

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

**Федеральное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"**

На правах рукописи

Мануйлов Виктор Александрович

**Генетическое разнообразие вируса гепатита В
в группах коренного населения Сибири**

03.01.00 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
член-корр. РАН, профессор, д.б.н. С.В. Нетесов

Кольцово, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
1. ВВЕДЕНИЕ	5
Цель и задачи исследования.....	6
Научная новизна и практическая ценность.....	7
Апробация результатов диссертации и публикации.....	7
Структура и объем диссертации.....	8
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
2.1. Историческая справка	9
2.2. Строение вириона ВГВ, его геном и репликация	15
2.3. Патогенез инфекции ВГВ, серологические маркеры	19
2.4. Классификация ВГВ	23
2.4.1. Вариабельность ВГВ	23
2.4.2. Серологическая классификация (субтипы HBsAg)	26
2.4.3. Генетическая классификация (генотипы и субгенотипы ВГВ) ...	28
2.5. Зачем изучают разнообразие ВГВ?	37
2.5.1. Эволюция и распространение ВГВ.....	37
2.5.2. Влияние субтипов HBsAg на диагностику и иммуно- профилактику ВГВ	42
2.5.3. Влияние генотипов ВГВ на клиническую картину заболевания	45
2.6. Эпидемиологическая характеристика ВГВ	48
2.7. Разнообразие ВГВ в мире	51
2.8. Характеристика ВГВ в России и странах ближнего зарубежья	58

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	63
3.1. Дизайн исследования и обследуемые группы	63
3.2. Сбор, хранение и транспортировка образцов	64
3.3. Иммуноферментный анализ	65
3.4. ПЦР и секвенирование ДНК	65
3.5. Анализ последовательностей	66
3.1.1. Выбор метода анализа и исследуемого участка генома ВГВ	67
3.5. Статистическая обработка данных.....	68
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	71
4.1. Результаты для всей исследованной группы	71
4.2. Республика Алтай (юго-запад Сибири; казахи, алтайцы)	76
4.3. Кемеровская область (юго-запад Сибири; телеуты)	77
4.4. Иркутская область (юго-восток Сибири; буряты, русские)	78
4.5. Ямало-Ненцкий автономный округ (северо-запад Сибири; ханты, коми, ненцы, селькупы)	79
4.6. Красноярский край (север Сибири; долганы, нганасаны, кеты)	80
4.7. Множественные сравнения	82
4.8. Возможные пути передачи ВГВ у коренного населения Сибири	83
4.9. Другое представление данных: общая группа	86
4.10. Другое представление данных: национальности	88
4.11. Генотип С ВГВ в Сибири.....	96
4.12. Заключение	99
5. ВЫВОДЫ	100
6. БЛАГОДАРНОСТИ	102
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО – аминокислотный остаток (мономер пептида, белка)

ВГВ – вирус гепатита В

ВГС – вирус гепатита С

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ИФА – иммуноферментный анализ

н. – нуклеотид, п.н. – пара (пар) нуклеотидов

ОГВ – острый гепатит В

пгРНК – прегеномная РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ХГВ – хронический гепатит В

ЯНАО – Ямало-Ненецкий автономный округ

anti-HBs, HBc, HBe – антитела к соответствующим антигенам (см. ниже)

CDC – Centre for Disease Control and Prevention (Центр по контролю заболеваний, США)

kb – kilobase, единица, обозначающая 1 тысячу нуклеотидов ДНК или РНК

HBsAg – hepatitis B surface antigen (поверхностный антиген вируса гепатита В)

HBcAg – hepatitis B core antigen (коровый антиген вируса гепатита В)

HBeAg – hepatitis B envelope antigen (оболочечный антиген вируса гепатита В)

IgG – иммуноглобулины (антитела) класса G

IgM – иммуноглобулины (антитела) класса M

ML – maximum likelihood, метод максимального правдоподобия в филогенистике

RFLP – restriction fragment length polymorphism (анализ длины рестрикционных фрагментов)

UPGMA – unweighted pair group method using arithmetic averages, метод невзвешенных попарных средних в филогенистике

1. ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита В (ВГВ) относится к одним из наиболее опасных отдаленными последствиями инфекций вирусов человека. В мире насчитывается 250-300 млн. хронических носителей ВГВ, причем этот показатель продолжает увеличиваться с ростом населения планеты (Ott et al., 2012). Среди 15-25% хронических носителей ВГВ со временем разовьется цирроз печени или гепатоцеллюлярная карцинома (Mast & Alter, 1993). От хронических заболеваний печени и гепатоцеллюлярной карциномы в мире в год умирает около 1 млн. человек (Thomas & Jacyna, 1993).

В последние годы получены данные о влиянии генетических и серологических особенностей ВГВ на клиническую картину заболевания (Fujii et al., 1992; McMahon, 2009; Kao et al., 2010; Lin and Kao, 2011), чувствительность и специфичность существующих методов диагностики (Echevarria et al., 2005; Баженов и др., 2008) и эффективность вакцинопрофилактики (Cooreman et al., 2001, Avazova et al., 2006) данного патогена. В современном мире практический специалист в области диагностики и лечения ВГВ должен учитывать эти генетические особенности вируса в своей работе (Tanaka and Mizokami, 2007; Kao et al., 2011). Кроме того, высокая вариабельность ВГВ представляет хорошие возможности для проведения исследований, связанных с эволюцией вируса, историей и динамикой его распространения среди населения земного шара (Simmonds, 2001; Norder et al., 2004; Paraskevis et al., 2013). Такие исследования выполняются в различных регионах мира (Norder et al., 2004; Kurbanov et al, 2010; Kao, 2011).

В то же время, существующие данные, касающиеся разнообразия ВГВ в сибирском регионе и в России в целом, до сих пор весьма ограничены, что не позволяет создать целостную молекулярно-эпидемиологическую картину в отношении данной инфекции. Исследование геномов изолятов¹ ВГВ,

¹ Изолят - целый организм инфекционного патогена (включая вирион), его жизнеспособная часть, или популяция таких организмов, полученная от больного или выделенная из природного источника; говоря об изолятах ВГВ, обычно подразумевают вирусы, полученные от разных носителей.

циркулирующих среди населения Сибири, необходимо для изучения молекулярной вариабельности ВГВ на данной территории. Сибирский регион интересен для эпидемиолога разнообразием групп населения, развивавшихся в течение долгого времени в условиях ограниченных контактов. В этой связи следует предположить роль небольших по численности локальных популяций в качестве возможных резервуаров, в которых происходит сохранение и, возможно, ускоренное эволюционное развитие каких-либо инфекционных патогенов. Молекулярно-генетические исследования позволяют оценить степень генетической гетерогенности возбудителя, предсказать направление дальнейшего развития эпидемической ситуации, а также расследовать эпидемические цепочки случаев заражения ВГВ.

В настоящей работе приведены обобщенные результаты исследований параметров изолятов ВГВ в нескольких группах коренного населения, проживающих в удаленных районах севера, юга и востока Сибири.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение частоты встречаемости ВГВ, его генотипов, субгенотипов и субтипов (серотипов поверхностного белка вируса – HBsAg) в группах коренного населения ряда районов Сибири и анализ полученных данных.

Задачи исследования:

1. Определить частоту встречаемости HBsAg методом ИФА в группах коренного населения Сибири: алтайцев и казахов Республики Алтай; телеутов Кемеровской области; бурят и русских Иркутской области; хантов, коми, ненцев, селькупов Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО); долган, нганасан и кетов Красноярского края.
2. Определить встречаемость генотипов и субгенотипов ВГВ в перечисленных группах.
3. Определить встречаемость субтипов HBsAg в перечисленных группах.

4. Сравнить исследованные группы коренного населения Сибири между собой по изучаемым параметрам и сделать выводы о характеристиках ВГВ в этих группах и различиях между ними.

Научная новизна и практическая ценность

Впервые получены данные о встречаемости ВГВ и его вариантов (генотипов, субгенотипов), а также уточнены данные по встречаемости субтипов HBsAg для групп коренного населения Сибири: алтайцев и казахов Республики Алтай, телеутов Кемеровской области, бурят и русских Иркутской области, хантов, коми, ненцев и селькупов ЯНАО, кетов, долган и нганасан Красноярского края. Полученные данные являются оригинальными и должны учитываться при организации эпиднадзора за вирусными гепатитами среди коренных жителей Сибири, а также совершенствовании средств диагностики и вакцинопрофилактики гепатита В с учетом разнообразия вариантов ВГВ, циркулирующих на данной территории.

Апробация результатов диссертации и публикации

По теме диссертации опубликовано 3 научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ.

Результаты исследований были представлены на Российской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2005 г.), Международной научно-практической конференции «Геномные технологии в медицине и медицинское образование на рубеже веков» (Республика Казахстан, Алматы, 2006 г.), XIII Международном конгрессе по приполярной медицине (Новосибирск, 2006 г.), VII Российской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты – эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика» (Москва, 2007 г.), VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 118 страницах текста, включает 6 таблиц и 12 рисунков и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, а также список литературы, состоящий из 240 источников отечественных и зарубежных авторов.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Историческая справка

Предположения об инфекционной природе гепатита, распространенного заболевания печени, известного под названием катаральной желтухи, впервые были высказаны С.П. Боткиным в конце 19 века, еще до открытия вирусов как биологических объектов (Боткин, изд. 1950). Со временем в результате широкого признания этой точки зрения гепатиты инфекционной природы получили название болезни Боткина. В 40-х годах 20 века от алиментарного гепатита А, распространяющегося фекально-оральным путем, стали отличать так называемый сывороточный гепатит В, передающийся парентерально – посредством переливания зараженной крови (MacCallum and Bauer, 1944). Со временем были открыты возбудители, вызывающие гепатиты С, D, E и другие.

Изучение возбудителя гепатита В берет свое начало в 1964 году, когда Барух Бламберг с соавторами при исследовании иммунологическими методами крови аборигенов Австралии обнаружил неизвестный до тех пор антиген, названный «австралийским» (Blumberg et al., 1965). Тот факт, что передача этого антигена не подчинялась законам менделевской генетики, и его приобретение происходило не сразу после рождения, а спустя какое-то время, а также несомненная связь между наличием антигена в крови и заболеваемостью гепатитом В, позволили предположить, что «австралийский антиген» и является инфекционным агентом гепатита В или его частью. В настоящее время «австралийский антиген» известен как HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) – поверхностный белок ВГВ. За открытие «австралийского антигена» Б. Бламберг в 1976 году удостоен Нобелевской премии (стоит отметить, что к настоящему времени это единственная Нобелевская премия, присужденная за исследования в области вирусных гепатитов).

В 1970 году, при электронно-микроскопическом исследовании сывороток крови, содержавших «австралийский антиген», в больших количествах были обнаружены сферические и продолговатые (тубулярные) частицы, имевшие

диаметр 22 нм, а также более крупные сферические частицы размером 42 нм, содержавшие внутренний нуклеокапсид (Dane et al., 1970; рисунок 1). Последние были названы частицами Дейна по имени первооткрывателя. Вскоре было показано, что частицы Дейна являются цельными вирионами ВГВ, в то время как меньшие частицы образованы конгломератами HBsAg.

В 1971-72 годах были впервые описаны четыре серотипа (субтипа) HBsAg (Le Bouvier, 1971, Bancroft et al., 1972), что положило начало серологической классификации ВГВ. К 1983 году число открытых основных субтипов HBsAg достигло девяти (Courouce et al., 1983) и остается таковым до сих пор. Несмотря на то, что исследования HBsAg на молекулярном уровне продолжают и по сей день, основные успехи в изучении аминокислотных последовательностей, соответствующих различным субтипам HBsAg, были достигнуты к 1992 году (Okamoto et al., 1989; Norder et al., 1992a).

В 1978 году полный геном ВГВ был впервые клонирован в прокариотической векторной системе (Fritsch et al., 1978). Определение нуклеотидной последовательности полноразмерного генома ВГВ было завершено к 1979 году (Galibert et al., 1979). В 1988 году Хироши Окамото с соавторами предложили использовать отличия в ДНК геномов ВГВ для создания генетической классификации изолятов данного патогена. К четырем генетическим группам (генотипам) ВГВ, выделенным этими авторами (Okamoto et al., 1988), в 1992 году добавилось еще две (Norder et al., 1992a), а к 2002 году число известных генотипов ВГВ увеличилось до восьми (Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002). В начале 21 века, в связи с накоплением новых данных, полученных при изучении филогенетическими методами большого числа полногеномных последовательностей ВГВ, появилась возможность расширить существовавшую генетическую классификацию, подразделив некоторые генотипы вируса на субгенотипы (Kramvis et al., 2002; Norder et al., 2003; Kimbi et al., 2004; Norder et al., 2004; Huy et al. 2004; Huy et al. 2006). В настоящий момент выделяют 24 субгенотипа ВГВ, однако вполне вероятно

увеличение их количества в будущем (Olinger et al., 2006; Sakamoto et al., 2006; Schaefer et al., 2009; Utsumi et al., 2009).

Параллельно с изучением молекулярной биологии ВГВ, происходило активное развитие методов диагностики, лечения и профилактики гепатита В (ГВ). В начале 70-х годов прошлого века дополнительно к HBsAg были охарактеризованы еще два антигена ВГВ, имеющие важное диагностическое значение. Это core-антиген (известный также как HBcAg и образующий нуклеокапсид вируса) и описанная для него сероконверсия HBcAg/anti-HBc (Almedia et al., 1971), а также HBeAg, являющийся процессируемым вариантом HBcAg, и его система сероконверсии HBeAg/anti-HBe (Magnius and Espmark, 1972).

В 1975 году на основе фотометрического анализа очищенного белка HBsAg был предложен один из первых методов его количественного определения в крови (Gerlich and Thomssen, 1975), что дало возможность оценивать (хоть и косвенно) эффективность проводимой терапии. Развитие иммунологических методов, в частности, иммуноферментного анализа (ИФА), в качестве диагностических, а также понимание динамики появления и исчезновения серологических маркеров гепатита В на различных стадиях болезни (Chau et al., 1983) позволило к началу 1990-х годов сформировать алгоритм серодиагностики ВГВ практически в том виде, в котором он существует и по сей день (Hoofnagle and Di Bisceglie, 1991). Применение в диагностических целях методов молекулярной биологии, и, главным образом, ПЦР, предложенной для ВГВ впервые в 1990 году (Kaneko et al., 1990), кардинальным образом расширило возможности диагностики данной инфекции.

Неспецифическое противовирусное лечение хронического гепатита В с использованием лейкоцитарных интерферонов было впервые предложено в 1976 году (Desmyter et al., 1976; Greenberg et al., 1976). Предпосылки для этиотропной терапии ВГВ, основанной на применении нуклеозидных аналогов, взаимодействующих с вирусной полимеразой, появились еще в 1991 году

(Doong et al., 1991), но широкое применение в клинической практике препараты этого типа получили только с 1995 года (Dientstag et al., 1995), и в настоящий момент они широко используются в терапии гепатита В. Однако, несмотря на достигнутые успехи в лечении данной инфекции и постоянную разработку новых средств лечения, существующие схемы терапии отнюдь не обладают абсолютной эффективностью в отношении гепатита В. Поэтому признанным способом предотвращения распространения этой инфекции является профилактика заражения гепатитом В, и, в первую очередь, вакцинация против ВГВ.

Первая вакцина против ВГВ на основе очищенных антигенов вируса, полученных из донорской крови, появилась в конце 70-х годов 20 века (Francis et al., 1982; McLean et al., 1983). Коммерчески доступная вакцина против ВГВ, основанная на рекомбинантном HBsAg и отличавшаяся большей эффективностью и безопасностью, впервые была разработана в США в конце 1970-х гг. (Valenzuela et al., 1979; Edman et al., 1981; Valenzuela et al., 1982). Именно в этой стране впервые началось внедрение программ вакцинации против гепатита В, охватывающих широкие слои населения: в 1982 году Центр по контролю над инфекционными заболеваниями (Centre for Disease Control and Prevention, CDC) рекомендовал вакцинацию лиц, входящих в основные группы риска в отношении передачи ВГВ (Davidson and Krugman, 1986), в 1991 году началась вакцинация всех новорожденных, а начиная с 1995 года – всех подростков (Goldstein et al., 2002). Вскоре большинство развитых стран последовали примеру США. В России всеобщая вакцинация новорожденных началась в 2001 году (приказ Министерства здравоохранения РФ № 229 от 27.06.2001); также в начале первого десятилетия XXI века в ряде регионов России стартовали программы по вакцинации подростков и работников медицинских учреждений, которые стали всероссийскими с 2005 года (см. Федеральный закон № 157-ФЗ от 17.09.1998 г. «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» с последующими изменениями до 2014 г., а также периодические приказы МЗ РФ «Об утверждении национального календаря

профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»).

В целом, гепатит В и его возбудителя на сегодняшний день можно считать хорошо изученными, особенно по сравнению с некоторыми другими инфекциями, передающимися парентерально, в частности, вирусами иммунодефицита человека и гепатита С. На момент написания настоящего обзора, в международной электронной базе данных PubMed (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) депонировано не менее 75 000 научных статей и сообщений, тем или иным образом касающихся тематики гепатита В. В то же время, достигнутые на сегодняшний день успехи в изучении ВГВ не позволяют говорить о полном контроле над этой инфекцией, что оставляет широкое поле для поиска новых средств в борьбе с этой одной из самых распространенных и опасных болезней человека.

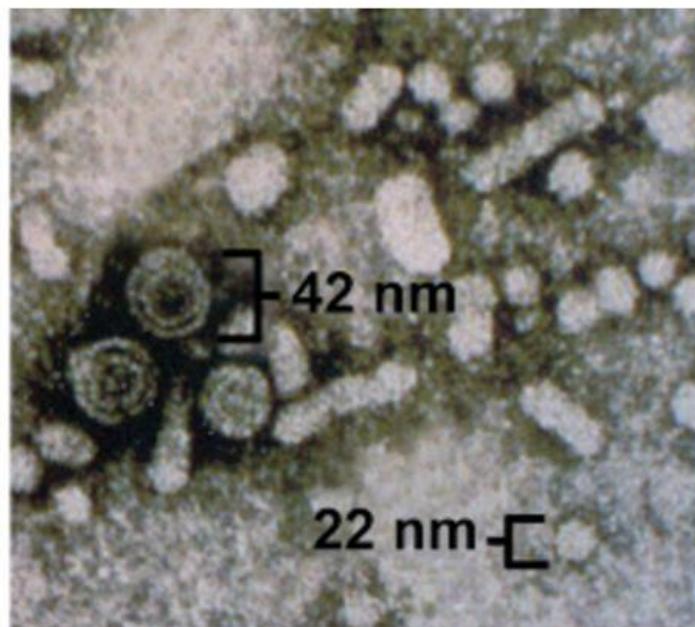


Рисунок 1.

Фотография вирионов ВГВ (справа) и конгломератов HBsAg (слева), полученная методом электронной микроскопии (рисунок из Jake Liang, 2009).

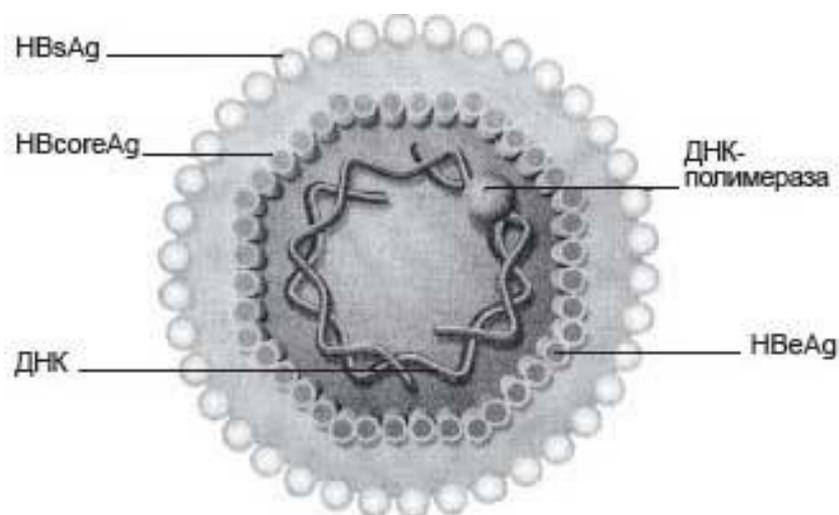


Рисунок 2.

Схематическое строение вириона ВГВ (рисунок по Jake Liang, 2009).
Обозначения в тексте.

2.2. Строение вириона ВГВ, его геном и репликация

ВГВ человека относится к роду *Orthohepadnavirus* семейства *Hepadnaviridae* и является его типичным представителем (здесь и далее информация о вирионе и геноме ВГВ цит. по обзорам Nassal, 1999; Hollinger, 2001; Jake Liang, 2009). Ближайшими его родственниками являются ВГВ обезьян, отдаленными – ВГВ некоторых грызунов и птиц. Вирион ВГВ сферической формы имеет диаметр 42 нм (рисунки 1, 2). Вирион включает геномную ДНК, липидный бислой и три вида структурных белков: поверхностный – HBsAg (от англ. «hepatitis B surface antigen»), коровый – HBcAg или HBcoreAg (от «hepatitis B core antigen») и вирусную полимеразу – Р-белок (от «polymerase») (рисунок 2).

Размер генома ВГВ для большинства генетических вариантов вируса составляет 3221 п.н.², однако описаны вариации размера геномной ДНК в пределах ± 200 п.н. за счет делеций и инсерций (Norder et al., 1994; Bowyer et al., 1997). Геном ВГВ представляет собой незавершенно-двухцепочечную кольцевую структуру (рисунок 3). Длинная «минус»-цепь содержит всю последовательность генов, достаточную для обеспечения структуры и жизнедеятельности вируса. Короткая «плюс»-цепь ДНК варьирует по длине и составляет только 50–80% от длины «минус»-цепи. Кольцевая структура генома получается благодаря спариванию комплементарных оснований нуклеотидов двух цепей на «липких» 5'-концах. «Минус»-цепь на 5'-конце ковалентно связана с молекулой Р-белка (Gerlich and Robinson, 1980).

Геном ВГВ содержит 4 перекрывающихся открытые рамки считывания, включающих гены, обозначаемые S, С, Р и Х. Эти гены, кроме структурных, также содержат регуляторные последовательности, управляющие синтезом вирусных белков, циклом репликации вируса.

Ген S размером 678 п.н. кодирует 226 аминокислотных остатков (АО) HBsAg. Перед этим геном имеются Pre-S1- и Pre-S2-области, размером 324-357

² Геном ВГВ незавершенно-двухцепочечный, то есть часть его представлена одноцепочечной ДНК. Тем не менее, здесь и далее мы будем использовать обозначение п.н. (пар нуклеотидов), как более привычное.

п.н. и 165 п.н., соответственно, и кодирующие 108-119 АО Pre-S1- и 50 АО Pre-S2-пептидов ВГВ. Pre-S-пептиды транслируются совместно с HBsAg, поэтому поверхностная оболочка вируса включает три вида этого белка в зависимости от положения иницирующего кодона, и различающихся из-за этого по размеру (Heermann et al., 1984).

Ген С размером 555 п.н. кодирует 185 АО HBcAg (иногда называемый HBcoreAg). Как и гену S, гену С предшествует короткая кодирующая область Pre-C размером 87 п.н. Pre-C-пептид обеспечивает связывание предшественника HBcAg с мембраной эндоплазматического ретикулула клетки (Ou et al., 1986; Milich and Liang, 2003). Совместный продукт Pre-C- и С-областей после пост-трансляционной модификации называется HBeAg (hepatitis B envelope antigen), имеет размер 150-151 АО, и не является структурным, однако, по ряду данных, обеспечивает толерантность иммунной системы хозяина к вирусу и клеткам, пораженным им (Lok and McMahon, 2007; Liaw et al., 2010).

Ген Р имеет размер 2532 п.н. и кодирует 844 АО ДНК- и РНК-зависимой полимеразы ВГВ. Функция гена Х (размер 462 п.н.), располагающегося на «липких» концах генома и кодирующего 154 АО белка Х, до конца не выяснена, однако предполагается, что продукт этого гена участвует в регуляции экспрессии вирусных и, возможно, клеточных генов (Leupin et al., 2005; Ishtiaq et al., 2011).

Существуют разные способы нумерации сайтов (нуклеотидов) в геноме ВГВ, однако мы в данной работе будем пользоваться тем из них, который получил наибольшее распространение (Norder et al., 1992; Schaefer, 2007; Norder et al., 2004). За основу нумерации берется опубликованная еще в 1980 году (Valenzuela et al., 1980) референсная последовательность генотипа А с уникальным шифром базы GenBank X02763 (авторами обозначенная как рНВV3200). При этом первым нуклеотидом в ней считается следующий за сайтом рестрикции EcoRI - g↓Aattc. Эта позиция находится в области Pre-S2 генома.

Цикл репликации ВГВ можно представить следующей упрощенной схемой (Ganem and Schneider, 2001, рисунок 4). После взаимодействия вируса с клеточными рецепторами, нуклеопротеиновый комплекс проникает в цитоплазму клетки. Здесь нуклеокапсид разрушается, и кольцевая молекула ДНК вируса с присоединенной к ней молекулой вирусной ДНК-полимеразы транспортируется в ядро клетки. В ядре с помощью ДНК-полимеразы вируса происходит достройка «плюс»-цепи и восстановление завершенной кольцевой структуры ДНК вируса. Затем клеточные ферменты синтезируют 4 основных типа транскриптов (длиной 0,7, 2,1, 2,4 и 3,5 kb) с «плюс»-цепи генома ВГВ. Все типы транскриптов выполняют роль мРНК при трансляции вирусных белков, а самый длинный из них содержит всю комплементарную последовательность «плюс»-цепи и называется прегеномной РНК (пгРНК). пгРНК в цитоплазме клетки присоединяет молекулу вирусной ДНК-полимеразы и вместе с молекулами С-белка образует прекапсид, в котором происходит обратная транскрипция пгРНК с образованием «минус»-цепи ДНК ВГВ. В дальнейшем пгРНК деградирует, синтезируется незавершенная «плюс»-цепь, капсид транспортируется в шероховатую эндоплазматическую сеть клетки и комплекс Гольджи, где с присоединением HBsAg формируется зрелый вирион, который выходит из клетки. Клетки, инфицированные ВГВ, начинают также в большом количестве продуцировать HBsAg в виде частиц размером 20-22 нм (рисунок 1). Концентрация HBsAg в крови некоторых больных в период активной репликации вируса может достигать 500 мг/мл и быть сравнимой с концентрацией сывороточного альбумина (Zoulim et al., 1992).

ВГВ при обычном цикле репликации не разрушает клетки печени. Цитолиз гепатоцитов при заболевании гепатитом В связывают с атакой эффекторных цитотоксических элементов иммунной системы организма хозяина на зараженные клетки (Nassal, 1999).

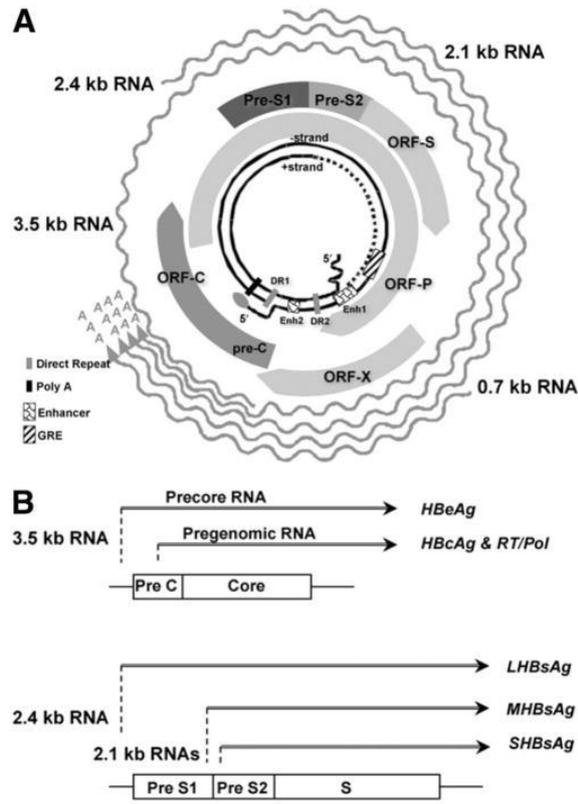


Рисунок 3.

Строение генома ВГВ (рисунок из Jake Liang, 2009). Обозначения в тексте.

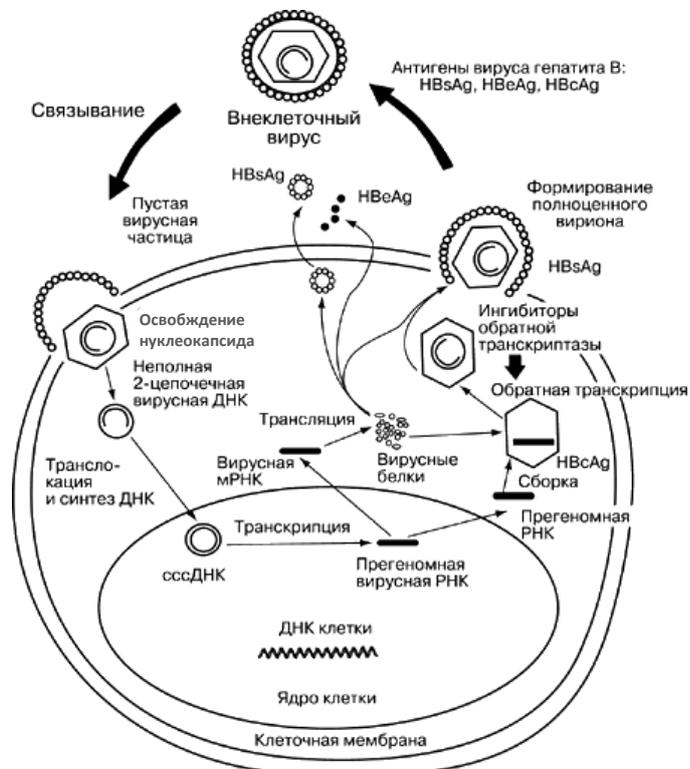


Рисунок 4.

Схема репликации ВГВ (рисунок из De Clercq, 1999).

2.3. Патогенез инфекции ВГВ, серологические маркеры

После инфицирования и инкубационного периода (2-4 месяца для взрослого человека) развивается острая фаза заболевания (острый гепатит В, ОГВ). Ее симптомы могут быть как весьма умеренными (до 65-80% инфицированных переносят заболевание бессимптомно), так и выраженными в форме желтухи, лихорадки, тошноты и т.д. Смертность при выраженном ОГВ составляет 3-10%, то есть находится на уровне смертности от других острых гепатитов (в т.ч. неинфекционных) (цит. по обзору Аммосов, 2006). В редких случаях в острой фазе развивается фулминантный гепатит В (особо тяжелая острая форма заболевания, смертность при которой составляет 80-100%) (Fagan and Williams, 1990). Острая фаза может завершиться полным выздоровлением и реконвалесценцией – иммунизацией после перенесенного заболевания. В ряде случаев происходит хронизация болезни (хронический гепатит В, ХГВ). Частота хронизации зависит от ряда факторов, основным из которых является возраст пациента. У новорожденных, инфицированных при рождении, этот показатель составляет 90%, у детей до 5 лет – 20-50% (Shapiro, 1993). В старшем возрасте ХГВ развивается в 5-10% случаев (Huams, 1995). В последующие годы при хронической инфекции у 20% больных развивается цирроз печени, а у больных с циррозом в 30% случаев в дальнейшем обнаруживается первичный рак печени (гепатоцеллюлярная карцинома – ГЦК). В результате, ежегодно в мире умирает около 700 тыс. человек от цирроза и 300 тыс. от ГЦК, развивающейся вслед за циррозом. (Thomas & Jасуна, 1993).

