



Ф. Н. КАРПЕНКО, В. Ф. ЕРЕМИН

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОГО У ДОНОРОВ КРОВИ

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

Цель исследования. Определить распространенность маркеров парентерального вирусного гепатита В у доноров крови и ее компонентов в Республике Беларусь.

Материал и методы. В исследование был включен 61 образец сыворотки/плазмы крови, собранных от доноров из всех регионов страны. Все образцы были исследованы методами ХЛИА/ИФА и ПЦР на наличие маркеров вируса гепатита В.

Результаты. Как показали проведенные исследования, из 61 секвенированного образца 58 (95,1 %) относились к генотипу D, 3 (4,9 %) — к A. Генотип D в 47 (81,1 %) случаях был представлен подгенотипом D2, в 5 (8,6 %) образцах был выявлен подгенотип D1, в 5 (8,6 %) — D3, в 1 (1,7 %) пробе выявили подгенотип D4; все образцы генотипа A относились к подгенотипу A2. Все последовательности ДНК подгенотипов D1 и D3 были отнесены к подтипу ayw2, D4 — к ayw3, большинство проб подгенотипа D2 были подтипа ayw3, по 1 образцу было отнесено к подтипу ayw2 и ayw4. Все последовательности ДНК подгенотипа A2 относились к подтипу adw2.

Заключение. Выявленные у доноров варианты вируса гепатита В при филогенетическом анализе находились в одном кластере с ранее описанными последовательностями из Беларуси, что указывает на то, что эпидемиологический процесс по гепатиту В в стране поддерживается за счет местных «домашних» вирусов.

Ключевые слова: доноры, сыворотка/плазма крови, ИХЛ/ИФА, ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ.

Objective. To determine the prevalence of markers of parenteral viral hepatitis B in donors of blood and its components in the Republic of Belarus.

Materials and methods. The study included 61 blood serum/plasma samples collected from donors from all regions of the country. All samples were examined by CLIA/ELISA and PCR for the presence of hepatitis B virus markers.

Results. As studies have shown, out of 61 sequenced samples, 58 (95.1 %) belonged to genotype D, and 3 (4.9 %) to A. Genotype D in 47 (81.1 %) cases was represented by the D2 subgenotype, in 5 (8.6 %) samples, the D1 subgenotype was detected, in 5 (8.6 %) — D3 and in 1 (1.7 %) sample the D4 subgenotype was detected, all samples of genotype A belonged to the A2 subgenotype. All DNA sequences of the D1 and D3 subgenotypes were assigned to the ayw2 subtype, D4 — to the ayw3 subtype, most samples of the D2 subgenotype were of the ayw3 subtype, and one sample each was assigned to the ayw2 and ayw4 subtypes. All DNA sequences of the A2 subgenotype belonged to the adw2 subtype.

Conclusion. The HBV variants identified in donors during phylogenetic analysis were in the same cluster with previously described sequences from Belarus, which indicates that the epidemiological process of hepatitis B in the country is supported by “local domestic” viruses.

Key words: donors, blood serum/plasma, CLIA/ELISA, PCR, sequencing, phylogenetic analysis.

HEALTHCARE. 2024; 12: 54—65

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISATION OF HEPATITIS B VIRUS DETECTED
FOR THE FIRST TIME IN BLOOD DONORS

F. N. Karpenko, V. F. Eremin

Инфицирование вирусом гепатита В (ВГВ; HBV — hepatitis B virus) по-прежнему представляет огромную проблему для здоровья, несмотря на введение вакцины против ВГВ в конце 1990-х гг. С момента открытия заболевания до начала XXI в. во всем мире было зарегистрировано около 2 млрд случаев заболевания, причем более 400 млн таких когорт переросли в хронических носителей ВГВ [1]. Из-за значительного генетического разнообразия ВГВ подразделяется на 10 генотипов (A—J) с межгрупповыми вариантами 7,5 % [2].

Помимо Е и G, все генотипы подразделяются на 25 субгенотипов с вариабельностью аминокислот 4 % [3; 4]. Генотипы ВГВ распределяются по-разному в зависимости от географического положения: HBV-B, HBV-C и HBV-E наиболее распространены в Океании и Восточной Азии, тогда как HBV-E — в Центральной и Западной Африке. HBV-F и HBV-H встречаются только на Аляске и в Латинской Америке. Напротив, HBV-D представляет собой глобальную пандемию. В Австралии, Европе, Индонезии, Северной Африке и Западной Азии HBV-D1

является наиболее распространенным вирусом, тогда как HBV-D2 встречается в Албании, Японии, Малайзии, Северо-Восточной Европе, России и Великобритании [5—9].

Прогрессирование и естественное течение заболевания неодинаковы для разных генотипов ВГВ. Последнее может сделать лечение ВГВ очень сложным, поскольку эффективность известных терапевтических препаратов становится неэффективной против определенных генотипов и новых генотипических вариантов [3; 4]. Таким образом, во всем мире существует большая потребность в генотипической информации и исследованиях людей, инфицированных ВГВ [9].

Донорство является «индикатором» эпидемиологического процесса по вирусным гепатитам В, С и ВИЧ-инфекции, поскольку, как правило, при тестировании донорской крови выявляются пациенты с острыми формами вышенназванных инфекций [10—14]. В этой связи тестирование образцов сыворотки/плазмы крови на инфекции, передаваемые при трансфузиях крови, является важнейшим элементом биологической безопасности, а безопасность запасов крови является элементом национальной безопасности Республики Беларусь. С 2020 г. в стране введено обязательное двойное тестирование заготавливаемой крови и ее компонентов с использованием серологических (ХЛИА и ИФА) и молекулярно-биологических ПЦР (NAT-технологии). К диагностическим наборам, которые используют в службе крови, предъявляются повышенные требования по чувствительности и специфичности с целью максимального снижения риска инфицирования реципиентов крови, ее компонентов. В этой связи проведение входного контроля качества тест-систем, поступающих в лаборатории учреждений службы крови, проверка качества работы сотрудников этих лабораторий, а также осуществление внешнего контроля качества и межлабораторных сличительных испытаний становятся приоритетными задачами в системе биологической безопасности.

Учитывая высокую генетическую изменчивость ВИЧ, ВГВ и ВГС (вирус гепатита С) определение генотипов/подгенотипов/подтипов этих вирусов и создание на их основе контролей для серологических и молекулярно-биологических исследований становится важной и ответственной задачей.

В РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий проводятся исследования по генотипированию вирусов, передающихся через кровь, в первую очередь ВИЧ, ВГВ и ВГС и некоторых других. На основании проведенных исследований в рамках Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2021—2025 годы в центре была разработана и зарегистрирована в РУЦ «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» панель сывороток крови, содержащих и не содержащих HBsAg, «Панель HBsAg» № ИМ-7.115699.

В настоящей статье приводятся данные по генотипированию ВГВ и определению мутаций в геноме вируса.

Материал и методы

Для тестирования на маркеры ВГВ методами ХЛИА/ИФА и ПЦР использовали сыворотку/плазму крови (61 образец), полученную от доноров крови. Возраст пациентов варьировал от 20 до 58 лет; 28 образцов было от лиц женского пола, 33 пробы — от мужчин.

