

На правах рукописи

Исаева Ольга Владиславовна

**ГЕПАТИТ ДЕЛЬТА В ЭНДЕМИЧНЫХ РЕГИОНАХ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

03.02.02 – вирусология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва, 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Научные консультанты:

доктор биологических наук, профессор РАН **Кюрегян Карен Каренович**,
доктор медицинских наук, профессор **Ильченко Людмила Юрьевна**

Официальные оппоненты:

Карганова Галина Григорьевна – доктор биологических наук, профессор; ФГАНУ
«Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), лаборатория биологии
арбовирусов, заведующий;

Блохина Наталья Петровна – доктор медицинских наук, профессор; ГБУЗ
«Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города
Москвы»; консультативно-диагностическое отделение, заведующий;

Туполева Татьяна Алексеевна – доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, отделение
инфекционной безопасности трансфузий, заведующий.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-
Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «22» сентября 2022 года в 12.00 час. на заседании диссертационного
совета Д 001.035.01 в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, Москва, Малый Казённый переулок, д. 5 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и на сайте <https://www.instmech.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Яковлева Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

С момента открытия вируса гепатита дельта (Hepatitis Delta Virus, HDV) прошло более 40 лет. Однако и сегодня, несмотря на практически полувековую историю изучения, остаются нерешенными вопросы лечения и прогноза исхода заболевания, а также полного предотвращения распространения и циркуляции этого вируса, вызывающего тяжелый, быстро прогрессирующий гепатит.

Массовая вакцинация населения против гепатита В с использованием рекомбинантных вакцин привела к уменьшению распространенности вируса гепатита В (HBV), а также к снижению распространения HDV, вызывающего тяжелый гепатит у лиц, инфицированных HBV [M.H.Nguyen et al., 2020]. Инфицирование HDV может происходить одновременно с HBV (коинфекция), или в виде суперинфекции на фоне уже существующего хронического гепатита В. Одновременное инфицирование HBV и HDV может приводить к острому заболеванию в умеренной или тяжелой форме, или даже к фульминантному гепатиту, но обычно наступает полное выздоровление и хронический гепатит D развивается редко (менее чем в 5% случаев острого гепатита) [F.Negro et al., 2014]. Суперинфекция HDV при хроническом гепатите В, как правило, принимает хроническую форму, и ускоряет развитие более тяжелого заболевания в любом возрасте у 70-90% пациентов. Наблюдения за больными, инфицированными HDV, показали, что у пациентов с активным хроническим гепатитом D (ХГД) цирроз печени (ЦП) развивается на 10 лет ранее, чем у пациентов с моноинфекцией HBV, и быстрее формируется гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), несмотря на то, что HDV подавляет репликацию HBV [D.Alfaiate et al., 2015]. HDV обладает некрозогенным свойством, и заражение им отягощает течение вирусного гепатита В, значительно ухудшая прогноз. В то же время, данные о прогностических факторах исхода хронической HDV-инфекции крайне ограничены. Механизмы патогенного действия HDV, связанные с более тяжелым течением заболевания печени и ускоренным развитием фиброза по сравнению с моноинфекцией HBV, остаются неясными [H. Wedemeyer et al., 2010].

В Российской Федерации (РФ) о ситуации в отношении HDV-инфекции можно судить только по результатам отдельных научных исследований, в стране отсутствует ее

официальная регистрация и рекомендации по обязательному определению антител к HDV (анти-HDV) у больных хроническим ГВ (ХГВ). Данные о широте распространения HDV в РФ, основанные на частоте выявления анти-HDV среди лиц, положительных по HBsAg, ограничены.

Представленные в литературе результаты исследований по определению частоты выявления анти-HDV в общей популяции и у больных ХГВ получены лишь в некоторых регионах РФ. По данным литературы, HDV относительно редко встречается на территории Европейской части РФ, но широко распространен на отдельных территориях Азиатской части страны – в Республике Тыва, Республике Саха (Якутия), на Чукотке [Т.В. Кожанова и соавт., 2012; С.С. Слепцова, 2013].

Причины широкой распространенности HDV в определенных регионах РФ остаются до сих пор невыясненными, так же как неизвестна история распространения вируса на этих территориях.

В условиях отсутствия эффективных терапевтических препаратов, позволяющих добиваться элиминации вируса из организма, единственным надежным средством для управления HDV является вакцинация. Поскольку в состав вирусной частицы HDV, как и HBV, входит HBsAg, гуморальный иммунный ответ на вакцину против гепатита В в полной мере защищает и от инфицирования HDV. Массовая вакцинация против гепатита В приводит к уменьшению числа лиц, инфицированных HBV, и, как следствие, восприимчивых к HDV. В то же время, данные об эпидемиологической эффективности в отношении HDV вакцины против гепатита В в эндемичных странах, где число потенциальных источников этого вируса велико, отсутствуют. Наличие в мире и, в частности, в Российской Федерации регионов с широкой распространенностью HDV указывает на необходимость разработки специальных программ по диагностике, профилактике и терапии этой опасной инфекции.