С клинической точки зрения, различные стадии ОГВ и ХГВ характеризуются появлением в крови больного серологических маркеров гепатита В - продуктов S и С генов ВГВ, антител к ним, ДНК ВГВ, и ряда биохимических маркеров - аланинаминотрансферазы (АЛТ) и билирубина (последние два высвобождаются из гепатоцитов при их цитолизе клетками иммунной системы), и их соотношением (рисунки 5, 6). Краткое описание серологических маркёров ВГВ представлено ниже (согласно Hollinger et al, 2001):

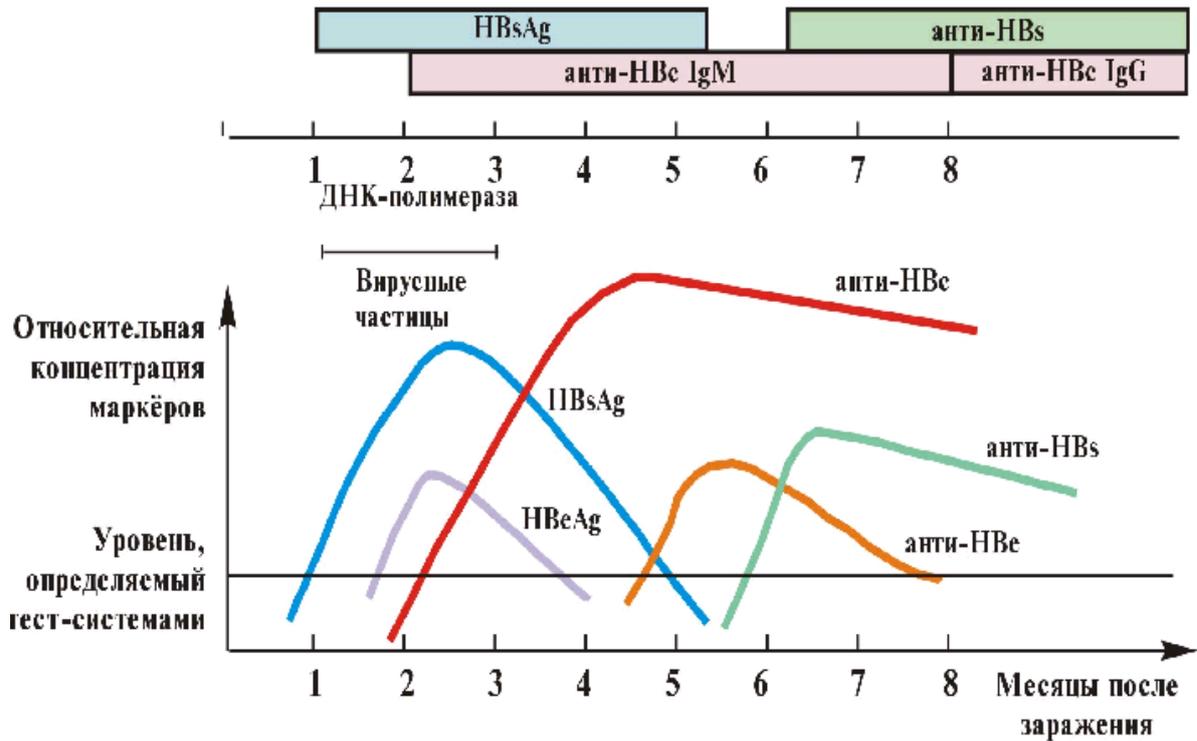


Рисунок 5.

Динамика появления серологических маркеров при ОГВ
(из: Амосов, 2006). Обозначения в тексте.

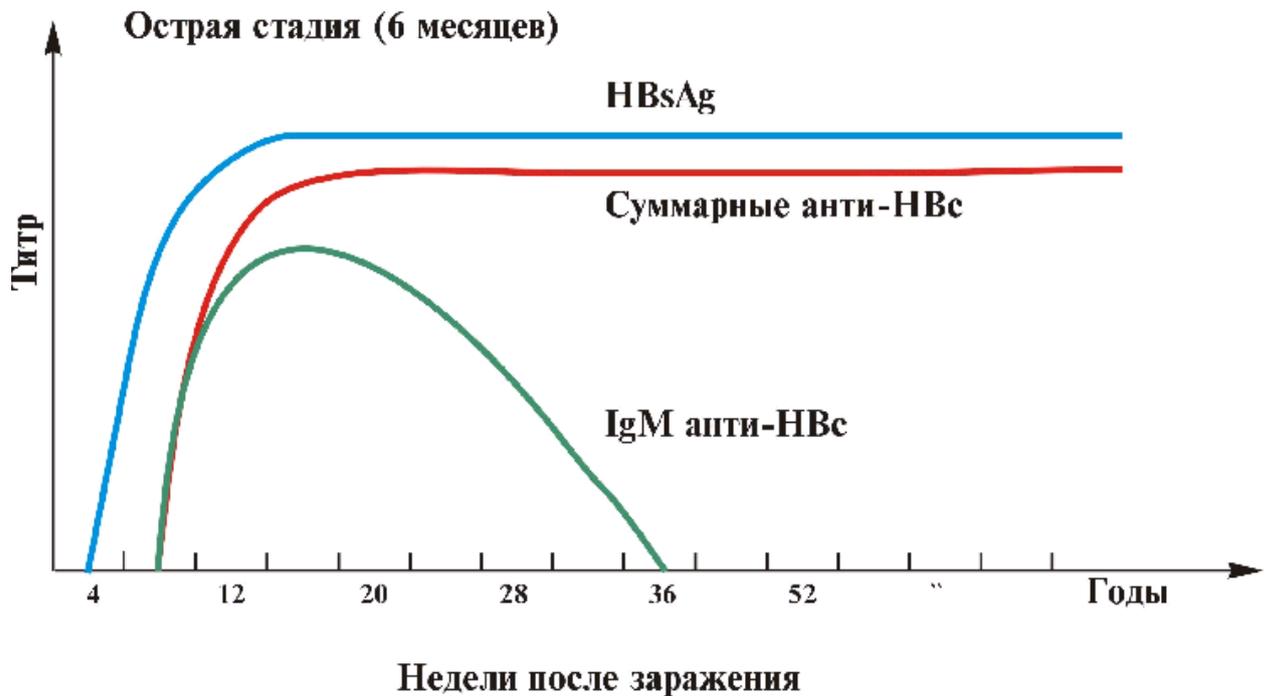


Рисунок 6.

Динамика появления серологических маркеров при ХГВ
(из: Амосов, 2006). Обозначения в тексте.

HBsAg – один из первых (по порядку появления в крови больного) маркеров ОГВ. Он появляется за 2-4 недели до появления первых клинических признаков заболевания, его концентрация достигает пика на высоте острой фазы болезни, а затем постепенно снижается до неопределяемого тест-системами уровня в течение 4-6 месяцев. HBsAg является главным (наиболее часто используемым для целей выявления вируса) маркером инфекции, и его обнаружение в крови считается признаком активной инфекции ВГВ. При этом, если ранее регистрировавшийся HBsAg перестает обнаруживаться в крови, это не обязательно соответствует полной санации организма и выздоровлению. У таких больных в крови иногда продолжает обнаруживаться ДНК ВГВ в течение длительного времени, что характеризует их потенциальную инфекционную опасность (Morales-Romero et al., 2014).

Антитела к HBsAg (anti-HBs) появляются после исчезновения HBsAg, причем иногда через довольно отдаленный период (до 6 месяцев). Этот период называется периодом «корового окна», так как в это время в сыворотке больного регистрируются anti-HBc без HBsAg и anti-HBs. Выявление anti-HBs служит доказательством перенесенного гепатита В либо является результатом вакцинации против ВГВ, если таковая проводилась. Концентрация anti-HBs 10 мМЕ/мл считается минимально протективной, а 50 мМЕ/мл – надежно защищающей от инфицирования ВГВ. Антитела к HBsAg могут выявляться пожизненно. В некоторых случаях, в течение последующих нескольких лет после перенесенного ОГВ может происходить постепенное снижение концентрации anti-HBs до уровней, недоступных выявлению самыми чувствительными методами индикации.

Антитела к HBcAg (anti-HBc). Anti-HBc класса М (IgM) появляются со времени проявления симптомов, исчезают примерно через 5-6 месяцев, одновременно с появлением anti-HBc IgG. Anti-HBc IgM – главный маркер, отличающий ОГВ от ХГВ.

HBeAg. Данный антиген не обнаруживается в составе полноразмерных вирусных частиц, но выявляется в крови на ранних стадиях ОГВ. Данный маркер указывает на высокую репликативную активность ВГВ.

Анти-HBe. Появление anti-HBe вместе с исчезновением HBsAg и HBeAg указывает на уменьшение вирусной репликации и на начало выздоровления. Примерно у одной трети пациентов anti-HBe регистрируются не дольше, чем 6 месяцев.

О хронизации гепатита В говорят, когда через 6 месяцев после заражения не происходит сероконверсии HBsAg – anti-HBs, то есть не появляются протективные антитела против HBsAg. HBsAg, anti-HBc сохраняются в крови на прежнем уровне на протяжении многих лет с постепенным уменьшением титров. При ХГВ сероконверсия HBeAg – anti-HBe происходит, но гораздо позже, чем при ОГВ (через год и даже более от начала заражения). ХГВ с постоянным цитолизом гепатоцитов, воспалением печени, постепенно развиваясь в течение большого промежутка времени, может привести к циррозу и ГЦК. Хронический процесс реализуется в режиме продолжительных ремиссий, сменяющихся периодическими длительными обострениями процесса повреждения печени с проявлениями астено-вегетативного синдрома и гепатоцеллюлярной недостаточности.

Важным показателем при ХГВ является оценка степени инфекционности крови. Чтобы оценить инфекционность крови, образец тестируется на HBeAg, anti-HBe и ДНК ВГВ. HBeAg-позитивные пациенты имеют высокую концентрацию инфекционных вирусных частиц в крови в отличие от anti-HBe - позитивных пациентов, в крови которых число вирусных частиц значительно ниже. Для примера, в 1 мл HBeAg-позитивной крови содержится до 10^8 вирионов ВГВ. У anti-HBe-позитивных носителей в 1 мл крови содержится меньше 100 инфекционных вирионов. HBeAg-позитивные пациенты – наиболее вероятный источник передачи ВГВ по половому пути, а также гемоперкутанному или перинатальному механизмам. Инфекционность лиц, которые HBsAg-позитивны и anti-HBe-позитивны, значительно ниже.

Выявление HBeAg у HBsAg-положительных беременных женщин означает, что их будущие дети подвержены большому риску заражения ВГВ (до 80%), в то время как у беременных матерей с anti-HBe процент инфицирования ВГВ у будущего потомства не более 10% (Hollinger et al, 2001; Аммосов, 2006).

2.4. Классификация ВГВ

4.4.1. Вариабельность ВГВ

Вирусы семейства *Hepadnaviridae* – единственные из известных ДНК-содержащих вирусов животных, использующие стратегию обратной транскрипции в цикле репликации (Kidd-Ljunggren et al., 2002). Р-белок вируса, выполняющий функцию и РНК- и ДНК-зависимой полимеразы, не обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью (Hollinger et al, 2001) и не способен исправлять ошибки при репликации. Вследствие этого мутационный уровень, характерный для данной группы вирусов, значительно выше, чем для ДНК-содержащих вирусов, не использующих этап обратной транскрипции при репликации, и может приближаться к уровню, характерному для ретровирусов – 3×10^{-5} замен на сайт за один цикл репликации (Okamoto et al., 1987; Orito et al., 1989). С другой стороны, геном ВГВ чрезвычайно компактен: в нем нет некодирующих участков, а все перекрывающиеся гены кодируют примерно на 50% больше белка, чем можно было бы ожидать, исходя из размера генома ВГВ (Ganem & Varmus, 1987). Это накладывает ограничения на число значащих замен: согласно (Orito et al., 1989), количество синонимичных (не приводящих к изменению АК остатка в данном положении) замен во много раз превышает количество несинонимичных замен во всех 4 рамках считывания.

Ранние оценки скорости накопления мутаций в геноме ВГВ, основанные на длительных или ретроспективных наблюдениях за единичными пациентами, а также полученные на основе анализа филогенетических отношений изолятов ВГВ, давали значения в пределах $1,4 - 5 \times 10^{-5}$ замен на сайт в год при циркуляции в организме одного хозяина (Okamoto et al., 1987a; Fares and

Holmes, 2002; Kidd-Ljunggren et al., 2002; Simmonds and Midgley, 2005). Неоднократно принимались попытки уточнения скорости накопления мутаций при «нормальной» циркуляции вируса – без искусственного отбора при антивирусной терапии и вне давления со стороны иммунной системы хозяина. Считается, что в таких условиях накопление мутаций будет происходить только за счет ошибок вирусной полимеразы, а их закрепление будет обусловлено только факторами естественного отбора (если мутация нарушает работу гена, мутант элиминируется или замедляет репликацию). В этой связи стоит обратиться к уже упоминавшемуся явлению, получившему название сероконверсии HBeAg – Anti-HBe.

Как мы отметили ранее (см. раздел 2.3), одной из функций вирусного белка HBeAg является обеспечение толерантности иммунной системы к пораженным ВГВ гепатоцитам (Lok and McMahon, 2007; Liaw et al., 2010). Говоря упрощенно, если в крови хронического больного выявляется HBeAg, то его иммунная система не атакует зараженные клетки; если же HBeAg в крови нет (произошла сероконверсия HBeAg – Anti-HBe (Magnius and Espmark, 1972)), то вирус в организме начинает подвергаться жесткому контролю со стороны иммунной системы (хотя в действительности механизмы взаимодействия вирус-хозяин намного более сложны). В одной из первых работ, посвященных этому вопросу (Hannoun et al., 2000a), было показано, что у HBeAg-положительных пациентов скорость накопления мутаций ВГВ составляет $0 - 13 \times 10^{-5}$ (в среднем $2,1 \times 10^{-5}$) замен на сайт в год, а у HBeAg-негативных пациентов этот показатель в 12 раз больше. Данное исследование носило ретроспективный характер и основывалось на анализе изолятов ВГВ, полученных от матерей и их взрослых детей, предположительно инфицированных пренатально. Время, прошедшее с момента инфицирования, при этом составляло 20-35 лет (в среднем 22 года).

В 2006 году группа ученых (Osiowy et al., 2006) опубликовала результаты непрерывного 25-летнего наблюдения за восемью HBeAg-негативными носителями ВГВ, которые добровольно приняли участие в исследовании и при

этом не получали антивирусной терапии вследствие отсутствия соответствующих показаний (симптомов заболевания). Средний показатель накопления мутаций, полученный в данной работе, оказался несколько выше, чем предыдущие оценки, и составил $7,9 \times 10^{-5}$ замен на сайт в год.

Может показаться, что исследователи уделяют чрезмерное внимание определению такого специфического показателя, как скорость изменчивости генома ВГВ (нетрудно заметить, что все приведенные оценки находятся в пределах одного порядка). Следует, однако, отметить, что показатель скорости накопления мутаций является критически важным для создания модели молекулярных часов ВГВ и изучения времени его возникновения и эволюции (Norder et al., 2004; Paraskevis et al., 2013). Разница в скорости накопления мутаций в 5-10 раз при определении времени возникновения ближайшего общего предка ВГВ человека может привести к разбросу в десятки тысяч лет (Simmonds, 2001). Для сравнения: появление ВИЧ в человеческой популяции датируется с точностью до десятков лет (цит. по обзору Castro-Nallar et al., 2012), вируса гепатита С – с точностью до сотен лет (Sarwar et al., 2011). К сожалению, ни один из описанных выше способов определения скорости изменчивости ВГВ не позволяет оценить накопление мутаций при передаче вируса от одного человека к другому и адаптации к условиям нового организма и его иммунной системы (не считая передачи ВГВ от матери к плоду; однако в этом случае ВГВ, по сути, находится в условиях фактически одной и той же иммунной системы). Неясным также остается вопрос о возможных отличиях в скорости накопления мутаций различных генетических вариантов ВГВ (см. ниже), циркулирующих в генетически неоднородных группах людей. Ситуация осложняется также возможным существованием внутри одного изолята квазивидов ВГВ – потомков одного вируса, циркулирующих внутри одного хозяина, но несколько различающихся по последовательностям ДНК вследствие дивергенции (Yousif et al., 2014). Работы в данном направлении продолжаются несколькими группами исследователей (частные сообщения).

2.4.2. Серологическая классификация (субтипы HBsAg)

Значительная генетическая вариабельность ВГВ позволила разработать способы его классификации исходя как из последовательности геномной ДНК, так и из замен АО в кодируемых белках.

Исторически первой была разработана классификация ВГВ, основанная на антигенных свойствах HBsAg (серологическая классификация). Различные изоляты вируса, могут иметь различия в структуре HBsAg (как и других вирусных антигенов), обусловленные определенными заменами АО. В 1971 г. Ле Бувье были описаны две взаимно исключаютые антигенные субдетерминанты HBsAg (d и y) (Le Bouvier, 1971). Затем У. Банкрофт с соавторами описали две другие взаимоисключаютые субдетерминанты – w и r (Bancroft et al., 1972). Эти авторы установили, что четыре известных на тот момент серотипа ВГВ, названные субтипами HBsAg, обусловлены комбинацией детерминантных пар d/y и w/r, и общей для всех серотипов детерминанты a. Это субтипы adw, ayw, adr, ayr. Пары d/y и w/r отличаются заменами АО в положениях 122 и 160 (таблица 1) (Okamoto et al., 1987; Norder et al., 1990). К настоящему моменту, на основе данных о нескольких минорных субдетерминантах, обусловленных различиями в АО, находящихся в позициях 127, 134, 140, 143, 144, 145, 158, 159, 161, 168, 177 и 178 в HBsAg (Okamoto et al., 1989; Norder et al., 1992b; Norder et al., 1992a), выявлено девять основных субтипов HBsAg – ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq- и некоторые их варианты.

Методологически субтипы определяют в ИФА с панелью субтип-специфических моноклональных антител (Swenson et al., 1991; Netesova et al., 2003), либо с использованием других серологических методов (Гранникова и др., 1977; Courouce et al., 1983). Определив последовательность ДНК S-гена ВГВ и кодоны, соответствующие АО в субтип-значимых положениях, можно также восстановить субтип HBsAg конкретного изолята (Norder et al., 1992a; Norder et al., 2004; таблица 1).

Таблица 1. Некоторые аминокислотные остатки, определяющие специфические детерминанты HBsAg (согласно Norder et al., 1992a).

Позиция АО и кодона в S-гене	Кодоны	АО	Детерминанта
122	AAA, AAG	Lys	d
	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Arg	y
127	CCT, CCC, CCA, CCG	Pro	w1/w2
	ACT, ACC, ACA, ACG	Thr	w3
	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG, ATT, ATC, ATA	Leu/Ile	w4
134	TAT, TAC	Tyr	w2/w3
	TTT, TTC	Phe	w1/w4, r
140	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	Ser	w4
	ACT, ACC, ACA, ACG	Thr	w1/w2/w3, r
143	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	Ser	w2
	ACT, ACC, ACA, ACG	Thr	w1/w3/w4, r
158	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG	Leu	w4q-
	TTT, TTC	Phe	все остальные
159	GCT, GCC, GCA, GCG	Ala	w1/w2, rq+
	GGT, GGC, GGA, GGG	Gly	w3/w4
	GTT, GTC, GTA, GTG	Val	r/rq-
160	AAA, AAG	Lys	w
	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Arg	r
161	TAT, TAC	Tyr	w1/w2, w4q-
	TTT, TTC	Phe	w2/w3/w4, r

2.4.3. Генетическая классификация (генотипы и субгенотипы ВГВ)

Определение первичной структуры ДНК геномов изолятов ВГВ внесло новый вклад в изучение природы данного патогена. В 1988 г. Х. Окамото с соавторами впервые предложили использовать генетическое разнообразие изолятов вируса для создания классификации ВГВ, альтернативной уже существовавшей классификации, основанной на субтипах HBsAg. Определив полноразмерные нуклеотидные последовательности геномов для 18 изолятов ВГВ, эти исследователи обнаружили, что изученные изоляты образуют 4 группы, обозначенные как А, В, С и D. При этом различие между нуклеотидными последовательностями (вычисленное как процент нуклеотидных замен) геномов изолятов ВГВ, относящихся к разным группам, превышает 8% (Okamoto et al., 1988). Различие в 8% между нуклеотидными последовательностями ДНК изолятов ВГВ и было в дальнейшем принято в качестве граничного критерия разделения изолятов на генетические группы, получившие название генотипов ВГВ (Norder et al., 2004; Kramvis et al., 2008).

Используя последовательности Р-гена ВГВ, Е. Орито с соавторами в 1989 г. получили схожие результаты, также выделив 4 генетические группы (Orito et al., 1989). Х. Нордер с соавторами в 1992 г. при исследовании последовательностей S-гена 122 изолятов ВГВ не только подтвердили выводы Окамото (1988), но и выявили две ранее не обнаруженные группы, Е и F (Norder et al., 1992a). В дальнейших исследованиях той же группы авторов при определении полных нуклеотидных последовательностей изолятов ВГВ, отнесенных к группе Е, было показано, что эта группа генетически очень близка к группе D, однако может быть выделена в самостоятельный генотип ВГВ (Norder et al., 1994). Основное отличие изолятов генотипа Е – это отсутствие делеции размером 33 пн. в начале Pre-S1 области, характерной для всех изолятов генотипа D (Norder et al., 1994; Bowyer et al., 1997). Х. Номанн с соавторами в 1993 г. показали, что нуклеотидные последовательности геномов изолятов ВГВ, относящихся к генотипу F, имеют наибольшее отличие (15%) от нуклеотидных последовательностей изолятов, принадлежащих к любому

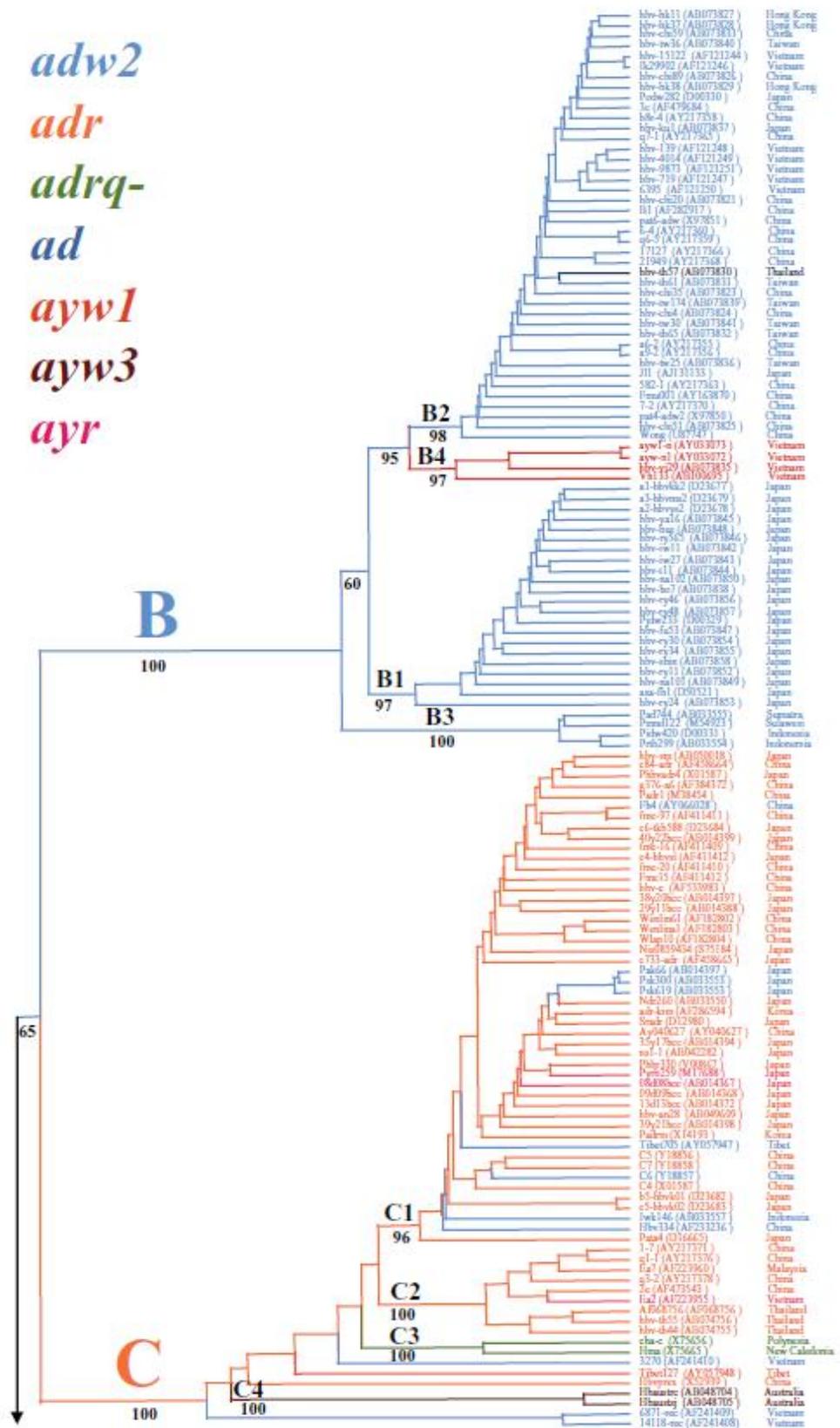
другому генотипу, хотя и демонстрируют некоторое сходство с последовательностями изолятов генотипа А (Naumann et al., 1993). В связи с этим изоляты ВГВ генотипа F, часто используются в качестве внешней группы при установлении филогенетических отношений между различными вирусными изолятами других генотипов (Kidd-Ljunggren et al., 2002).

Исследуя последовательность участка из Pre-S1 области для 33 изолятов ВГВ, Н. Огата соавторами (Ogata et al., 1993) обнаружили генотип-ассоциированный район, использование которого для определения генотипа ВГВ хорошо согласуется с результатами (Okamoto et al., 1988).

В 2000 г. вышла статья Л. Стайвера с соавторами, в которой описан генотип G (Stuyver et al., 2000). В 2002 г. другая группа исследователей обнаружила генотип H (Arauz-Ruiz et al., 2002). Таким образом, в настоящее время известно 8 генотипов ВГВ, обозначаемых прописными буквами латинского алфавита от А до H (рисунок 7).

Для отнесения изолятов ВГВ к тому или иному генотипу в настоящее время общепринятым методом является определение нуклеотидной последовательности полноразмерного генома изолята или чаще его отдельных, наиболее вариабельных, районов с последующим филогенетическим анализом с использованием прототипных последовательностей изолятов известных генотипов (Okamoto et al., 1988; Ogata et al., 1993; Norder et al., 2004). Также до широкого внедрения автоматических секвенаторов ДНК использовались методы рестрикционного анализа (RFLP – «restriction fragment length polymorphism») (Lindh et al., 2000; Shih et al., 1991) и иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител к генотип-специфическим эпитопам аминокислотной последовательности, кодируемой pre-S2 областью (Swenson et al., 1991; Moriya et al., 2002).

adw2
adr
adrq-
ad
ayw1
ayw3
ayr



Genotypes A and D – H

Рисунок 7.

Филогенетическое дерево полногеномных последовательностей 252 изолятов ВГВ по Norder et al., 2004 (продолжение на следующей странице).

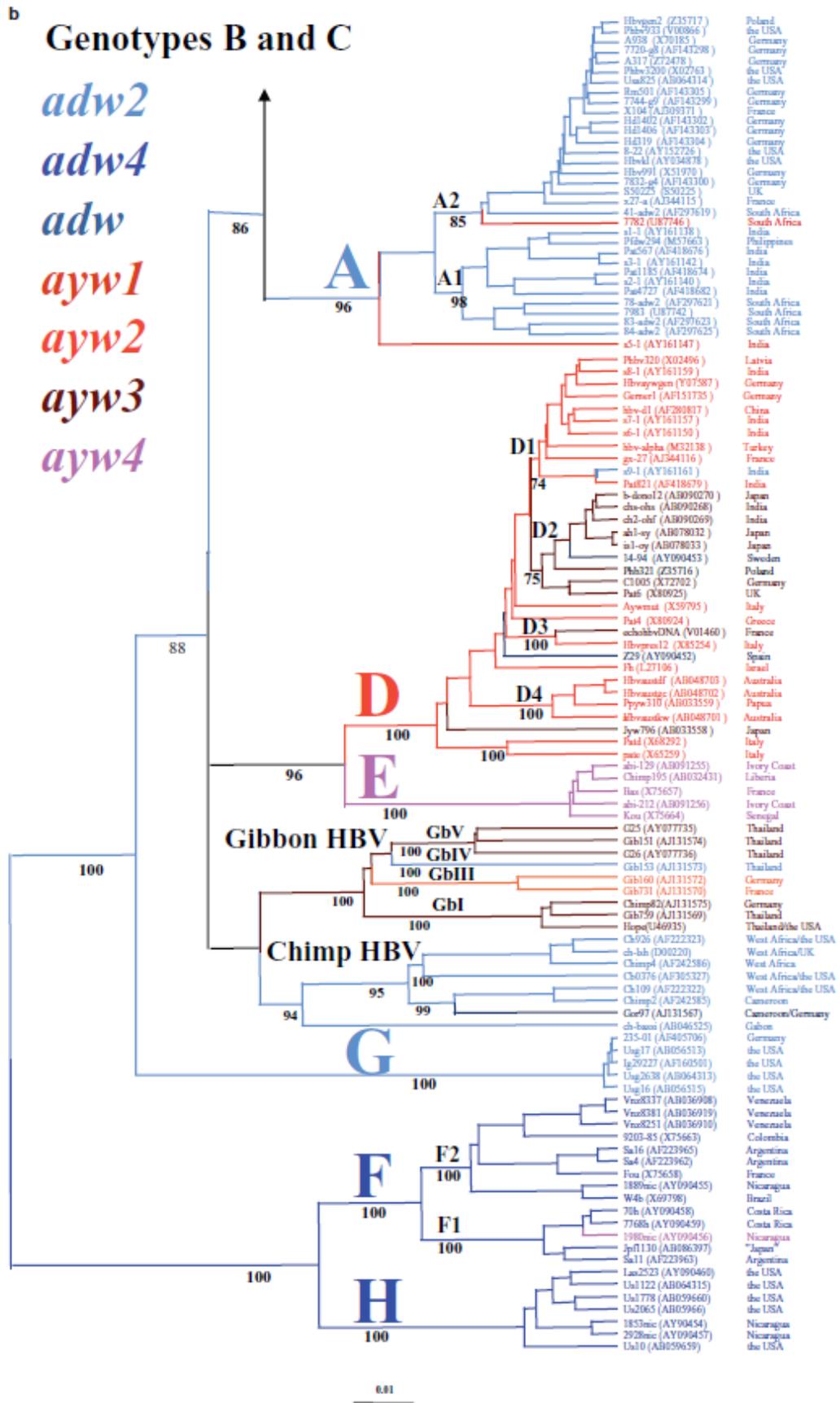


Рисунок 7.

Филогенетическое дерево полногеномных последовательностей 252 изолятов ВГВ по Norder et al., 2004. Приведены буквенные обозначения генотипов, субгенотипов ВГВ. Оттенками обозначены субтипы HBsAg.

В 2002 году появились первые данные о филогенетической кластеризации изолятов внутри ветвей отдельных генотипов. Группа исследователей (Kramvis et al., 2002; Kimbi et al., 2004) обнаружила в Африке специфическую подгруппу изолятов генотипа А (получившую обозначение А'), которая не могла быть выделена в отдельный генотип (отличие от остальных изолятов генотипа составляло менее 8%), но которая образовывала обособленную ветвь на филогенетическом дереве. В дальнейшем подобные генетические подгруппы были описаны для генотипов С (Huy et al., 2004; Banerjee et al., 2006a), F (Norder et al., 2003; Huy et al., 2006), а также В и D (Norder et al., 2004). Эти группы были названы субгенотипами и получили обозначения А1, А2 и т.д. Сейчас известно не менее 24 субгенотипов ВГВ: А1-А4, В1-В4, С1-С4, D1-D5, F1-F4; генотипы Е, G, Н не разделяются на субгенотипы (Norder et al., 2004; Kramvis and Kew, 2005; Ahn et al., 2009; Schaefer et al., 2009).

Ветви субгенотипов хорошо различимы на филогенетическом дереве при корректно проведенном анализе (рисунки 7, 8, 11). При этом для этого не обязательно использовать полногеномные последовательности ВГВ. Еще в 1993 году было показано, что анализ последовательностей только S-гена ВГВ достаточен для идентификации генотипа (Ogata et al., 1993). В 2004 году авторы, предложившие, собственно, термин «субгенотип» (Norder et al., 2004) сразу же показали, что кластеризация по субгенотипам происходит и при анализе последовательностей S-гена, правда, индексы статистической поддержки узлов дерева при этом получаются ниже (70-80%), чем при анализе полногеномных последовательностей (рисунок 8). В одной из следующих работ, посвященных этому вопросу (Tallo et al., 2008) показано, что использование последовательностей S-гена вместе с Pre-S1/2 областями дает разделение по субгенотипам генотипа D с более высоким уровнем статистической поддержки узлов (75-90%), при этом результат практически неотличим от анализа полногеномных последовательностей (для более консервативных регионов генома – Pre-C/C-гена, X-гена похожих результатов достичь не удастся). Это избавляет современных исследователей от

секвенирования всего генома, позволяя анализировать ту или иную его часть в зависимости от задач.