HBsAg выявляли с использованием коммерческой тест-системы ХЛИА Architect HBsAg Qualitative II Reagent Kit (Abbott, США). Подтверждение положительного результата проводили с использованием набора Architect HBsAg Qualitative II Confirmatory Reagent Kit (Abbott, США), ИФА «Вектоген В-HBs-антитело» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия).

Полимеразную цепную реакцию в количественном варианте по определению ДНК ВГВ осуществляли на тест-системах «Реал-Бест ДНК ВГВ (количественный)» (ЗАО «Вектор-Бест»).

Синтез специфических пар праймеров к участкам Р и S генома ВГВ был осуществлен в ОДО «Праймтех», г. Минск.

Выделение вирусных РНК/ДНК из образцов сыворотки/плазмы крови выполняли с использованием комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот (НК) (ЗАО «Вектор-Бест») и комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РНК-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Все манипуляции проводили согласно инструкциям, прилагаемым к наборам.

Амплифицированные фрагменты ДНК анализировали в 2%-м агарозном геле. Электрофорез проводили при 10 в/см геля

в ТРИС-ацетатном буфере, pH — 8,0. ДНК визуализировали с помощью гельдокументирующей системы Vitran Photo (компания Биоком», Россия). Размер фрагмента определяли по отношению к маркеру молекулярных весов 100—1000 п. н. (Fermentas, Литва).

Для секвенирования генома ВГВ были подобраны консервативные участки в области участков Р и С и к ним синтезированы пары праймеров, которые позволяли осуществить генотипирование ВГВ (р1: 5_-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3_ в положении 55—76 и рR5: 5_-GGTTGCGTC AGCAAAACACTTG-3_ в положении 1197—1178); для гнездовой ПЦР использовали пару праймеров: р4 5_-CTCACAATACCGCAGAGTCTAGACT-3_ в положении 230—254 и рR2: 5_-AAAGCCCCAAAGACCCACAAT-3_ в положении 1017—997 (рис. 1).

Состав ПЦР-смеси для проведения реакции в 25 мкл: 1 × ПЦР = буфер, MgCl₂ — 1,5 мМ, смесь трифосфатов — 0,2 мМ, праймеры — по 1 pmol/л каждого, Тақ-полимераза — 1,0 Ед, кДНК — 2 мкл. Режим амплификации: 95 °C — 5 мин; 95 °C — 15 с; 50 °C — 30 с; 72 °C — 1 мин (35 повторов); 72 °C — 5 мин.

Электрофорез полученных и очищенных после секвенирующей ПЦР фрагментов ДНК ВГС, ВГВ проводили на генетическом анализаторе AB 3500 (США).

Филогенетический анализ полученных фрагментов ДНК ВГВ и ВГС был проведен с использованием компьютерных программ Sequencing Analysis v.6.0, BioEdit, SeqScape v3.0, MEGAX и Genious 8.1. Филогенетические деревья строили с применением алгоритма ML (maximum likelihood) в программе PHYML. Для расчета статистической достоверности кластеров использовали тест SH-aLRT. Достоверными считали кластеры с узлом поддержки $\geq 0,9$.

Мутации в геноме ВГВ по участкам С и Р определяли с использованием программ geno2pheno.org, hiv-grade.de, hivdb.stanford.edu.

Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования из 61 секвенированного образца 58 (95,1 %) относились к генотипу D, 3 (4,9 %) — к А. Генотип D в 47 (81,1 %) случаях был представлен подгенотипом D2, в 5 (8,6 %) образцах был выявлен подгенотип D1, в 5 (8,6 %) — D3, в 1 (1,7 %) пробе выявили подгенотип D4; все

образцы генотипа А относились к подгенотипу A2 (рис. 2).

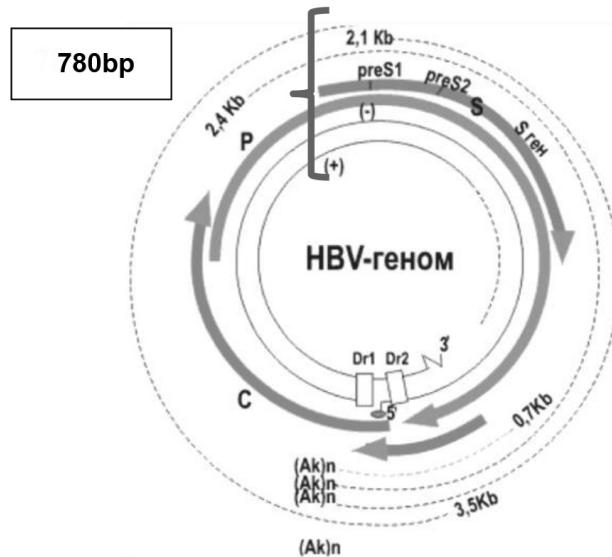


Рис. 1. Схема расположения праймеров к участкам Р и С генома ВГВ

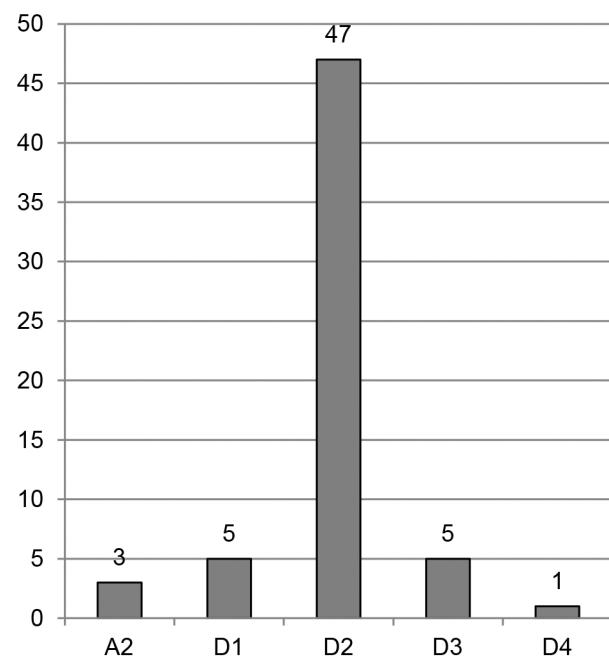


Рис. 2. Подгенотипы вируса гепатита В, обнаруженные у доноров крови

На следующем этапе исследований нами был проведен филогенетический анализ последовательностей ДНК секвенированных образцов подгенотипа D1. Исследования показали, что образцы образовывали пять независимых кластеров и располагались на филогенетическом дереве с образцами из Беларуси, ранее описанными нами, а также с последовательностями из Ирана, Индии, Турции и Пакистана (рис. 3).

