидными. Таким образом, демонстрировали реакции с МАТ по методике Dr. P.Swenson 132/142 (93,0%) образцов.

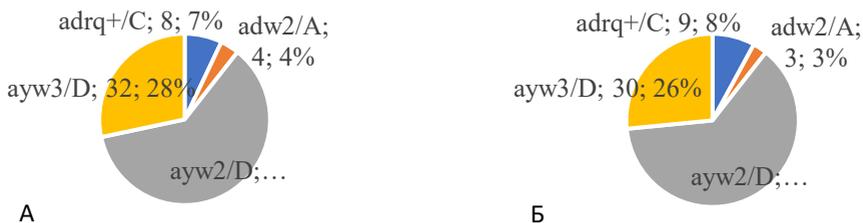
При этом 18/142 (12,7%) образцов, хоть и демонстрировали наличие реакций, но их совокупность не позволяла сделать однозначный вывод по субтипу HBsAg в связи с получением сигналов ОП в зоне от  $1 \cdot OP_{\text{крит}}$  до  $1,1 \cdot OP_{\text{крит}}$  со всеми МАТ, что затрудняло формирование четких выводов. Эти образцы не были взяты в дальнейшем для сопоставительного анализа результатов двух серологических методик.

Таким образом, валидные результаты при определении субтипов HBsAg и генотипов ВГВ были получены для 114/142 (80,3%) образцов, которые распределились следующим образом: 72/114 (63%) ayw2/D, 30/114 (26%) ayw3/D, 3/114 (3%) adw2/A, 9/114 (8%) adrq+/C.

Полученные по методике Dr. P.Swenson результаты сопоставимы с результатами молекулярно-генетических исследований, опубликованными в работе (Мануйлов, 2015) по генотипическому разнообразию ВГВ в HBsAg-положительных образцах крови представителей коренного населения данных регионов.

### Сопоставление результатов, полученных с помощью разработанной методики, с результатами, полученными по методике Dr. P.Swenson

Для сопоставления результатов двух серологических методик были взяты образцы, для которых, во-первых, по методике Dr. P.Swenson были однозначно установлены субтипы HBsAg и генотипы ВГВ (таких образцов было 114/142 (80,3%)), а во-вторых, результаты были получены в обеих сравниваемых методиках. Таким образом, сопоставить результаты оказалось возможным для 113 образцов (Таблица 4 и Рисунок 2), прореагировавших одновременно в двух методиках. Для 113 (100%) образцов, для которых был проведен сравнительный анализ (Рисунок 2), совпадение результатов двух методик составило:



**Рисунок 2.** Диаграммы распределения субтипов HBsAg/ генотипов ВГВ (N=113), определенных с помощью разработанной методики (А) и с реагентами Dr. P.Swenson (Б). Распределение вариантов ВГВ, полученные двумя сравниваемыми методиками, не имеют достоверных отличий ( $p > 0,05$ )

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

- при установлении субтипов HBsAg 108/113 (95,6%); не совпали результаты 5 образцов; один из образцов с разноречивыми результатами как генотипирования, так и субтипирования (НУК14) и еще 4 образца, для которых при совпадающем генотипе D получены отличающиеся результаты только субтипирования: для одного образца (КРА148) с помощью собственных реагентов был получен субтип HBsAg ayw2, с МАТ Dr. P.Swenson - ayw3, в трех других (ВО187, МУЖ146, НУК416) – наоборот. Отметим, что эти два сероварианта белка (ayw2, ayw3) отличаются одной заменой в 127 положении (пролин для варианта «w2» и треонин для варианта «w3»).

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

### Субтипы HBsAg/ генотипы ВГВ в HBsAg+ образцах сывороток и плазм крови, определенные молекулярно-генетическими методами