Вместе с тем, одна из групп авторитетных в отношении систематики ВГВ исследователей (Schaefer et al., 2009) недавно предложила в качестве формального признака разделения генотипов на субгенотипы использовать естественные филогенетические признаки, а разницу в не менее чем 4% между полногеновыми последовательностями изолятов разных субгенотипов. Не все исследователи согласны с таким правилом: регулярно публикуются сообщения об обнаружении новых субгенотипов (B5, B6, C6, C7 и т.д.) на основе филогенетических данных (Huy et al., 2006; Olinger et al., 2006; Sakamoto et al., 2006; Cavinta et al., 2009; Meldal et al., 2009; Utsumi et al., 2009; Mulyanto et al., 2011), и даже новых генотипов: I (Tran et al., 2008; Phung et al., 2010) и J (Tatematsu et al., 2009).

Не все вновь обнаруженные изоляты ВГВ могут быть отнесены к существующим группам генотипов или субгенотипов. Во-первых, такие изоляты могут оказаться мутантами, в которых накапливающиеся изменения в ДНК увели их слишком далеко от родительской клады (филогенетической ветви). Из-за не до конца изученной биологической особенности ВГВ, при его длительной персистенции в организме одного HBeAg-негативного хозяина (см. разделы 2.3, 4.4.1), может происходить резкое увеличение скорости накопления мутаций в геноме вируса, достигая значений $4,5 - 8,1 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год (van de Klundert et al., 2012), то есть на порядок выше, чем у ВГВ в популяции в целом. Схожий эффект может наблюдаться при получении антивирусной терапии (Thai et al., 2012) и при коинфекции ВИЧ и другими вирусами (Tangkijvanich et al., 2013). Таким образом, изолят ВГВ, полученных от HBeAg-негативного хронического носителя через 20-30 и более лет после инфицирования, может существенно отличаться от изолятов любых известных генетических групп за счет накопленных мутационных изменений.

Во-вторых, описаны многочисленные случаи рекомбинации между ВГВ различных генетических групп и даже между ВГВ-подобными вирусами

разных видов. Так, изоляты уже упоминавшегося генотипа I, вероятно, представляют собой устойчивую рекомбинантную форму между несколькими родительскими изолятами ВГВ человека и гиббона (Tran et al., 2008), причем в качестве рекомбинанта этот вариант был описан задолго до выделения его в группу отдельного генотипа (Hannoun et al., 2000b). Изоляты генетической группы, традиционно обозначаемой как субгенотип В1, представляют собой рекомбинантную форму субгенотипа В2 с небольшими участками последовательностей генотипа С (Sugauchi et al., 2004). Описаны и другие случаи рекомбинации ВГВ (Simmonds et al., 2005). Очевидно, что рекомбинанты будут попадать в одну или другую филогенетическую группу в зависимости от участка ДНК, выбранного для анализа, или не попадать ни в одну из них, если исследуемая последовательность включает точку рекомбинации. Часть из вновь открываемых субгенотипов (см. выше) являются именно рекомбинантными формами (Abdou Chekaraou et al., 2010). Все это говорит о том, что таксономия ВГВ является развивающимся научным направлением, и исследования в данной области будут продолжаться (Schaefer et al., 2009). В дальнейшем изложении мы будем использовать классификацию ВГВ, предложенную в основополагающей работе (Norder et al., 2004), поскольку генетические группы ВГВ, определенные в данном исследовании, являются общепризнанными (цит. по обзорам Kurbanov, 2010; Као, 2011 и др.)

При соотнесении субтипов HBsAg и генотипов вируса оказалось, что одному генотипу ВГВ может соответствовать несколько субтипов (Magnius & Norder, 1995; Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002; Norder et al., 2004) (таблица 2).

Таблица 2. Географическое распределение субтипов и генотипов ВГВ

Суб-генотип	Субтип HBsAg	Зоны наибольшей встречаемости	Источник
A1	adw2	Южная и Восточная Африка, Индия	Bowyer et al., 1997; Sugauchi et al., 2004a
A2	adw2	Западная Европа, США, Канада	Sugauchi et al., 2004a
A3	adw2, ayw2	Западная Африка	Hannoun et al., 2005; Kurbanov et al., 2005
A4	нет данных	Западная Африка	Olinger et al., 2006
A5*	нет данных	Западная Африка	Olinger et al., 2006
B1	adw2	Япония	Sugauchi et al., 2002; Sugauchi et al., 2004b
B2	adw2	Китай, Вьетнам	Sugauchi et al., 2002; Sugauchi et al., 2004b
B3	adw2	Индонезия	Norder et al., 2004
B4	ayw1	Вьетнам	Norder et al., 2004
B5*	ayw1	Филиппины	Nagasaki et al., 2006; Sakamoto et al., 2006
B6*	нет данных	Аляска, Канада, Гренландия	Sakamoto et al., 2007
B7*	нет данных	Индонезия	Nurainy et al., 2008
B8*	нет данных	Индонезия	Mulyanto et al., 2009
C1	adr, adw2	Южная Азия: Тайланд, Вьетнам, Лаос, Бангладеш	Chan et al., 2005; Huy et al., 2004; Norder et al., 2004
C2	adr, аур	Восточная Азия: Япония, Корея, Китай	Huy et al., 2004; Norder et al., 2004
C3	adrq-	Полинезия, Микронезия	Norder et al., 2004
C4	ayw3	Австралия	Norder et al., 2004; Sugauchi et al., 2001
C5*	adw2	Филиппины, Вьетнам	Sakamoto et al., 2006
C6*	нет данных	Индонезия	Utsumi et al., 2009
C7*	нет данных	Филиппины	Cavinta et al., 2009
C8*	нет данных	Индонезия	Mulyanto et al., 2009
C9*	нет данных	Индонезия	Mulyanto et al., 2010
D1	ayw2, adw2	Ближний Восток, Средиземноморье	Norder et al., 2004
D2	ayw3, ayw4	Восточная Европа, Россия	Norder et al., 2004; Tallo et al., 2008
D3	ayw2, ayw3	Восточная Европа, Южная Африка, Аляска	Norder et al., 2004
D4	ayw2	Океания, Сомали	Norder et al., 2004
D5	ayw3	Восточная Индия	Banerjee et al., 2006b
D6*	ayw2	Индонезия	Lusida et al., 2008
D7*	нет данных	Тунис	Meldal et al., 2009
D8*	нет данных	Нигер	Abdou Chekaraou et al., 2010
E	ayw4	Западная Африка	Norder et al., 1994
F1	adw4, ayw4	Южная и Центральная Америка	Norder et al., 2004
F2	adw4	Южная Америка, Полинезия	Norder et al., 2004
F3	нет данных	Венесуэла, Колумбия	Huy et al., 2006
F4	нет данных	Аргентина, Боливия	Huy et al., 2006
G	adw2	США, Франция	Stuyver et al., 2000
H	adw4	Южная и Центральная Америка	Arauz-Ruiz et al., 2002

*) Обозначения субгенотипов со звездочкой приведены в соответствии с источниками и пока не являются общепризнанными (Schaefer et al., 2009).



Рисунок 8. Филогенетическое дерево последовательностей S-гена ВГВ (из: Norder et al., 2004). Показана только ветвь генотипа D. Хорошо различимы ветви субгенотипов (обозначены буквами). Для анализа авторы использовали метод UPGMA. Оттенками обозначены субтипы H5Ag.

2.5. Зачем изучают разнообразие ВГВ?

Как и любая отрасль биологического научного знания, исследования разнообразия ВГВ преследуют и сугубо «фундаментальные» цели – изучение вопросов возникновения вируса, его эволюции и распространения в человеческой популяции, и имеющие непосредственное отношение к практическому здравоохранению. В числе последних наиболее актуальные задачи лежат в области совершенствования средств диагностики и иммунопрофилактики заболевания, а также применение знаний о генетических особенностях вируса к клинической практике – выбору средств лечения и прогнозу исхода заболевания, а также расследованию эпидемических цепочек при передаче ВГВ.

2.5.1. Эволюция и распространение ВГВ

Поскольку ВГВ является строго антропонозным агентом, т.е. им заражаются только от инфицированных ВГВ людей, и вирус не распространяется другими природными путями (животными, через воду, и т.д.), встречаемость вариантов ВГВ будет различной в разных географических и/или социальных группах населения. Эти различия обусловлены историческими путями миграций групп населения, а также способами передачи инфекции, наиболее характерными для этих групп. Обобщая знания о современной встречаемости типов ВГВ (субтипов, субгенотипов) и их филогенетических отношениях, с эпидемиологическими и историко-социологическими данными, можно строить гипотезы об эволюции ВГВ в человеческих коллективах (Norder et al., 2004; Schaefer, 2005; Kurbanov et al, 2010).

Обобщение накопленных знаний о эволюции ВГВ впервые было сделано в обзоре (Simmonds, 2001). В этой работе перечислены три основных эволюционных теории, существовавших на тот момент, и приведена их критика. Современные взгляды на историю и эволюцию ВГВ во многом являются развитием этих теорий.

Первая из них (Vollyky et al., 1997) основана на определенной к тому времени средней скорости накопления мутаций в геноме ВГВ - $0-13 \times 10^{-5}$ замен на сайт в год (эти значения уже были известны в 1997 году, но их публикация была осуществлена позднее – в работе Hannoun et al., 2000a), известном авторам филогенетическом разнообразии ВГВ, заключающемся в существовании генотипов А-Е, и описанных отличиях в количестве замен между ними. Сопоставление этих данных позволило сделать вывод, что разделение ветвей генотипов произошло в период 2300-3100 лет назад. При этом, поскольку генотип Е, эндемичный строго для коренного населения Южной Америки, является наиболее отличающимся от других (до 15% по заменам в геноме, Norder et al., 1992a), исследователи предположили, что он является также наиболее древним (первым отделившимся от «ствола» филогенетического дерева) и, следовательно, ВГВ человека впервые возник в Америке (Vollyky et al., 1997). Распространение же ВГВ по остальным районам земного шара с формированием известных групп генотипов в таком случае произошло за последующие 400 лет, прошедшие с начала активной колонизации Америки европейцами. Данная теория встречает следующие возражения. Во-первых, если считать, что все известное разнообразие ВГВ в пределах генотипов А-Е возникло за 400 лет, то скорость накопления мутаций в геноме вируса должна составлять около $1,5 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год, что намного больше, чем значения, полученные для НВеАg-негативных носителей (Hannoun et al., 2000a; Osioy et al., 2006). Во-вторых, нельзя игнорировать то обстоятельство, что генотипы ВГВ человекообразных обезьян, ареалы которых широко распространены в Старом свете, включая Африку и Азию, являются близкородственными, и отличаются от ВГВ человека примерно настолько же, насколько генотипы ВГВ человека отличаются друг от друга (8-11% по сравнению с генотипами А-Е) (Hu et al., 2000; Takahashi et al., 2000; MacDonald et al., 2000). Действительно, сложно предположить, что за столь короткий период ВГВ сумел не только распространиться среди всего человечества, но и

неоднократно передаться от человека различным видам обезьян (Simmonds, 2001).

Другая теория, предложенная в работах (Norder et al., 1994; Magnius and Norder, 1995), заключается в том, что ВГВ был единожды интродуцирован в популяцию человека еще до его исторического расселения из районов Северной Африки (около 100 000 лет назад), и распространялся в соответствии с путями миграции анатомически-современных людей. Эти миграции, согласно теории, и объясняют эволюцию вируса и его разделение на генетические группы. В целом, области распространения генотипов действительно схожи с современными ареалами существования разных этнических групп человека (генотипы В и С наиболее часто встречаются у монголоидов, А и D – у европеоидов, Е – у африканцев), однако это правило выполняется далеко не всегда. Например, монголоиды Юго-Восточной Азии и индейцы Южной Америки генетически наиболее близки друг другу, при этом в их популяциях распространены совершенно разные генотипы (В/С и F, соответственно). Жители Южной Америки и жители Полинезии относятся к разным расам, и нет никаких генетических и исторических оснований предполагать, что они контактировали и смешивались, однако в обеих этих группах превалирует генотип F, и т.д. (Simmonds, 2001). Кроме того, при разделении генотипов в течение 100 000 лет скорость накопления мутаций в геноме ВГВ составила бы всего около 5×10^{-7} замен на сайт в год, что не согласуется с современными наблюдениями. Данная эволюционная модель также не объясняет близкое родство генотипов ВГВ человекообразных приматов и человека, поскольку при использовании данной модели их ветви должны были разделиться во времена существования их общего предка и эволюционировать в течение гораздо большего времени (10-15 млн. лет). При этом расчетная скорость накопления мутаций должны была бы составить $3-5 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год, что ниже, чем для любого известного вируса (Simmonds, 2001).

Несмотря на описанные сложности, данная эволюционная модель (о единой интродукции ВГВ в человеческую популяцию и дальнейшем его

расхождении на группы генотипов) в настоящее время поддерживается рядом исследователей. Так, она получила уточнение в обширном филогенетическом исследовании с использованием современных вычислительных методов (Paraskevis et al., 2013). Авторы тоже предположили возникновение ВГВ в африканской человеческой популяции, откуда он распространялся вместе с путями расселения человека на другие территории, но при этом калибровали молекулярные часы эволюции ВГВ в соответствии с описанными историческими периодами этого расселения (датированными археологическими методами). При этом ими был получен показатель скорости изменчивости генома ВГВ $1,5-3 \times 10^{-6}$ (медианное значение $2,2 \times 10^{-6}$) замен на сайт в год на протяжении всей истории эволюции вируса. Такие предположения позволили оценить время возникновения предка ВГВ у человека 22 000 – 47 100 лет назад (среднее значение 33 600 лет). Филогенетическое родство генотипов ВГВ человека и обезьян авторы объясняют возможной передачей вируса от человека к другим приматам (а не наоборот), причем последняя такая передача произошла, по данным исследования, не ранее чем 6 100 лет назад.

Наконец, альтернативная модель, предложенная в работе (Simmonds, 2001) была призвана объяснить родство генотипов ВГВ человека и обезьян при помощи предположения о том, что ВГВ неоднократно передавался в человеческую популяцию от приматов, а современные генотипы ВГВ человека представляют собой потомков различных генотипов ВГВ обезьян, в разное время заражавших людей. В качестве примера автор приводит аналогию с ВИЧ-1, который минимум два раза передавался человеку от разных видов приматов (Gao et al., 1999) и ВИЧ-2, который также неоднократно возникал в Западной Африке при независимых контактах людей с обезьянами рода *Cercopithecus* (мангабеями) (Feng et al., 1992). Возможность такой многократной передачи ВГВ косвенно подтверждается тем фактом, что наибольшая встречаемость ВГВ и явное превалирование определенного генотипа обнаруживается в тех географических районах, где контакты с обезьянами наиболее вероятны (Южная Америка, генотип F; центральная и западная

Африка, генотип E; Юго-Восточная Азия, генотипы B и C). Отметим также географическую близость ареалов генотипа F (который, как уже неоднократно отмечалось, является наиболее отличным от других генотипов ВГВ) и еще более отличающимся ВГВ шерстистых обезьян, живущих исключительно в Южной Америке (Robertson and Margolis, 2002). Проблемой этой теории является то, что на сегодняшний день не обнаружено общих генотипов для человека и обезьян, за исключением обнаружения одного из вариантов генотипа E у шимпанзе (Takahashi et al., 2000). Таким образом, остается неясным, от каких именно видов обезьян человек мог получать ВГВ.

С открытием субгенотипов ВГВ, логично предполагающих наличие общего предка своего генотипа в человеческой популяции, появилась возможность для изучения более тонких процессов эволюции ВГВ. В работе (Norder et al., 2004) приводится следующий пример в отношении субгенотипов генотипа D (D1-D4, известных на тот момент). Субгенотип D4 имеет наибольшую генетическую дистанцию от наиболее вероятного общего предка генотипа D (соответствующего узла на филогенетическом дереве, от которого отделились изоляты субгенотипы D4, см. рисунки 7, 8, 11); следовательно, он является наиболее древним. Затем произошло отделение субгенотипа D3, а позже – субгенотипов D1 и D2, которые отделились практически одновременно. Если соотнести географические ареалы распространения субгенотипов (таблица 2), и предположить, что более древние субгенотипы достигли «окраин» современного распространения генотипа D, а более новые субгенотипы сейчас циркулируют ближе к центру этой области, то можно сделать вывод о том, что генотип D первоначально возник в районах Ближнего Востока или Северо-восточной Африки.

В настоящий момент единая теория происхождения и эволюции ВГВ еще не создана. Многочисленные исследования, посвященные встречаемости вариантов ВГВ в различных географических районах земного шара и накоплению банка последовательностей ВГВ, постоянно дополняют картину разнообразия ВГВ и служат фундаментом для создания обобщающей

эволюционной теории в отношении данного патогена. Отметим, что для изучения эволюционной истории ВГВ обычно исследуют его разнообразие в изолированных от общей человеческой популяции группах (как правило, это обособленные группы коренного населения), поскольку в таких группах в течение длительного времени фиксируются приобретенные варианты вируса (Norder et al., 2004; Paraskevis et al., 2013 и др.) Исследование же разнообразия ВГВ в смешанных городских популяциях человека, в которых происходит быстрый обмен вновь возникающими вариантами ВГВ и их распространение на значительные территории, имеет большое значение для изучения вопросов влияния генетических характеристик вируса на его профилактику, диагностику и лечение.

2.5.2. Влияние субтипов HBsAg на диагностику и иммуно-профилактику ВГВ

С появлением современных средств диагностики ВГВ и широким внедрением программ вакцинации против этого патогена, возникли дополнительные факторы эволюционного отбора вариантов ВГВ.

Наиболее массовым средством скрининговой диагностики инфекции ВГВ в мире является ИФА. Производители коммерческих наборов используют для этих целей как поликлональные антитела к HBsAg, так и моноклональные – в комбинации, обеспечивающей высокую специфичность и чувствительность к нескольким субтипам одновременно. В последнем случае разработчики наборов должны учитывать встречаемость различных субтипов HBsAg на территориях стран, в которых будут использоваться эти наборы. Например, наборы, основанные на использовании моноклональных антител, высокочувствительных по отношению к субтипам adr и aур, широко распространенным на территории Китая, могут оказаться недостаточно эффективными на территории России, где представлены в основном субтипы ауw2 и ауw3 (Нетесова и др., 2004).

Описаны варианты HBsAg, которые позволяют ему не быть обнаруженным в ИФА с использованием наборов широкого круга производителей. Такие варианты характеризуются изменениями в детерминанте «а» HBsAg, которая локализуется между 124 и 147 АО HBsAg и образует гидрофильную «петлю» этого белка, направленную наружу вириона и обладающую высокой иммуногенностью (цит. по обзорам Hollinger et al, 2001; Kreutz, 2002). Впервые такие изменения были описаны для пациентов, инфицированных ВГВ и получавших терапию на основе очищенных иммуноглобулинов человека, специфических по отношению к HBsAg. У части из таких пациентов HBsAg перестал определяться в ИФА с антителами к детерминанте «а» (Carman et al., 1996).

Вероятно, «дикие» (неиндуцированные терапией) мутанты ВГВ с различными дефектами HBsAg, затрудняющими их иммунодиагностику, постоянно возникают в вирусной популяции ВГВ. В работе (Баженов и др., 2007) исследовали 2510 образцов, полученных от больных ХГВ и содержащих заведомо определяемый (высокий) уровень HBsAg, при помощи диагностических наборов различных производителей. При этом 19 образцов (0,76%) показали различные результаты в разных тестах (то есть при исследовании одним набором в них было показано наличие HBsAg, другим – отсутствие). После секвенирования последовательностей S-гена соответствующих изолятов было обнаружено, что они представлены тремя типами мутантов с заменами АО (по сравнению с диким типом ВГВ): G145R (Gly¹⁴⁵ → Arg¹⁴⁵), S143L (Ser¹⁴³ → Leu¹⁴³), T143M (Thr¹⁴³ → Met¹⁴³). В дальнейшем было показано (Баженов и др., 2008), что из семи доступных на тот момент на российском рынке диагностических ИФА-наборов различных производителей только два способны обнаруживать таких мутантов. При этом мутантов с заменой G145R, встречаемость которого в европейской части России составляет 0,12% (по данным Баженов и др., 2007), не смог обнаружить ни один набор, использующий для этого моноклональные антитела. Результаты аналогичной работы, выполненной в Испании, свидетельствуют о том, что доля

изолятов с атипичными формами HBsAg, не обнаруживаемыми в стандартных ИФА-тестах, достигает 4,5% (Echevarria et al., 2005).

Помимо описанного выше эффекта, замена незаряженного остатка глицина в положении 145, характерного для большинства известных изолятов ВГВ, на остаток заряженного аргинина или глутаминовой кислоты может приводить к явлению «иммунологического бегства» ВГВ (в англоязычной литературе «immune escape») (Carman et al., 1990; Fujii et al., 1992). Данный феномен выражается в отсутствии заметного уменьшения концентрации HBsAg в крови инфицированного вместе с присутствием антител к HBsAg, несмотря на то, что последние могут вырабатываться иммунной системой хозяина в значительных количествах. Существование подобных вариантов HBsAg должно в будущем учитываться и при проведении программ вакцинации, поскольку изоляты, подобные описанным (включая G145R), по-видимому, способны распространяться в иммунизированных группах населения (Cooreman et al., 2001).

Актуальным является также вопрос об эффективности применения вакцин, содержащих один субтип HBsAg на территориях, эндемичных для других субтипов. В исследовании (Avazova et al., 2008) приведены результаты сравнения встречаемости HBsAg в группах детей, иммунизированных рекомбинантными вакцинами двух различных производителей, содержащими субтип adw2 и субтип adr, а также не иммунизированных, после 6 лет с начала программы всеобщей иммунизации новорожденных в Узбекистане. При сравнении выяснилось, что обе вакцины оказались одинаково эффективными (ни один вакцинированный ребенок не оказался инфицированным, а среди невакцинированных встречаемость HBsAg составила 11%), при том, что на этой территории превалирует ВГВ субтипов ayw2 и ayw3 (Ruzibakiev et al., 2002). Это говорит в пользу того, что антитела и клеточный иммунитет против рекомбинантного HBsAg определенного субтипа также эффективны и против ВГВ с HBsAg других субтипов, хотя на основании одного исследования делать окончательные выводы, разумеется, преждевременно.

2.5.3. Влияние генотипов ВГВ на клиническую картину заболевания

Значительное количество работ последних лет посвящено связи генотипа и клинического фенотипа ВГВ, то есть особенностям течения болезни, клиническому исходу, прогнозу терапии, связанным со структурой ДНК вируса. Поскольку клинические аспекты гепатита В не имеют прямого отношения к настоящей работе, мы ограничимся лишь кратким перечислением наиболее впечатляющих результатов в этой области (частично описанных в обзорах Kao et al., 2011 и Nakami et al., 2013). При этом отметим, что в случае ВГВ связь генотипа с клинической картиной, судя по опубликованным на данный момент работам, не столь выражена, как в случае некоторых других патогенов, например, ВГС. Для последнего принадлежность к тому или иному генотипу четко влияет на клинический прогноз: инфекция ВГС генотипов 2 и 3 поддается специфической терапии в 75-85% случаев, в то время как генотипа 1 – только в 40-50% (Alexorolou and Paratheodoridis, 2012). При этом в силу своей специфичности основные клинические исследования в отношении ВГВ выполнены на ограниченных группах пациентов, как правило, наблюдающихся в региональных клиниках и относящихся к населению одной области. Поэтому существует проблема применимости результатов, полученных, например, для жителей Юго-Восточной Азии, где преобладают генотипы ВГВ В и С, к европейской популяции, члены которой не только сами отличаются генетически от азиатов (влияние генетики человека на инфекционные и другие заболевания печени – это вопрос отдельной обширной области исследований), но и являются носителями в основном генотипов А и D (Tanaka and Mizokami, 2007).

В отношении тяжести заболевания гепатитом В показано, что инфекция ВГВ генотипа С протекает в более острой форме и может привести к более серьезным последствиям, чем ВГВ генотипа В. Обобщенные данные говорят о том, что при инфекции генотипом С сероконверсия HBeAg→anti-HBe происходит позже, спонтанное выздоровление (отсутствие хронизации) – реже (McMahon, 2009; Kao et al., 2010; Lin and Kao, 2011), а риск развития

гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) – выше в среднем в 2,3 раза по сравнению с инфекцией вирусом генотипа В (Yang et al., 2008). При развитии рака у пациентов, инфицированных генотипом В, чаще развивается операбельная единая опухоль (а не общее многоузловое поражение печени) по сравнению с генотипом С (94% и 86%, пациентов, соответственно, по данным Chen et al., 2004 и Lin et al., 2007). В областях, где одновременно циркулирует ВГВ генотипов А, D и F (в частности, в Испании и на Аляске), получены аналогичные корреляции. Инфекция, обусловленная генотипами D и особенно F, чаще хронизируется и приводит к более серьезным последствиям по сравнению с генотипом А, в том числе, к более высокому риску развития ГЦК и смерти от заболеваний печени, ассоциированных с ВГВ (Sánchez-Tapias et al., 2002; Livingston et al., 2007).

Отличия в патогенности вариантов ВГВ связывают с различной репликативной способностью и уровнем экспрессии вирусных белков ВГВ разных генотипов. Показано, что вирусы генотипа С быстрее проходят репликативный цикл (Sugiyama et al., 2006; Liu et al., 2009) и экспрессируют больше HBeAg (Chen et al., 2009) по сравнению с генотипом В, что приводит к более быстрому накоплению вирионов и вирусного белка внутри гепатоцитов. Авторы делают вывод, что высокая вирусная нагрузка делает пораженные гепатоциты более уязвимыми для иммунной системы, что и определяет тяжесть заболевания (Kao et al., 2011).

Разные генетические варианты ВГВ также обладают различной устойчивостью к противовирусной терапии. Так, устойчивый ответ к интерферонотерапии в течение 6-12 месяцев статистически значимо чаще развивается при инфекции генотипами А и В по сравнению с генотипами С и D (Kao et al., 2000; Erhardt et al., 2005; Buster et al., 2008; Marcellin et al., 2009). Что касается специфической терапии с использованием нуклеозидных аналогов, таких как ламивудин, энтекавир и т.д., то ВГВ всех генотипов поддается такому лечению практически одинаково хорошо на ранних стадиях терапии (Wiegand et al., 2008), однако вирусы генотипов В и D гораздо чаще образуют мутантов,

устойчивых к действию таких препаратов (Marcellin et al., 2008; Hsieh et al., 2009; Tan et al., 2012).

Наиболее известный класс таких вариантов – «YMDD-мутанты». Последовательность АО YMDD (Tyr⁵⁵¹ – Met⁵⁵² – Asp⁵⁵³ – Asp⁵⁵⁴) соответствует «дикой» последовательности каталитического домена вирусной полимеразы (Р-белка) (Kreutz, 2002). Наличие этого домена роднит вирусы семейства *Herpesviridae* с ретровирусами, которые обладают такой же высококонсервативной последовательностью в каталитическом домене своей полимеразы (Tipples et al., 1996). Мутации, приводящие к изменению АО-последовательности в этом домене, среди которых наиболее распространены YVDD и YIDD, приводят к резистентности вируса к терапии ламивудином (Tipples et al., 1996; Bartholomew et al., 1997), фамцикловиром (Mutimer et al., 2000), а также некоторыми другим нуклеозидными аналогами в различных комбинациях (Kreutz, 2002). При этом YMDD-мутанты могут возникать не только при терапии, но и спонтанно, то есть пациент может быть заражен вирусом, уже устойчивым к наиболее распространенным в настоящее время препаратам антивирусной терапии ВГВ (Yang et al., 2014).

Все это говорит о том, что практикующий инфекционист должен учитывать встречаемость генотипов и мутантных вариантов ВГВ среди своих пациентов и при необходимости назначать дополнительные исследования по определению генотипа вируса и возможных мутаций устойчивости к препаратам, поскольку для пациентов с разными генотипами ВГВ будут эффективными различные тактики лечения (Tanaka and Mizokami, 2007; Kao et al., 2011). Впрочем, как мы увидим в следующем разделе, знания об общей встречаемости ВГВ в популяции, путях его передачи и основных факторах риска не менее важны как для клинического врача, так и для исследователя-эпидемиолога.

2.6. Эпидемиологическая характеристика ВГВ

ГВ – строго антропонозное заболевание, т.е. им заражаются только от инфицированных ВГВ людей, в том числе от больных в скрытой форме – носителей инфекции. Пути передачи инфекции – парентеральный (когда заражение вызвано попаданием вируса во внутреннюю среду организма при повреждении кожных или слизистых покровов), половой (при гетеро- и гомосексуальных контактах) и вертикальный (от инфицированной матери – ребёнку). Пути передачи ВГВ сходны с таковыми при ВИЧ-инфекции и гепатите С, однако ВГВ отличается гораздо более высокой инфекционностью. Заражение ВГВ возможно при попадании во внутреннюю среду организма столь малых объемов крови от больного, как 0,1-0,5 мкл (инфекционная доза – около 10 вирионов).

Повышенный риск инфицирования ВГВ имеют люди, которые по состоянию здоровья, либо вследствие профессиональных обязанностей или особенностей поведения контактируют часто с кровью или другими биологическими жидкостями. В целом, к категориям высокого риска в современном мире относятся: внутривенные наркоманы; люди с рискованным гетеросексуальным поведением; мужчины-гомосексуалисты; медицинские работники (особенно – хирурги, анестезиологи, стоматологи и т.д.); пациенты, регулярно получающие переливания крови и гемодиализ; заключенные тюрем и колоний, а также обслуживающий их персонал; люди, проживающие совместно с больными ХГВ.

Отдельная группа высокого риска – дети, рождающиеся у матерей, больных ГВ. Вертикальная передача ВГВ может происходить ещё до рождения (трансплацентарная передача), но в большинстве случаев заражение ребёнка от инфицированной матери происходит во время родов (перинатальное инфицирование). Кроме этого, возможна передача вируса с молоком матери (цит. по Hollinger et al., 2001; Kidd-Ljunggren, 2002; Шахгильдян и др., 1994; Шахгильдян и др., 2000).

В качестве критерия оценки распространенности ВГВ в определённой популяции или на данной территории принято считать частоту выявления HBsAg-позитивных носителей. Низкоэндемичными считаются территории с частотой встречаемости HBsAg менее 2%. Частота встречаемости HBsAg от 2 до 7% характерна для среднеэндемичных зон, частота встречаемости HBsAg более 8% – для высокоэндемичных территорий (Margolis et al., 1991). Работы по изучению распространенности ВГВ непрерывно ведутся во всем мире для уточнения эпидемической ситуации, а также для контроля эффективности программ вакцинации против ВГВ.

Частота встречаемости HBsAg меньше 2% характерна для стран с высоким уровнем жизни, таких как Великобритания, Канада, США, страны Скандинавии и часть Европейских стран. Например, при обследовании в 2001 году 5305 взрослых жителей Германии, HBsAg был выявлен в 0,62% случаев (Jilg et al., 2001). Очень высокая частота встречаемости HBsAg (5-20%) выявлена в Китае, странах Тихого Океана, в некоторых странах Южной Америки, странах Азии, Африки (Ayoola, 1988; Norder et al., 2003; Kao et al., 2011). В частности, в Индонезии в 1994 г. 4,6% популяции было позитивно по HBsAg, в Таиланде 8-10% мужчин и 6-8% женщин были HBsAg-позитивными. В Сингапуре, после вакцинации против гепатита В, частота встречаемости HBsAg значительно снизилась за 5 лет и составила 4,5% (данные 2000 г.); в Малайзии 5,2% добровольцев в возрасте до 34 лет были HBsAg-позитивными (1997 г.) (Merican et al., 2000). В Японии, на Окинаве HBsAg был выявлен в 8,2% случаев (1980 г.) (Furusyo et al., 1988).

Кроме того, число носителей HBsAg может существенно варьировать в одной стране или среди различных этнических групп, населяющих страну или регион. При обследовании пяти этнических групп, проживающих на юге Тайваня, частота встречаемости HBsAg варьировала от 10% у людей, идентифицирующих себя как пришлые китайцы (в оригинале статьи - *mainland chinese*) до 25,8% у коренной тайваньской этнической группы *rukaiese* (Chung et al., 1988). При изучении частоты встречаемости серологических маркеров

гепатита В у пяти этнических групп, проживающих на севере Лабрадора, среди людей, составляющих этническую группу инуитов HBsAg был обнаружен в 6,9% случаев; у поселенцев европейского происхождения в 1,9% случаев; 0,4% – среди людей, составляющих этническую группу инну (Baikie et al., 1989). В США, у белых не мексиканского происхождения частота встречаемости маркеров гепатита В составила 2,6%, у испаноговорящих американцев – 4,4%, среди афроамериканцев – 11,9% (данные 1999, цит. по обзору Аммосов, 2006).