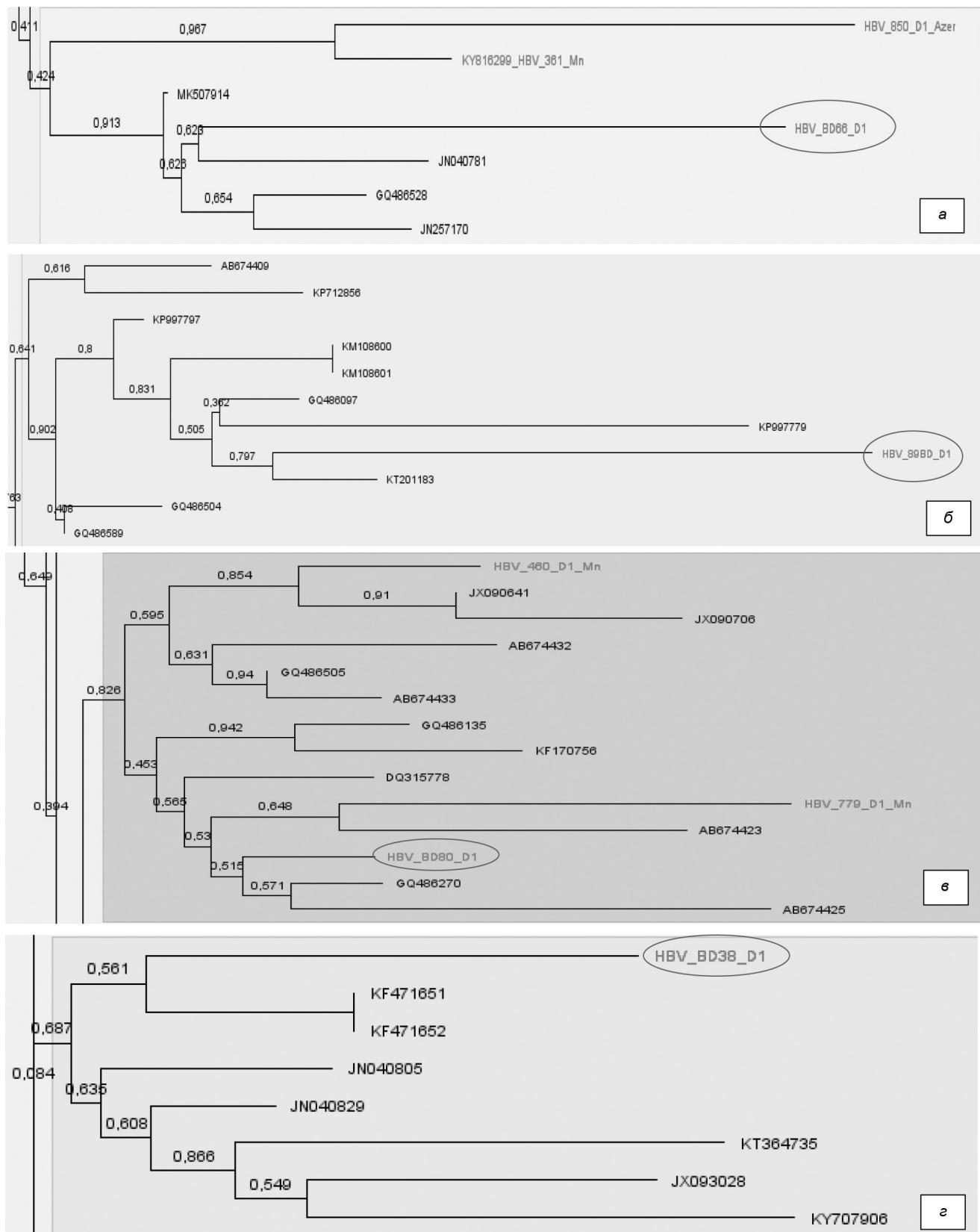


Рис. 3. Филогенетический анализ подгенотипа D1, выявленного у доноров крови
(начало, окончание на с. 58)

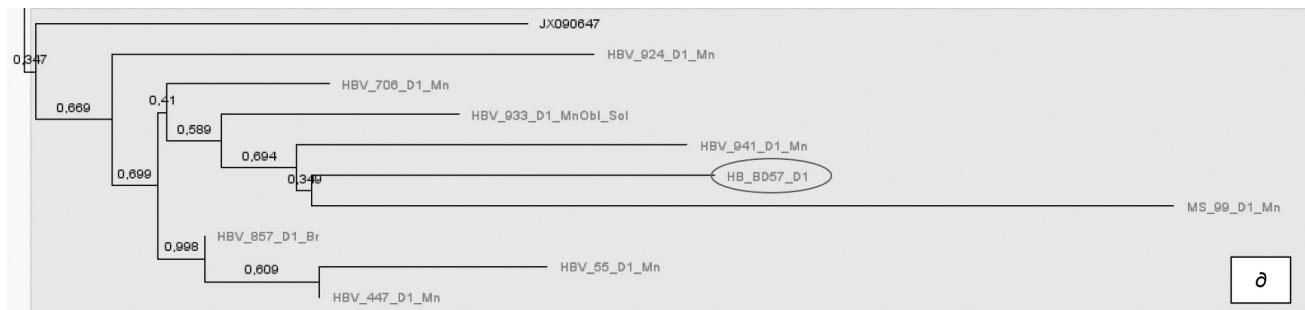


Рис. 3. Филогенетический анализ подгенотипа D1, выявленного у доноров крови (окончание, начало на с. 57)

Проведенные исследования по определению подтипа вируса показали, что все образцы относились к подтипу ayw2 подгенотипа D1 (рис. 4).

Вирусы подгенотипа D2, как указывалось выше, были представлены более широко: 47 (82,5 %) образцов. Все последовательности ДНК ВГВ подгенотипа D2 формировали 18 кластеров (рис. 5). Как показали наши исследования, образцы ВГВ, изолированные от доноров, в основном располагались с по-

следовательностями из Беларуси, описанными ранее, а также с образцами из США (рис. 5, а), с пробами из России (рис. 5, б, в), из Сербии, США и России (рис. 5, г), с последовательностями из Японии (рис. 5, е) и из Испании (рис. 5, з).

При определении подтипов у подгенотипа D2 было установлено, что большинство образцов относится к подтипу ayw3, образец HBV_28BD_D2 является подтипов ayw2, а проба HBV_8BD_D2 — ayw4 (рис. 6).

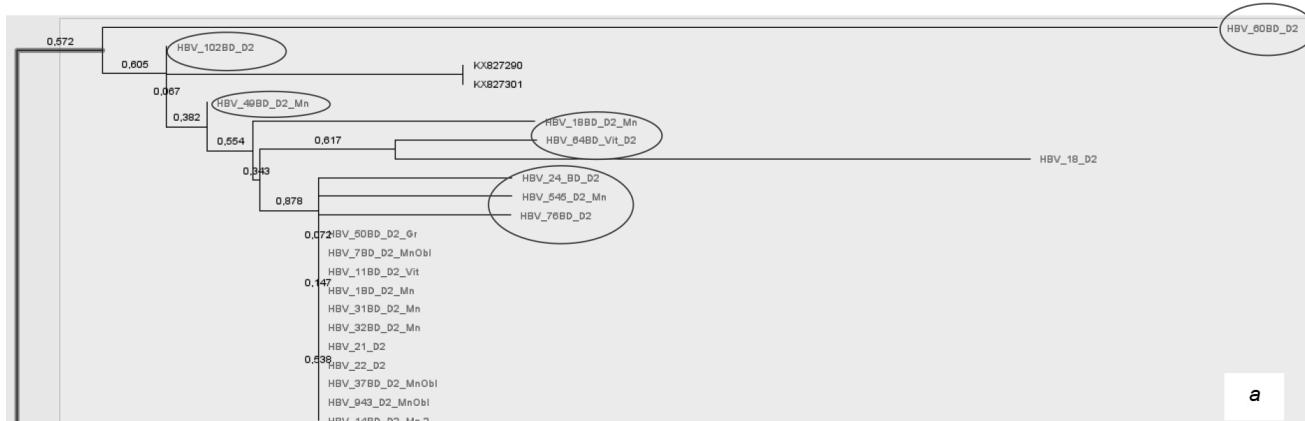
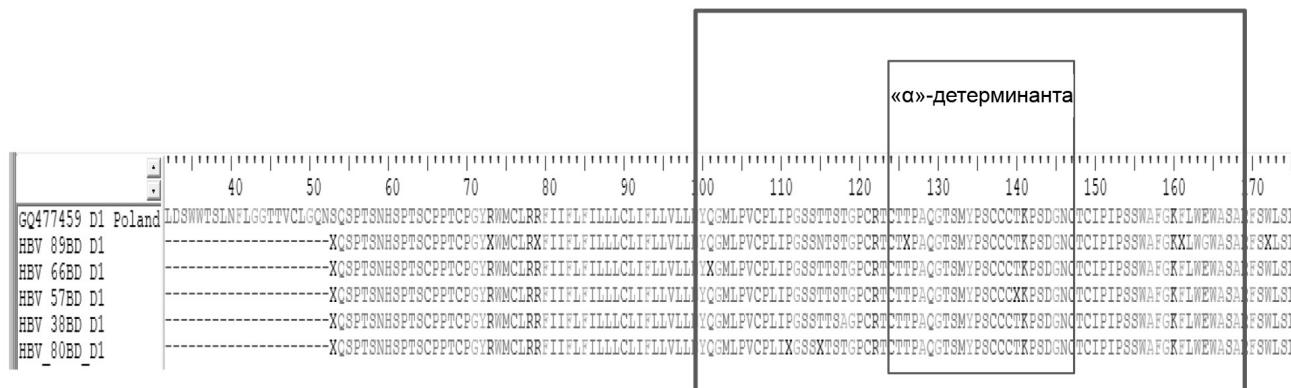