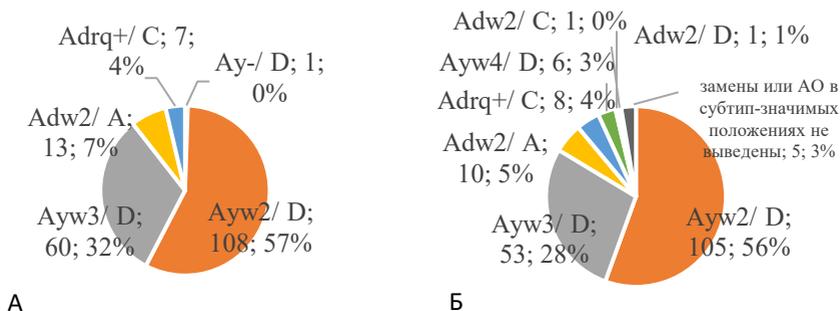
Молекулярно-генетическими методами были получены результаты для 206 образцов (охарактеризованы 206 изолятов ВГВ). Были установлены следующие предсказанные субтипы HBsAg и определены генотипы ВГВ: adw2/A – 4,9% (n=10), adrq+/C – 3,9% (n=8), ayw2/D – 57,8% (n=119), ayw3/D – 27,2% (n=56), ayw4/D – 2,9% (n=6); для 2,4% образцов (n=5) не удалось вывести АО в субтип-значимых положениях

и 1% изолятов ВГВ (n=2) охарактеризованы как нетипичные (1 – рекомбинант между генотипами А и D, 1 – рекомбинант между А и С).

### Сопоставление результатов, полученных с помощью разработанной методики, с анализом геномных последовательностей вирусной ДНК

Не для всех образцов были получены результаты молекулярно-генетических исследований, равно как и не все образцы, описанные молекулярно-генетическими методами, демонстрировали реакции в разработанной методике. Двумя методами одновременно было проанализировано 189 образцов (Таблица 4 и Рисунок 3). Один образец (АЛЗ96), о котором упоминалось в предыдущем разделе, хоть и включен в общую статистику, но субтип «ау» установлен только до «второй» буквы (не проверили реакцию с Н2 для дифференцирования «w2» и «w3»), так как образец закончился, при этом по результатам реакций с тремя конъюгатами (SM, E1, D4) был сделан вывод о генотипе D, который совпал с заключением по результатам анализа нуклеотидной последовательности S-гена изолята вируса. Еще один образец (БЛАГ20) не передавали для исследований молекулярно-генетическими методами (закончился). Остальные образцы не были охарактеризованы молекулярно-генетическими методами ввиду того, что ДНК ВГВ в них не детектировалась.

При определении генотипов ВГВ выделенных 189 изолятов вируса совпадение результатов двух методов составило 98,9% (187/189). При определении субтипов НВsAg совпадение результатов двух методов было получено в 88,4% (167/189) случаев, что является хорошим показателем сопоставления результатов этих методик.



**Рисунок 3.** Диаграмма распределения субтипов НВsAg/ генотипов ВГВ (N=189), определенных с помощью разработанной методики (А) и молекулярно-генетическими методами (Б). Распределения вариантов ВГВ, полученные двумя сравнимыми методами, не имеют достоверных отличий ( $p > 0,05$ )

### Дискордантные результаты

В общей сложности для 23 случаев с дискордантными результатами (Таблица 5) представлены данные всех трех исследований и еще для 2 – данные двух альтернативных серологических методик с МАТ.

Только для двух из 189 образцов (1.1%) при сопоставлении результатов, полученных с помощью разработанных реагентов и при анализе последовательностей ДНК ВГВ, были выявлены расхождения в результатах генотипирования (Таблица 5, ч. I. п. 1). Один из этих образцов (НУК14, JX125365) при повторном исследовании с МАТ показал совпадающий с данными секвенирования результат, что позволяет квалифицировать первично полученную реакцию как возникшую в результате технической ошибки. Другой образец, ВО163 (JX125371) демонстрировал в ИФА