Разумеется, различие в поведении людей, составляющих одну и ту же географическую и этническую группу, также будет влиять на их заболеваемость гепатитом В в соответствии с факторами риска, которым они подвержены. В качестве типичного в этом отношении можно привести в пример исследование группы новосибирских авторов (Баяндин и др., 2004; Кочнева и др., 2005; Баяндин и др., 2007), показавших, в частности, что встречаемость ХГВ может варьировать от 5,8% в группе людей, гипотетически не подверженным основным факторам риска, до 8,2% в группе пациентов наркологического диспансера, а относительный риск *заболеваемости* (то есть обнаружения случаев заражения, включая ОГВ) парентеральными гепатитами у наркоманов (OR = 27,3) в десять раз выше, чем у людей, получающих инфекцию половым путем (OR = 1,66-2,88), и в 30 раз выше, чем у людей, не подверженных основным факторам риска (условный OR = 1). Исследования, проводимые много лет десятками групп авторов во всем мире, подтверждают это простое, но важное правило: чем более группа людей подвержен действию основных факторов риска в отношении ВГВ и других парентеральных инфекций (перечисленным в начале этого раздела), тем более высокий уровень носительства HBsAg она будет демонстрировать; при этом факторы генетики этих людей, принципы, по которым отбирается группа (географический, социальный, этнический и т.д.) имеют не определяющее, а лишь связанное с поведением значение (см., например, обзоры: Kwon and Lee, 2011; Nelson et al., 2011; Rossi et al., 2012 и другие).

2.7. Разнообразие ВГВ в мире

Встречаемость генетических вариантов ВГВ часто служит эпидемиологической характеристикой выбранной географической области мира. Как уже отмечалось, зафиксированная на сегодняшний день встречаемость этих вариантов в различных регионах, вероятно, является следствием миграций населения и/или других исторических событий (Simmonds, 2001; Norder et al., 2004). Распределение генетических и серологических вариантов ВГВ в мире, очевидно, весьма медленно изменяется с течением времени. Работы по изучению встречаемости вариантов ВГВ в разных странах, начавшиеся сразу же после открытия субтипов (1971 г.) и генотипов ВГВ (1988 г.) и продолжающиеся до сих пор (данные на конец 2014 г.) в целом, демонстрируют картину, отраженную в таблице 2 и подтверждают выводы друг друга (ссылки см. в таблице 2 и поздних обзорах, в частности, Kurbanov et al., 2010; Као, 2011; Nakami et al., 2013). При этом редки регионы, в которых обнаруживается только одна форма вируса: обычно на одной территории можно обнаружить один-два превалирующих генотипа и несколько минорных, в том числе – завозных (Norder et al., 2004). Сведения, изложенные ниже, иллюстрируют данные таблицы 2 и дают примеры лишь небольшой части работ, характерных для той или иной территории.

Генотип А (субтипы adw2, ayw2) наиболее распространен в странах Западной Европы, Северной Америки (Norder et al., 1993) и Африки (Bowyer et al., 1997). В частности, при обследовании 320 HBsAg-положительных доноров из США, генотип А был обнаружен в 44,7% случаев, В – 9,7%, С – 18,4%, D или E – 25,9% (метод, которым пользовались исследователи, не позволяет однозначно разделить эти генотипы), F – 1,2% (2002 г.) (Moriya et al., 2002). При изучении 258 изолятов ВГВ, полученных от испанцев, больных ХГВ, генотип А был обнаружен в 52% случаев, также обнаружены генотипы D (35%) и F (7%) (Sanchez-Tapias et al., 2002). В настоящее время варианты генотипа А, характерные для США и западноевропейских стран, относят к субгенотипу А2 (Norder et al., 2004; Sugauchi et al., 2004a). Субгенотип А1, ранее обозначаемый как А' (Bowyer et al., 1997), наиболее часто встречается в Южной и Восточной

Африке (Sugauchi et al., 2004a). Субгенотип А3 встречается в Западной Африке (Kurbanov et al., 2005). Интересно, что изоляты субгенотипа А3 авторы полагают рекомбинантами в связи с обнаружением в их геноме генотип-специфического паттерна гена полимеразы, характерного для генотипа Е, который также широко распространен в этой части Африки. Рекомбинация здесь тем более вероятна, поскольку уровень носительства ВГВ среди населения (авторы исследовали ситуацию в Камеруне) достигает 9,4%, а в целом 86,8% населения контактировали с ВГВ в прошлом (имеют серологические маркеры перенесенной инфекции) и, следовательно, вероятность микст-инфекций ВГВ разных генотипов очень высока (Kurbanov et al., 2005).

Генотипы В (субтипы ауw1, адw2) и С (субтипы адr, ауr, адw2, ауw3) являются характерными для населения Восточной и Юго-Восточной Азии (Kidd-Ljunggren et al., 2002; Okamoto et al., 1988), при этом соотношение этих генотипов варьирует в разных странах региона. В Китае, где генотип С в целом превалирует над другими генотипами, частота обнаружения изолятов генотипа В увеличивается с запада на восток. Так, в Тибете (Западный Китай), являющемся высокоэндемичной зоной по носительству HBsAg (19,1%), для всех исследованных изолятов определен генотип С (Zhao et al., 2001). При исследовании жителей Гуанси-Чжуанского Автономного Района, находящегося на юго-востоке Китая, выявлено следующее соотношение генотипов: С – 72,7% изолятов, В – 21,7%, А – 3,7%, D – 1,2% (Ge et al., 2003). В Харбине (Северо-Восточный Китай), генотип С был определен для 53,8% изолятов, В – 44,7% (Ding et al., 2003). На Тайване же превалирующим был генотип В, он определялся для 68-83,7% изолятов, генотип С – для 14,8-32%, F – 0,4%, микст-инфекции ВГВ генотипов В и С – 1,1% (Kao et al., 2002a; Kao et al., 2002b). Встречаемость субтипов HBsAg в Китае также неоднородна: на севере страны доминирует субтип адr (78%), на юге – адw (76%) (Sung and Chen, 1977). Наиболее характерные субгенотипы ВГВ для Китая – это В2 (Sugauchi et al., 2002; Sugauchi et al., 2004b) и С2 (Huy et al., 2004; Norder et al., 2004).

В Японии, среди жителей о. Окинава и г. Фукуока наблюдалось превалирование разных генотипов. На Окинаве – 86,9% изолятов имели генотип В, 13,1% – С; в Фукуоке – 5,2% изолятов относились к генотипу В и 94,2% – С (Furusyo et al., 2002). Неоднородность распространения вариантов ВГВ на юге Японии была описана и ранее, когда было показано, что в г. Кумамото субтип *adr* встречается в 95% образцов крови, а на Окинаве – в 47% образцов крови (Katsuki et al., 1980). Структура субгенотипического разнообразия Японии несколько отлична от Китая: здесь наиболее распространены В1 (Sugauchi et al., 2004b) и С2 (Norder et al., 2004).

При обследовании больных ОГВ и ХГВ в Токио обнаружена также различная частота встречаемости генотипов для этих двух групп пациентов. Так, генотип А был определен для 22,8% изолятов, полученных от больных ОГВ и для 1,9% изолятов, полученных от ХГВ, генотип В – для 14,0% и 9,4% изолятов соответственно, С – 43,9% и 87,7%, D – 1,8% и 0,2%, F – 1,8% и 0,2% (Kobayashi et al., 2002). Именно с широким распространением ВГВ генотипа С некоторые авторы связывают высокую степень хронизации гепатита В среди населения Восточной и Юго-Восточной Азии (Kao et al., 2002b; Kidd-Ljunggren et al., 2002).

В Таиланде превалирует генотип С, частота его встречаемости составляет 54,4%, в то время как генотипа В – 23,5%, А – 22,1%, при этом 45,6% процента всех обнаруженных изолятов имели субтип *adw2*, а 54,4% - *adr* (Theamboonlers et al., 1998). Для Таиланда и близко расположенных стран – Вьетнама, Лаоса, Бангладеш – наиболее характерным является субгенотип С1 ВГВ (Chan et al., 2005; Нуу et al., 2004; Norder et al., 2004). Изоляты генотипа С также с высокой частотой встречаются среди коренного населения южных островов Тихого океана (Norder et al., 2004), являющихся высокоэндемичной зоной по распространенности ВГВ (Gust, 1984). При этом изоляты ВГВ, циркулирующие среди жителей этих островов, с гораздо более высокой частотой имеют субтип *adrq*, чем изоляты генотипа С, обнаруживаемые в странах Юго-Восточной Азии

(Norder et al., 1993). Для этих территорий также характерен свой эндемичный субгенотип – С3 (Norder et al., 2004).

Генотип D (субтипы ауw2, ауw3, адw2) является наиболее широко распространенным генотипом ВГВ и обнаруживается повсеместно во всем мире. Данный генотип превалирует в странах Южной, Восточной Европы, Средиземноморья и Северной Африки (Madalinski et al., 1977; Borchani-Chabchoub et al., 2000; Norder et al., 1993; Sanchez-Tapias et al., 2002), Индии (Kidd-Ljunggren et al., 2002), регионах Ближнего Востока, Пакистане, Монголии (Norder et al., 2004; Kurbanov et al., 2010), а также в России и странах бывшего Советского Союза (см. ниже). Так, в Тунисе все исследованные изоляты ВГВ имели генотип D и субтип ауw2 (Borchani-Chabchoub et al., 2000). В Индии, при исследовании образцов, полученных от острых и хронических больных гепатитом В, генотип D (субтипы ауw2 или ауw3) был обнаружен в 92% случаев, генотип А (субтип адw2) – 8%, при этом все изоляты, для которых был определен генотип А, были получены от хронических больных (Gandhe et al., 2003). Точно такое же распределение генотипов было получено при обследовании аборигенов Андаманских и Никобарских островов (Arankalle et al., 2003). В Швеции, характеризующейся крайне низкой эндемичностью по распространенности инфекции ВГВ, генотип D был определен для 50% изолятов ВГВ, полученных от больных ОГВ (Lindh et al., 2000). Субгенотипы генотипа D обладают определенной географической эндемичностью: D1 обнаруживается в основном на Ближнем Востоке и в Средиземноморье; D2 – почти исключительно в Восточной Европе; D3 - в Восточной Европе, Южной Африке, на Аляске; D4 – в Океании и в Сомали (Norder et al., 2004; Tallo et al., 2008)

Генотип E (субтип ауw4) обнаруживается почти исключительно в странах Западной и частично Южной Африки (Norder et al., 1994). В Нигерии, являющейся высокоэндемичной зоной по распространенности инфекции ВГВ, все исследованные изоляты ВГВ имели генотип E и субтип ауw4 (Odemuyiwa et al., 2001). При исследовании изолятов ВГВ, полученных от жителей Кот-

д'Ивуара, генотип E был определен в 87,4% случаев, A – 6,3%, D – 6,3% (Suzuki et al., 2003).

Генотип F (субтипы *ayw4*, *adw4*) обнаруживается и преобладает исключительно в странах Южной и Центральной Америки (Arauz-Ruiz et al., 1997; Mbayed et al., 1998; Norder et al., 1993). Так, среди жителей Венесуэлы африканского происхождения изоляты генотипа F обнаруживаются в 50% случаев, так же, как и генотипа A, при этом в общей популяции населения Венесуэлы частота встречаемости изолятов ВГВ генотипа F намного выше (Quintero et al., 2002). При исследовании изолятов ВГВ, полученных в Мексике, генотип F (субтип *adw4*) был определен в 66,6% случаев, A (*adw2*) – 20%, D (*ayw3*) – 6,6%, G (*adw2*) – 6,6% (Sanchez et al., 2002). Среди субгенотипов генотипа F, F1 наиболее распространен в Центральной Америке, а F2 – на юге региона и в Полинезии (Norder et al., 2004). Спорадические изоляты субгенотипа F3 обнаружены в Венесуэле и Колумбии, а F4 – в Аргентине и Боливии (Huy et al., 2006).

Генотип G был обнаружен одновременно во Франции и США (Stuyver et al., 2000). Несколько изолятов генотипа H было найдено в Никарагуа, Калифорнии и Мексике (Arauz-Ruiz et al., 2002), а также Японии и Тайланде. При этом, возможно, что азиатские случаи генотипа H являются не завозными, а эндемичными для этой территории, поскольку на филогенетическом дереве генотипа H изоляты из Японии и Тайланда образуют отдельную ветвь (Kumagai et al., 2007; Yamada et al., 2014).

В современном мире на распространенность различных генотипов ВГВ во многих странах существенно влияет миграция населения и, в особенности, происхождение иммигрантов. Преобладание на территории Южной Африки генотипов ВГВ A и D (Bowyer et al., 1997), может быть связано с иммиграцией из Северо-Западной Европы (главным образом из Великобритании и Нидерландов) (Kidd-Ljunggren et al., 2002). Преобладание тех же генотипов ВГВ в Аргентине некоторые авторы объясняют активной миграцией жителей Италии и Испании (Kidd-Ljunggren et al., 2002; Mbayed et al., 1998). Кроме того,

генотип А обнаруживается у населения Филиппин (Kidd-Ljunggren et al., 1995; Norder et al., 1993) и Гонконга (Lok et al., 1994), поддерживающих тесное социально-экономическое сотрудничество с США. В Австралии и Новой Зеландии, где преобладание генотипов А и D также связывается с британским происхождением жителей этих стран, широкое распространение генотипа С объясняется миграцией коренного населения Юго-Восточной Азии и Океании (Kidd-Ljunggren et al., 1995; Sugauchi et al., 2003). В США, при обследовании иммигрантов были обнаружены различные соотношения генотипов ВГВ: иммигранты из Юго-Восточной Азии являлись носителями изолятов ВГВ преимущественно генотипов В (субтип ауw1) и С (adr), из стран бывшего СССР и Восточной Европы – D (ауw2 и ауw3), из Африки – А (адw2) и D (ауw2) (Swenson et al., 2001).

Особенности социального поведения, возможно, также могут влиять на распределение генотипов в данной группе населения. При обследовании группы японских мужчин, практикующих гомосексуальные отношения и являющихся одновременно носителями ВГВ и ВИЧ, изоляты генотипа А превалировали над изолятами генотипов В и С, являющимися характерными для Японии (Koibuchi et al., 2001). В ретроспективном исследовании, проведенном в 1992-97 гг. в Амстердаме и включавшем группу людей, имеющих повышенный риск в отношении инфекции ВГВ, получены данные, свидетельствующие о том, что гомосексуалисты являются носителями изолятов почти исключительно генотипа А, носительство же изолятов генотипа D однозначно связывается с внутривенным употреблением наркотиков, либо с марокканским происхождением инфицированных людей (van Steenberg et al., 2002). Среди изолятов ВГВ, полученных от наркоманов в Сиэтле, США, превалировал генотип D (Swenson et al., 2001). В Финляндии субтип ау, наиболее характерный для генотипа В ВГВ, обнаруживался в 100% случаев у пациентов, больных ОГВ и употреблявших наркотики, против 77% у всех остальных (Ukkonen, 1978). По мнению ряда других авторов, (Blackberg et al., 2000; Flodgren et al., 2000; Kidd-Ljunggren et al., 2002), генотип D, возможно,

является преобладающим для ВГВ у лиц, употребляющих наркотики внутривенно, во всех странах мира.

Таким образом, исследования, посвященные разнообразию ВГВ в мире, многочисленны и затрагивают самые различные научные и практические стороны существования этой инфекции в человеческих популяциях. Такие исследования, включая настоящую работу, регулярно проводятся и в России. Следующий раздел представляет собой обзор основных результатов этих работ.

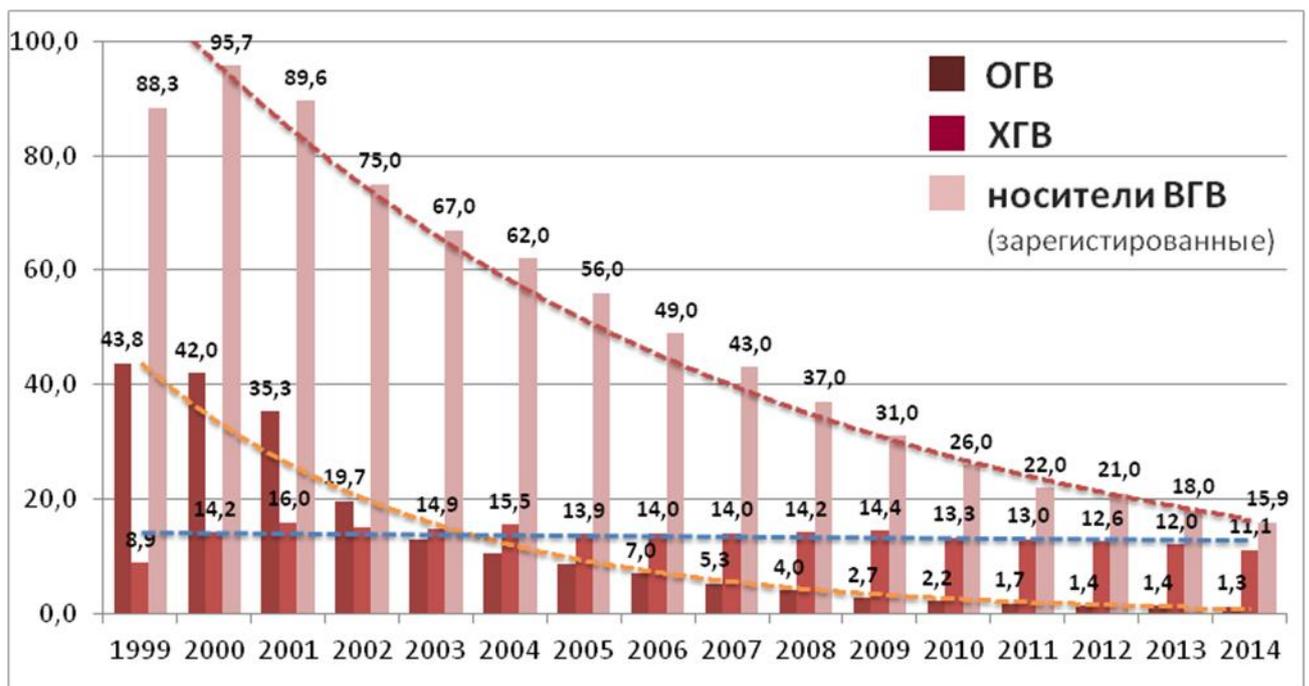


Рисунок 9.

Заболеваемость ОГВ и ХГВ и количество носителей ВГВ в РФ (на 100 тыс. населения, зарегистрированные случаи). Источник: Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году». Приведены тренды в отношении показателей: заболеваемости ОГВ и носительства – экспоненциальные, ХГВ – линейный.

2.8. Характеристика ВГВ в России и странах ближнего зарубежья

Заболеваемость ГВ в России существенно снизилась за последние 10-15 лет. После пика заболеваемости, пришедшегося на конец 90-х годов XX века (в 1999 году зафиксировано 43,8 новых случаев заболевания на 100 000 населения), в связи с предпринятыми мерами по профилактике, главнейшими из которых были введение масштабных программ вакцинации, развитие средств диагностики ВГВ и усилия по борьбе с распространением наркотиков, заболеваемость плавно снизилась до уровня 1,3 случая на 100 000 человек населения в 2014 году (рисунок 9, по материалам Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году»). Отметим, что официальная медицинская статистика отражает лишь зарегистрированные случаи; реальное же количество носителей ВГВ в России, вероятно, существенно отличается от числа пациентов, попавших в поле зрения органов здравоохранения (Асратян и др., 2004). Это предположение основывается на следующих обстоятельствах. Во-первых, в основном регистрируются манифестные случаи заболевания, а бессимптомное носительство может быть обнаружено только случайным образом; во-вторых, частота хронизации ГВ сильно варьирует в зависимости от персональных особенностей организма пациента и, во всяком случае, существенно отстает от частоты инфицирования ВГВ; в-третьих, большинство заболевших ОГВ благополучно выздоравливают за относительно короткий срок, а человек с ХГВ будет являться носителем вируса в течение десятилетий (цит. по Аммосов, 2006). Таким образом, есть основания предполагать, что динамика общего носительства ВГВ в России (и других странах) отстает от динамики заболеваемости гепатитом В на 20-30 лет. Отчасти эту ситуацию иллюстрирует рисунок 9: видно, что заболеваемость ОГВ резко снизилась с 1999 по 2014 гг., а регистрация случаев ХГВ за это время оставалась примерно на одном и том же уровне. Поэтому число «носителей» ВГВ на данном рисунке, скорее, всего, не отображает их количество в стране в целом (к сожалению, авторы доклада никак не комментируют этот показатель; вероятно в данном

случае под «носителями» подразумеваются вновь зарегистрированные случаи неманифестного заболевания, а не общее экстраполируемое количество инфицированных ВГВ). Эта картина типична и для других стран (см., например, Ray Kim, 2009).

Таким образом, никто не знает точное количество носителей ВГВ в России, поскольку для этих целей пришлось бы проводить постоянный непрерывный мониторинг всего населения страны. Тем не менее, ряд работ, выполненных на территории РФ и описываемых ниже, позволяет оценить среднюю частоту встречаемости ВГВ в 4-5%, что соответствует среднеэндемичной области в отношении гепатита В (Margolis et al., 1991). Вместе с тем, как мы увидим, размеры России и разнообразие населяющих ее людей приводят к существованию как областей с крайне низким, так и чрезвычайно высоким уровнем встречаемости ВГВ.

Первые масштабные исследования этого вопроса начались в 1980-г годах. Для различных районов на территории бывшего СССР было показано, что частота HBsAg-позитивных носителей в разное время составляла: в Москве – 3,0%, Таллине – 4,8%, Запорожье – 5,0%, Тбилиси – 6,1%, Ашхабаде – 5,6%, Алма-Ате – 6,1% (Вязов, 1985); в Ленинграде – 2,1%, (а у детей до 14 лет – 3,4%) (Мукомолов и др., 1984); в Москве, Нижнем Тагиле и Братске – 2,6%, Каунасе, Риге – 2,0%, Ташкенте, Бишкеке – 6,9%, Молдове – 10,3% (Сомова и др., 1992); в Кемерово – 2,5% (Круглов и др., 1995), на Камчатке – 11,8% (Ohba et al., 1999). Схожие результаты фиксируются и в недавних работах (Нетесова и др., 2004; Баяндин и др., 2004; Заботина, 2011 и другие авторы).

Параллельно в СССР проводились исследования и серологического разнообразия ВГВ. Одна из первых работ, затронувшая ряд стран Восточной Европы, показала, что на территории СССР, также, как и в Румынии, Югославии и Болгарии, преобладают субтипы группы ауw (встречаются в 87,5%, 82,8%, 79% и 71,5% случаев соответственно); в Польше же и Венгрии доминирующим субтипом был adw (80,7% и 72,2% соответственно) (Madalinski et al., 1977). В работе советских исследователей в то же время получены

следующие данные: в Европейской части в 78% образцах крови был обнаружен субтип ау HBsAg, в 22% – субтип ад; на Урале – 88% (ау), 12% (ад); в Западной и Восточной Сибири – 96% (ау), 4% (ад); в Средней Азии – 100% образцов крови содержали субтип ау; на Дальнем Востоке – в 89% образцов крови обнаружен ау субтип HBsAg, в 11% – ад субтип (Гранникова и др., 1977). В образцах крови доноров Москвы, Горького, Владимира, Кирова в 96,6% образцов был установлен субтип ау HBsAg, в 3,4% – ад (Михайлов и др., 1984). Доминирование в разных частях России субтипов HBsAg ауw2 и ауw3 с присутствием минорного субтипа адw2 (эти три субтипа наиболее характерны для генотипов D и A ВГВ) было неоднократно подтверждено поздними исследованиями (Нетесова и др., 2004; Баженов и др., 2007; Tallo et al., 2008 и другие авторы).

Исследователи XXI века, располагая современными молекулярно-биологическими инструментами, имеют возможность более детально описать генетическую гетерогенность ВГВ в выбранных группах. В целом, в Российской Федерации превалирует генотип D. К нему отнесены 85% изолятов ВГВ из Москвы (Abe et al., 2004), 100% изолятов ВГВ из Самары (Flodgren et al., 2000), 98% изолятов из Новосибирской области и Барнаула (Баяндин и др., 2004; Кочнева и др., 2005; Баяндин и др., 2007). Преобладание генотипа D также наблюдается в Белоруссии (до 89% изолятов ВГВ) (Olinger et al., 2008), Эстонии (81% изолятов ВГВ) (Tallo et al., 2004), Узбекистане (от 69% до 87% изолятов ВГВ по данным разных авторов) (Kato et al., 2002; Avazova et al., 2008), Таджикистане (94% изолятов ВГВ) (Khan et al., 2008).

По данным (Tallo et al., 2008) субгенотип D2 является доминирующим в России и соседних странах (82%), однако субгенотипы D1 (6%) и D3 (12%) также циркулируют на данной территории (исследовались изоляты из Эстонии, России, Казахстана и Узбекистана). Данные, полученные в Белоруссии, демонстрируют схожее распределение генотипов: D2 – 58,1%, D3 – 16,3%, D1 – 11,6% и D4 – 2,3% (Olinger et al., 2008). В то же время, для Владимирской области показана иная встречаемость субгенотипов ВГВ: D1 – 18%, D2 – 26%,

D3 – 56% (Заботина, 2011). В работе (Чуланов, 2013) показано, что частота обнаружения субгенотипа D1 убывает от европейской части России до Дальнего Востока с 45% до 12%, тогда как частота выявления субгенотипа D3, напротив, возрастает с 15% до 63%; встречаемость же субгенотипа D2 примерно одинакова и составляет около 27%.

На территории бывшего СССР циркулируют и другие генотипы ВГВ. Доля генотипа А (субтип adw2, субгенотип A2) достигает 10% в западных областях, в частности, в Москве (Abe et al., 2004), Белоруссии (Olinger et al., 2008), и 18,5% в Эстонии (Tallo et al., 2004). Генотип С (субтип adrq+) часто обнаруживается в восточных областях страны, в частности, на Чукотке (24-33%, субгенотип С1) (Цой и др., 2009; Чуланов, 2013) и в Якутии (12-50%, субгенотип С2) (Лобзин и др., 2004; Кузин и др., 2008; Чуланов, 2013).

Как можно видеть, молекулярная эпидемиология ВГВ в России и странах ближнего зарубежья изучена достаточно подробно. В то же время, в этой области кроется еще много неразгаданных загадок. Во-первых, данные разных авторов, исследовавших конкретные группы населения, значительно разнятся от «средних» для России (см. выше). Во-вторых, регулярно публикуются работы с результатами, нарушающими устоявшуюся картину разнообразия ВГВ на этой территории. В качестве примеров можно привести обнаружение абсолютно нетипичного для данной области субтипа adrq+ в Кабардино-Балкарии (Кузин и др., 2006) вместе с необычно высокой частотой встречаемости здесь же генотипа А (Чуланов, 2013); аномально высокую встречаемость генотипов А и С (до 25% каждый) в Якутии (Лобзин и др., 2004; Кузин и др., 2008); ближайшее филогенетическое родство единичных изолятов генотипа D из Эстонии и Сибири, имеющих нехарактерный для этого генотипа субтип auw4 (Tallo et al., 2004), и т.д. Кроме того, для ряда регионов России современные данные просто отсутствуют. Все это говорит о том, что единая картина истории распространения и эволюции ВГВ на территории бывшего СССР еще далека от завершения.

Исследование городских популяций ВГВ хорошо для быстрого мониторинга меняющейся эпидемической ситуации. Из-за возросшей мобильности населения структура разнообразия ВГВ в крупных городах России постепенно выравнивается, поэтому данные о вариантах вируса, полученные, например, в Новосибирске, можно с определенной долей уверенности использовать в Москве, и наоборот. Для того же, чтобы проникнуть вглубь эволюционной истории ВГВ, лучше исследовать изолированные от городского населения коллективы, в которых вирус циркулирует в течение длительного периода времени, будучи подвержен в основном естественным эволюционным факторам (Simmonds, 2001; Norder et al., 2004). В нашей стране на роль таких коллективов хорошо подходят малые (коренные) народности Сибири, которые в силу традиционного уклада, неразвитости коммуникаций и малой плотности населения до сих пор сохраняют свою идентичность и мало контактируют с пришлым (городским) населением. Данные о разнообразии ВГВ в ряде таких сибирских групп, прокомментированные с учетом результатов других авторов, работавших с населением Сибири, и составляют основную часть настоящей работы.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Дизайн исследования и обследуемые группы

Исследовали 5657 образцов плазмы крови (далее – образцов), полученных от коренных жителей Сибири в 1993-2006 г. (таблица 4). Все образцы были разделены на группы в соответствии с территориальной принадлежностью доноров (таблицы 4, 5), а именно: группа жителей Республики Алтай, которая включала группы жителей Кош-Агачского (казахи) и Усть-Канского (алтайцы) районов республики; Кемеровской области (Беловский район, телеуты); Иркутской области (Аларский и Нукутский районы, буряты и Иркутский район, русские); Ямало-Ненецкого автономного округа - ЯНАО (включала группы жителей Шурышкарского, Пуровского, Приуральского, Красноселькупского районов округа – хантов, коми, ненцев, селькупов); Красноярского края, включавшего группы Туруханского района (кетты) и Дудинского района (долганы и нганасаны). Таким образом, в исследовании приняли участие пять групп, сформированных по субъектам федерации (областям) и 12 групп, соответствующим отдельным районам. Расположение исследуемых районов на карте России представлено на рисунке 10.

Национальный состав групп определялся на основе опроса обследуемых лиц. Данные о титульных национальностях в группах приведены в таблице 4. Национальность доноров некоторых образцов (для которых получены изоляты ВГВ) приведена на рисунке 10. Данные о половозрастном составе групп приведены в таблице 5.

Все обследованные лица дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ГНЦ ВБ “Вектор”.

Все образцы исследовали в ИФА для определения HBsAg. HBsAg-положительных доноров учитывали как людей, инфицированных ВГВ. Для них проводился ПЦР-анализ с целью определения ДНК ВГВ. ДНК ВГВ-содержащие образцы учитывали как изоляты ВГВ; для них проводили

определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) фрагмента генома ВГВ, соответствующего районам Pre-S1/Pre-S2/S (рисунок 3). Размер секвенированных последовательностей составил от 1647 нуклеотидов для генотипа D до 1680 нуклеотидов для других генотипов.

Для полученных последовательностей, а также прототипных, полученных из базы данных GenBank, проводили филогенетический анализ для определения принадлежности к генотипу и субгенотипу (рисунок 11); субтип HBsAg определяли путем анализа последовательности S-гена ВГВ (таблица 1). Таким образом, для каждой из исследуемых групп был определен набор из 10 параметров: 1) встречаемость HBsAg (отношение HBsAg-положительных образцов к числу всех образцов в группе); 2) встречаемость генотипа А; 3) генотипа С; 4) субгенотипа D1; 5) D2; 6) D3; 7) генотипа D неидентифицированных субгенотипов; 8) субтипа HBsAg ayw2; 9) ayw3; 10) других субтипов (в случае 2-10 встречаемость определялась как отношение числа изолятов данного типа в группе к числу всех изолятов группы) (таблица 4). Затем все группы сравнивали между собой по этим параметрам: группы областей сравнивали каждую с каждой; группы районов сравнивали между собой внутри одной области. При этом оценивали статистическую достоверность каждого из таких сравнений по каждому из параметров. Отдельно сравнивали встречаемость HBsAg в половозрастных подгруппах внутри каждой группы (таблица 5).

3.2. Сбор, хранение и транспортировка образцов

Цельную кровь дноров получали с использованием стерильных одоразовых систем забора крови, содержащих КЗ-ЭДТА в качестве антикоагулянта. Объем полученного образца крови составлял 5-9 мл. Одоразовые пробирки с цельной кровью центрифугировали при 2000g для отделения плазмы, после чего плазму аликвотировали в условиях, исключающих контаминацию образцов, по объемам 1-2 мл. Кратковременная транспортировка плазмы осуществлялась в термоконтейнерах при -20°C , долговременное хранение при -86°C .

3.3. Иммуноферментный анализ

Для обнаружения HBsAg использовали наборы реагентов серии «Вектогеп В-HBs-антиген» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Паспортная аналитическая чувствительность данных наборов по HBsAg составляет 0,05 МЕ/мл (нг/мл) (<http://www.vector-best.ru>).