Рис. 5. Филогенетический анализ подгенотипа D2, выявленного у доноров крови (начало, продолжение на с. 59–60)

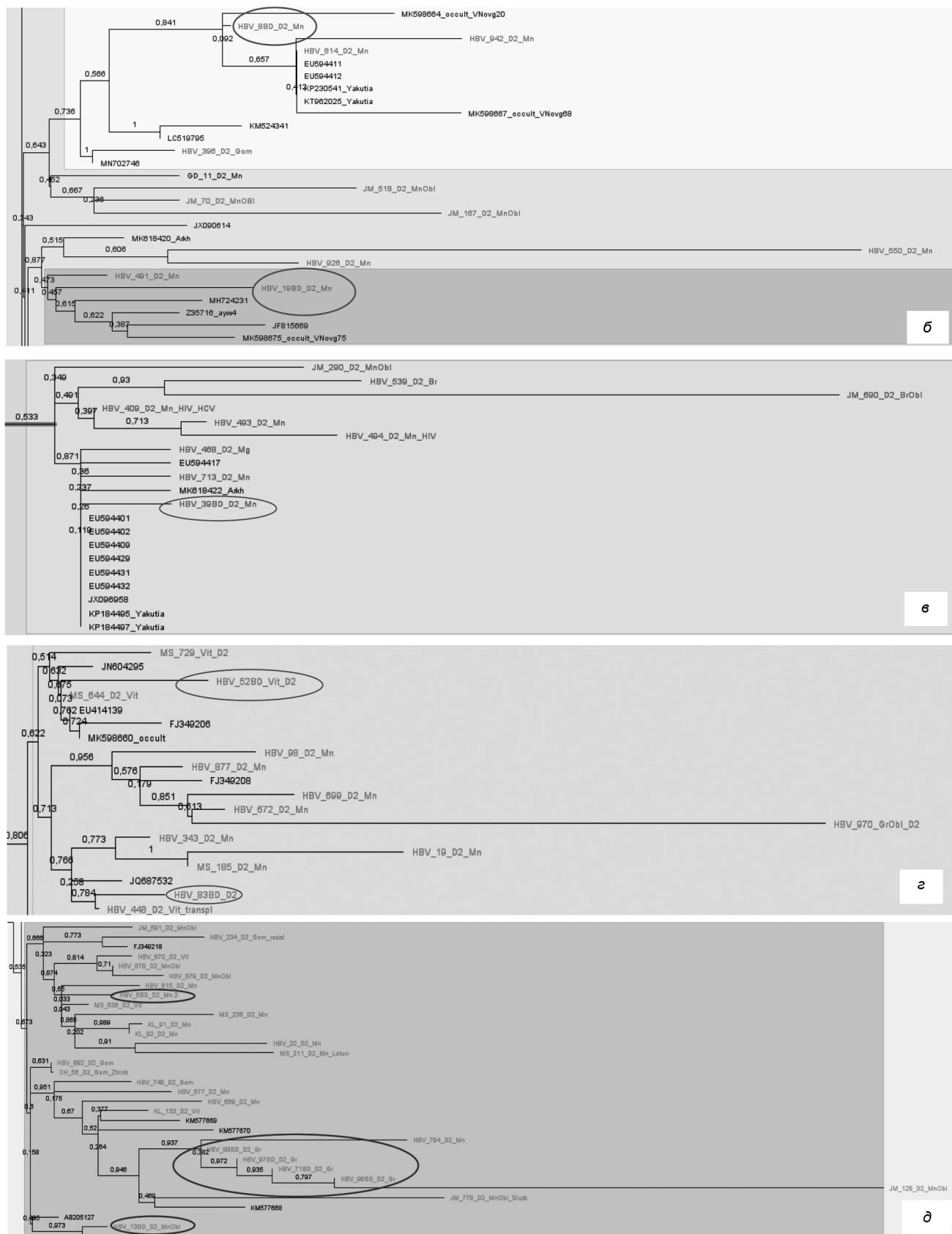


Рис. 5. Филогенетический анализ подгенотипа D2, выявленного у доноров крови (продолжение, начало на с. 58)