реакции, характерные для генотипа А (субтип adw2), при том, что по данным секвенирования данный изолят может быть отнесен к генотипу С (субтип adrq+) (Таблица 5). В то же время, в выведенной аминокислотной последовательности HBsAg данного изолята (JX125371) в положении 126 показано наличие остатка треонина, что не является типичным для последовательностей субтипа adrq+, на который указывают аминокислотные остатки в других субтип-значимых позициях этого изолята (у других описанных изолятов ВГВ субтипа adrq+ в положении 126 находится изолейцин, а треонин характерен для субдетерминант типа «w»). Описанный уникальный феномен последовательности HBsAg изолята BO163 (JX125371) мог послужить причиной его нетипичной реакции с использованными МАТ. Это предположение подтверждается тем фактом, что образец демонстрирует нетипичную реакцию также по методике Dr. P.Swenson: реакцию, характерную для генотипа С субтипа adw2, но не adrq+, как было предсказано при анализе нуклеотидной последовательности изолята вируса. Подводя промежуточный итог, можно заключить, что показатель правильности определения генотипа ВГВ, предварительно определенный в рамках описываемых испытаний, составил 0,99 (верно генотипированы 187 из 189 прореагировавших с МАТ образцов), что является удовлетворительным значением для теста, основанного на методе ИФА. При этом неправильное определение генотипа не было связано с систематической ошибкой используемого метода, а являлось следствием наличия в исследуемой выборке мутантных изолятов ВГВ или же технических ошибок, то есть воздействия случайных факторов.

**Таблица 5.** Дискордантные результаты, полученные при сопоставлении результатов разработанной методики, анализа нуклеотидных последовательностей S-гена изолятов ВГВ, методики Dr. P.Swenson

Описание		Количество образцов	Предполагаемые причины несоответствий
<b>I. ОБРАЗЦЫ С ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК ВГВ</b>			
1. Не совпали результаты генотипирования и субтипирования (2 образца)		1	Случайная ошибка
		1	Замена П26Т, характерная для субдетерминанты w
2. Совпали результаты генотипирования, выявлены расхождения в результатах субтипирования (21 образец)	2.1. Нетипичная структура S-гена изолятов ВГВ	2	Рекомбинантные варианты
		3	Замены в 122, 127, 134 п, невозможно дифференцировать субдетерминанты w2 и w3
	2.2. Образцы с субтипом ауw4 HBsAg	6	Методика не дифференцирует субдетерминанту w4
	2.3. Невозможно предсказать субтип HBsAg по выведенным АО последовательностей ДНК ВГВ	3	Невозможно вывести АО в 122 или 127 п
	2.4. Неустановленные причины расхождения результатов	7	Причина не установлена
<b>II. ОБРАЗЦЫ С НЕДЕТЕКТИРУЕМОЙ ДНК ВГВ</b>			
3. Не совпали результаты субтипирования двух методик на основе ИФА (2 образца)		2	Причина не установлена

Помимо двух, описанных выше образцов (для которых не были правильно определены одновременно генотип ВГВ и субтип HBsAg), еще для 21 образца не совпали только результаты субтипирования с данными анализа нуклеотидных последовательностей изолятов ВГВ (Таблица 5). Из них пять изолятов (Таблица 5, ч. I. п. 2.1) имеют различные генетические aberrации в S-гене, кодирующем, как известно, HBsAg. Два из них (МУЖ240 и АЛ482) являются межгенотипными рекомбинантами с точками рекомбинации внутри S-гена, а три несут смысловые замены аминокислот HBsAg:

- T126P127 → N126S127, не позволяющую различить субтип-значимые субдетерминанты w2 и w3 в образце ЛИС15,
- замена 127S, в результате чего невозможно предсказать детерминанту w1/2/3/4 в образце БЛАГ12,
- замена 122T и не выведены АО в 127, 134 п, вследствие чего невозможно предсказать субтип HBsAg в образце 10-01709.

Интересно, что во всех трех случаях были доступны результаты трех альтернативных методик субтипирования HBsAg, при этом результаты субтипирования серологическими методами с МАТ (разработанная и Dr. P.Swenson) полностью совпали (Таблица 5, ч. I. п.2.1). Поскольку субтип HBsAg является серологической характеристикой ВГВ, в данном случае, по-видимому, верным будет установить субтип именно по результатам ИФА. Очевидно, описанные генетические особенности в перечисленных трех изолятах затрудняют установление субтипа при анализе выведенной аминокислотной последовательности, но при этом не затрагивают эпитопы распознавания использованных субтип-специфичных МАТ.

Еще шесть образцов (Таблица 5, ч. I. п. 2.2) содержали, согласно данным секвенирования, HBsAg субтипа ауw4 (генотип D), встречающийся в Сибири у 1-5% инфицированных пациентов. В разработанной методике не предусмотрена возможность распознавания субтипа ауw4, что отражено в Таблице 2, при этом генотип D в данных образцах был определен верно (Таблица 5, ч. I. п. 2.2).