3.4. ПЦР и секвенирование ДНК

Выделение суммарных ДНК из 50 мкл плазмы крови проводили методом фенол-хлороформенной экстракции с протеназой К, как описано в работе (Баяндин и др., 2004). Для амплификации участков генома ВГВ, в совокупности перекрывающих область Pre-S1/Pre-S2/S генома ВГВ, с последующим секвенированием полученных фрагментов использовали праймеры hep75b, hep73, hep3, hep33, hep4, hep34, HB2452S, hep38, hep36M (Norder et al., 1994). Последовательности перечисленных праймеров и их положения на карте генома ВГВ приведены в таблице 3. Для амплификации фрагментов, перекрывающих ген S ВГВ, в первом раунде вложенного ПЦР (nested-PCR) использовали пару праймеров hep75b-hep73; во втором – пары hep3-hep33 и hep4-hep34 (их же впоследствии использовали для секвенирования по обеим цепям). Для амплификации фрагмента, включающего область Pre-S1/S2, в первом раунде ПЦР использовали пару праймеров HB2452S-hep38; во втором - HB2452S-hep36M (их же использовали и для секвенирования). Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК выполняли с использованием генетических анализаторов (использующих модифицированный метод Сэнгера на основе капиллярного электрофореза) и реагентов производства Applied Biosystems, США.

Таблица 3. Последовательности праймеров, использованных в работе.

Праймер	Последовательность	Тип	Позиции в геноме ВГВ*
hep75b	5'-TTCCTGCTGGTGGCTCCAGTT	прямой	56 - 77
hep73	5'-AGCCAGTGGGGGTTGCGTCAG	обратный	1166- 1187
hep33	5'-AGGACTGGGGACCCTG	прямой	131 - 147
hep3	5'-CTCAAGCTTCATCATCCATATA	обратный	714 - 736
hep4	5'-CTTGGATCCTATGGGAGTGG	прямой	636 - 656
hep34	5'-ACTTTCCAATCAATAGG	обратный	957 - 974
HB2452S	5'-TGTTTRRTATYCCYTGACWCAAYAARGT	прямой	2516 - 2543
hep38	5'-GACAAACGGGCAACATACC	обратный	435 - 454
hep36M	5'-CCACCACGAGTCTAGACTCTG	обратный	241 - 262
Расположение всей протяженной секвенированной последовательности (contig)			2516-3221; 1-974

^{*)} Нумерация позиций приведена в соответствии с прототипным изолятом рНВV3200 (GenBank #X02763; Valenzuela et al., 1980; см. раздел 2.2.)

3.5. Анализ последовательностей

Полученные последовательности обрабатывали с использованием программы DNA STAR SeqMan, США (<http://www.dnastar.com>) и выравнивали с соответствующими регионами прототипных последовательностей, депонированных в базе данных GenBank, используя программу MegAlign того же производителя. Шифры прототипных последовательностей приведены на рисунке 11. Филогенетический анализ выполняли в среде пакета PHYLIP (v. 3.53) (Felstenstein, 1993). Для построения матрицы генетических расстояний в соответствии с алгоритмом двухпараметрической модели Кимуры использовали программу DNADIST; восстановление топологии филогенетических деревьев осуществляли при помощи метода UPGMA с использованием программы NEIGHBOR.

Причисление исследуемого изолята к определенному генотипу и субгенотипу выполняли в случае, если этот изолят занимал свое место на ветви филогенетического дерева, включающей прототипные изоляты только одного генотипа (субгенотипа) и не включавшей изоляты других генетических групп. Субтип HBsAg изолята определяли, восстановив аминокислотную последовательность данного антигена, кодируемую S-геном, и сравнивая

аминокислотные остатки, находящиеся в субтип-значимых положениях, с описанными для каждого из известных субтипов (Norder et al., 1992b).

3.1.1. Выбор метода филогенетического анализа и исследуемого участка генома ВГВ

Для проведения филогенетического анализа с целью определения принадлежности изолятов ВГВ к генотипам и субгенотипам авторы выбрали фрагмент ДНК, соответствующий примерно половине генома ВГВ (размером 1647-1680 п.н., см. таблицу 3 и раздел 4.1), и содержащий области Pre-S1/Pre-S2/S, а также метод UPGMA для восстановления топологии филогенетических деревьев, руководствуясь следующими соображениями. В работе (Ogata et al., 1993) показано, что анализ последовательностей S-гена ВГВ достаточен для идентификации генотипа. Затем, в работе (Norder et al., 2004) показано, что при анализе последовательностей S-гена происходит кластеризация изолятов по субгенотипам (рисунок 8, также см. раздел 2.4.3); авторы при этом использовали для построения дерева метод UPGMA. Наконец, этот метод субгенотипирования получил уточнение в работе (Tallo et al., 2008), показавшей, что использование для этих целей фрагмента генома, включающего области Pre-S1/Pre-S2/S позволяет уверенно определить субгенотип (по крайней мере, внутри генотипа D).

Поскольку одной из задач настоящей работы было определение субгенотипов ВГВ, был избран «синтетический» метод, основанный на предшествующих основополагающих работах в этой области, а именно использование области Pre-S1/Pre-S2/S (как в Tallo et al., 2008), метода UPGMA как в и тех же последовательностей, что и в работе (Norder et al., 2004) в качестве референсных.

Вопрос о том, позволяет ли данный метод субгенотипирования изучать более тонкие отношения между изолятами ВГВ, в данной работе не рассматривается.

3.6. Статистическая обработка данных

Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$. В случае, если более чем две группы в парных сравнениях демонстрировали значимые различия одновременно, применяли апостериорную поправку на множественные сравнения по методу Бонферрони. Вычисление индексов статистической поддержки узлов филогенетического дерева в тесте bootstrap с 500 репликами осуществляли при помощи программ SEQBOOT и CONSENSE пакета PHYLIP (v. 3.53) (Felstenstein, 1993).



Рисунок 10.
Исследуемые районы на карте России.

Таблица 4. Результаты в территориальных группах.

Наиболее характерные для каждой группы результаты выделены серой заливкой.

№	Область/район	Годы сбора	Шифры образцов	Основная националь-сть	Кол-во образцов	HBsAg (+)	Кол-во изолятов	Генотипы/субгенотипы						Субтипы HBsAg		
								A	C	D1	D2	D3	D*	ayw2	ayw3	Другие
1.	Республика Алтай				425	41 9,6%	28	0	0	10 35,7%	1 3,6%	16 57,1%	1 3,6%	27 96,4%	1 3,6%	0
1.1	Кош-Агачский район	1999-2000	A-ZH	Казахи	194	10 5,2%	7	0	0	6 85,7%	0	0	1 14,3%	7 100%	0	0
1.2	Усть-Канский район	1993, 1995, 1997	A-MS	Алтайцы	231	31 13,4%	21	0	0	4 19,0%	1 4,8%	16 76,2%	0	20 95,2%	1 4,8%	0
2.	Кемеровская область (Беловский район)	2003	Ke-BEK	Телеуты	137	14 10,2%	5	0	0	3 60,0%	0	0	2 40,0%	4 80,0%	0	1 20,0%
3.	Иркутская область				1,391	84 6,0%	43	1 2,3%	3 7,0%	12 27,9%	9 20,9%	14 32,6%	4 9,3%	25 58,1%	13 30,2%	5 11,6%
3.1	Аларский район	2005	I-AL	Буряты	487	40 8,2%	24	0	2 8,3%	2 8,3%	5 20,8%	12 50,0%	3 12,5%	14 58,3%	7 29,2%	3 12,5%
3.2	Нукутский район	2006	I-NU	Буряты	654	35 5,4%	11	1 9,1%	1 9,1%	3 27,3%	4 36,4%	2 18,2%	0	3 27,3%	6 54,5%	2 18,2%
3.3	Иркутский район	2003-2005	I-IR	Русские	250	9 3,6%	8	0	0	7 87,5%	0	0	1 12,5%	8 100%	0	0
4.	ЯНАО				3,183	51 1,6%	33	2 6,1%	1 3,0%	2 6,1%	20 60,6%	5 15,2%	3 9,1%	10 30,3%	18 54,5%	5 15,2%
4.1	Шурышкарский район	1999, 2000-2002	Y-SH, Y-SHUR, Y-PIT	Ханты, коми	932	27 2,9%	20	0	0	1 5,0%	15 75,0%	2 10,0%	2 10,0%	5 25,0%	14 70,0%	1 5,0%
4.2	Приуральский район	2003-2005	Y-PR	Ненцы	1,263	10 0,8%	5	0	0	1 20,0%	1 20,0%	2 40,0%	1 20,0%	3 60,0%	1 20,0%	1 20,0%
4.3	Красноселькупский район	2006	Y-KR	Селькупы	284	2 0,7%	1	0	1 100%	0	0	0	0	0	0	1 100%
4.4	Пуровский район	1992-1993	Y-SAM	Ненцы	704	12 1,7%	7	2 28,6%	0	0	4 57,1%	1 14,3%	0	2 28,6%	3 42,9%	2 28,6%
5.	Красноярский край				521	61 11,7%	34	0	6 17,6%	22 64,7%	2 5,9%	4 11,8%	0	25 73,5%	2 5,9%	7 20,6%
5.1	Дудинский район	2000	Kr-DU	Долганы, нганасаны	408	54 13,2%	32	0	6 18,8%	22 68,7%	0	4 12,5%	0	25 78,1%	0	7 21,9%
5.2	Туруханский район	2000	Kr-TH	Кеты	113	7 6,2%	2	0	0	0	2 100%	0	0	0	2 100%	0
6.	ВСЕГО				5,657	251 4,4%	143	3 2,1%	10 7,0%	49 34,2%	32 22,4%	39 27,3%	10 7,0%	91 63,6%	34 23,8%	18 12,6%

Примечание: D* - изоляты, отнесенные к генотипу D, которые не могли быть отнесены ни к одному из исследованных субгенотипов.

Таблица 5. Носители HBsAg в половозрастных группах

№	Область/район	Мужчины	Женщины	< 35 лет	≥ 35 лет	Комментарий
1.	Республика Алтай	21/191 11,0%	20/234 8,5%	26/253 10,3%	15/172 8,7%	Нет достоверных различий
1.1	Кош-Агачский район	6/106 5,7%	4/88 4,5%	7/139 5,0%	3/55 5,5%	Нет достоверных различий
1.2	Усть-Канский район	15/85 17,6%	16/146 11,0%	19/114 16,7%	12/117 10,3%	Нет достоверных различий
2.	Кемеровская область (Беловский район)	4/56 7,1%	10/81 12,3%	1/45 2,2%	13/92 14,1%	В группе старше 35 лет инфицированных больше , чем в группе моложе 35 лет (p<0,05)
3.	Иркутская область	26/455 5,7%	58/936 6,2%	38/597 6,4%	46/794 5,8%	Нет достоверных различий
3.1	Аларский район	13/157 8,3%	27/330 8,2%	17/187 9,1%	23/300 7,7%	Нет достоверных различий
3.2	Нукутский район	11/202 5,4%	24/452 5,3%	15/272 5,5%	20/382 5,2%	Нет достоверных различий
3.3	Иркутский район	2/96 2,1%	7/154 4,5%	6/138 4,3%	3/112 2,7%	Нет достоверных различий
4.	ЯНАО	21/1109 1,9%	30/2074 1,4%	30/1903 1,6%	21/1280 1,6%	Нет достоверных различий
4.1	Шурышкарский район	7/245 2,9%	20/687 2,9%	14/425 3,3%	13/507 2,6%	Нет достоверных различий
4.2	Приуральский район	4/482 0,8%	6/781 0,8%	6/845 0,7%	4/418 1,0%	Нет достоверных различий
4.3	Красноселькупский район	2/113 1,8%	0/171 0%	1/206 0,5%	1/78 1,3%	Нет достоверных различий
4.4	Пуровский район	8/269 3,0%	4/435 0,9%	9/427 2,1%	3/277 1,1%	Нет достоверных различий
5.	Красноярский край	28/224 12,5%	33/297 11,1%	37/388 9,5%	24/133 14,5%	В группе старше 35 лет инфицированных больше , чем в группе моложе 35 лет (p<0,025)
5.1	Дудинский район	23/170 13,5%	31/238 13,0%	37/325 11,4%	17/83 20,5%	В группе старше 35 лет инфицированных больше , чем в группе моложе 35 лет (p<0,05)
5.2	Туруханский район	5/54 9,3%	2/59 3,4%	0/63 0%	7/50 14,0%	В группе старше 35 лет инфицированных больше , чем в группе моложе 35 лет (p<0,01)
6.	ВСЕГО	100/2035 4,9%	151/3622 4,2%	132/3186 4,1%	119/2471 4,8%	Нет достоверных различий

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Результаты для всей исследованной группы

Данные, полученные при исследовании всех 5 657 собранных образцов, приведены в таблице 4. Частота встречаемости HBsAg во всей группе коренного населения (4,4%), по-видимому, близка к доле хронических носителей ВГВ среди городского населения Сибири. Так, например, ранее при обследовании различных групп населения Новосибирска и Новосибирской области, частота встречаемости HBsAg составила 5,8% в группе пациентов поликлиник, не подвергавшихся действию основных факторов риска в отношении ГБ (Баяндин и др., 2004).

На этом фоне выделяются три высокоэндемичные группы по распространенности инфекции ВГВ с высокой частотой встречаемости HBsAg: алтайцы Республики Алтай (13,4%), долганы и нганасаны Красноярского края (13,2%), телеуты Кемеровской области (10,2%) (таблица 4). Высокая эндемичность ВГВ среди коренного населения уже была отмечена другими авторами на Алтае (Нетесова и др., 2001) и в северо-восточных районах – Якутии (10,4-23,8%) (Кузин и др., 2004; Зотова, 2010) и Чукотке (9,6%) (Чуланов, 2013). Напротив, на северо-западе Сибири, в ЯНАО, находится зона с крайне низкой встречаемостью ВГВ (1,6%), что подтверждается данными других исследователей, получивших сходные данные (0-2,2%) в близлежащих районах (Netesova et al., 2003; Dobrodeeva et al., 2005).

Во всех исследованных образцах было обнаружено 143 изолята ВГВ, для которых были определены последовательности районов Pre-S1/Pre-S2/S генома ВГВ размеров 1647-1680 нуклеотидов. Последовательности ДНК ВГВ, полученные в настоящей работе, депонированы в базе данных GenBank с уникальными шифрами **JX090605-JX090724**, **JX125364-JX125386**. Филогенетические отношения между исследованными изолятами представлены на рисунке 11. Среди обнаруженных изолятов превалировал генотип D ВГВ (91%). Среди субгенотипов не было доминирующих: все три субгенотипа D1,

D2 и D3 были представлены в сходных пропорциях (34%, 22% и 27% соответственно³). Также обнаружены генотипы С (7%) и А (2%). Среди субтипов HBsAg преобладал ауw2 (64%), вклад ауw3 (24%) также был выраженным (таблица 4). Субгенотипы и субтипы каждого из исследованных изолятов приведены на рисунке 11.

Использование альтернативных методов филогенетического анализа не повлияло на результаты исследования. Например, на рисунке 12 представлено дерево, полученное для тех же последовательностей с использованием метода максимального правдоподобия (ML). Видно, что топология этого дерева отлична от UPGMA-дерева: в частности, не происходит полного разделения ветвей субгенотипов D1 и D2 (D2 «вложен» в D1), а часть изолятов с неопределенным ранее субгенотипом может быть классифицирована методом ML, то есть этот метод дает больше информации, чем UPGMA. Тем не менее, для основного анализа нами, с учетом обстоятельств, изложенных в разделе 3.1.1, был выбран именно UPGMA, как метод, позволяющий легко сравнить наши результаты с результатами основополагающей работы Norder et al., 2004.

Полученная на материале всей обследованной группы картина разнообразия ВГВ не противоречит опубликованным ранее работам, выполненным на территории Сибири. В частности, изоляты ВГВ, обнаруженные в Новосибирске и Барнауле, были отнесены в 98% случаев к генотипу D, в 1% - А и 1% - С (Кочнева и др., 2005; Баяндин и др., 2007). Что касается субтипов HBsAg, то полученная ранее частота их встречаемости на территории Западной Сибири (учитывалось как коренное, так и городское население) составила: 50% ауw2, 48% ауw3, 2% адw2 (Netesova et al., 2003). При этом соотношение субгенотипов ВГВ и субтипов HBsAg существенным образом различалось в отдельных территориальных группах, вошедших в исследование (таблица 4).

³ Здесь и далее частота встречаемости отдельных вариантов (субтипов и субгенотипов) ВГВ для исследуемых групп рассчитывается как отношение числа изолятов данного варианта к общему числу изолятов в группе.

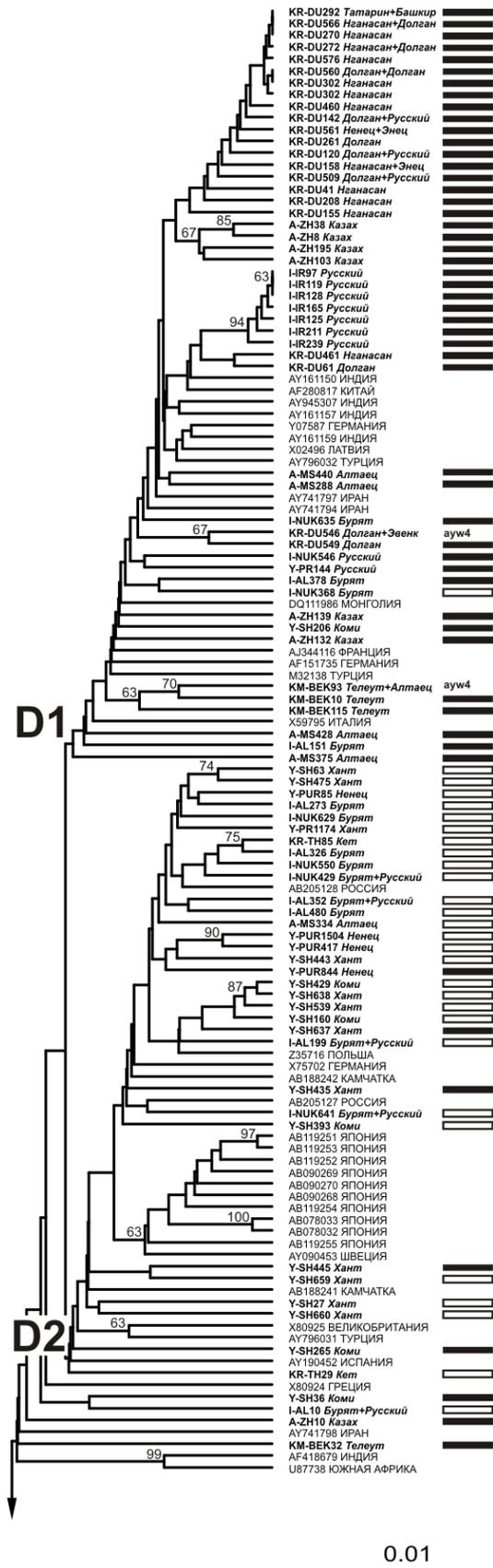


Рисунок 11.
 Филогенетическое дерево исследованных и прототипных изолятов ВГВ
 (продолжение на следующей странице).

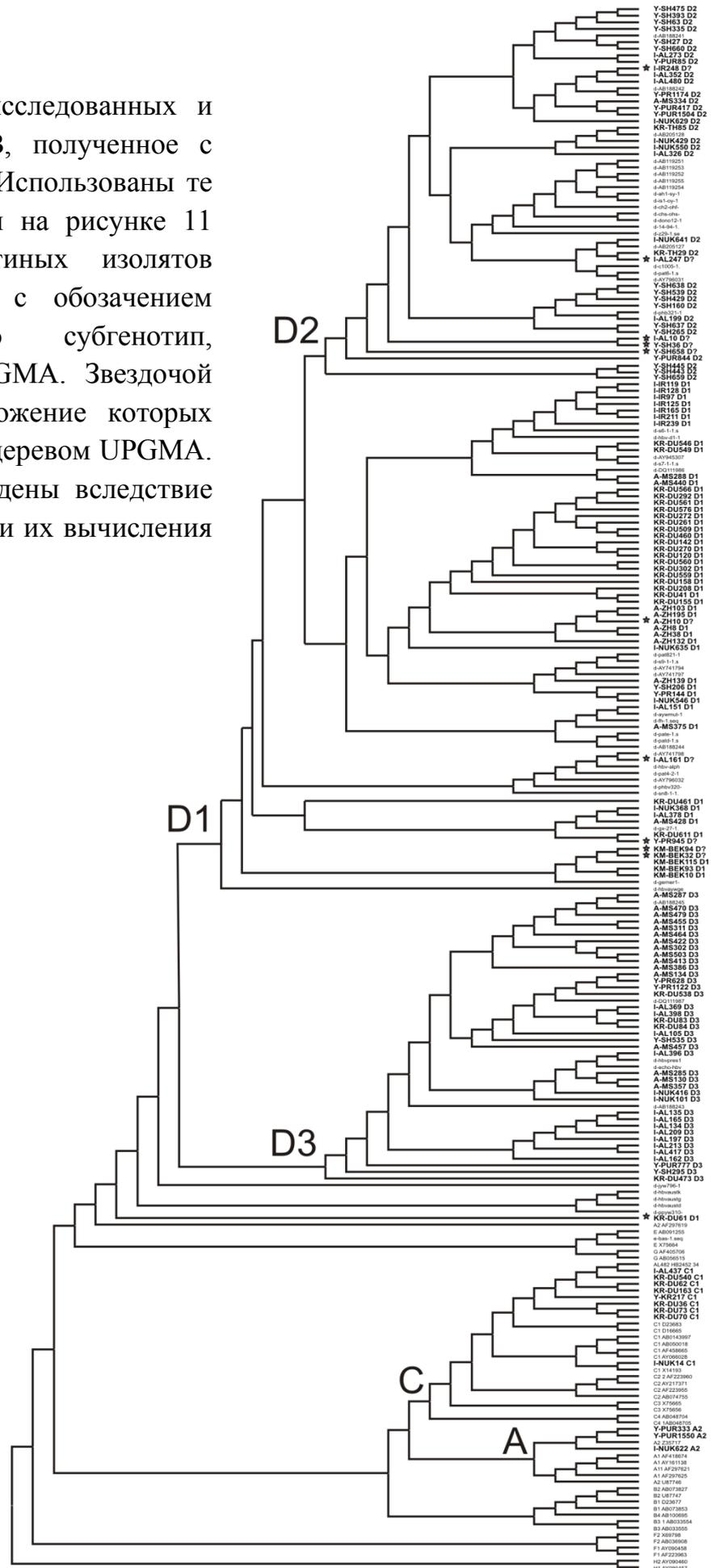


Рисунок 11 (продолжение).

Филогенетическое дерево исследованных и прототипных изолятов ВГВ. Шифры исследованных изолятов (совпадают с обозначениями в таблице 4), выделены жирным шрифтом. Курсивом указана национальность донора, включая метисов. Прямоугольником справа от шифра обозначен субтип HbAg соответствующего изолята: черный – ауw2, белый – ауw3, для других субтипов приведено буквенное обозначение. Для прототипных последовательностей указан шифр базы данных GenBank и название территории, на которой данный изолят был получен. Ветви генотипов и субгенотипов отмечены соответствующими буквами. Приведены индексы поддержки узлов, превышающие 60, а также масштаб шкалы генетических расстояний.

Рисунок 12.

Филогенетическое дерево исследованных и прототипных изолятов ВГВ, полученное с использованием метода ML. Использованы те же последовательности, что и на рисунке 11 (хотя обозначения прототипных изолятов могут отличаться). Рядом с обозначением изолята приведен его субгенотип, определенный методом UPGMA. Звездочкой отмечены те изоляты, положение которых изменилось по сравнению с деревом UPGMA. Индексы bootstrap не приведены вследствие чрезвычайной ресурсоемкости их вычисления в случае метода ML.



4.2. Республика Алтай (юго-запад Сибири; казахи, алтайцы)

Встречаемость HBsAg в образцах данной группы составила 9,6%, что свидетельствует о ее принадлежности к высокоэндемичным по распространенности инфекции ВГВ (Margolis et al., 1991). Ранее в республике уже была зафиксирована высокая встречаемость ВГВ на уровне 5-13% (Нетесова и др., 2001; Netesova et al., 2003). Доля носителей HBsAg в группе Республики Алтай достоверно превышала⁴ этот показатель в группах Иркутской области ($p < 0,025$) и ЯНАО ($p < 0,001$), но была сходной со значениями, полученными для высокоэндемичных групп Кемеровской области и Красноярского края (таблица 4). Наиболее часто встречающимися субгенотипами ВГВ в группе были D3 (57,1%) и D1 (35,7%). Частота встречаемости субгенотипа D3 была более высокой по сравнению с таковой среди изолятов Кемеровской области ($p < 0,05$), ЯНАО ($p < 0,01$) и Красноярского края ($p < 0,001$). Субгенотип D1 встречался чаще, чем в изолятах ЯНАО ($p < 0,01$), но реже, чем в изолятах Красноярского края ($p < 0,05$). Субгенотип D2 был минорным (3,6%), его встречаемость среди изолятов Республики Алтай была меньшей по сравнению с таковыми из ЯНАО ($p < 0,001$). Доминирующим субтипом HBsAg в группе образцов Республики Алтай оказался ауw2. Частота его встречаемости составила 96,4%, что было больше, чем в образцах групп Иркутской области ($p < 0,005$) и ЯНАО ($p < 0,001$). Обнаруженная встречаемость субтипа HBsAg ауw3 (3,6%) была ниже, чем в образцах групп Иркутской области ($p < 0,025$) и ЯНАО ($p < 0,001$) (таблица 4). В предшествующих работах, выполненных при изучении населения Республики Алтай (Нетесова и др., 2004), было также показано доминирование субтипа ауw2 (93-100%) при практически полном отсутствии субтипа ауw3 (0-7%). Следует отметить, что субтип ауw2 наиболее характерен для субгенотипов D1 и D3 (Norder et al., 2004; таблица 2), обнаруженных нами в Республике Алтай.

⁴ Здесь и далее приведены только статистически значимые отличия, полученные при сравнении групп; сравнения, в которых были получены недостоверные результаты, опущены.

Два района Республики Алтай, вошедших в исследование, существенно отличались между собой по исследуемым характеристикам. При сравнении групп этих районов (Кош-Агачского и Усть-Канского), обнаружены различия по встречаемости HBsAg (5,2% и 13,4% соответственно, $p < 0,01$), субгенотипов D1 (85,7% и 19,0%, $p < 0,01$) и D3 (0% и 76,2%, $p < 0,001$) (таблица 4). Эти данные свидетельствуют о том, что, по всей видимости, между группами населения указанных районов отсутствует или практически отсутствует передача ВГВ. С учетом относительной географической близости районов, входящих в одну республику, это может быть объяснено различным этническим составом групп: донорами образцов в Кош-Агачском районе были казахи, в Усть-Канском – алтайцы.

4.3. Кемеровская область (юго-запад Сибири; телеуты)

Небольшая численность данной группы не позволила получить достоверные различия в большинстве сравнений с другими группами. Тем не менее, по ряду показателей группа Кемеровской области (Беловский район) демонстрировала отличия с группой ЯНАО: в образцах Кемеровской области были обнаружены более высокие значения встречаемости HBsAg (10,2%, $p < 0,001$) и субгенотипа D1 (60,0%, $p < 0,05$). В группе образцов Кемеровской области не было обнаружено ни одного изолята субгенотипа D2 или субтипа ауw3, поэтому доли изолятов этих типов, равные 0%, оказались достоверно ниже аналогичных, полученных для ЯНАО ($p < 0,05$ в обоих случаях). Встречаемость субгенотипа D3 в группе Кемеровской области, также равная 0%, была ниже, чем в группе Республики Алтай ($p < 0,05$; некоторые результаты сравнений дублируются с изложенными выше для удобства читателя) (таблица 4). В группе телеутов был обнаружен один изолят с субтипом HBsAg ауw4 (субгенотип D1); ранее существование этого нетипичного (Norder et al., 2004) для генотипа D субтипа в Сибири было показано в работе (Tallo et al., 2004).

4.4. Иркутская область (юго-восток Сибири; буряты, русские)

Данная группа может быть отнесена к среднеэндемичным по встречаемости ВГВ: доля HBsAg-позитивных носителей в ней составила 6,0%, что было больше, чем в ЯНАО ($p < 0,001$), но меньше, чем в Республике Алтай ($p < 0,025$) и Красноярском крае ($p < 0,001$) (таблица 4). Среди субгенотипов ВГВ в группе Иркутской области не было доминирующего: D1, D2 и D3 были представлены примерно равными долями (таблица 4). Встречаемость субгенотипа D1 (27,9%) была выше, чем в ЯНАО ($p < 0,05$), но ниже, чем в Красноярском крае ($p < 0,005$). Субгенотип D2 (20,9%) обнаруживался в группе Иркутской области реже, чем в группе ЯНАО ($p < 0,001$). Встречаемость субгенотипа D3 (32,6%) не показала значимых различий ни в одном из сравнений группы Иркутской области с группами других областей. Среди субтипов HBsAg, в группе Иркутской области превалировал ауw2 – его встречаемость составила 58,1%, что было больше, чем в ЯНАО ($p < 0,05$), но меньше, чем в группе Республике Алтай ($p < 0,005$). Доля субтипа ауw3 в группе Иркутской области (30,2%) превышала таковую, полученную для групп Республики Алтай ($p < 0,025$) и Красноярского края ($p < 0,025$) (таблица 4).

В исследование вошло три района Иркутской области. Сравнение групп Аларского и Нукутского района (обе представлены преимущественно этническими бурятами), не выявило между ними достоверных различий ни по одному из исследуемых параметров. Группы Аларского и Иркутского районов (последняя группа состояла из русского населения) отличались по встречаемости HBsAg (8,2% и 3,6% соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, в Аларском районе превалировал субгенотип D3 (50% против 0% в Иркутском районе, $p < 0,05$), а в Иркутском – D1 (87,5% по сравнению с 8,3% в Аларском районе, $p < 0,001$). При сравнении Нукутского и Иркутского районов различия получены во встречаемости субгенотипа D1 (27,3% и 87,5% соответственно, $p < 0,05$), субтипов ауw2 (27,3% и 100%, $p < 0,01$) и ауw3 (54,5% и 0%, $p < 0,05$) (таблица 4). Заметные отличия параметров инфекции ВГВ в группах, представленных преимущественно бурятами и русскими, очевидно, говорят о

том, что передача ВГВ между этими группами редка. Следует отметить, что в группах Аларского и Нукутского района (буряты) обнаружены в том числе три изолята ВГВ генотипа С, один изолят - генотипа А ВГВ (Нукутский район), в то время как все 8 изолятов Иркутского района были генотипа D (рисунок 11, таблица 4). Из необычных субтипов HBsAg обнаружены два изолята с adrq+ (субгенотип С1), два – adw2 (один – субгенотипа А2 и один – генотипа D неопределенного субгенотипа) и один – субтипа ауw4 (субгенотип D3) (рисунок 11).

4.5. Ямало-Ненецкий автономный округ (северо-запад Сибири; ханты, коми, ненцы, селькупы)

Группа ЯНАО во многом отличалась от всех остальных групп, вошедших в исследование. Как уже отмечалось, в данной группе был обнаружен достоверно более низкий уровень встречаемости HBsAg (1,6%) по сравнению со всеми группами других регионов (таблица 4). Низкая (до 0%) встречаемость HBsAg среди ненцев и коми в соседнем с ЯНАО регионе – Ненецком автономном округе, была отмечена и другими исследователями (Dobrobееva et al., 2005); эндемичность ВГВ среди ненцев и хантов ЯНАО на уровне 1,8% и 2,2%, соответственно, была ранее описана в работе (Netesova et al., 2003).

Группа ЯНАО была единственной, в которой преобладали субгенотип D2 и субтип ауw3. Встречаемость субгенотипа D2 в ЯНАО (60,6%) была выше, чем в других группах ($p < 0,001$ для Республики Алтай, Иркутской области и Красноярского края и $p < 0,05$ для Кемеровской области). Встречаемость субгенотипа D1 в ЯНАО (6,1%), напротив, была ниже, чем в других группах ($p < 0,01$ для Республики Алтай, $p < 0,05$ для Кемеровской и Иркутской областей, $p < 0,001$ для Красноярского края). Доля субгенотипа D3 (15,2%) в ЯНАО была меньшей по сравнению с Республикой Алтай ($p < 0,005$). Субтип ауw3 в ЯНАО встречался чаще (54,5%), чем в группах Республики Алтай ($p < 0,001$), Кемеровской области ($p < 0,05$) и Красноярского края ($p < 0,001$). В то же время, субтип ауw2 обнаруживался в ЯНАО реже (30,3%) по сравнению с группами

Республики Алтай ($p < 0,001$), Иркутской области ($p < 0,05$) и Красноярского края ($p < 0,001$) (таблица 4). Среди других субтипов стоит отметить три изолята с субтипом adw2 (два субгенотипа A2 и один – D3), один – ауw4 (субгенотип генотипа D не определен). Интересно, что единственный исследованный изолят ВГВ из Красноселькупского района был субгенотипа C1, субтип adrq+ (рисунок 11).