Таким образом данное исследование, посвящённое анализу особенностей циркуляции HDV и HBV в условиях изменяющейся эпидемиологии данных инфекций и изучению взаимоотношений этих вирусов и человеческого организма, позволит получить новые данные для разработки стратегии борьбы с гепатитом D в регионах Российской Федерации, а также будет иметь прикладное значение для здравоохранения.

Степень разработанности темы

Коинфекция HBV и HDV приводит к более быстрому по сравнению с моноинфекцией HBV прогрессированию хронического гепатита в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному. Клиническое течение вирусного гепатита D, его тяжесть и скорость прогрессирования сильно варьируют. Факторы, определяющие тяжесть течения инфекции, изучены недостаточно, а данные по распространенности HDV в России остро нуждаются в актуализации, так как большинство работ по этому вопросу были опубликованы до 2000 г. В настоящее время известно, что распространение HDV на территории РФ является мозаичным. Причины и история формирования эндемичных по HDV регионов, равно как и особенности циркуляции вируса в них, а именно ведущие пути передачи, факторы риска, формирование семейных очагов, не изучены до сих пор. Ситуация осложняется тем, что в России тестирование на маркеры гепатита D среди больных HBV не является обязательным. Более того, гепатит D не относится к регистрируемой инфекции, все случаи этого заболевания учитываются в статистике по гепатиту B, что скрывает реальную заболеваемость населения и нагрузку этой инфекции на систему здравоохранения. Кроме того, в РФ нет ни одной сертифицированной тест-системы для определения вирусной нагрузки HDV в реальной клинической практике.

Решение этой проблемы здравоохранения требует фундаментальных знаний о генетическом разнообразии HDV, особенностях его циркуляции и эволюции, в том числе ко-циркуляции и ко-эволюции с HBV, влиянии вакцинации против гепатита B на распространенность HDV на эндемичных территориях, а также идентификации факторов вируса и организма-хозяина, определяющих клиническое течение HDV-инфекции.

Цель – разработка комплекса мер по диагностике, контролю и профилактике вирусного гепатита D, основанного на получении новых фундаментальных знаний об эпидемиологии, генетическом разнообразии и истории распространения возбудителя, клинике этой инфекции в эндемичных регионах Российской Федерации.

Задачи

1. Установить распространенность HBV и HDV-инфекции на территории двух эндемичных в отношении HBV регионов – Республики Тыва и Республики Саха (Якутия) и её изменения в многолетней динамике.

2. Оценить влияние массовой вакцинации против гепатита В на циркуляцию HDV в эндемичных регионах Российской Федерации.
3. Определить генетическое разнообразие вариантов HDV, циркулирующих в эндемичных регионах Российской Федерации: Республике Тыва, Республике Дагестан и Республике Саха (Якутия).
4. Реконструировать историю распространения HDV и HBV в Российской Федерации с помощью филогенетического и филогеографического анализа.
5. Определить механизмы формирования семейных очагов инфекции, вызванной HDV.
6. Оценить значимость динамического мониторинга биохимических и вирусологических показателей, как прогностических маркеров прогрессирования и исхода хронического гепатита D.
7. Разработать предложения по разработке системы контроля за гепатитом D в Российской Федерации.

Научная новизна

Впервые на основании многолетних наблюдений получены достоверные данные (количество образцов сыворотки крови, использованных для исследования – более 4000) об интенсивности циркуляции HBV и HDV-инфекции на эндемичных в отношении этих инфекций территориях Российской Федерации: Республики Тыва и Республики Саха (Якутия) и представлены сравнительные изменения в динамике (диапазон исследований – 10 лет).

Впервые установлено значительное снижение и даже прекращение циркуляции HDV-инфекции в эндемичных регионах среди поколений, охваченных вакцинацией против гепатита В при рождении. В то же время, показано резкое (в семь раз) увеличение частоты коинфекции HDV/HBV за последние 10 лет среди лиц в возрасте 50-59 лет в Республике Тыва.

Впервые показано сохранение в Республике Саха (Якутия) и Республике Тыва циркуляции HBV среди вакцинированного при рождении поколения, подтверждаемой высокой, до 12-20%, частотой выявления антител к капсидному белку HBV (анти-HBc) среди лиц моложе 20 лет.