Еще для трех образцов (Таблица 5, ч. I. п. 2.3), вошедших в раздел «Дискордантные результаты», не выведены АО в субтип-значимых положениях, а по методике Dr. P.Swenson данные образцы не были исследованы, таким образом, эти результаты невозможно полноценно сопоставить.

Наконец, для семи оставшихся образцов (Таблица 5, ч. I. п. 2.4) выдвинуть обоснованных предположений о причинах расхождения результатов, полученных в разных методиках, не представляется возможным. Тот факт, что субтип HBsAg в данных образцах не мог быть в большинстве случаев установлен и с использованием методики Dr. P.Swenson, заставляет предположить наличие в образцах белковых примесей, неспецифически взаимодействующих с антителами.

Результаты еще двух образцов, которые были исследованы только серологическими методами (разработанная нами методика и Dr. P.Swenson), также внесены в таблицу (Таблица 5, ч. II), причины дискордантных результатов не установлены, возможно лишь констатировать факт разночтений при сопоставлении результатов субтипирования HBsAg в пределах однозначно установленного генотипа D.

Таким образом, сравнительная оценка двух методик по определению генотипов ВГВ и субтипов HBsAg в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови, выполненная на выборке из 189 образцов, исследованных одновременно с помощью разработанных реагентов и молекулярно-генетическими методами,

показала совпадение 98,9% (187/189) результатов при генотипировании ВГВ и 88,4% (167/189) при субтипировании HBsAg.

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

#### **Оценка воспроизводимости методики определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека**

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

#### **Валидация разработанной методики типирования ВГВ.**

#### **Результаты определения генотипов ВГВ в HBsAg+ образцах сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД, в том числе в образцах с недетектируемым уровнем ДНК ВГВ**

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

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

Число валидных результатов, полученных в разработанной методике, основанной на применении МАТ, и число совпавших результатов двух методик (молекулярный метод генотипирования и с помощью МАТ) при тестировании образцов сывороток крови пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД представлены в Таблице 6.

С помощью разработанной нами методики с применением МАТ АО «Вектор-Бест», в целом, для всех групп образцов, было получено 96% (320/333) валидных результатов. Для образцов, полученных от пациентов с ВГВ с детектируемой ДНК ВГВ (группа 1) было получено 95% (82/86) валидных результатов в разработанной методике генотипирования с применением МАТ. Для двух из четырех образцов в этой группе, результаты которых признаны не валидными, была определена концентрация

HBsAg - 8 и 51 МЕ/мл соответственно (два других образца закончились). Для 81/82 (99%) образцов в этой группе результаты определения генотипов ВГВ совпали с результатами анализа нуклеотидных последовательностей ДНК ВГВ. Для одного образца (13Я) были получены дискордантные результаты: с использованием панели МАТ был установлен генотип А, в то время как филогенетический анализ нуклеотидной последовательности указывал на принадлежность генотипу С. Для данного изолята на основании аминокислотной последовательности был предсказан серотип adrq+ генотипа С ВГВ с аминокислотной заменой I126T в поверхностном белке ВГВ, и эта особенность подтверждается результатами апробации в АО «Вектор-Бест», когда выделенный изолят (ВО163) с такой же аминокислотной заменой демонстрировал аналогичное поведение. В группе образцов, полученных от пациентов с ХГВ с недетектируемой ДНК ВГВ (группа 2), валидные результаты с помощью разработанных реагентов были получены в 97% (35/36) случаев (Таблица 6). При этом высокий показатель совпадения результатов определения генотипов ВГВ, полученный на охарактеризованной молекулярно-генетическими методами панели образцов (99%), предполагает высокую вероятность получения верных результатов с помощью панели МАТ при исследовании HBsAg-положительных образцов сывороток крови пациентов с недетектируемой ДНК ВГВ. При исследовании образцов группы 2 с помощью разработанных реагентов распределение генотипов ВГВ было следующим: генотип А - 31% (n=11), генотип С - 3% (n=1), генотип D - 66% (n=23) (Таблица 7). В целом, для образцов от пациентов с ХГВ (объединенные группы 1 и 2) соотношение генотипов ВГВ А: С: D было следующим - 37%: 3%: 60%.