Встречаемость преимущественно субтипа ауw3, характерного для изолятов ВГВ субгенотипа D2 (Norder et al., 2004; таблица 2) среди ненцев и хантов ЯНАО (42% и 100% соответственно) ранее была выявлена и в работе (Нетесова и др., 2004).

Группы четырех районов ЯНАО практически не различались между собой по параметрам инфекции ВГВ (таблица 4). Исключение составили Шурышкарский и Приуральский районы, между которыми зафиксированы отличия в долях HBsAg-позитивных носителей (2,9% и 0,8% соответственно, $p < 0,001$) и изолятов субгенотипа D2 (75,0% и 20,0%, $p < 0,05$). Во всех остальных попарных сравнениях районов ЯНАО между собой не было выявлено различий по всем исследуемым параметрам. Таким образом, можно предположить, что в ЯНАО, несмотря на различную этническую принадлежность его коренных жителей, значительные размеры округа и низкую плотность населения, существует общая популяция ВГВ, не разделенная эпидемиологическими барьерами. В то же время, вероятно, ЯНАО в целом изолирован от проникновения ВГВ со стороны групп населения других областей, вошедших в исследование.

4.6. Красноярский край (север Сибири; долганы, нганасаны, кеты)

Данная группа отнесена к высокоэндемичным в отношении инфекции ВГВ. Частота встречаемости HBsAg в группе составила 11,7%, что было выше, чем в группах Иркутской области ($p < 0,001$) и ЯНАО ($p < 0,001$) (таблица 4). Ранее столь высоких уровней встречаемости HBsAg в северных районах центральной и западной Сибири зафиксировано не было; авторы некоторых

предшествующих работ (Нетесова и др., 2001; Netesova et al., 2003; Нетесова и др., 2004; Dobrodeeva et al., 2005), полагали, что встречаемость ВГВ должна уменьшаться с юга на север Сибири.

В группе Красноярского края превалировал субгенотип D1 (64,7%), его доля в этой группе была выше по сравнению с группами Республики Алтай ($p < 0,05$), Иркутской области ($p < 0,005$) и ЯНАО ($p < 0,001$). Встречаемость субгенотипа D2 в группе Красноярского края (5,9%), как и во всех остальных группах, была ниже, чем в группе ЯНАО ($p < 0,001$). Доля также минорного для данной группы субгенотипа D3 (11,8%) была меньшей по сравнению с группой Республикой Алтай ($p < 0,001$). Значительная часть изолятов Красноярского края принадлежала к генотипу С ВГВ (17,6%), в то время как, например, ни в одном из 28 изолятов Республики Алтай ВГВ генотип С не был выявлен (таблица 4, подробнее см. ниже). Все эти изоляты принадлежали к субгенотипу С1 (субтип adrq+) (рисунок 11). Как и во всех остальных группах, за исключением ЯНАО, в группе Красноярского края доминировал субтип ауw2 (73,5%, $p < 0,001$ по сравнению с ЯНАО). Доля субтипа ауw3 (5,9%), в свою очередь, оказалось меньшей, чем в группе ЯНАО ($p < 0,001$). Также был обнаружен один изолят ауw4 (субгенотип D1), что подтверждает его широкую распространенность в Сибири (Tallo et al., 2004).

Два района Красноярского края, вошедшие в исследование, не различались достоверно ни по одному из определяемых параметров (таблица 4). Вероятно, это связано не столько с эпидемиологической однородностью этих районов, сколько с небольшой численностью группы из Туруханского района, не позволившей осуществить корректный статистический анализ (таблица 4). Поэтому основной вклад в описанные выше характеристики группы Красноярского края внесла более многочисленная группа Дудинского района. Так, в ней обнаружены все признаки, характерные для группы Красноярского края в целом: высокая встречаемость HBsAg, доминирование субгенотипа D1 и субтипа ауw2, значительный вклад изолятов генотипа С. Два изолята ВГВ, выделенные из образцов крови кетов Туруханского района, отнесены к

субгенотипу D2 и субтипу ауw3, которые не были обнаружены образцах крови долган и нганасан Дудинского района, но, в то же время, являются эндемичными для ЯНАО, граничащего с западом Туруханского района (таблица 4, рисунок 10).

Подводя промежуточный итог, можно заключить следующее. Среди коренного населения Сибири существуют несколько обособленных вирусных популяций ВГВ разных типов, при этом субгенотип D1 (субтип ауw2) превалирует в группах казахов Республики Алтай, Кемеровской области, русских Иркутской области и Дудинского района Красноярского края; D2 (ауw3) – в ЯНАО; D3 (ауw2) – в группах алтайцев Республики Алтай и Аларского района Иркутской области, что свидетельствует о существовании в прошлом нескольких различных источников инфекции ВГВ в Сибири.

4.7. Множественные сравнения

Как было показано в разделах 4.3-4.7, среди исследованных нами групп многие отличались друг от друга в попарных сравнениях по тому или иному признаку (встречаемости HBsAg, того или иного субгенотипа и т.д.) Возникает вопрос, есть ли среди них такие, которые бы одновременно отличались друг от друга в трех и более сравнениях? Применение методов множественных проверок гипотез позволяет решить проблему того, что при одновременной проверке большого числа гипотез на том же наборе данных вероятность сделать неверное заключение в отношении хотя бы одной из этих гипотез значительно превышает изначально принятый уровень значимости (который в нашей работе равен 0,05). Иными словами, вероятность того, что сразу несколько исследуемых нами групп отличаются друг от друга одновременно (т.е. представляют выборки из действительно разных групп), будет заметно ниже вероятности того, что они будут достоверно различаться в попарных сравнениях.

В нашей работе не так много групп, которые бы одновременно отличались друг от друга более чем в двух попарных сравнениях. Группы районов сравнивали между собой только внутри областей. В двух областях количество сравниваемых районов было три или четыре (в Иркутской области и ЯНАО), но среди этих районов не нашлось хотя бы трех, которые одновременно различались друг от друга в попарных сравнениях по какому-либо признаку. Зато при сравнении областей между собой такие группы нашлись. Перечислим их все:

По встречаемости HBsAg – внутри каждой тройки группы (ЯНАО, Красноярского края, Иркутской области) и (ЯНАО, Республики Алтай и Иркутской области) имели достоверные отличия между собой. По встречаемости субгенотипа D1 такими группами были (ЯНАО, Красноярский край, Иркутская область) и (ЯНАО, Красноярский край, Республика Алтай). По встречаемости субгенотипа ауw2 это были группы (ЯНАО, Красноярский край, Республика Алтай) и (ЯНАО, Республики Алтай и Иркутской области). Этими тройками групп ограничивается весь доступный нам список множественных сравнений (достоверных попарно).

Поскольку максимальное количество гипотез, которые необходимо одновременно проверить, было равно всего трем, для этих целей выбрали поправку Бонферрони. В этом простом методе каждое из значений P, полученных при попарных сравнениях, нужно умножить на количество одновременно проверяемых гипотез и сравнить с установленным уровнем значимости, в качестве которого по-прежнему установлен 0,05. Для первой тройки групп из перечисленных выше значения, полученные при парных сравнениях по уровню HBsAg были следующими:

ЯНАО ↔ Красноярский край, $p < 0,001$;

ЯНАО ↔ Иркутская область, $p < 0,001$;

Красноярский край ↔ Иркутская область, $p < 0,001$.

Видно, что любое из этих значений P , будучи умноженное на 3, будет меньше 0,05. Таким образом, можно сделать вывод, что все эти три группы достоверно отличаются друг от друга, причем одновременно.

Во всех других сравнениях для перечисленных групп, хотя бы одно из значений P было на уровне 0,025-0,05, что при умножении на три дает значение большее 0,05. Таким образом, эти множественные сравнения проверку поправкой Бонферрони не прошли. Это никаким образом не девальвирует полученные результаты для парных сравнений, но говорит о том, что среди исследованных нами выборок не удалось достоверно обозначить представителей сразу трех независимых групп при рассмотрении только одного признака. Этот результат вполне ожидаем, если учесть что мы исследовали в основном взаимоисключающие параметры: в той или иной группе доминирует либо субгенотип D1, либо D2, либо третий, но никогда два субгенотипа одновременно. Поэтому только для показателя частоты встречаемости HBsAg удалось обнаружить группы с тремя достоверно различающимися уровнями.

Завершая данный раздел, хотелось бы отметить то обстоятельство, что все статистические расчеты, произведенные в ходе исследования, по сути, позволяют сделать только одно простое предположение: если две группы отличаются по каким-то параметрам инфекции ВГВ, то вполне вероятно, что распространение вируса в них происходило по-разному. Именно это предположение в очень осторожной формулировке и составляет, на наш взгляд, основной результат работы, и количества одновременно различающихся по одному из параметров групп этот результат не меняют.

4.8. Возможные пути передачи ВГВ у коренного населения Сибири

Нам не удалось получить достоверную эпидемиологическую информацию о факторах риска в отношении инфекции ВГВ, действующих в исследуемых группах. Обычно эту информацию получают путем анализа опросников, заполняемых для каждого образца, которые в случае работы с коренным населением по ряду причин оказались малоинформативными. Тем не менее, ряд

косвенных признаков позволяет с высокой степенью уверенности утверждать, что среди коренного населения Сибири действуют пути передачи ВГВ, не связанные с основными факторами риска, характерными для городских сообществ Сибири: внутривенным употреблением наркотических средств и рискованным сексуальным поведением (Шустов, 2003; Баяндин и др., 2004; Кочнева и др., 2005; Баяндин и др., 2007).

Так, при сравнении встречаемости HBsAg в половозрастных группах всех исследованных областей и районов (таблица 5), показано, что среди исследуемых лиц уровень инфицирования не связан с полом или возрастом до 35 лет. Напротив, для некоторых групп показано увеличение риска инфицирования с возрастом (таблица 5). Следовательно, факторы риска передачи ВГВ одинаково действуют на всех участников группы, и вероятность заражения в течение жизни закономерно увеличивается с возрастом. Если бы основными путями передачи вируса были половой и употребление наркотиков, то мы обнаружили бы увеличение доли инфицированных людей в возрасте 15-35 лет, а также среди мужчин, поскольку именно эти группы наиболее подвержены упомянутым рискам (Шустов, 2003; Ray Kim, 2009).

Данные других авторов также подтверждают это предположение. В частности, показано, что ВГВ-инфекции у эвенков (Южная Якутия) распространяется в условиях отсутствия употребления ими наркотиков (автор использует для описания этого выражение «естественные пути передачи») (Зотова, 2010). В другой работе (Netesova et al., 2003), которая затрагивала различные группы населения Западной Сибири, включая как коренных жителей, так и людей из городской среды, употреблявших наркотики, описан следующий факт. Субтип HBsAg ауw3 имеет два варианта (varA и varB), дифференцируемых при помощи панели моноклональных антител (Swenson et al., 2001), при этом вариант ауw3varA выявлялся в крови лиц, употреблявших наркотики внутривенно, но не обнаруживался в образцах крови, полученных от коренного населения Западной Сибири (Netesova et al., 2003).

Личные свидетельства сотрудников Лаборатории популяционной этногенетики Института Цитологии и Генетики СО РАН под руководством Л. П. Осиповой, непосредственно собиравших образцы для данного исследования, также говорят о том, что коренные жители Сибири не подвержены внутривенному употреблению наркотических средств и девиантному половому поведению (частные сообщения). Тем не менее, действующие пути передачи ВГВ в исследованных группах (вероятно, различные для разных групп, что отражается в значительной разнице в эндемичности ВГВ) до сих пор неясны и их обнаружение могло бы быть предметом будущих исследований.

4.9. Другое представление данных: общая группа

Как уже отмечалось, результаты, полученные для общей группы, по крайней мере, не противоречат предшествующим работам, посвященным молекулярной эпидемиологии ВГВ в Сибири. С существенными оговорками можно предложить гипотезу о том, что закономерности, обнаруженные в общей исследуемой группе, выполняются также и среди остального населения Сибири, включая городское население. Тогда сравнение общей группы с группами отдельных районов позволит оценить степень их изолированности от общего населения Сибири. Автор понимает ограниченность такого подхода, равно как и то, что в строгом эпидемиологическом смысле общая группа не подходит на роль группы сравнения вследствие своих отличий от других исследуемых групп (имеются в виду различия в численности и половозрастном составе). В то же время, использование данного приема обусловлено тем, что в нашем распоряжении нет других данных о населении Сибири и молекулярном разнообразии ВГВ в регионе на обсуждаемом уровне детализации.

Численные данные для общей группы приведены в таблице 3. При сравнении с ними данных исследуемых групп получим:

в Республике Алтай встречаемость HBsAg, субгенотипа D3 и субтипа ауw2 выше, чем в общей группе ($p < 0,001$; $0,0005$; $0,005$), а субгенотипа D2 и субтипа ауw3 – ниже ($p < 0,005$ для обоих параметров);

в Кош-Агачском районе (казахи) выше встречаемость субгенотипа D1 ($p < 0,005$);

в Усть-Канском районе (алтайцы) выше показатели встречаемости HBsAg, субгенотипа D3 и субтипа ауw2 ($p < 0,001$; 0,001; 0,01);

в Кемеровской области (Беловский район, телеуты) встречаемость HBsAg выше ($p < 0,001$);

в Иркутской области в целом ни один из исследуемых показателей не отличается от общей группы;

в Аларском районе (буряты) чаще встречается HBsAg и субгенотип D3 ($p < 0,001$; 0,975), но реже – D1 ($p < 0,025$);

в Нукутском районе (буряты) выше частота встречаемости субтипа ауw3 ($p < 0,05$);

в Иркутском районе (русские) чаще встречается субгенотип D1 ($p < 0,05$);

в ЯНАО встречаемость HBsAg, субгенотипа D1 и субтипа ауw2 ниже ($p < 0,001$; 0,995; 0,999), но выше встречаемость D2 и ауw3 ($p < 0,001$; 0,995);

в Шурышкарском районе (ханты, коми) наблюдается картина полностью идентичная ЯНАО в целом ($p < 0,05$; 0,975; 0,999; 0,995; 0,999);

Приуральский, Красносельский и Пуровский районы (ненцы, селькупы) отличаются от общей группы только более низкой встречаемостью HBsAg ($p < 0,001$ для всех) – вероятно, из-за малого количества обнаруженных изолятов, не позволяющего получить достоверный результат, – но в Пуровском районе выше встречаемость генотипа А ($p < 0,05$);

в Красноярском крае выше частота встречаемости HBsAg и субгенотипа D1 ($p < 0,001$; 0,995), и ниже – субтипа ауw3 ($p < 0,05$);

Туруханский район (кеты) ни по одному показателю от общей группы не отличается;

в Дудинском районе (долганы, нганасаны) чаще обнаруживается HBsAg, генотип С, субгенотип D1 ($p < 0,001$; 0,95; 0,001), но реже – субгенотип D2 и субтип ауw3 ($p < 0,01$; 0,995).

Таким образом, почти каждая из исследованных групп имеет различия с общей группой, то есть, в соответствии с нашей гипотезой, в той или иной мере эпидемиологически изолирована от населения Сибири в целом. Наиболее же сильно изолированы группы Усть-Канского района Республики Алтай (алтайцы), Аларского района Иркутской области (буряты), группа ЯНАО в целом (ханты, коми, ненцы, селькупы) и группа Дудинского района Красноярского края (долганы и нганасаны).

4.10. Другое представление данных: национальности

Поскольку наше исследование проводилось на материале коренных народностей Сибири, интересно было бы выяснить, насколько национальная принадлежность доноров коррелирует с вариантами ВГВ, циркулирующими среди них. Исследователя, который решил разобраться в этом вопросе, ожидают две основных трудности. Во-первых, в терминах современной науки национальность человека – понятие субъективное и сложно формализуемое. В настоящей работе национальность доноров определялась на основе их опроса, а также на основе данных «похозяйственных книг» (архивов с информацией о людях, живших в районе и являвшихся предками обследуемого человека), что накладывает определенные ограничения на научную достоверность таких исходных данных. Во-вторых, в исследуемых группах оказывается значительное количество людей со смешанным происхождением (метисов), причем количество вариантов таких метисов не позволяет выделить каждый из них в отдельную группу. Поэтому, несмотря на то, что анализ разнообразия ВГВ в национальных группах был выполнен и результаты его приведены ниже, этот анализ может рассматриваться только как дополнительная обработка данных, полученных в территориальных группах районов и областей.

Всего выделены 12 национальных групп, которые перечислены в таблице 6. Одиннадцать из них были образованы по мононациональному признаку – алтайцы, буряты и т. д. Двенадцатая группа включила всех людей, национальности которых не относятся к понятию «коренных» (т.н. «пришлые

население»), и численность которых не позволяла для каждой национальности выделить отдельную группу. Поскольку в этой группе 81% составляли люди славянского происхождения, она получила условное название «русских».

Из 5 657 лиц, вошедших в исследование, 4 441 были определены как принадлежащие к одной национальности (вклад предков отличной национальности не превышал 1/8). Это значение, с учетом длительного совместного проживания представителей многих национальностей на территории России, может показаться завышенным, однако следует помнить, что сложившиеся культурные традиции большинства малых народов, вошедших в исследование, способствуют сохранению их национальной идентичности. Оставшиеся 1 216 человека со смешанным происхождением были распределены по группам таким образом, что если человек имел среди своих предков, например, и хантов, и коми, он попадал одновременно в обе эти группы. Таким образом, суммарная численность национальных групп превышала численность общей группы на 1 216 человек (на 21,5%). Увеличение размеров групп, на наш взгляд, не повлияло на достоверность результатов, поскольку сравниваемыми параметрами были не абсолютные значения, а доли групп, имеющие тот или иной признак. Правомерность такого подхода, разумеется, нуждается в обсуждении, однако стоит отметить, что он позволил избавиться от многочисленных проблем, связанных с анализом данных по метисам. Кроме того, если допустить существование неких специфических факторов, ответственных за особенности инфицирования ВГВ лиц какой-либо определенной национальности, то в смешанных семьях, одним из членов которых будет человек этой национальности, скорее всего, эти факторы будут действовать вне зависимости от происхождения остальных членов семьи. Очевидно, эти факторы, если они существуют, носят не физиологический или генетический характер (в распоряжении авторов нет соответствующих данных), а связаны с бытовыми и культурными особенностями народов.

Следует отметить, что в большинстве случаев национальные и территориальные группы практически совпадали. Так, 97,5% всех алтайцев, вошедших в исследование, проживали на территории Усть-Канского района Республики Алтай, 97,0% казахов – в Кош-Агачском районе Республики Алтай, 99,8% всех бурят – в Нукутском и Аларском районах Иркутской области, 100% нганасанов и 99,0% долганов – в Дудинском районе Красноярского края, 97,4% кетов – в Туруханском районе Красноярского края, 99,4% хантов и 99,2% коми – в Шурышкарском и Приуральском районах ЯНАО, 94,9% ненцев – в Пуровском и Приуральском районах ЯНАО, 98,7% селькупов – в Красноселькупском районе ЯНАО, 100% телеутов – в Беловском районе Кемеровской области.

Таблица 6. Результаты в национальных группах.
 Наиболее характерные для каждой группы результаты выделены серой заливкой.

Регион	Национальность	Кол-во образцов	HBsAg (+)	Кол-во изолятов	Генотипы/субгенотипы						Субтипы HBsAg		
					A	C	D1	D2	D3	D*	ayw2	ayw3	Другие
Республика Алтай	Алтайцы	237	32 13,5%	22	0	0	5 22,7%	1 4,6%	16 72,7%	0	20 90,8%	1 4,6%	1 4,6%
	Казахи	200	10 5,0%	7	0	0	6 85,7%	0	0	1 14,3%	7 100%	0	0
Кемеровская область	Телеуты	131	14 10,7%	5	0	0	3 60,0%	0	0	2 40,0%	4 80,0%	0	1 20,0%
Иркутская область	Буряты	1042	72 6,9%	34	1 2,9%	3 8,8%	4 11,8%	9 26,5%	14 41,2%	3 8,8%	16 47,1%	13 38,2%	5 14,7%
ЯНАО	Ханты	1176	26 2,2%	18	0	0	0	13 72,2%	4 22,2%	1 5,6%	4 22,2%	13 72,2%	1 5,6%
	Коми	521	10 1,9%	7	0	0	1 14,3%	4 57,1%	1 14,3%	1 14,3%	4 57,1%	3 42,9%	0
	Ненцы	1396	17 1,2%	9	2 22,2%	0	2 22,2%	4 44,5%	1 11,1%	0	4 44,5%	3 33,3%	2 22,2%
	Селькупы	226	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Красноярский край	Долганы	207	28 13,5%	18	0	5 27,8%	10 55,5%	0	3 16,7%	0	12 66,7%	0	6 33,3%
	Нганасаны	231	27 11,7%	15	0	1 6,7%	12 80,0%	0	2 13,3%	0	14 93,3%	0	1 6,7%
	Кеты	116	7 6,0%	2	0	0	0	2 100%	0	0	0	2 100%	0
Везде	«Русские»	1393	50 3,6%	30	0	6 20,0%	17 56,7%	4 13,3%	0	3 10,0%	16 53,3%	6 20,0%	8 26,7%
ВСЕГО		6876	293 4,3%	167	3 1,8%	15 9,0%	60 35,9%	37 22,2%	41 24,5%	11 6,6%	101 60,5%	41 24,5%	25 15,0%

Примечание: D* - изоляты, отнесенные к генотипу D, которые не могли быть отнесены ни к одному из исследованных субгенотипов.

Количественные данные по разнообразию ВГВ в национальных группах представлены в таблице 6. При сравнении групп между собой по 10 исследуемым параметрам, получены следующие результаты.

Группа алтайцев, состоящая из 237 человек, оказалась высокоэндемичной по встречаемости HBsAg (13,5%). По этому показателю она достоверно отличалась от низко- и среднеэндемичных групп казахов (5,0%, $p < 0,01$), которые проживают в той же республике; бурят (6,9%, $p < 0,01$); хантов (2,2%, $p < 0,001$); коми (1,9%, $p < 0,001$); ненцев (1,2%, $p < 0,001$); селькупов (0%, $p < 0,001$); кетов (6,0%, $p < 0,05$) и обобщенной группы «русских» (3,6%, $p < 0,001$). Среди алтайцев циркулирует в основном субгенотип D3 ВГВ (72,7%), и по этому показателю они отличны от групп казахов ($p < 0,01$), телеутов ($p < 0,01$) и «русских» ($p < 0,001$), у которых D3 не обнаружен вообще; а также групп бурят (41,2%, $p < 0,05$), хантов (22,2%, $p < 0,01$), коми (14,3%, $p < 0,05$), ненцев (11,1%, $p < 0,01$), долган (16,7%, $p < 0,001$) и нганасан (13,3%, $p < 0,001$). Из субтипов HBsAg у казахов с наиболее высокой частотой встречается ауw2 (90,8%), что отличает их от бурят (47,1%, $p < 0,01$), хантов (22,2%, $p < 0,001$), ненцев (44,5%, $p < 0,05$) и даже «русских» (53,3%, $p < 0,01$) (напомним, что ауw2 – доминирующий субтип в России и Сибири).

Среднеэндемичная по встречаемости ВГВ группа казахов (5,0%) превышала по этому показателю группы северо-западных народностей – хантов (2,2%, $p < 0,05$), коми (1,9%, $p < 0,05$), ненцев (1,2%, $p < 0,001$) и селькупов (0%, $p < 0,001$). Доминирующим среди казахов был субгенотип D1 (85,7%), и частота его встречаемости намного превышала этот показатель, полученный для алтайцев (22,7%, $p < 0,01$), бурят (11,8%, $p < 0,001$), хантов (0%, $p < 0,001$), коми (14,3%, $p < 0,05$) и ненцев (22,2%, $p < 0,05$), то есть групп, в которых преобладали субгенотипы D2 и D3. Субтип ауw2 у казахов (100%) встречался чаще, чем у бурят (47,1%, $p < 0,05$), хантов (22,2%, $p < 0,001$), ненцев (44,5%, $p < 0,05$), кетов (0%, $p < 0,05$) и «русских» (53,3%, $p < 0,05$).

Среди телеутов показатель встречаемости HBsAg был высоким – 10,7%, и закономерно превышал значения, полученные для низкоэндемичных народностей северо-запада Сибири – хантов (2,2%), коми (1,9%), ненцев (1,2%) и селькупов (0%) ($p < 0,001$ во всех случаях), а также «русских» (3,6%, $p < 0,001$). Встречаемость субгенотипа D1 (60%) у телеутов была выше, чем у бурят (11,5%, $p < 0,05$) и хантов (0%, $p < 0,01$). Доминирующим субтипом HBsAg в группе телеутов был ауw2 (80%), его встречаемость оказалась выше, чем в группе хантов (22,2%, $p < 0,05$). Никаких других достоверных отличий группы телеутов от остальных обнаружено не было, вероятно, в связи с малой численностью группы.

Группа бурят была наиболее гетерогенной по показателям встречаемости вариантов ВГВ. В ней, в частности, в единственной обнаруживались все возможные из изученных нами генотипов, субгенотипов ВГВ и субтипов HBsAg. В этом отношении наиболее интересным было сравнение группы бурят с группой «русских» (также отличавшейся разнообразием ВГВ), поскольку в Иркутской области, где было получено основное количество образцов от бурят, они проживают рядом с русским населением. От «русских» группа бурят отличалась более высокой встречаемостью HBsAg (6,9% против 3,6%, $p < 0,001$) и ВГВ субгенотипа D3 (41,2% и 0%, $p < 0,001$). Из-за высокой частоты встречаемости HBsAg, буряты по этому показателю отличались и от хантов (2,2%), коми (1,9%), ненцев (1,2%) и селькупов (0%, $p < 0,001$ для всех сравнений). Другой заметной характеристикой группы бурят была относительно высокая встречаемость субтипа ауw3, по этому параметру группа превосходила группы долган (0%, $p < 0,01$) и нганасан (0%, $p < 0,05$).

Четыре народности северо-запада Сибири – ханты, коми, ненцы, селькупы – были очень близки между собой, и не отличались ни по одному из исследуемых параметров. Исключение составляет только крайне низкая встречаемость HBsAg у селькупов (0% в нашем исследовании), которая была даже ниже, чем у хантов (2,2%) и коми (1,9%) ($p < 0,05$ для обоих сравнений). Это говорит о том, что передача ВГВ между жителями ЯНАО происходит

безотносительно их этнической принадлежности. Признаки, характерные для этих четырех групп, были наиболее выражены у хантов (за счет величины самой группы и значительного количества изолятов ВГВ). Так, встречаемость изолятов субгенотипа D2 среди хантов (72,2%) была выше, чем практически во всех других группах: у алтайцев (4,6%, $p < 0,001$), казахов (0%, $p < 0,01$), бурят (26,5%, $p < 0,01$), долган (0%, $p < 0,001$), нганасан (0%, $p < 0,001$) и «русских» (13,3%, $p < 0,001$). Частота обнаружения субгенотипа D3 у хантов (22,2%) была выше, чем у русских (0%, $p < 0,05$). Встречаемость субтипа ауw3, преваляровавшего среди хантов (72,2%), была также выше, чем в остальных группах: алтайцев (4,6%, $p < 0,001$), казахов (0%, $p < 0,01$), телеутов (0%, $p < 0,01$), долган (0%, $p < 0,001$), нганасан (0%, $p < 0,001$) и «русских» (20,0%, $p < 0,001$). Группы коми и ненцев демонстрировали схожие результаты при сравнениях, но с меньшими значениями достоверности из-за невысокого количества обнаруженных в них изолятов. Интересно, что группа ненцев достоверно отличалась от группы «русских» по встречаемости генотипа А ВГВ (22,2% и 0%, $p < 0,05$).

Группы долган и нганасан, проживающих совместно на Таймыре (Дудинский район Красноярского края) достоверно не отличались между собой ни по одному из исследуемых параметров, что говорит об отсутствии эпидемиологических барьеров в отношении передачи ВГВ между их представителями. С кетами, обитающими в соседнем Тураханском районе, эти группы также не демонстрировали никаких отличий (вероятно, из-за малой численности обследованной группы кетов), за исключением различий во встречаемости субтипа ауw2 у нганасан и кетов (93,3% и 0%, $p < 0,05$), и ауw3 у кетов, долган и нганасан (100%, 0% и 0% соответственно, $p < 0,01$ для обоих сравнений). Разнообразие ВГВ среди и долган, и нганасан, было схоже с группой «русских», за исключением более высокой встречаемости патогена (13,5% у долган и 11,7% у нганасан против 3,6% у русских; $p < 0,001$ в обоих случаях), а также встречаемости субгенотипа D3 у долган (13,7% против 0% у русских, $p < 0,05$) и субтипа ауw2 у нганасан (93,3% и 53,3% у русских, $p < 0,05$).

Из других особенностей групп долган и нганасан можно отметить значительную частоту встречаемости ВГВ генотипа С у долган (27,8%), которая превышала таковую для алтайцев и хантов (0%, $p < 0,05$ для обоих сравнений); высокую распространенность субгенотипа D1 у долган (55,5%), который встречался чаще, чем у бурят (11,8%, $p < 0,01$), хантов (0%, $p < 0,001$) и коми (14,3%, $p < 0,05$); а также более высокий показатель встречаемости субтипа ауw2 у нганасан по сравнению с бурятами (93,3% и 47,1%, $p < 0,01$).

Обобщая результаты данного раздела, можно заключить, что они практически полностью совпадают с изложенными ранее результатами, полученными для групп районов и областей. Действительно, можно выделить несколько групп, отличающихся между собой по характеристикам ВГВ: на юго-западе Сибири это обособленные группы алтайцев (в которой превалирует субгенотип D3) и казахов (D1); на северо-западе – объединенная группа хантов, коми, селькупов и ненцев (D2, субтип ауw3) которые практически не отличаются между собой по исследуемым характеристикам, но заметно отличны от всех остальных групп, вошедших в исследование; на юго-востоке – бурят (D3); на севере – общая группа долганов и нганасанов Таймыра (D1 с заметной долей генотипа С). Все эти группы имеют различия между собой и с объединенной группой «русских», причем к последним ближе всего по разнообразию ВГВ буряты и, возможно, долганы и нганасаны.

4.11. Генотип С ВГВ в Сибири

Большой интерес представляет факт обнаружения на севере Красноярского края (Дудинский район занимает полуостров Таймыр) значительной доли изолятов генотипа С ВГВ (18,8% в группе района). Ранее генотип С, эндемичный для Юго-Восточной Азии, не обнаруживался так далеко к северу (Таймыр – наиболее северный участок материковой части Евразии) (Norder et al., 2004; Kurbanov et al., 2010). Возникает вопрос о возможных путях его распространения в этих районах. Для того, чтобы ответить на него, необходимо

сделать небольшое отступление и обратить внимание на лежащие к востоку области Республики Саха (Якутия) и людей, их населяющих.

Для начала примем во внимание то обстоятельство, что долганы, населяющие Дудинский район вместе с нганасанами, в отличие от последних не являются коренным населением этой местности, а пришли сюда вместе с племенами своих близких родственников – якутов. Якуты тоже не всегда жили в современной Якутии: они являются пришлым (некоренным) народом Сибири и относятся к тюркоязычной этнической группе (Тарская и др., 2009). До того как поселиться на нынешних местах проживания, якуты проделали долгий исторический и географический путь. Отдаленные предки якутов, близкие уйгурам, мигрировали из областей, соответствующих северному Китаю, на территорию Средней Азии (приблизительно соответствует современному Афганистану), где частично смешались с индоевропейцами. Представители получившейся этнической группы (одна из ветвей гуннов) мигрировали на север, переместившись в районы Южного Алтая, откуда затем были вытеснены другими пришлыми племенами. Продолжив миграции, предки якутов переместились в область южного Прибайкалья (здесь они жили уже в средние века), а затем перешли далее на северо-восток, расселившись по территории современной Якутии (около XVII века). В ранний период своего нахождения в Прибайкалье предки якутов, по-видимому, попали под влияние монгольских племен, совершавших в это время под предводительством Чингисхана экспансию на запад (считается, что именно в это время якуты приобрели монголоидные черты) (исторический обзор дан по книге Тарская и др., 2009).