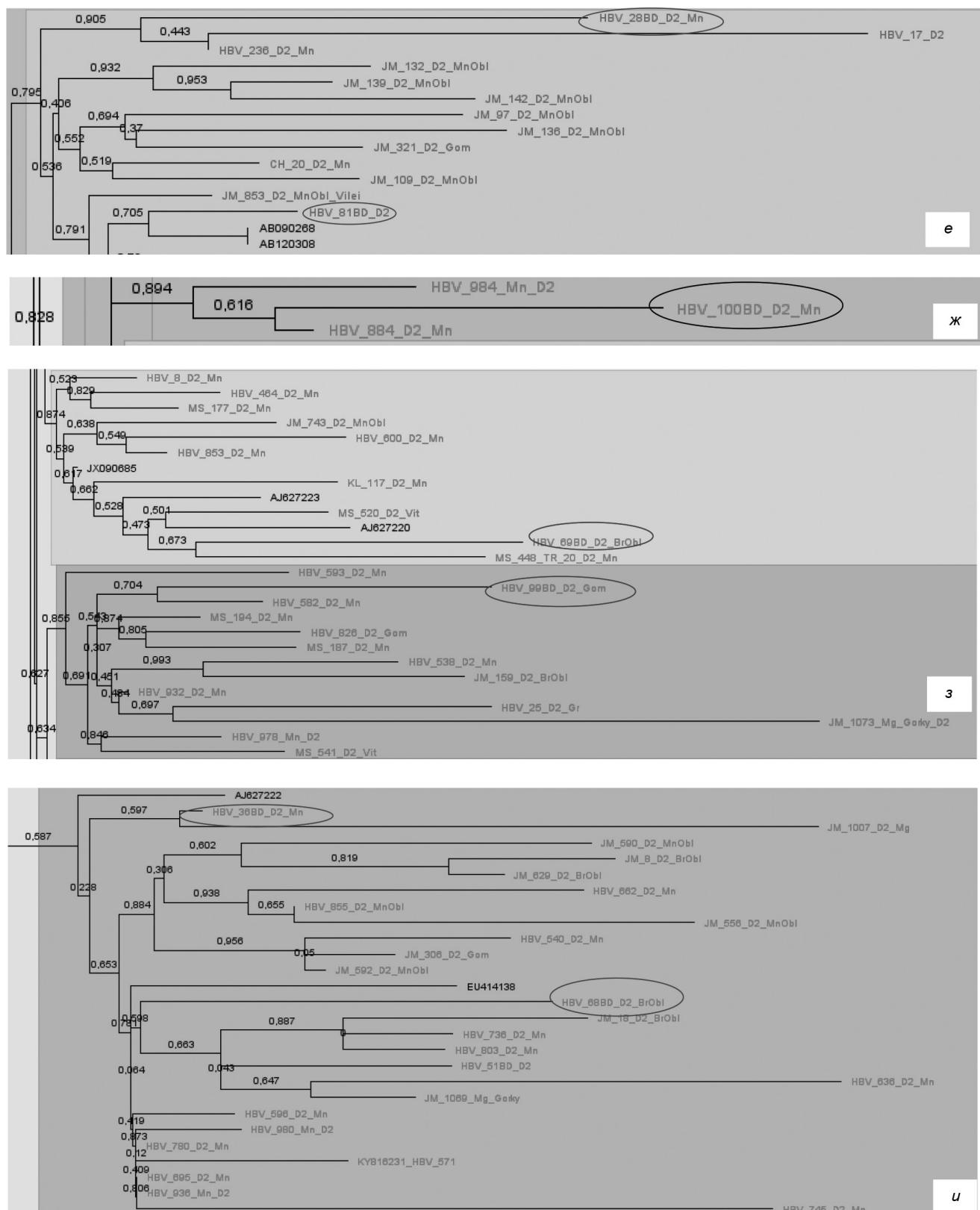


Рис. 5. Филогенетический анализ подгенотипа D2, выявленного у доноров крови (продолжение, окончание на с. 61)

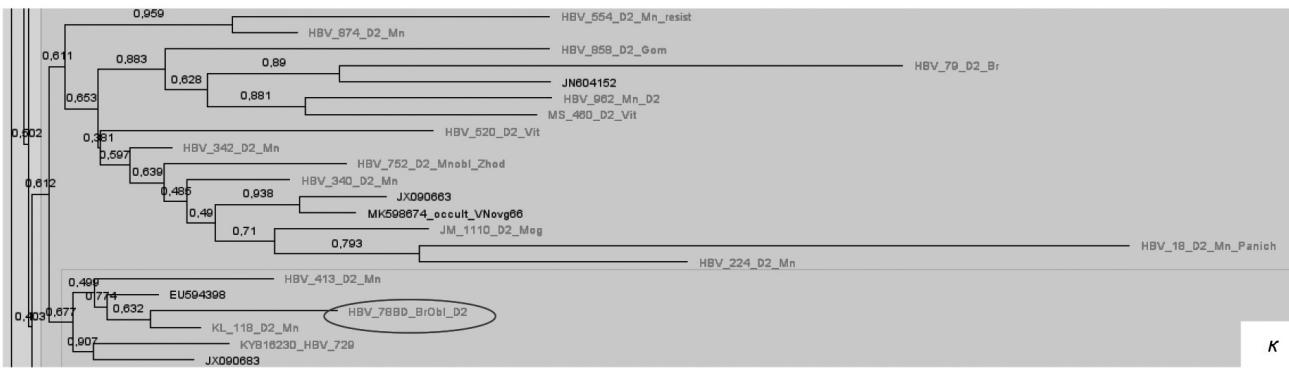


Рис. 5. Филогенетический анализ подгенотипа D2, выявленного у доноров крови (окончание, начало на с. 58)

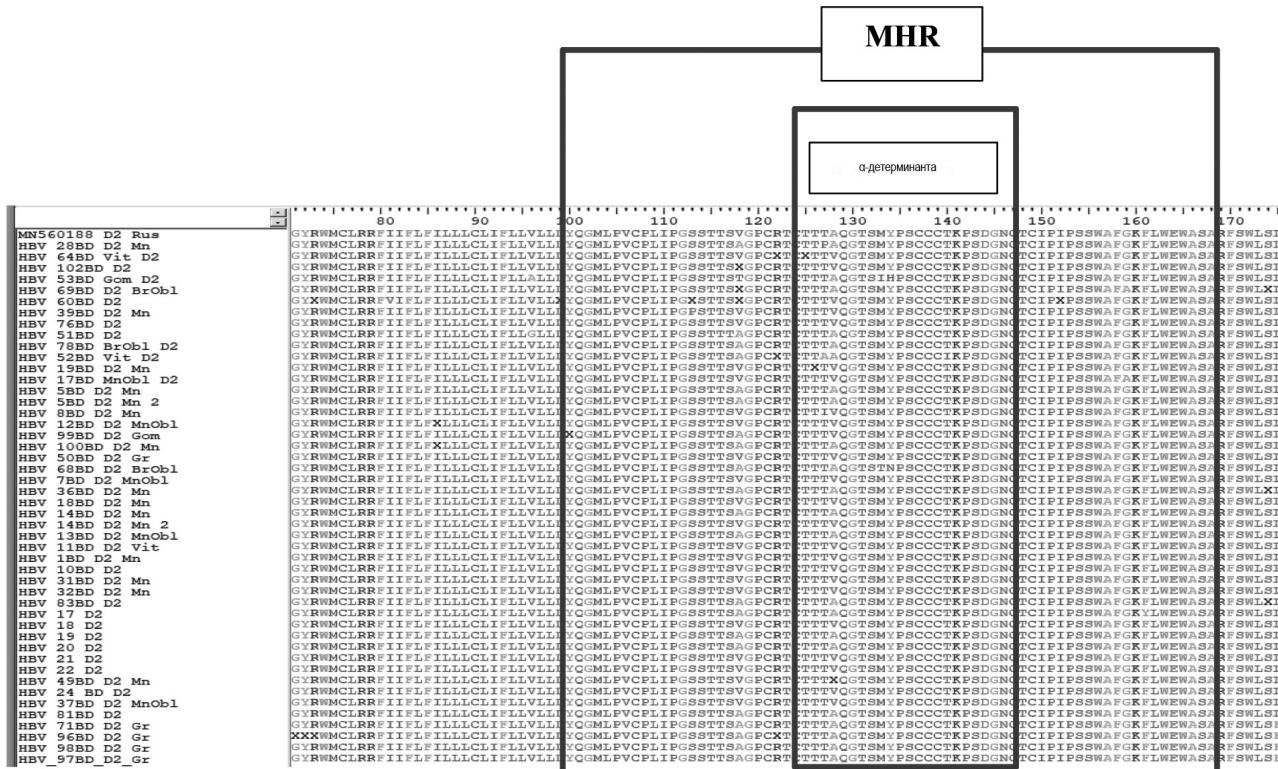


Рис. 6. Подтипы подгенотипа D2, выявленного у доноров крови

Генотипирование и филогенетический анализ подгенотипа D3 показали, что вирусы формировали три кластера и располагались в основном с последовательностями из России и Беларуси, ранее описанными нами (рис. 7, а, б). В то же время образцы HBV42BD_D3 HBV_15_D3 располагались в кластере с последовательностью из Бразилии (рис. 7, в). Все образцы подгенотипа D3 относились к подтипу ayw2 (рис. 8).