**Таблица 6.** Число валидных результатов, полученных в разработанной методике на основе МАТ, и число совпавших результатов двух методик (молекулярно-генетические исследования и ИФА с МАТ) при тестировании образцов сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ и сочетанной инфекцией ВГВ+ВГD

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

*Н.п. - не применимо*

У пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГD разработанная методика с МАТ АО «Вектор-Бест» позволила достоверно чаще определять генотип ВГВ по сравнению со стандартными молекулярно-генетическими методами (96,2% (203/211) против 3,8% (8/211),  $p < 0,001$ ). Данное преимущество связано с нередким отсутствием детектируемой ДНК ВГВ на фоне достаточного для анализа количества HBsAg у таких пациентов: в образцах сывороток крови пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГD

достоверно реже удавалось выявить ДНК ВГВ по сравнению с пациентами с моноинфекцией ВГВ (3,8% (8/211) против 70,5% (86/122),  $p < 0,001$ ) (Таблица 6).

**Таблица 7.** Результаты определения генотипов ВГВ, полученные в разработанной методике с применением МАТ, в образцах сывороток крови пациентов с ВГВ и ВГВ+ВГД

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

Таким образом, совпадение результатов определения генотипов ВГВ в образцах сывороток крови пациентов с моноинфекцией ВГВ с помощью разработанной методики и молекулярно-генетическими методами составило 99% (81/82). С помощью разработанной методики определены генотипы ВГВ также у пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД, у большинства из которых ДНК ВГВ не детектировалась. Разработанная методика генотипирования ВГВ была валидирована на образцах сывороток крови пациентов с ВГВ, и показано ее успешное применение для исследования образцов сывороток крови пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГД, а также образцов от пациентов с моноинфекцией ВГВ при низкой концентрации вирусной ДНК.

#### **Оценка возможности применения разработанной методики субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ в HBsAg+ образцах сывороток крови пациентов в клинической лабораторной практике**

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

В исследовании, проведенном совместно с Потаповой А. А., с помощью разработанной методики с применением МАТ валидные результаты иммуноферментного гено- и субтипирования ВГВ были получены для 10 из 40 HBsAg-положительных образцов сывороток крови. Во всех (10/10) случаях был установлен генотип D ВГВ, субтипы HBsAg ауw2 – 70% (7/10) и ауw3 – 30% (3/10), которые не противоречат данным молекулярной эпидемиологии о преобладании на территории РФ генотипа D и субтипов ауw2, ауw3.

В данном исследовании было показано, что для наиболее эффективного гено- и субтипирования ВГВ с помощью разработанной методики с применением МАТ следует использовать образцы с ОП в скрининге не менее 2,0 о.е.; показано ее успешное применение в клинической лабораторной практике для целей субтипирования HBsAg и генотипирования ВГВ в образцах проб пациентов с положительным заключением по HBsAg.

## Оценка возможности применения методики субтипирования HBsAg в иммунобиологических препаратах рекомбинантного HBsAg

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

- коммерческий рекомбинантный антиген производства ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия) субтипов ауw (серия НВС-651-А-22 от 11.2022) и adw (серия НВВ-078-22 от 11.2022), синтезирован рекомбинантным штаммом дрожжей *Hansenula polymorpha*,

- рекомбинантный антиген, полученный в АО «Вектор-Бест» (Россия) субтипов ауw (серия 230623 от 06.2023) и adw (серия 140623 от 06.2023), получен экспрессией в культуре клеток яичника китайского хомяка.

Из полученных препаратов рекомбинантного антигена были приготовлены положительные контрольные образцы (ПКО) с расчетной конечной концентрацией HBsAg 3000 МЕ/мл.

Результаты субтипирования HBsAg в приготовленных образцах ПКО, полученные с помощью разработанной методики с применением МАТ АО «Вектор-Бест» в ИФА, соответствовали совокупности реакций, характерных для субтипов HBsAg ауw2 и adw2, и представлены в Таблице 8.