В сегодняшней Якутии зафиксированы характеристики ВГВ, значительно отличающиеся от остальной Сибири и России в целом. Так, в различных регионах Якутии (исследованы южные и арктические зоны, а также г. Якутск) встречаемость HBsAg была чрезвычайно высокой и составила 10,4-23,8% (Кузин и др., 2004). Генотипирование ряда изолятов показало, что встречаемость генотипов А и D в Якутии составляет по 44%, генотипа С – 12 %, при этом внутри генотипа D наиболее распространены субгенотипы D3

(86%) и в– D2 (14% от числа изолятов с генотипом D) (Кузин и др., 2008). В работе других авторов показано близкое соотношение генотипов среди больных ХГВ в Якутии - генотип D был обнаружен у 38%, генотип А - у 24,1%, генотип С - у 24,1%, одновременное присутствие двух генотипов ВГВ отмечено у 13,8% пациентов (Лобзин и др., 2004). В одной из последних работ приводятся данные о том, что доля генотипа А в Якутии может достигать еще больших значений – до 49,5% (Чуланов, 2013). Видно, что, хотя данные исследователей несколько разнятся, они заметно отличают Якутию от описанных в настоящей работе областей, включая Россию в целом. При этом в отношении встречаемости генотипа С и уровня носительства ВГВ Якутия довольно близка к Дудинскому району (18,8% изолятов генотипа С при частоте выявления HBsAg 13,2%, таблица 4).

Можно было бы предположить, что якуты, а вслед за ними и долганы, приобрели такую необычную структуры разнообразия ВГВ во время своих миграций, например, при контакте с монголами. Однако некоторые обстоятельства не позволяют сделать этого. Так, если бы якуты получили ВГВ генотипа С от монголов, мы бы и по сей день наблюдали циркуляцию изолятов генотипа С на всем пути дальнейших миграций монголов на запад, чего не происходит (Kurbanov et al., 2010). Более того, в Монголии преобладает генотип D, а генотип С там практически не обнаруживается (Norder et al., 2004). Следовательно, монголы не являлись носителями генотипа С ВГВ и не могли передать его якутам.

То, что возникновение генотипа С в популяции якутов произошло позднее, косвенно подтверждается данными, полученными еще для одной сибирской группы – эвенков. Во время миграции из областей Южного Забайкалья на север, которое датируется 13-17 вв. (то есть уже после вторжения монголов), якуты активно взаимодействовали с эвенками (Шубин, 1973), которые сейчас населяют восток Красноярского края и Южную Якутию. Среди эвенков, при общем высоком уровне встречаемости HBsAg (12,9%) обнаружен только генотип D (Зотова, 2010). Все это позволяет предположить существование

другого пути распространения ВГВ генотипа С в этих областях, а именно – с востока на запад севера Сибири.

В последние годы показана высокая встречаемость генотипа С на Чукотке. Так, методом ИФА с помощью высоко специфических моноклональных антител был установлен субтип HBsAg adrq+, генотип С ВГВ в 33% образцов крови жителей г. Анадырь (Цой и др., 2009). В обширном исследовании, посвященном структуре ВГВ у чукчей этого региона (Чуланов, 2013), показано, что среди коренного населения частота обнаружения HBsAg достигает 11,2%. При этом выявляется следующее разнообразие генотипов и субгенотипов: А2 – 1,5%, С1 – 32,3%, D – 66,2% (субгенотипы D1 – 6,3%, D2 – 28,1%, D3 – 65,6% от числа изолятов генотипа D), причем эти значения достоверно отличались от значений, полученных для не коренного (пришлого) населения Чукотского АО (Чуланов, 2013).

Дополнительно отметим, что генотип С обнаруживается на Аляске, куда он попал с миграциями монголоидов во время заселения Америки (Norder et al., 2004; Livingston et al., 2007; Sakamoto et al., 2007), и, вероятно, изоляты ВГВ на Чукотке имеют то же историческое происхождение. Все это свидетельствует в пользу существования возможного пути передачи ВГВ с востока на запад Сибири. Интересно, что единственный изолят генотипа С, полученный в нашем исследовании в Красноселькупском районе ЯНАО (расположенном южнее и западнее Таймыра), оказался филогенетически схожим с изолятами субгенотипа С1 из Дудинского района Красноярского края (рисунок 11), что, возможно, говорит о вовлечении в указанный северный путь передачи ВГВ населения и более западных областей Сибири.

В любом случае, обнаружение ВГВ генотипа С в северных районах Сибири необходимо учитывать практикующим врачам-инфекционистам, поскольку клиническая картина заболевания, развивающегося при инфекции генотипа С может существенно отличаться от таковой при инфекции генотипом D ВГВ (Tanaka and Mizokami, 2007; Kao et al., 2011).

4.12. Заключение

Таким образом, результаты настоящей работы по выявлению HBsAg в пяти обследованных регионах Сибири свидетельствуют о наличии трех высокоэндемичных групп по распространенности инфекции ВГВ: алтайцев Республики Алтай (13,4%), долганов и нганасан Красноярского края (13,2%), телеутов Кемеровской области (10,2%), в которых необходимо проведение массовых мероприятий по профилактике ВГВ-инфекции. Определение генотипов ВГВ в 143 изолятах показало, что 130 (90,9%) из них относятся к генотипу D, 10 (7%) - к генотипу C, и только 3 (2,1%) – к генотипу A. Установлена различная встречаемость субгенотипов ВГВ в изолятах обследованных групп: субгенотип D1 (субтип ауw2) превалировал в изолятах групп казахов Республики Алтай (85,7%), телеутов Кемеровской области (60%), русских Иркутской области (87,5%), долганов, нганасан Красноярского края (68,8%); D2 (ауw3) – в изолятах групп хантов, коми (75%), ненцев Пуровского района (57,1%) ЯНАО; D3 (ауw2) – в изолятах групп алтайцев Республики Алтай (76,2%) и бурят Аларского района Иркутской области (50%). Генотип C (adrq+) ВГВ обнаружен в изолятах групп Дудинского района Красноярского края, Аларского и Нукутского районов Иркутской области, Красноселькупского района ЯНАО; генотип A выявлен в изолятах групп Пуровского района ЯНАО и Нукутского района Иркутской области. Полученные данные говорят о существовании в прошлом нескольких различных источников инфекции ВГВ в популяциях коренного населения Сибири, а также их эпидемиологической обособленности друг от друга. В совокупности с результатами, которые уже получены, или будут в будущем получены на изучаемой территории, настоящее исследование способствует созданию единой картины циркуляции ВГВ в Сибири, его разнообразия и эволюционной истории, а также прогнозированию возможных новых вызовов практическому здравоохранению в отношении этого опасного заболевания.

5. ВЫВОДЫ

1. Определена частота встречаемости HBsAg в группах коренного населения Сибири. Обнаружены высокоэндемичные по распространенности ВГВ группы алтайцев Усть-Канского района Республики Алтай (13,4%); телеутов Беловского района Кемеровской области (10,2%); долган и нганасан Дудинского района Красноярского края (13,2%); среднеэндемичные группы казахов Кош-Агачского района Республики Алтай (5,2%); бурят Аларского и Нукутского районов Иркутской области (6,9%); русских Иркутского района Иркутской области (3,6%); низкоэндемичная группа хантов, коми, ненцев и селькупов Шурышкарского, Приуральского, Красноселькупского и Пуровского районов ЯНАО (1,6%).
2. Определены частоты встречаемости генотипов и субгенотипов ВГВ в группах коренного населения Сибири. Во всех без исключения группах наиболее распространен генотип D ВГВ (91% всех изолятов). Субгенотип D1 превалирует в группах казахов Республики Алтай (85,7%); телеутов Кемеровской области (60%); русских Иркутской области (87,5%); долган и нганасан Красноярского края (68,7%). Субгенотип D2 превалирует в группах хантов, коми, ненцев и селькупов ЯНАО (60,6%); кетов Красноярского края (100%). Субгенотип D3 превалирует в группах алтайцев Республики Алтай (76,2%); бурят Иркутской области (41,2%).
3. Определены частоты встречаемости субтипов HBsAg в группах коренного населения Сибири. Субтип ауw2 превалирует в группах казахов (95,2%) и алтайцев (100%) Республики Алтай; телеутов Кемеровской области (80%); бурят (47,1%) и русских (100%) Иркутской области; долган и нганасан Красноярского края (78,1%). Субтип ауw3 превалирует в группах хантов, коми, ненцев и селькупов ЯНАО (54,5%); кетов Красноярского края (100%).

4. Выявлена высокая частота встречаемости изолятов ВГВ генотипа С (субгенотип С1, субтип adrq+) в группе долган и нганасан Красноярского края (п-ов Таймыр) – 18,8%. Обнаружены три изолята генотипа А (2,1% от общего количества): два в ЯНАО, один – в Иркутской области.
5. Проведенный статистический анализ полученных данных показал, что перечисленные группы коренного населения изолированы друг от друга в отношении передачи ВГВ.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проведено при поддержке грантов НШ-65387.2010.4, НШ-6086-2004.4 и НШ-387.2008.4 по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации, гранта МФТИ №00012/00049 «Создание региональной референс-лаборатории для ПЦР-диагностики вирусных гепатитов», Госконтракта № 02.740.11.0767 «Выявление вирусных возбудителей заболеваний, актуальных для здравоохранения Западной Сибири (гепатиты, гастроэнтериты, серозный менингит), изучение их генетического разнообразия в целях разработки и совершенствования диагностикумов», гранта The Swedish Institute №01543/2006 и гранта РФФИ №05-06-80333.

Сбор всех образцов и опрос обследованных лиц осуществлялся сотрудниками Лаборатории популяционной этногенетики Института цитологии и генетики СО РАН под руководством Л.П. Осиповой. Авторы выражают благодарность Р.В. Дульбееву, Л.Р. Алексеевой, Ю.Н. Тулугоеву, Ю.К. Булсунаеву за помощь в организации сбора образцов.

Иммуноферментный анализ проводился на базе ЗАО «Вектор-Бест» силами И.Г. Нетесовой и Л.В. Безугловой.

Молекулярно-биологическая часть работы (ПЦР, секвенирование, анализ данных) выполнена автором лично на базе ГНЦ ВБ «Вектор» при методической и направляющей поддержке В.Б. Локтева, В.А. Тернового, Г.В. Кочневой, Е.В. Чуб, Р.Б. Баяндина, А.В. Шустова, С.А. Походни, а также на базе Шведского института по контролю над инфекционными заболеваниями при поддержке Н. Norder и L.O. Magnius.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Аммосов А.Д. Гепатит В. – Новосибирск: Вектор-Бест. – 2006. – 132 с.
- Асратян А.А., Исаева О.В., Михайлов М.И. Тенденция и анализ эпидемической ситуации по парентеральным вирусным гепатитам В и С в РФ и отдельных регионах. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2005. – № 4. – С. 40-45.
- Баженов А.И., Годков М.А., Коноплева М.В., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Н.И., Хац Ю.С., Суслов А.П. Алгоритм серологического поиска и оценка распространенности серологически значимых HBsAg-мутаций у носителей вируса гепатита В. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2007. – № 6. – С. 30-37.
- Баженов А.И., Годков М.А., Коноплева М.В., Фельдшерова А.А., Эльгорт Д.А., Хац Ю.С., Лапина Н.Е., Суслов А.П. Оценка чувствительности коммерческих тест-систем для иммунодетекции HBsAg по их способности выявлять HBsAg-мутанты вируса гепатита В. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. – № 3. – С. 49-53.
- Баяндин Р.Б., Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Акинфеева Л.А., Ракова И.Г., Алешина М.В., Букин В.Н., Орловский В.Г., Беспалов В.С., Нетесов С.В. Генотипическое разнообразие изолятов и факторы риска инфекции вирусом гепатита В у отдельных групп населения Новосибирской области. // Инфекционные болезни. – 2004. – Т. 2. – № 3. – С. 39-44.
- Баяндин Р.Б., Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Локтев В.Б., Гранитов В.М., Нетесов С.В. Частота обнаружения маркеров, генотипы вируса и факторы риска гепатита В у пациентов инфекционного отделения городской больницы Барнаула. // Инфекционные болезни. – 2007. – Т. 5. – № 5. – С. 5-10.
- Боткин С.П. Курс клиники внутренних болезней и клинические лекции, т. 1-2. – Москва: МЕДГИЗ. – 1950. – 181 с.
- Вязов С.О., Компаниец А.А., Ананьев В.А., Листовская Е.К., Дардик Ф.Г., Пирожкова З.П., Лейбензон А.С., Мчедлишвили И.М., Сакваредидзе Л.О., Воробей В.С., Рейнару И.К. Выявление HBsAg анти-HBs у здорового населения различных городов СССР. // Вопросы вирусологии. – 1985. – № 2. – С. 231-233.
- Гранникова С.А., Русакова Е.В., Будницкая П.З., Королева В.М., Лозинская Т.М., Васильева В.И. Подтиповая характеристика поверхностного антигена гепатита В в различных районах России. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1977. – № 19. – С. 97-101.
- Заботина Е.Е. Эпидемиологические и молекулярно-генетические аспекты гепатитов В и С (по материалам Владимирской области). Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. – Москва. – 2011. – 133 с.
- Зотова А.В. Парентеральные вирусные гепатиты в Южной Якутии. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. – Москва. – 2010. – 128 с.
- Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Шустов А.В., Гаврилова И.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Терновой В.А., Чаусов Е.В., Акинфеева Л.А., Гранитов В.М., Сахарова Е.Г., Губанова Л.И., Орловский В.Г., Нетесов С.В. Этиология острых гепатитов и генотипическое разнообразие вирусов гепатитов А, В, С и Е в трех регионах Сибири. // Инфекционные болезни. – 2005. – Т. 3. – № 1. С. 26-31.
- Круглов И.В., Яшина Т.Л., Цветова Г.В., Селютин И.А., Клишкин А.Ю., Аксенова Н.Ф., Собина Г.В., Герасименко Н.А., Бакулин В.С., Иванов С.В., Владимиров И.В., Громыко Г.П., Новокрещенова Т.М., Душманова М.С., Шамкина М.К., Дорошенко Н.В., Фаворов М.О. Распространение маркеров гепатитов В и С и этиологическая структура заболеваемости

- острыми вирусными гепатитами населения Кузбасса и северо-западного Казахстана. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1995. – № 6. – С. 36-37.
- Кузин С.Н., Павлов Н.Н., Семенов С.И., Кривошапкин В.Г., Индеева Л.Д., Саввин Р.Г., Николаев А.В., Чемезова Р.И., Кожевникова Л.К., Лавров В.Ф., Алаторцева Г., Кузина Л.Е., Садикова Н.В., Зверев В.В. Широта распространения вирусных гепатитов среди различных групп населения на территории Республики Саха (Якутия). // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2004. – № 1. – С. 18-22.
- Кузин С.Н., Тленкопачев Р.С., Садикова Н.В., Нетесова И.Г., Кабалоева Э.Н., Власова Г.Г., Нагоев Б.С., Варламова И.А., Кузина Л.Е., Нетесов С.В., Лавров В.Ф., Зверев В.В. Распространение вирусов гепатитов В и С и структура субтипов HBsAg в Кабардино-Балкарии. // Вопросы вирусологии. – 2006. – № 3. – С. 21-25.
- Кузин С.Н., Забелин Н.Н., Самохвалов Е.И., Семенов С.И., Павлов Н.Н., Терехова М.В., Зверева И.К., Кузина Л.Е., Кожевников А.А. Генетическое разнообразие вируса гепатита В на территории Республики Саха (Якутия). // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, – 2008. – Т. 42. – № 5. – С. 10-15.
- Лобзин Ю.В., Слепцова С.С., Алексеева М.Н., Рахманова А.Г. Клинико-эпидемиологическая характеристика гепатита В в Республике Саха (Якутия). // Инфекционные болезни. – 2004. – Т. 2. – № 2. – С. 13-16.
- Михайлов М.И., Ворожбиева Т.Е., Хорват Г.Н., Зубов С.В., Жаворонок С.В., Кожухарь А.Е., Ананьев В.А. Детерминанты поверхностного антигена гепатита В (получение моноспецифических сывороток, география распространения субтипов). // В сборнике: Успехи гематологии. – Рига. – 1984. – № 2. – С.145-151.
- Мукомолов С.Л., Ананьев В.А., Шляхтенко Л.И., Нечаев В.В., Евдокимова Т.В., Михайлов М.И. Эпидемиологическая характеристика и значение носителей поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1984. – № 12. – С. 76-80.
- Нетесова И.Г., Swenson P.D., Осипова Л.П., Киселев Н.Н., Посух О.Л., Черепанова Н.С., Казаковцева М.А., Кашинская Ю.О., Нетесов С.В. Маркеры вирусного гепатита В у южных алтайцев пос. Мендур-Соккон (Республика Алтай). Субтипирование HBsAg изолятов ВГВ с помощью моноклональных антител. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2001. – № 1. – С. 29-33.
- Нетесова И.Г., Swenson P.D., Калашникова Т.В., Нетесов С.В., Фаворов М.О. Субтипы HBsAg вируса гепатита В в Западной Сибири. // Вопросы вирусологии. – 2004. – № 1. – С. 17-20.
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году: Государственный доклад. [Электронный ресурс] // [Официальный сайт.] Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. URL: http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf
- Сомова А.В., Голосова Т.В., Марголина А.Н., Багрянцева С.Ю. Серодиагностика вирусных гепатитов С и В среди различных групп населения. // Вопросы вирусологии. – 1992. – № 4. – С. 105-107.
- Тарская Л.А., Гоголев А.И., Ельчинова Г.И., Егорова А.Г., Лимборская С.А. Этническая геномика якутов (народов саха). – Москва: Наука. – 2009. – 272 с.
- Чуланов В.П. Эпидемиологическое и клиническое значение генетической гетерогенности вирусов гепатита А и В. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. – Москва. – 2013. – 47 с.

Шахгильдян И.В., Хухлович П.А., Михайлов М.И., Храпунова И.А., Кузин С.Н., Жукова Л.Д., Финкель М.П., Матвеев С.И., Селькова Е.П., Малышев Н.А., Ананьев В.А. Риск инфицирования вирусами гепатита В и С медицинских работников, больных отделений гемодиализа и вакцинопрофилактика у них гепатит-В вирусной инфекции. // Вопросы вирусологии. – 1994. – № 5. – С. 226-229.

Шахгильдян И.В., Хухлович П.А., Савин Е.А., Кузин С.Н., Ананьев В.А., Сергеева Н.А., Хасанова В.А., Шостка Г.Д., Ву Зиен, Васильев А.Н., Жукова Л.Д., Храпунова И.А., Курибко С.Г., Ошеревич А.М., Малышев Н. Широта инфицирования медицинских работников вирусами гепатитов В и С и оценка эффективности вакцинопрофилактики HBV-вирусной инфекции среди них. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2000. – № 5. – С. 59-63.

Шубин А.Ц. Краткий очерк этнической истории эвенков Забайкалья (XVIII-XX век). – Улан-Удэ: Бурятское книжное издательство. – 1973. – 108 с.

Шустов А.В. Генотипическое разнообразие изолятов и молекулярная вариабельность вируса гепатита В у населения Новосибирской области. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Кольцово. – 2003. – 209 с.

Цой Л.В., Венгерова Я.Д., Иптышева Е.П., Донская М.Г., Хабибуллина В.Е., Ищенко Н.М., Кругляк С.П., Мартынченко Ю.Н., Еремина Г.А., Гальбрайт Р.Б., Рыжаенков В.Г., Сидоренко Н.А., Златник Е.Ю., Михайлова Н.В., Асмолова М.А., Нетесова И.Г. Субтипы HBsAg и генотипы ВГВ в образцах крови населения различных регионов России (Тезисы VIII Российской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика», 26-28 мая 2009 г.) // Мир вирусных гепатитов. – 2009. – № 3. – С. 8-9.

Abdou Chekaraou M., Brichler S., Mansour W., Le Gal F., Garba A., Deny P., Gordien E. A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. // Journal of General Virology. – 2010. – V. 91. – N. 6. – P. 1609-1620.

Abe K., Hayakawa E., Sminov A.V., Rossina A.L., Ding X., Huy T.T., Sata T., Uchaikin V.F. Molecular epidemiology of hepatitis B, C, D and E viruses among children in Moscow, Russia. // Journal of Clinical Virology. – 2004. – V. 30. – N. 1. – P. 57-61.

Ahn S.H., Yuen L., Revill P. Clarification Required for the Definition of Hepatitis B Virus Subgenotypes C1 and C2. // Intervirology. – 2009. V. 52. – P. 321-322.

Alexopoulou A., Papatheodoridis G.V. Current progress in the treatment of chronic hepatitis C. // World Journal of Gastroenterology. – 2012. – V. 18. – N. 42. – P. 6060-6069.

Almeida J.D., Rubenstein E.M., Stott E.J. New antigen-antibody system in Australia- antigen-positive hepatitis. // The Lancet. – 1971. – V. 298. – N. 7736. – P. 1225-1227.

Arankalle V.A., Murhekar K.M., Gandhe S.S., Murhekar M.V., Ramdasi A.Y., Padbidri V.S., Sehgal S.C. Hepatitis B virus: predominance of genotype D in primitive tribes of the Andaman and Nicobar islands, India (1989-1999). // Journal of General Virology. – 2003. – V. 84. – N. 7. – P. 1915-1920.

Arauz-Ruiz P., Norder H., Visona K.A., Magnius L.O. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. // The Journal of Infectious Diseases. – 1997. – V. 176. – N. 4. – P. 851-858.

Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnius L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. // Journal of General Virology. – 2002. – V. 83. – N. 8. – P. 2059-2073.

- Avazova D., Kurbanov F., Tanaka Y., Sugiyama M., Radchenko I., Ruziev D., Musabaev E., Mizokami M. Hepatitis B virus transmission pattern and vaccination efficiency in Uzbekistan. // *Journal of Medical Virology*. – 2008. – V. 80. – N. 2. – P. 217-224.
- Ayoola E.A. Viral hepatitis in Afrika. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Editor A.J. Zuckerman – 1988. – New York, Alan R. Liss. – P 161-168.
- Baikie M., Ratnam S., Bryant D.G., Jong M., Bokhout M. Epidemiologic features of hepatitis B virus infection in northern Labrador. // *Canadian Medical Association Journal*. – 1989. – V. 141. – N. 8. – P. 791-795.
- Banerjee A., Datta S., Chandra P.K., Roychowdhury S., Panda C.K., Chakravarty R. Distribution of hepatitis B virus genotypes: phylogenetic analysis and virological characteristics of genotype C circulating among HBV carriers in Kolkata, Eastern India. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006a. – V. 37. – P. 5964-5971.
- Banerjee A., Kurbanov F., Datta S., Chandra P.K., Tanaka Y., Mizokami M., Chakravarty R. Phylogenetic relatedness and genetic diversity of hepatitis B virus isolates in Eastern India. // *Journal of Medical Virology*. – 2006b. – V. 78. – N. 9. – P. 1164-1174.
- Bancroft W.H., Mundon F.K., Russell P.K. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. // *Journal of Immunology*. – 1972. – V. 109. – N. 4. – P. 842-848.
- Bartholomew M.M., Jansen R.W., Jeffers L.J., Reddy K.R., Johnson L.C., Bunzendahl H., Condrey L.D., Tzakis A.G., Schiff E.R., Brown N.A. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. // *The Lancet*. – 1997. – V. 349. – N. 9044. – P. 20-22.
- Blackberg J., Braconier J.H., Widell A., Kidd-Ljunggren K. Long-term outcome of acute hepatitis B and C in an outbreak of hepatitis in 1969-72. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2000. – V. 19. – N. 1. – P. 21-26.
- Blumberg B.S., Alter H.J., Visnich S. A 'new' antigen in leukemia sera. // *Journal of American Medical Association*. – 1965. V. 191. – P. 541-546.
- Bollyky P.L., Rambaut A., Grassly N., Carman W.F., Holmes E.C. Hepatitis B virus has a New World evolutionary origin. // *Hepatology*. – 1997. – V. 26. – P. 765.
- Borchani-Chabchoub I., Gargouri A., Mokdad-Gargouri R. Genotyping of Tunisian hepatitis B virus isolates based on the sequencing of preS2 and S regions. // *Microbes and Infection*. – 2000. – V. 2. – N. 6. – P. 607-612.
- Bowyer S.M., van Staden L., Kew M.C., Sim J.G. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. // *Journal of General Virology*. – 1997. – V. 78. – N. 7. – P. 1719-1729.
- Buster E.H., Flink H.J., Cakaloglu Y., Simon K., Trojan J., Tabak F., So T.M., Feinman S.V., Mach T., Akarca U.S., Schutten M., Tielemans W., van Vuuren A.J., Hansen B.E., Janssen H.L. Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. // *Gastroenterology*. – 2008. – V. 135. – P. 459-467.
- Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., Zuckerman A.J., Thomas H.C. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. // *The Lancet*. – 1990. – V. 336. – N. 8711. – P. 325-329.
- Carman W.F., Trautwein C., van Deursen F.J., Colman K., Dornan E., McIntyre G., Waters J., Kliem V., Müller R, Thomas H.C., Manns M.P. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. // *Hepatology*. – 1996. – N. 3. – P. 489-493.

- Castro-Nallar E., Pérez-Losada M., Burton G.F., Crandall K.A. The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2012. – V. 62. – N. 2. – P. 777-792.
- Cavinta L., Sun J., May A., Yin J., von Meltzer M., Radtke M., Barzaga N.G., Cao G., Schaefer S. A new isolate of hepatitis B virus from the Philippines possibly representing a new subgenotype C6. // *Journal of Medical Virology*. – 2009. – V. 81. – P. 983–987.
- Chau K.H., Hargie M.P., Decker R.H., Mushahwar I.K., Overby L.R. Serodiagnosis of recent hepatitis B infection by IgM class anti-HBc. // *Hepatology*. – 1983. – V. 3. – N. 2. – P. 142-149.
- Chen J.D., Liu C.J., Lee P.H., Chen P.J., Lai M.Y., Kao J.H., Chen D.S. Hepatitis B genotypes correlate with tumor recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2004. – V. 2. – N. 1. – P. 64-71.
- Chen R.Y., Bowden S., Desmond P.V., Dean J., Locarnini S.A. Effects of interferon alpha therapy on the catalytic domains of the polymerase gene and basal core promoter, precore and core regions of hepatitis B virus. // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2003. – V. 18. – P. 630-637.
- Chung D.C., Ko Y.C., Chen C.J., Wu C.C., Chen E.R., Liaw Y.F., Hwang S.J. Seroepidemiological studies on hepatitis B and D viruses infection among five ethnic groups in southern Taiwan. // *Journal of Medical Virology*. – 1988. – V. 26. – N. 4. – P. 411-418.
- Cooreman M.P., Leroux-Roels G., Paulij W.P. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. // *Journal of Biomedical Science*. – 2001. – V. 8. – N. 3. – P. 237-247.
- Courouce A.M., Lee H., Drouet J., Canavaggio M., Soulier J.P. Distribution of HBsAg subtypes in the world. // *Vox Sanguinis*. – 1983. – V. 44. – P. 197-211.
- Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. // *The Lancet*. – 1970. – V. 295 (1). – N. 7657. – P. 695-698.
- Davidson M., Krugman S. Recombinant yeast hepatitis B vaccine compared with plasma-derived vaccine: immunogenicity and effect of a booster dose. // *Journal of Infection*. – 1986. – V. 13. – Supplement A. – P. 31-38.
- De Clercq E. Perspectives for the Treatment of Hepatitis B Virus Infections. // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 1999. – V. 12. – N. 2. – P. 81-97.
- Desmyter J., De Groote J., Desmet V.J., Billiau A., Ray M.B., Bradburne A.F., Edy V.G., De Somer P. Administration of human fibroblast interferon in chronic hepatitis-B infection. // *The Lancet*. – 1976. – V. 2. – N. 7987. – P. 645-647.
- Dienstag J.L., Perrillo R.P., Schiff E.R., Bartholomew M., Vicary C., Rubin M. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. // *The New England Journal of Medicine*. – 1995. – V. 333. – N. 25. – P. 1657-1661.
- Ding X., Gu H., Zhong Z.H., Zilong X., Tran H.T., Iwaki Y., Li T.C., Sata T., Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. // *Japanese Journal of Infectious Diseases* – 2003. – V. 56. – N. 1. – P. 19-22.
- Dobrodeeva L.K., Kornienko E.B., Petrenya N.N., Lutfaliev G.T., Schegoleva L.S., Demeneva L.V., Duberman B.L., Tkachev A.V., Chiba H., Senoo H., Ito K., Mizoguchi E., Yoshida S., Tajima K. An unique seroepidemiological pattern of HBV, HCV and HTLV-I in Nenets and Komi in northwestern Russia. // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2005. – V. 6. – N. 3. – P. 342-345.
- Doong S.L., Tsai C.H., Schinazi R.F., Liotta D.C., Cheng Y.C. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1991. – V. 88. – N. 19. – P. 8495-8499.

- Edman J.C., Hallewell R.A., Valenzuela P., Goodman H.M., Rutter W.J. Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*. // *Nature*. – 1981. – V. 291. – N. 5815. – P. 503-506.
- Echevarria J.M., Avellón A., Magnius L.O. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. // *Journal of Medical Virology*. – 2005. V. 76. – N. 2. – P. 176-184.
- Erhardt A., Blondin D., Hauck K., Sagir A., Kohnle T., Heintges T., Häussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. // *Gut*. – 2005. V. 54. – P. 1009-1013.
- Fagan E.A., Williams R. Fulminant viral hepatitis. // *British Medical Bulletin*. – 1990. – V. 46. – N. 2. – P. 462-480.
- Fares A.M., Holmes E.C. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). // *Journal of Molecular Evolution*. – 2002. – V. 54. – P. 807-814.
- Felstenstein J. PHYLIP: Phylogeni inference package; version 3.52c. – Seatle, WA, University of Washington. – 1993. – 72 p.
- Feng G., Yue L., White A.T., Pappas P.G., Barchue J., Greene B.M., Sharp P.M., Shaw G.M., Hahn B.H. Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in West Africa. // *Nature*. – 1992. – V. 358. – P. 495-499.
- Flodgren E., Bengtsson S., Knutsson M., Strebkova E.A., Kidd A.H., Alexeyev O.A., Kidd-Ljunggren K. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2000. – V. 38. – N. 1. – P. 3311-3316.
- Francis D.P., Hadler S.C., Thompson S.E., Maynard J.E., Ostrow D.G., Altman N., Braff E.H., O'Malley P., Hawkins D., Judson F.N., Penley K., Nylund T., Christie G., Meyers F., Moore J.N. Jr, Gardner A., Doto I.L., Miller J.H., Reynolds G.H., Murphy B.L., Schable C.A., Clark B.T., Curran J.W., Redeker A.G. The prevention of hepatitis B with vaccine. Report of the centers for disease control multi-center efficacy trial among homosexual men. // *Annals of Internal Medicine*. – 1982. – V. 97. – N. 3. – P. 362-366.
- Fritsch A., Pourcel C., Charnay P., Tiollais P. Cloning of the hepatitis B virus genome in *Escherichia coli*. // *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. D: Sciences Naturelles*. – 1978. – V. 287. – N. 16. – P. 1453-1456.
- Fujii H., Moriyama K., Sakamoto N., Kondo T., Yasuda K., Hiraizumi Y., Yamazaki M., Sakaki Y., Okochi K., Nakajima E. Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1992. – V. 184. – N. 3. – P. 1152-1157.
- Furusyo N., Hayashi J., Sawayama Y., Kawakami Y., Kishihara Y., Kashiwagi S. The elimination of hepatitis B virus infection: changing seroepidemiology of hepatitis A and B virus infection in Okinawa, Japan over a 26-year period. // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* – 1988. – V. 59. – N. 5. – P. 693-698.
- Furusyo N., Nakashima H., Kashiwagi K., Kubo N., Hayashida K., Usuda S., Mishiro S., Kashiwagi S., Hayashi J. Clinical outcomes of hepatitis B virus (HBV) genotypes B and C in Japanese patients with chronic HBV infection. // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* – 2002. – V. 61. – N. 2. – P. 151-157.
- Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., Tiollais P., Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. // *Nature*. – 1979. – V. 281. – N. 5733. – P. 646-650.
- Gandhe S.S., Chadha M.S., Arankalle V.A. Hepatitis B virus genotypes and serotypes in western India: lack of clinical significance. // *Journal of Medical Virology*. – 2003. – V. 69. – N. 3. – P. 324-330.