Анализ последовательностей образца HBV_61BD_D4 показал, что он формирует кластер с пробами ДНК ВГВ, ранее выявленными на территории страны, и с последова-

тельностями из Кубы, взятыми в международной базе данных GenBank (рис. 9).

Проведенные исследования по определению подтипа вириуса показали, что он относится к подтипу ауm3 (рис. 10).

Как показал филогенетический анализ последовательностей подгенотипа A2, они формировали три кластера с образцами из Беларуси, ранее описанными нами (рис. 11, а—в), исключение составила проба HBV_95BD_A2, которая располагалась в кластере с образцом из Италии (рис. 11, в). Все образцы подгенотипа A2 были отнесены к подтипу adw2 (рис. 12).

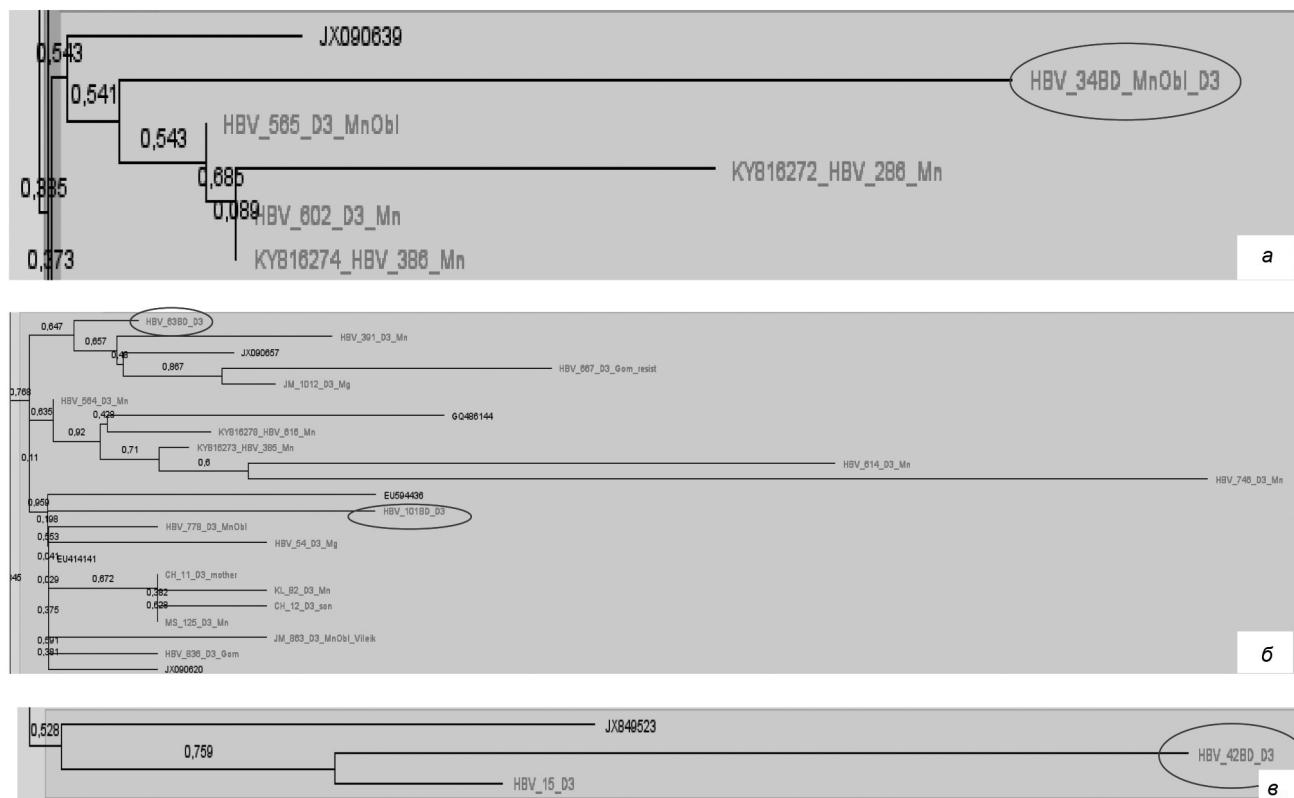


Рис. 7. Филогенетический анализ подгенотипа D3, выявленного у доноров крови

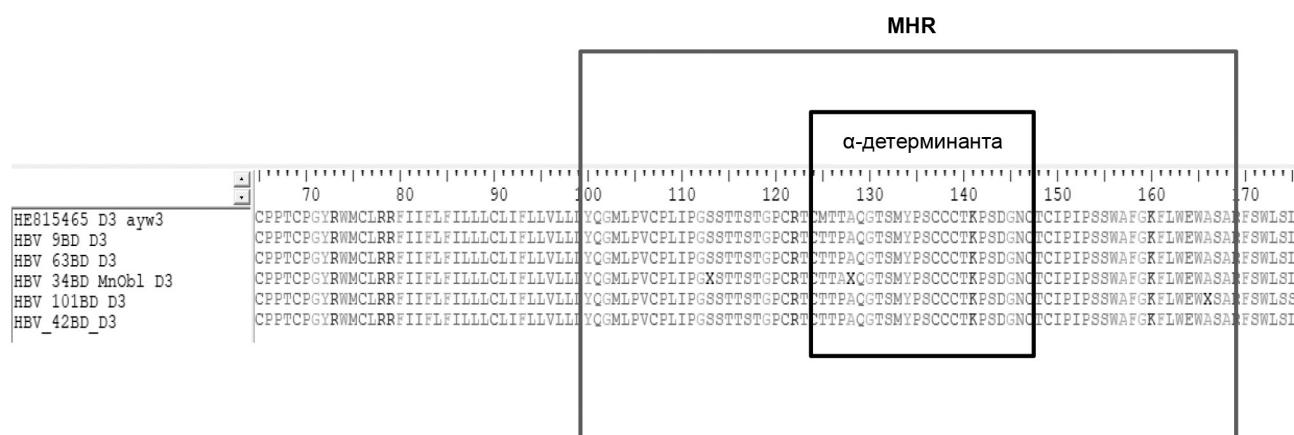


Рис. 8. Подтипы подгенотипа D3, выявленного у доноров крови

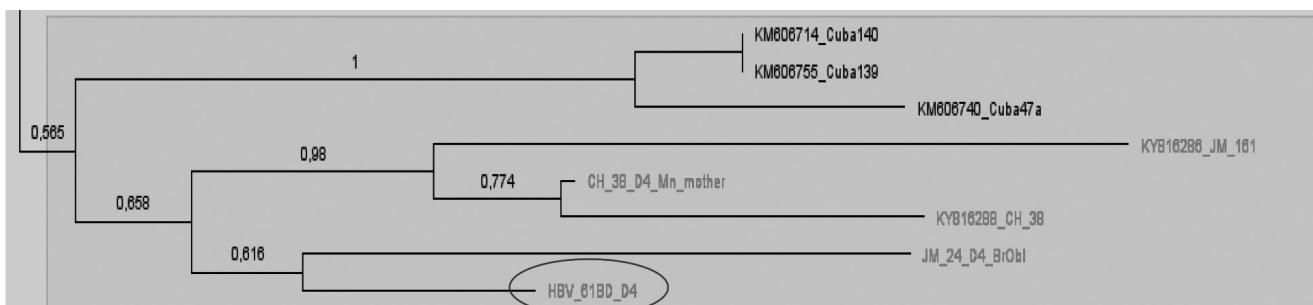


Рис. 9. Филогенетический анализ подгенотипа D4, выявленного у доноров крови

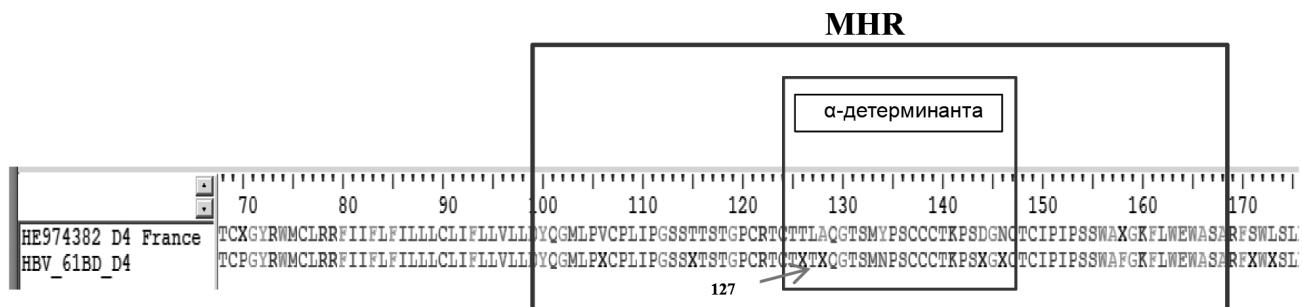


Рис. 10. Подтипы подгенотипа D4, выявленного у доноров крови

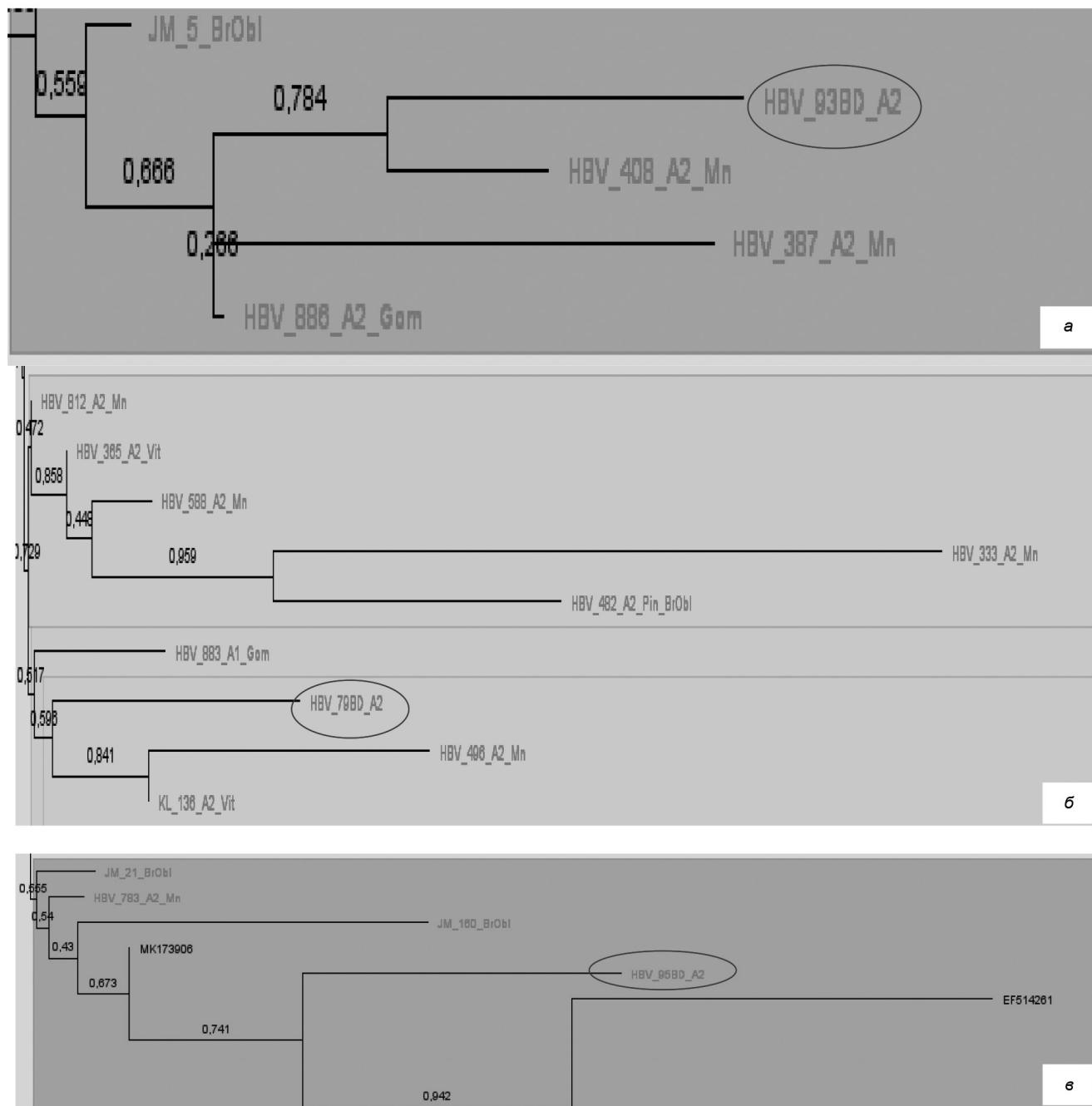


Рис. 11. Филогенетический анализ подгенотипа A2, выявленного у доноров крови

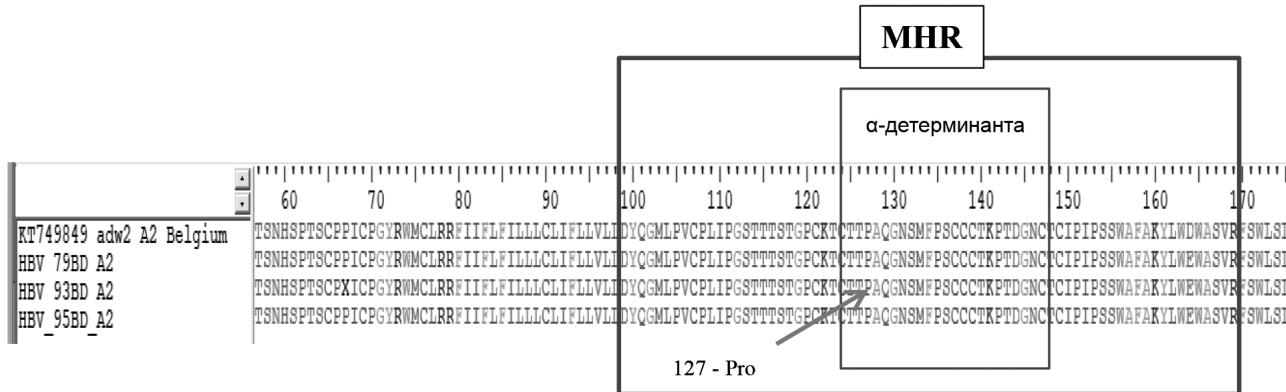


Рис. 12. Подтипы подгенотипа A2, выявленного у доноров крови

Используя программы geno2pheno.org и hiv-grade.de, нами был осуществлен анализ мутаций в секвенированных геномах ВГВ. Исследования показали, что чаще всего встречалась вторичная мутация в положении 128V (мутации, которые компенсируют функциональные дефекты активности полимеразы, связанные с появлением первичной мутации). Данная мутация снижает иммунный ответ на вакцину против гепатита В и относится к так называемым ускользающим (escape) мутациям. Всего было определено 27 таких мутаций, большая часть из которых приходилась на подгенотип D2 (25), по 1 случаю данная мутация была выявлена в последовательностях подгенотипов D3 и D4. В 2 случаях была определена вторичная мутация 134N, ведущая к снижению иммунного ответа и чувствительности при диагностике. В 1 последовательности подгенотипа D2 выявлена мутация 133T, с которой связано снижение чувствительности тест-систем при диагностике ВГВ. В 3 последовательностях подгенотипа D2 была определена компенсаторная мутация 184S, с которой связано снижение чувствительности к энтекавиру (Baraclude). Наконец, в 1 последовательности подгенотипа D2 выявлена мутация 204V, которая ведет к резистентности к противовирусным препаратам «Ламивудин» и «Телбивудин» и частичной резистентности к препарату «Энтекавир».

З а к л ю ч е н и е