**Таблица 8.** Результаты субтипирования HBsAg в препаратах рекомбинантного HBsAg, в виде значений ОП

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

Таким образом, с помощью разработанной методики были установлены субтипы HBsAg в препаратах рекомбинантного антигена двух вариантов (ауw и adw) от двух разных производителей (ЗАО НПК «Комбиотех» и АО «Вектор-Бест»). Субтипы HBsAg полностью соответствует заявленным изготовителями ауw и adw. Следовательно, применение разработанной методики субтипирования HBsAg также возможно в иммунобиологических препаратах рекомбинантного HBsAg.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика удобного и эффективного типирования ВГВ в образцах сывороток и плазм крови человека, содержащих HBsAg. С использованием данной методики возможно определить субтипы HBsAg ауw2, ауw3, adw2, adrq+ и генотипы ВГВ А, С, D. Показано, что сопоставимость результатов определения генотипов ВГВ и субтипов HBsAg в HBsAg-положительных образцах сывороток/плазм крови при использовании двух альтернативных методик составляет: от 98,2% (111/113) до 98,9% (187/189) при генотипировании ВГВ и от 88,4% (167/189) до 95,6% (108/113) при субтипировании HBsAg.

Валидация методики, выполненная независимыми исследователями, подтвердила возможность выявлять и корректно дифференцировать генотипы ВГВ А, С, D в HBsAg-положительных образцах крови человека. Важно отметить, что методика позволяет получать результаты в случаях с недетектируемой ДНК ВГВ.

Помимо этого, в связи с наличием достаточного количества HBsAg в образцах крови пациентов с сочетанной инфекцией ВГВ+ВГD, оказалось возможным установить генотип ВГВ у таких пациентов, у большинства из которых ДНК ВГВ не детектировалась.

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

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

Обнаруженный в ходе апробации разработанной методики образец субтипа ayw4 пополнил нашу коллекцию положительных образцов, содержащих разные субтипы HBsAg. Данный образец был включен в состав 7 серии Стандартной панели сывороток крови D-0540 (образцы 16-18), содержащей разные субтипы и мутантные формы HBsAg ВГВ (Таблица 9), предназначенной для оценки возможности коммерческих иммуноферментных наборов реагентов выявлять циркулирующие на территории РФ субтипы этого антигена. Более того, несмотря на указанное в инструкции к Стандартной панели использование для ИФА методов выявления HBsAg, эта панель применима также для наборов, основанных на методе ИХЛА, что было отражено в паспорте (серия 7, D-0540), а также в работе (Солонин, 2024).

**Таблица 9.** Состав Стандартной панели сывороток крови D-0540, серия 7

№ сыворотки в панели	Субтип, мутантная форма HBsAg	Аттестация против ДС-СО-HBsAg, у.е. (1 у.е. = 1МЕ/мл)	Аттестация против WHO International Standard for HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtype ayw1/adw2) NIBSC code: 12/226 IU/ml
1	ayw2	0,1	0,1
2	ayw2	0,05	0,05
3	ayw2	<0,05	<0,05
4	adw2	0,1	0,1
5	adw2	0,05	0,05
6	adw2	<0,05	<0,05
7	ayw3varA	0,1	0,1
8	ayw3varA	0,05	0,05
9	ayw3varA	<0,05	<0,05
10	ayw3varB	0,1	0,1
11	ayw3varB	0,05	0,05
12	ayw3varB	<0,05	<0,05
13	adrq+	0,1	0,1
14	adrq+	0,05	0,05
15	adrq+	<0,05	<0,05
16	ayw4	0,1	0,1
17	ayw4	0,05	0,05
18	ayw4	<0,05	<0,05
19	ayw3, S143L	0,1	0,1
20	ayw3, S143L	0,05	0,05
21	ayw3, S143L	<0,05	<0,05
22	adw3, G145R	0,17	0,1
23	adw3, G145R	0,09	0,05
24	adw3, G145R	0,05	<0,05

Ранее в АО «Вектор-Бест» для определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ в HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови с помощью MAT Dr. P.Swenson требовалось 20,5 часов, а проведение иммунологической стадии проводили

в три этапа. Разработанная методика определения субтипов HBsAg и генотипов ВГВ имеет ряд преимуществ по сравнению с ранее используемой: она менее продолжительная (позволяет проводить анализ за 5,5 часов), МАТ анти-HBs конъюгированы с ПХ, что позволяет избежать дополнительных стадий (анализ проводится в две стадии, то есть на одну стадию меньше) и, таким образом, данная методика является более удобным форматом для исследователей, проводящих ИФА. Более того, МАТ анти-HBs, используемые в разработанной методике, являются продуктом отечественного производства, что также важно в связи с импортозамещением. Данная методика может хорошо дополнить молекулярные методы в случаях, когда не доступна нуклеиновая кислота ВГВ (нет специального оборудования или не удается выделить ДНК ВГВ при наличии специального оборудования).