- Ganem D., Varmus H.E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. // *Annual Review of Biochemistry*. – 1987. – V. 56. – P. 651-693.
- Ganem D., Schneider R.J. Hepadnaviridae and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Martin M.A., Lamb R.A., Roizman B. *Fields Virology*. Vol. 4. – Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers – 2001 – 3046 p.
- Gao F., Bailes E., Robertson D.L., Chen Y., Rodenburg C.M., Michael S.F., Cummins L.B., Arthur L.O., Peeters M., Shaw G.M., Sharp P.M., Hahn B.H. Origins of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. // *Nature*. – 1999. – V. 397. – P. 436-441.
- Ge X.M., Li D.Y., Fang Z.L., Huang G.Y., Jiang S.Q., Pan H.D., Du Y., Wang C.Y., Ding X., Masashi M. Distribution of hepatitis B virus genotypes and its clinical significance in Guangxi. // *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. – 2003. V. 17. – N. 2. – P. 169-173.
- Gerlich W., Thomssen R. Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume. // *Developments in biological standardization*. – 1975. – V. 30. – P. 78-87.
- Gerlich W., Robinson W.S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' end of its complete strand. // *Cell*. – 1980. – V. 21. – P. 801-811.
- Goldstein S.T., Alter M.J., Williams I.T., Moyer L.A., Judson F.N., Mottram K., Fleenor M., Ryder P.L., Margolis H.S. Incidence and risk factors for acute hepatitis B in the United States, 1982-1998: implications for vaccination programs. // *Journal of Infectious Diseases*. – 2002. – V. 185. – N. 6. – P. 713-719.
- Greenberg H.B., Pollard R.B., Lutwick L.I., Gregory P.B., Robinson W.S., Merigan T.C. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. // *The New England Journal of Medicine*. – 1976. – V. 295. – N. 10. – P. 517-522.
- Gust I. The epidemiology of viral hepatitis. In: *Viral hepatitis and liver disease*. Edited by G. N. Vyas. – Orlando, FL: Gruneand Stratton. – 1984. – P. 415-421.
- Hakami A. Ali A., Hakami A. Effects of Hepatitis B virus mutations on its replication and liver disease severity // *The Open Virology Journal*. – 2013. – N. 7. – P. 12-18
- Hannoun C., Horal P., Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. // *Journal of General Virology*. – 2000a. – V. 81. – P. 75-83.
- Hannoun C., Norder H., Lindh M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. // *Journal of General Virology*. – 2000b. – V. 81. – P. 2267-2272.
- Hannoun C., Soderstrom A., Norkrans G., Lindh M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. // *Journal of General Virology*. – 2005. – V. 86. – Pt. 8. – P. 2163-2167.
- Heermann K.H., Goldmann U., Schwartz W., Seyffarth T., Baumgarten H., Gerlich W.H. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. // *Journal of Virology*. – 1984. – V. 52. – P. 396-402.
- Hollinger F.B.; Liang T.J. Hepatitis B virus. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Martin M.A., Lamb R.A., Roizman B. *Fields Virology*. Vol. 4. – Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers – 2001 – 3046 p.
- Hoofnagle J.H., Di Bisceglie A.M. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. // *Seminars in Liver Disease*. – 1991. – V. 11. – N. 2. – P. 73-83.
- Hsieh T.H., Tseng T.C., Liu C.J., Lai M.Y., Chen P.J., Hsieh H.L., Chen D.S., Kao J.H. Hepatitis B virus genotype B has an earlier emergence of lamivudine resistance than genotype C. // *Antiviral Therapy*. – 2009. – V. 14. – P. 1157-1163.

- Hu, X., Margolis H.S., Purcell R.H., Ebert J., Robertson B.H. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* – 2000. – V. 97. – P. 1661-1664.
- Huy T.T., Ushijima H., Quang V.X., Win K.M., Luengrojanakul P., Kikuchi K., Sata T., Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. // *Journal of General Virology*. – 2004. – V. 85. – P. 283–292.
- Huy T.T., Ushijima H., Sata T., Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant. // *Archives of Virology*. – 2006. – V. 151. – N. 3. – P. 589-597.
- Hyams K.C. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. // *Clinical Infectious Diseases*. – 1995. – V. 20. – N. 4. – P. 992-1000.
- Jilg W., Hottentrager B., Weinberger K., Schlottmann K., Frick E., Holstege A., Scholmerich J., Palitzsch K.D. Prevalence of markers of hepatitis B in the adult German population. // *Journal of Medical Virology*. – 2001. – V. 63. – N. 2. – P. 96-102.
- Liang J. Hepatitis B: The Virus and Disease. // *Hepatology*. – 2009. – V. 49. – N. 5. – P. 13–21.
- Kaneko S., Unoura M., Kobayashi K. Detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction assay. // *Rinsho Byori*. – 1990. – V. 38. – N. 9. – P. 1036-1040.
- Kao J.H., Wu N.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. // *Journal of Hepatology*. – 2000. – V. 33. – P. 998-1002.
- Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002a. – V. 40. – N. 1. – P. 22-25.
- Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002b. – V. 40. – N. 4. – P. 1207-1209.
- Kao J.H., Chen P.J., Chen D.S. Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects. // *Advances in Cancer Research*. – 2010. – V. 108. – P. 21-72.
- Kao J.H. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. // *The Korean Journal of Internal Medicine*. – 2011. – V. 26. – P. 255-261.
- Kato H., Ruzibakiev R., Yuldasheva N., Hegay T., Kurbanov F., Achundjanov B., Tuichiev L., Usuda S., Ueda R., Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. // *Journal of Medical Virology*. – 2002. – V. 67. – N. 4. – P. 477-483.
- Khan A., Kurbanov F., Tanaka Y., Elkady A., Sugiyama M., Dustov A., Mizokami M. Epidemiological and clinical evaluation of hepatitis B, hepatitis C, and delta hepatitis viruses in Tajikistan. // *Journal of Medical Virology*. – 2008. – V. 80. – N. 2. – P. 268-276.
- Kidd-Ljunggren K., Oberg M., Kidd A.H. The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. // *Journal of General Virology*. – 1995. – V. 76. – P. 2119-2130.
- Kidd-Ljunggren K., Miyakawa Y., Kidd A. Genetic variability in hepatitis B viruses. // *Journal of General Virology*. – 2002. – V. 83. – P. 1267-1280.
- Kimbi G.C., Kramvis A., Kew M.C. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. // *Journal of General Virology*. – 2004. – V. 85. – P. 1211-1220.

- Kobayashi M., Arase Y., Ikeda K., Tsubota A., Suzuki Y., Saitoh S., Kobayashi M., Suzuki F., Akuta N., Someya T., Matsuda M., Sato J., Kumada H. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. // *Journal of Gastroenterology*. – 2002. – V.37. – N. 1. – P. 35-39.
- Koibuchi T., Hitani A., Nakamura T., Nojiri N., Nakajima K., Jyuji T., Iwamoto A. Predominance of genotype A HBV in an HBV HIV-1 dually positive population compared with an HIV-1-negative counterpart in Japan. // *Journal of Medical Virology*. – 2001. – V. 64. – P. 435-440.
- Kramvis A., Weitzmann L., Owiredu W.K., Kew M.C. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. // *Journal of General Virology*. – 2002. – V. 83. – P. 835-839.
- Kramvis A., Kew M.C. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. // *Journal of Viral Hepatology*. – 2005. – V. 12. – P. 456–464
- Kramvis A., Arakawa K., Yu M.C., Nogueira R., Stram D.O., Kew M.C. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. // *Journal of Medical Virology*. – 2008. – V. 80. – N. 1. –P. 27-46.
- Kreutz C. Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2002. – V. 6. – N. 1. – P. 113-143.
- Kumagai I., Abe K., Oikawa T., Sato A., Sato S., Endo R., Takikawa Y., Suzuki K., Masuda T., Sainokami S. A male patient with severe acute hepatitis who was domestically infected with a genotype H hepatitis B virus in Iwate, Japan. // *Journal of Gastroenterology*. – 2007. – V. 42. – P. 168–175.
- Kurbanov F., Tanaka Y., Fujiwara K., Sugauchi F., Mbanya D., Zekeng L., Ndembi N., Ngansop C., Kaptue L., Miura T., Ido E., Hayami M., Ichimura H., Mizokami M. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. // *Journal of General Virology*. – 2005. – V. 86. – N. 7. – P. 2047-2056.
- Kurbanov F., Tanaka Y., Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. // *Hepatology Research*. – 2010. – V. 40. – P. 14-30.
- Kwon S.Y., Lee C.H. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. // *The Korean Journal of Hepatology*. – 2011. – V. 17. – P. 87-95
- Le Bouvier G.L. The heterogeneity of Australia antigen. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1971. – V. 123. – P. 671-675.
- Leupin O., Bontron S., Schaeffer C., Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death // *Journal of Virology*. – 2005. – V. 79. – N. 7. – P. 4238-4245.
- Liaw Y.F., Lau G.K., Kao J.H., Gane E. Hepatitis B e antigen seroconversion: a critical event in chronic hepatitis B virus infection // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2010. – V. 55. – P. 2727-34.
- Lin C.L., Chen J.D., Liu C.J., Lee P.H., Chen P.J., Lai M.Y., Kao J.H., Chen D.S. Clinicopathological differences between hepatitis B viral genotype B- and C-related resectable hepatocellular carcinoma. // *Journal of Viral Hepatitis*. – 2007. – V. 14. – N. 1. – P. 64-69.
- Lin C.L., Kao J.H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2011. – V. 26. – Sup. 1. – P. 123-130.
- Lindh M., Horal P., Norkrans G. Acute hepatitis B in Western Sweden--genotypes and transmission routes. // *Infection*. – 2000. – V. 28. – N. 3. – P. 161-163.

- Liu C.J., Jeng Y.M., Chen C.L., Cheng H.R., Chen P.J., Chen T.C., Liu C.H., Lai M.Y., Chen D.S., Kao J.H. Hepatitis B virus basal core promoter mutation and DNA load correlate with expression of hepatitis B core antigen in patients with chronic hepatitis B. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2009. – V. 199. – P. 742-749.
- Livingston S.E., Simonetti J.P., McMahon B.J., Bulkow L.R., Hurlburt K.J., Homan C.E., Snowball M.M., Cagle H.H., Williams J.L., Chulanov V.P. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – V. 195. – N. 1. – P. 5-11.
- Lok A., Akarca U., Greene S. Mutations in the pre-core region of the hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1991. – V. 91. – P. 4087-4091.
- Lok A.S., McMahon B.J. Chronic hepatitis B. // *Hepatology*. – 2007. – V. 45. – P. 507-539.
- Lusida M.I., Nugrahaputra V.E., Soetjipto, Handajani R., Nagano-Fujii M., Sasayama M., Utsumi T., Hotta H. Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2008. – V. 46. – N. 7. – P. 2160-2166.
- MacCallum F.I., Bauer D.J. Homologous serum jaundice: transmission experiments with human volunteers. // *The Lancet*. – 1944. – V. 243 (1). – N. 6298. – P. 622-627.
- MacDonald D.M., Holmes E.C., Lewis J.C., Simmonds P. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. // *Journal of Virology*. – 2000. – V. 74. – P. 4253-4257.
- Madalinski K., Holland P.V., Moraczewska Z., Kalinowska A., Altre H.J. Subtypes of HBsAg in eastern and south-eastern Europe. // *Vox Sanguinis*. – 1977. V. 32. – N. 4. – P. 224-229.
- Magnius L.O., Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. // *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*. – 1972. – V. 80. – N. 2. – P. 335-337.
- Magnius L.O., Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. // *Intervirology*. – 1995. – V. 38. – P. 24-34.
- Marcellin P., Heathcote E.J., Buti M., Gane E., de Man R.A., Krastev Z., Germanidis G., Lee S.S., Flisiak R., Kaita K., Manns M., Kotzev I., Tchernev K., Buggisch P., Weilert F., Kurdas O.O., Shiffman M.L., Trinh H., Washington M.K., Sorbel J., Anderson J., Snow-Lampart A., Mondou E., Quinn J., Rousseau F. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. // *The New England Journal of Medicine*. – 2008. – V. 359. – P. 2442-2455.
- Marcellin P., Bonino F., Lau G.K., Farci P., Yurdaydin C., Piratvisuth T., Jin R., Gurel S., Lu Z.M., Wu J., Popescu M., Hadziyannis S. Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. // *Gastroenterology*. – 2009. – V. 136. – P. 2169-2179.
- Margolis H.S., Alter M.J., Hadler S.C. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. // *Seminars in Liver Disease*. – 1991. – V. 11. – P. 84-92.
- Mast E.E., Alter M.J. Epidemiology of viral hepatitis: an overview. // *Seminars in Virology*. – 1993. – V. 4. – P. 273-283.
- Mbayed V.A., Lopez J.L., Telenta P.F., Palacios G., Badia I., Ferro A., Galoppo C., Campos R. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1998. – V. 36. – P. 3362-3365.
- McLean A.A., Hilleman M.R., McAleer W.J., Buynak E.B. Summary of world wide experience with HB-Vax. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1983. – V. 7 (Sup). – P. 95-104.

- McMahon B.J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. // *Hepatology International*. – 2009;. – V. 3. – P. 334-342.
- Meldal B.H., Moula N.M., Barnes I.H., Boukef K., Allain J.P. A new hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. // *Journal of General Virology*. – 2009. – V. 90. – P. 1622-1628.
- Merican I., Guan R., Amarapuka D. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2000. – V.15. – N. 12. – P. 1356-1361.
- Milich D., Liang T.J. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. // *Hepatology*. – 2003. – V. 38. – P. 1075–1086.
- Morales-Romero J., Vargas G., García-Román R. Occult HBV infection: a faceless enemy in liver cancer development. // *Viruses*. – 2014. – V. 6. – N. 4. – P. 1590-1611.
- Moriya T., Kuramoto I.K., Yoshizawa H., Holland P.V. Distribution of hepatitis B virus genotypes among American blood donors determined with a PreS2 epitope enzyme-linked immunosorbent assay kit. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – V. 40. – N. 3 – P. 877-880.
- Mulyanto, Depamede S.N., Surayah K., Tsuda F., Ichiyama K., Takahashi M., Okamoto H. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. // *Archives of Virology*. – 2009. – V. 154. – N. 7. – P. 1047-1059.
- Mulyanto, Depamede S.N., Surayah K., Tjahyono A.A., Jirintai, Nagashima S., Takahashi M., Okamoto H. Identification and characterization of novel hepatitis B virus subgenotype C10 in Nusa Tenggara, Indonesia. // *Archives of Virology*. – 2010. – V. 155. – N. 5. – P. 705-715.
- Mulyanto, Depamede S.N., Wahyono A., Jirintai, Nagashima S., Takahashi M., Okamoto H. Analysis of the full-length genomes of novel hepatitis B virus subgenotypes C11 and C12 in Papua, Indonesia. // *Journal of Medical Virology*. – 2011. – V. 83. – N. 1. – P. 54-64.
- Mutimer D., Pillay D., Cook P., Ratcliffe D., O'Donnell K., Dowling D., Shaw J., Elias E., Cane P.A. Selection of multiresistant hepatitis B virus during sequential nucleoside-analogue therapy. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2000. – V. 181. – N. 2. – P.713-716.
- Nagasaki F., Niitsuma H., Cervantes J.G., Chiba M., Hong S., Ojima T., Ueno Y., Bondoc E., Kobayashi K., Ishii M., Shimosegawa T. Analysis of the entire nucleotide sequence of hepatitis B virus genotype B in the Philippines reveals a new subgenotype of genotype B. // *Journal of General Virology*. – 2006. – V. 87. – N. 5. – P. 1175-1180.
- Nassal M. Hepatitis B virus replication: Novel roles for virus-host interactions. // *Intervirology*. – 1999. – V. 42. – P. 100-116.
- Naumann H., Schaefer S., Yoshida C.F., Gaspar A.M., Repp R., Gerlich W.H. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. // *Journal of General Virology*. – 1993. – V. 74. – P. 1627-1632.
- Nelson P., Mathers B., Cowie B., Hagan H., Jarlais D., Horyniak D., Degenhardt L. The epidemiology of viral hepatitis among people who inject drugs: Results of global systematic reviews. // *The Lancet*. – 2011. – V. 378. – N. 9791. – P. 571–583.
- Netesova I.G., Swenson P.D., Osipova L.P., Gubina M.A., Posukh O.L., Netesov S.V. Determination of HbsAg subtypes in Western Siberian part of Russia. // *Journal of Medical Virology*. – 2003. – V. 71. – P. 183-187.
- Norder H., Hammas B., Magnius L.O. Typing of hepatitis B virus genomes by simplified polymerase chain reaction. // *Journal of Medical Virology*. – 1990. – V. 31. – P. 215-221.
- Norder H., Hammas B., Losfdahl S., Courouce A.M., Magnius L.O. 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. // *Journal of General Virology*. – 1992a. – V. 73. – N. 5. – P. 1201-1208.

- Norder H., Courouce A.M., Magnius L.O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. // *Journal of General Virology*. – 1992b. – V. 73. – N. 12. – P. 3141-3145.
- Norder H., Hammas B., Lee S.D., Bile K., Courouce A.M., Mushahwar I.K., Magnius L. O. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. // *Journal of General Virology*. – 1993. – V. 74. – N. 7. – P. 1341-1348.
- Norder H., Courouce A.M., Magnius L.O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. // *Virology*. – 1994. – V. 198. – P. 489-503.
- Norder H., Arauz-Ruiz P., Blitz L., Pujol F.H., Echevarria J.M., Magnius L.O. The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. // *Journal of General Virology*. – 2003. – V. 84. – N. 8. – P. 2083-2087.
- Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnius L.O. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. // *Intervirology*. – 2004. – V. 47. – N. 6. – P. 289-309.
- Nurainy N., Muljono D.H., Sudoyo H., Marzuki S. Genetic study of hepatitis B virus in Indonesia reveals a new subgenotype of genotype B in east Nusa Tenggara. // *Archives of Virology*. – 2008. – V. 153. – N. 6. – P. 1057-1065.
- Odemuyiwa S.O., Mulders M.N., Oyedele O.I., Ola S.O., Odaibo G.N., Olaleye D.O., Muller C.P. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. // *Journal of Medical Virology*. – 2001. – V. 65. – N. 3. – P. 463-469.
- Ogata N., Miller R.H., Ishak K.G., Purcell R.H. The complete nucleotide sequence of a pre-core mutant of hepatitis B virus implicated in fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees. // *Virology*. – 1993. – V. 194. – P. 263-276.
- Ohba K., Mizokami M., Kato T., Ueda R., Gurtsevitch V., Senyuta N., Syrtsev A., Zoya K., Yamashita M., Hayami M. Seroprevalence of hepatitis B virus, hepatitis C virus and GB virus-C infection in Siberia. // *Epidemiology and Infection*. – 1999. – V. 122. – N. 1. – P. 139-143.
- Okamoto H., Imai M., Kametani M., Nakamura T., Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. // *The Japanese Journal of Experimental Medicine*. – 1987a. – V. 57. – P. 231-236.
- Okamoto H., Imai M., Tsuda F., Tanaka T., Miyakawa Y., Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. // *Journal of Virology*. – 1987b. – V. 61. – P. 3030-3034.
- Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. // *Journal of General Virology*. – 1988. – V. 69. – P. 2575-2583.
- Okamoto H., Omi S., Wang Y., Itoh Y., Tsuda F., Tanaka T., Akahane Y., Miyakawa Y., Mayumi M. The loss of subtypic determinants in alleles, d/y or w/r, on hepatitis B surface antigen. // *Molecular Immunology*. – 1989. – V. 26. – P. 197-205.
- Olinger C.M., Venard V., Njayou M., Oyefolu A.O., Maiga I., Kemp A.J., Omilabu S.A., le Faou A., Muller C.P. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. // *Journal of General Virology*. – 2006. – V. 87. – P. 1163-1173.

- Olinger C.M., Lazouskaya N.V., Eremin V.F., Muller C.P. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences. // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2008. – V. 14. – N. 6. – P. 575-581.
- Orito E., Mizokami M., Ina Y., Moriyama E.N., Kameshima N., Yamamoto M., Gojobori T. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1989. – V. 86. – P. 7059-7062.
- Osiowy C., Giles E., Tanaka Y., Mizokami M., Minuk G.Y. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. // *Journal of Virology*. – 2006. – V. 80. – N. 21. – P. 10307-10314.
- Ott J.J., Stevens G.A., Groeger J., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. // *Vaccine*. – 2012. – V. 30. – N. 12. – P. 2212-2219.
- Ou J.H., Laub O., Rutter W.J. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1986. – V. 83. – P. 1578-1582.
- Paraskevis D., Magiorkinis G., Magiorkinis E., Ho S.Y., Belshaw R., Allain J.P., Hatzakis A. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. // *Hepatology*. – 2013. – V. 57. – N. 3. – P. 908-16.
- Phung T.B., Alestig E., Nguyen T.L., Hannoun C., Lindh M. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam: genotypes B4 and C1 predominate. // *Journal of Medical Virology*. – 2010. – V. 82. – P. 1327-1333.
- Qadri I., Fatima K., Abdel-Hafiz H. Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor, TFIIH. // *BMC Microbiology*. – 2011. – V. 11. – N. 3. – P. 48-64.
- Ray Kim W. Epidemiology of Hepatitis B in the United States. // *Hepatology*. – 2009. – V. 49. – N. 5. – P. 28-34.
- Robertson B.H., Margolis H.S. Primate hepatitis B viruses – genetic diversity, geography and evolution. // *Reviews in Medical Virology*. – 2002. – V. 12. – N. 3. – P. 133-41.
- Rossi C., Shrier I., Marshall L., Cnossen S., Schwartzman K., Klein M.B., Schwarzer G., Greenaway C. Seroprevalence of chronic hepatitis B virus infection and prior immunity in immigrants and refugees: A systematic review and meta-analysis. // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – N. 9. – P. e44611.
- Ruzibakiev R., Kato H., Ueda R., Yuldasheva N., Hegay T., Avazova D., Kurbanov F., Zalaliev M., Tuichiev L., Achundjanov B., Mizokami M. Risk factors and seroprevalence of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus infection in Uzbekistan. // *Intervirology*. – 2001. – V. 44. – N. 6. – P. 327-332.
- Sakamoto T., Tanaka Y., Orito E., Co J., Clavio J., Sugauchi F., Ito K., Ozasa A., Quino A., Ueda R., Sollano J., Mizokami M. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. // *Journal of General Virology*. – 2006. – V. 87. – P. 1873-1882.
- Sakamoto T., Tanaka Y., Simonetti J., Osiowy C., Borresen M.L., Koch A., Kurbanov F., Sugiyama M., Minuk G.Y., McMahon B.J., Joh T., Mizokami M. Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – V. 196. – N. 10. – P. 1487-1492.
- Sanchez L.V., Maldonado M., Bastidas-Ramirez B.E., Norder H., Panduro A. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. // *Journal of Medical Virology*. – 2002. – V. 68. – N. 1. – P. 24-32.

- Sanchez-Tapias J.M., Costa J., Mas A., Bruguera M., Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. // *Gastroenterology*. – 2002. – V. 123. – P. 1848-1856.
- Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., Ashfaq U.A., Asad S., Gull S., Shahid I., Hassan S. NS4A protein as a marker of HCV history suggests that different HCV genotypes originally evolved from genotype 1b. // *Virology Journal*. – 2011. – V. 23. – N. 8. – P. 317-324.
- Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. // *Journal of Viral Hepatology*. – 2005. – V. 12. – N. 2. – P. 111-124.
- Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2007. – V. 13. – N. 1. – P. 14-21.
- Schaefer S., Magnius L., Norder H. Under construction: classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. // *Intervirology*. – 2009. – V. 52. – N. 6. – P. 323-325.
- Shapiro CN. Epidemiology of hepatitis B. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 1993. – V. 12. – N. 5. – P. 433-437.
- Shih J.W., Cheung L.C., Alter H.J., Lee L.M., Gu J.R. Strain analysis of hepatitis B virus on the basis of restriction endonuclease analysis of polymerase chain reaction products. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1991. – V. 29 – P. 1640-1644.
- Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. // *Journal of General Virology*. – 2001. – V. 82. – P. 693-712.
- Simmonds P., Midgley S: Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. // *Journal of Virology*. – 2005. – V. 79. – P. 15467–15476.
- Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi R.F., Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. // *Journal of General Virology*. – 2000. – V. 81. – P. 67-74.
- Sugauchi F., Orito E., Kato H., Suzuki S., Kawakita S., Sakamoto Y., Fukushima K., Akiba T., Yoshihara N., Ueda R., Mizokami M. Genotype, serotype, and phylogenetic characterization of the complete genome sequence of hepatitis B virus isolates from Malawian chronic carriers of the virus. // *Journal of Medical Virology*. – 2003. – V. 69. – N. 1. – P. 33-40.
- Sugauchi F., Kumada H., Acharya S.A., Shrestha S.M., Gamutan M.T., Khan M., Gish R.G., Tanaka Y., Kato T., Orito E., Ueda R., Miyakawa Y., Mizokami M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. // *Journal of General Virology*. – 2004a. – V. 85. – N. 4. – P. 811-820.
- Sugauchi F., Kumada H., Sakugawa H., Komatsu M., Niitsuma H., Watanabe H., Akahane Y., Tokita H., Kato T., Tanaka Y., Orito E., Ueda R., Miyakawa Y., Mizokami M: Two subtypes of genotype B (Ba and Bj) of hepatitis B virus in Japan. // *Clinical Infectious Diseases*. // 2004b. – V. 38. – P. 1222–1228.
- Sugiyama M., Tanaka Y., Kato T., Orito E., Ito K., Acharya S.K., Gish R.G., Kramvis A., Shimada T., Izumi N., Kaito M., Miyakawa Y., Mizokami M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. // *Hepatology*. – 2006. – V. 44. – P. 915-924.
- Sung J.L., Chen D.S. Geographical distribution of the subtype of hepatitis B surface antigen in Chinese. // *Gastroenterologia Japonica*. – 1977. – V. 12. – N. 2. – P. 58-63.
- Suzuki F., Tsubota A., Arase Y., Suzuki Y., Akuta N., Hosaka T., Someya T., Kobayashi M., Saitoh S., Ikeda K., Matsuda M., Satoh J., Takagi K., Kumada H. Efficacy of Lamivudine therapy

- and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. // *Intervirology*. – 2003. – V. 46. – N. 3. – P. 182-189.
- Swenson P.D., Riess J.T., Kruger L.E. Determination of HBsAg subtypes in different high-risk populations using monoclonal antibodies. // *Journal of Virology Methods*. – 1991. – V. 33. – P. 27-38.
- Swenson P.D., Van Geyt C., Alexander E.R., Hagan H., Freitag-Koontz J.M., Wilson S., Norder H., Magnus L.O., Stuyver L. Hepatitis B virus genotypes and HBsAg subtypes in refugees and injection drug users in the United States determined by LiPA and monoclonal EIA. // *Journal of Medical Virology*. – 2001. – V. 64. – N. 3. – P. 305-311.
- Tan Y., Ding K., Su J., Trinh X., Peng Z. The naturally occurring YMDD mutation among patients chronically infected HBV and untreated with lamivudine: A systematic review and meta-analysis. // *PLoS ONE*. – 2012. V. 7. – N. 3. – P. e32789.
- Takahashi K., Brotman B., Usuda S., Mishiro S., Prince A.M. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild : implications for an origin of HBV. // *Virology*. – 2000. – V. 267. – P. 58-64.
- Tallo T., Norder H., Tefanova V., Krispin T., Priimägi L., Mukomolov S., Mikhailov M., Magnus L.O. Hepatitis B virus genotype D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4. // *Journal of Medical Virology*. – 2004. – V. 74. – N. 2. – P. 221-227.
- Tallo T., Tefanova V., Priimagi L., Schmidt J., Katargina O., Michailov M., Mukomolov S., Magnus L., Norder H. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. // *Journal of General Virology*. – 2008. – V. 89. – P. 1829-1839.
- Tanaka Y., Mizokami M. Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – V. 195. – N. 1. – P. 1-4.
- Tangkijvanich P., Sa-Nguanmoo P., Avihingsanon A., Ruxrungtham K., Poovorawan K., Poovorawan Y.. Characterization of hepatitis B virus mutations in untreated patients co-infected with HIV and HBV based on complete genome sequencing. // *Journal of Medical Virology*. – 2013. – V. 85. – N. 1. – P. 16-25.
- Tatematsu K., Tanaka Y., Kurbanov F., Sugauchi F., Mano S., Maeshiro T., Nakayoshi T., Wakuta M., Miyakawa Y., Mizokami M. 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. // *Journal of Virology*. – 2009. – V. 83. – N. 20. – P. 10538-10547.
- Thai H., Campo D.S., Lara J., Dimitrova Z., Ramachandran S., Xia G., Ganova-Raeva L., Teo C.G., Lok A., Khudyakov Y. Convergence and coevolution of hepatitis B virus drug resistance. // *Nature Communications*. – 2012. – V. 17. –N. 3. – P. 789.
- Theamboonlers A., Tangkijvanich P., Pramoolsinsap C., Poovorawan Y. Genotypes and subtypes of hepatitis B virus in Thailand. // *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. – 1998. – V. 29. – N. 4. – P. 786-791.
- Thomas H.C., Jacyna M.R. Hepatitis B virus: pathogenesis and treatment of chronic infection. // In: *Viral Hepatitis*. Edited by A.J. Zuckerman and H.C. Thomas. – Edinburgh: Churchill Livingstone. – 1993. – P. 185–207.
- Tipples G.A., Ma M.M., Fischer K.P., Bain V.G., Kneteman N.M., Tyrrell D.L. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. // *Hepatology*. – 1996. – V. 24. – N. 3. – P.:714-717.
- Tran T.T., Trinh T.N., Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. // *Journal of Virology*. – 2008. – V. 82. – P. 5657–5663.

- Ukkonen P. Subtypes of HBsAg among hepatitis patients. // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. – 1978. – V. 10. – N. 1. – P. 11-14.
- Utsumi T., Lusida M.I., Yano Y., Nugrahaputra V.E., Amin M., Juniastuti, Soetjipto, Hayashi Y., Hotta H. Complete genome sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates in Papua, Indonesia. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – V. 47. – P. 1842–1847.
- Valenzuela P., Gray P., Quiroga M., Zaldivar J., Goodman H.M., Rutter W.J. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. // *Nature*. – 1979. – V. 30. – N. 5725. – P. 815-819.
- Valenzuela P., Quiroga M., Zalvidar J., Gray P., Rutter W.J. The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. // In: *Animal Virus Genetics*. Edited by B.N. Fields, R. Jaenisch and C.F. Fox. – New York: Academic Press. – 1980. P. 57-70.
- Valenzuela P., Medina A., Rutter W.J., Ammerer G., Hall B.D. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. // *Nature*. – 1982. – V. 298. – N. 5872. – P. 347-50.
- van de Klundert M.A., Cremer J., Kootstra N.A., Boot H.J., Zaaijer H.L. Comparison of the hepatitis B virus core, surface and polymerase gene substitution rates in chronically infected patients. // *Journal of Viral Hepatology*. – 2012. – V. 19. – N. 2. – P. 34-40.
- van Steenberg J.E., Niesters H.G., Op de Coul E.L., van Doornum G.J., Osterhaus A.D., Leentvaar-Kuijpers A., Coutinho R.A., van den Hoek J.A. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Amsterdam 1992-1997. // *Journal of Medical Virology*. – 2002. – V. 66. – N. 2. – P. 159-165.
- Wiegand J., Hasenclever D., Tillmann H.L. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. // *Antiviral Therapy*. – 2008. – V. 13. – P. 211-220.
- Yamada N., Shigefuku R., Sugiyama R., Kobayashi M., Ikeda H., Takahashi H., Okuse C., Suzuki M., Itoh F., Yotsuyanagi H., Yasuda K., Moriya K., Koike K., Wakita T., Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – V. 20. – N. 11. – P. 3044-3049.
- Yang H.I., Yeh S.H., Chen P.J., Iloeje U.H., Jen C.L., Su J., Wang L.Y., Lu S.N., You S.L., Chen D.S., Liaw Y.F., Chen C.J. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2008. – V. 100. – P. 1134-1143
- Yang J., Chen X., Zhang H., Chen G. HBV genotype C strains with spontaneous YMDD mutations may be a risk factor for hepatocellular carcinoma. // *Journal of Medical Virology*. – 2014. – V. 86. – N. 6. – P. 913-917.
- Yousif M., Bell T.G., Mudawi H., Glebe D., Kramvis A. Analysis of ultra-deep pyrosequencing and cloning based sequencing of the basic core promoter/precore/core region of hepatitis B virus using newly developed bioinformatics tools. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – N. 4. – P. e95377.
- Zhao S.M., Li H.C., Lou H., Lu X.X., Yu X.F., Gao D.H., Hu J., Chiba H., Takezaki T., Takeshita H., Yashiki S., Fujiyoshi T., Sonoda S., Tajima K. High Prevalence of HBV in Tibet, China. // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* – 2001. – V. 2. – N. 4. – P. 299-304.
- Zoulim F., Mimms L., Floreani M., Pichoud C., Chemin I., Kay A., Vitvitski L., Trepo C. New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1992. – V. 30. – N. 5. – P. 1111-1119.