Вирус гепатита В относится к категории управляемых инфекций: выборочная вакцинация в Республике Беларусь начата с 1996 г., с 2000 г. — введение в Национальный календарь обязательных прививок, что привело

к некоторому снижению количества выявляемых случаев острого ВГВ в стране. Вместе с тем циркуляция вируса в республике среди населения продолжается, о чем свидетельствуют новые случаи выявления как острого, так и хронического вирусного гепатита В. Понятно, что необходимо постоянно проводить мониторинг за парентеральными вирусными гепатитами, в частности за ВГВ, чтобы определять его происхождение и прерывать цепочки его передачи. Все это позволяют сделать методы молекулярной биологии с применением биоинформационных программ.

Среди доноров крови в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий и в лабораториях учреждений службы крови в течение 2022 г. было выявлено 29 случаев вирусного гепатита В, в 2023 г. — 16. Как показали проводимые нами молекулярно-биологические исследования, в целом выявляемость разных генотипов/подгенотипов ВГВ среди доноров крови примерно соответствовала таковой в популяции лиц с гепатитом В, диагностированных инфекционной службой. Так, из 61 секвенированного образца ВГВ 58 (95,1 %) относились к генотипу D, 3 (4,9 %) — к A. Генотип D в 47 (81,1 %) случаях был представлен подгенотипом D2, в 5 (8,6 %) образцах был выявлен подгенотип D1, в 5 (8,6 %) — D3, в 1 (1,7 %) пробе выявили подгенотип D4, все образцы генотипа A относились к подгенотипу A2.

На основании проведенных исследований в рамках Государственной программы «Накоемкие технологии и техника» на 2021—2025 годы была разработана и зарегистрирована в РУЦ «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» панель сывороток крови, содержащих и не содержащих HBsAg, «Панель

HBsAg» № ИМ-7.115699. Панель предназначена для проведения входного и выборочного в процессе эксплуатации контроля качества тест-систем, рекомендованных к использованию на территории страны, для оценки качества работы сотрудников вирусологических лабораторий, межлабораторных сличительных испытаний и внешнего контроля качества.

Контактная информация:

Еремин Владимир Федорович — д. м. н., профессор, зав. лабораторией диагностики трансфузионно-трансмиссивных инфекций. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий. Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск. Сл. тел. +375 17 342-44-43.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: Ф. Н. К.
Сбор информации и обработка материала: В. Ф. Е.
Написание текста: В. Ф. Е.
Редактирование: Ф. Н. К.

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. *The global burden of cancer: Priorities for prevention* / M. J. Thun [et al.] // *Carcinogenesis*. — 2010. — Vol. 31. — P. 100—110.