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

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

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

### **ВЫВОДЫ**

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

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

3. Проведено сравнение разработанной нами методики и методики, предложенной Dr. P. Swenson, по определению субтипов HBsAg и ассоциированных с ними генотипов ВГВ на HBsAg-положительных образцах сывороток и плазм крови человека. Субтипы HBsAg и ассоциированные генотипы ВГВ были установлены для 256 образцов крови в разработанной методике и для 114 образцов крови представителей коренных народностей Сибири, исследованных по методике Dr.

P.Swenson. Показано совпадение 98,2% (111/113) результатов при генотипировании ВГВ и 95,6% (108/113) при субтипировании HBsAg при сравнении этих двух методик;

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

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

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. **Безуглова, Л. В.** Результаты испытаний реагентов для иммуноферментного определения субтипа HBsAg и генотипа вируса гепатита В в образцах плазмы крови человека / **Л. В. Безуглова**, В. А. Мануйлов, Л. П. Осипова, Я. Д. Мосина, В. А. Порываева, О. А. Агафонова, А. К. Могильных, С. В. Нетёсов, И. Г. Нетесова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2020. – Т. 38. – N. 4. – С. 188–195.
2. **Безуглова, Л. В.** Генотипы вируса гепатита В у пациентов с гепатитом D, определенные с помощью панели моноклональных антител собственной разработки / **Л. В. Безуглова**, О. В. Исаева, А. А. Карлсен, Л. Ю. Ильченко, С. С. Слепцова, А. А. Сарыглар, В. А. Порываева, Я. Д. Мосина, О. А. Агафонова, А. К. Могильных, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, С. В. Нетесов, И. Г. Нетесова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2022. – Т. 40. – N. 2. – С. 43–50.
3. Karlsen, A. A. Different evolutionary dynamics of hepatitis B virus genotypes A and D, and hepatitis D virus genotypes 1 and 2 in an endemic area of Yakutia, Russia / A. A. Karlsen, K. K. Kyuregyan, O. V. Isaeva, V. S. Kichatova, F. A. Asadi Mobarkhan, **L. V. Bezuglova**, I. G. Netesova, V. A. Manuylov, A. A. Pochtovyi, V. A. Gushchin, S. S. Sleptsova, M. E. Ignateva, M. I. Mikhailov // BMC Infectious Diseases. – 2022. – V. 22. – N. 452.
4. **Безуглова, Л. В.** Маркеры вирусного гепатита В в образцах плазмы крови коренного населения Крайнего Севера России. Генотипы ВГВ и субтипы HBsAg / **Л. В. Безуглова**, Л. П. Осипова, Е. И. Сергеева, И. В. Делий, Л. Э. Табиханова, С. В. Нетесов, И. Г. Нетесова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2022. – Т. 40. – N. 3. – С. 41-48.
5. **Безуглова, Л. В.** Алгоритм отбора образцов для гено- и субтипирования вируса гепатита В с помощью панели моноклональных антител в иммуноферментном анализе / **Л. В. Безуглова**, А. А. Потапова, И. Г. Нетесова // Медицинский алфавит. – 2023. – Т. 4. – С. 30–33.
6. **Безуглова, Л. В.** Результаты сравнительного определения субтипов HBsAg и генотипов вируса гепатита В в HBsAg-положительных образцах сыворотки крови человека, полученные с помощью реагентов собственной разработки и молекулярно-биологическими методами / **Л. В. Безуглова**, Л. Ю. Воеводская, Е. Е. Лыских, Н. В. Половица, Е. И. Сергеева, И. В. Делий, М. К. Иванов, С. В. Нетёсов, И. Г. Нетесова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2023. – Т. 41. – N. 2. – С. 36-41.