Впервые установлено распределение генотипов HBV у пациентов с наличием коинфекции HDV. Впервые показано, что на обследованных территориях Российской

Федерации (Республика Тыва и Республика Дагестан) в популяции пациентов с сочетанным вирусным поражением печени (HBV/HDV) циркулируют два основных генотипа: HBV-A и HBV-D с доминированием генотипа D (14,3% против 85,7%). Исключение на территории РФ составляет Республика Саха (Якутия), где определена циркуляция генотипа HBV-A и HBV-D в практически равных пропорциях (49,9 и 50,1%, соответственно).

Впервые установлено отсутствие взаимосвязи между генотипами HBV и HDV у инфицированных пациентов. Установлено, что нет каких-либо предпочтений в преимущественном сочетании HBV и HDV у инфицированных пациентов на территории, где с одинаковой частотой встречаются генотипы HDV-1 и HDV-2 и генотипы HBV-A и HBV-D.

Впервые при использовании нескольких методов филогенетического анализа в эндемичных регионах Российской Федерации (Республика Тыва и Республика Дагестан) определены механизмы формирования семейных очагов этой инфекции. Доказано частое формирование семейных очагов гепатита D в эндемичных регионах, возникающих как в результате горизонтальной передачи одного геноварианта вируса, так и вследствие неоднократных заносов в семью разных вариантов HDV.

Впервые в Российской Федерации с помощью филодинамического и филогеографического анализа реконструирована история распространения HDV в мире и в Российской Федерации в целом, а также определено генетическое разнообразие вариантов HDV, циркулирующих в отдельных регионах – Республиках Тыва, Саха (Якутия) и Дагестан. Реконструкция истории распространения HDV в мире, выполненная с помощью Байесовского анализа с временной шкалой с использованием полногеномных последовательностей вируса, выделенных в разные годы, продемонстрировала, что общий предок (прародитель) HDV имеет возраст около 6,5 тысяч лет. В это время произошло разделение на две ветви – это генотип 3, который циркулирует в настоящее время только в странах Латинской Америки, и генотипы 1, 2, 4-8. На основании данного анализа определено историческое время распространения современных вариантов вируса.

Впервые реконструирована совместная история распространения HDV и HBV в эндемичном регионе Российской Федерации, которая продемонстрировала, что начало распространения HDV на территории России произошло в начале 19 века, в отличие от

предков современных вариантов HBV, история циркуляции которых насчитывает тысячи лет. Впервые показано, что возраст современных вариантов HDV на территории Российской Федерации составляет не более 200 лет и формирование эндемичных по HDV регионов произошло в 19-20 веках на фоне сложившейся многовековой эндемичной циркуляции HBV.

Впервые установлено, что распространение HDV в Республике Тыва произошло в результате двух волн интродукции вируса генотипа HDV-1. Первая волна связана с Ближним Востоком и Центральной Азией, вторая – с заносами вируса с территории других регионов России в середине 20 века.

Впервые при анализе филогенетических отношений и реконструкции истории распространения и времени заноса HBV на территорию Республики Тыва установлено, что варианты HBV, циркулирующие в этом регионе, имеют историю эволюции протяженностью несколько тысячелетий, что привело к формированию эпидемических геновариантов.

Впервые, благодаря реконструкции истории циркуляции HDV в Республике Саха (Якутия), показано, что генотип HDV-1 неоднократно заносился в регион, в течение последних 180 лет. Все занесенные в Якутию варианты HDV-1 имели восточноевропейское или ближневосточное происхождение. Все последовательности HDV-2 из Якутии относятся к субгенотипу 2b и образуют монофилетическую группу, что свидетельствует о существовании «эффекта основателя». Впервые показано, что вопреки ранее существовавшим представлениям о том, что вариант HDV-2 попал в Якутию из Восточной Азии, существовал промежуточный предок, ближайший «потомок» которого сейчас циркулирует на территории Кыргызстана.

Впервые на основании филодинамического и филогеографического анализа нуклеотидных последовательностей HDV-1, выделенных на территории Дагестана, продемонстрировано, что длительная, более 150 лет, циркуляция вируса в регионе привела к формированию эпидемических геновариантов, являющихся предками вариантов HDV-1, встречающихся на других территориях РФ.