2. *Lin, C.-L. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances* / C.-L. Lin, J.-H. Kao // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2011. — Vol. 26 (Suppl. 1). — P. 123—130.
3. *Relation of viral genotypes to clinical features in children with chronic hepatitis B* / S. S. Zhu [et al.] // *Chin. J. Exp. Clin. Virol.* — 2008. — Vol. 22. — P. 192—194.
4. *Shamseer, L. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: Elaboration and explanation* / L. Shamseer [et al.] // *BMJ*. — 2015. — Vol. 349. — P. g7647.
5. *George, B. J. An application of meta-analysis based on DerSimonian and Laird method* / B. J. George, I. B. Aban // *J. Nucl. Cardiol.* — 2016. — Vol. 23. — P. 690—692.
6. *Fletcher, J. What is heterogeneity and is it important?* / J. Fletcher // *BMJ*. — 2007. — Vol. 334. — P. 94—96.
7. *Higgins, J. P. T. Measuring inconsistency in meta-analyses* / J. P. T. Higgins, S. G. Thompson, J. J. Deeks, D. G. Altman // *BMJ*. — 2003. — Vol. 327. — P. 557—560.
8. *Closing the Gap between Methodologists and End-Users: R as a Computational Back-End* / B. C. Wallace [et al.] // *J. Stat. Softw.* — 2012. — Vol. 49. — P. 2—15.
9. *Methodological guidance for systematic reviews of observational epidemiological studies reporting prevalence and cumulative incidence data* / Z. Munn [et al.] // *Int. J. Evid. Based Healthc.* — 2015. — Vol. 13. — P. 147—153.
10. *Critical Updates on Chronic Hepatitis B Virus Infection in 2021* / C. A. Philips [et al.] // *Cureus*. — 2021. — Vol. 13. — P. e19152.
11. *Prevalence, incidence and residual risk of transfusion transmitted viruses (HBV, HCV and HIV infections) in Lithuanian blood donors from 2004 to 2018: The incidence/window-period model study* / S. Grubyte [et al.] // *PLoS One*. — 2021. — P. 1—16.
12. *Seroprevalence of viral transfusion transmissible infections (HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, Syphilis) and coinfection among healthy volunteer blood donors during 5-years in Luanda, Angola* / A. E. Quintas [et al.] // *Braz. J. Infect. Dis.* — 2023. — Vol. 27 (6). — P. 1—10.
13. *Evolution of the residual risk of HBV, HCV and HIV transmission through blood transfusion in the Region of Valencia, Spain, during a 15-year period (2003—2017)* / C. López-Menchero [et al.] // *Blood Transfus.* — 2019. — Vol. 17(6). — P. 418—427.
14. *Residual risk of HIV, HCV, and HBV transmission by blood transfusion between 2015 and 2017 at the Regional Blood Transfusion Center of Ouagadougou, Burkina Faso* / A. P. Yooda [et al.] // *J. Blood Med.* — 2019. — Vol. 1, № 10. — P. 53—58.

Поступила 26.08.2024
Принята к печати 29.10.2024