Впервые определены вирусологические факторы, влияющие на прогрессирование хронического гепатита D и его исходы. Впервые полученные в относительно однородной когорте пациентов (этнос - тывинцы, инфицированы одним генотипом HDV (HDV-1) и в 95% случаев одним генотипом HBV (HBV-D)) результаты показали, что

основным прогностическим фактором, определяющим риск прогрессирования HDV-ассоциированного заболевания печени, является стабильная и активная репликация HDV. В меньшей степени прогностически неблагоприятным фактором прогрессирования гепатита D является высокий уровень сывороточного HBsAg (выше 3,5 lg ME/мл), и повышенный уровень аспартатаминотрансферазы (АСТ). Наличие детектируемой ДНК HBV и динамика прочих биохимических маркеров: аланинаминотрансферазы (АЛТ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), щелочной фосфатазы (ЩФ) и общего билирубина не являются достоверными и информативными показателями с точки зрения оценки риска прогрессирования и неблагоприятного исхода HDV-ассоциированного заболевания печени.

Теоретическая и практическая значимость

Установлены особенности и закономерности циркуляции HDV и HBV в эндемичных регионах в условиях изменяющейся эпидемиологии данных инфекций. Установлено сохранение циркуляции HBV в вакцинированном поколении, связанное с недостаточным охватом вакцинацией и нарушениями схемы иммунизации. Выявлено продолжающееся распространение HDV в старших возрастных группах населения эндемичного региона, обусловленное широкой распространенностью HBV среди старшего поколения. Установлено, что формирование эндемичного по HDV региона произошло в 19-20 веках на фоне интенсивной циркуляции HBV, имеющей на этой территории многовековую историю. Таким образом, установлено, что распространенность HBV является ключевым фактором, определяющим циркуляцию и эволюцию HDV как в краткосрочной, так и в глобальной перспективе. В то же время показано, что генотип HBV не имеет значения с точки зрения успешности формирования HDV-инфекции, поскольку корреляция между генотипами HBV и HDV отсутствует. Определены особенности взаимоотношений HDV и организма. Установлено, что хроническая HDV-инфекция имеет три различные формы протекания – быстрое прогрессирование в цирроз печени с частым летальным исходом; непрогрессирующий в цирроз печени хронический гепатит и непрогрессирующий цирроз класса А по Child-Pugh, при этом основным фактором риска неблагоприятного исхода является активность репликации HDV.

На основании полученных данных об особенностях циркуляции HDV и HBV в эндемичных регионах разработан комплекс мер по диагностике, контролю и

профилактике вирусного гепатита D. Установлена необходимость строгого контроля качества и охвата вакцинацией против гепатита B, а также реализации программы скрининга на HDV и HBV. Определены возможности и ограничения использования альтернативных образцов (слюна и сухая капля крови) для выявления HBsAg, анти-HBc и анти-HDV при скрининговых исследованиях.

Определена перспективность определения генотипа HBV методом иммуноферментного анализа (ИФА) с серотип-специфичными моноклональными антителами у пациентов с гепатитом D, у которых примерно в 80% случаев наблюдаются недетектируемые уровни ДНК HBV, что исключает возможность генотипирования данного вируса стандартными молекулярно-биологическими методами.

Установлено, что для расследования случаев заражения HDV филогенетический анализ фрагмента генома R0, последовательности которого наиболее представлены в базах данных, следует проводить только с помощью Байесовского анализа. Решение же таких задач с использованием алгоритма максимального правдоподобия (ML) возможно только с помощью анализа полного генома HDV.

На основании результатов многофакторного анализа установлена целесообразность мониторинга вирусемии HDV, уровней HBsAg и АСТ для оценки рисков исхода хронического гепатита D и выбора тактики ведения и лечения пациентов, инфицированных HDV. Установлено, что поздняя диагностика относится к факторам неблагоприятного исхода гепатита D. Таким образом, скрининг на маркеры гепатита D рекомендуется для всех пациентов, у которых обнаружен HBsAg, независимо от клинических проявлений заболевания печени.

На основании полученных результатов разработаны и внедрены в практическое применение Методические рекомендации МЗ РФ «Хронический вирусный гепатит D (ХВГD) у взрослых».

Методология и методы исследования

С помощью вирусологических, молекулярно-биологических, биоинформационных, статистических методов исследования получена достоверная информация о гепатите D в эндемичных регионах Российской Федерации, проанализированы и обработаны полученные данные.

Полученные достоверные результаты будут использованы для дополнения и совершенствования научных знаний и выработки практических рекомендаций.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработан комплекс мер по созданию системы контроля за гепатитом D в Российской Федерации, основанный на данных серологических и молекулярно-генетических исследований.
2. В результате проведения массовой вакцинации против гепатита B в эндемичных регионах Российской Федерации среди поколения, вакцинированного при рождении, отсутствуют случаи выявления HBsAg с наличием анти-HDV. В то же время выявлено значительное увеличение частоты инфекции HBV/HDV среди лиц старших возрастных групп в эндемичных регионах.
3. Несмотря на проводимую вакцинацию против гепатита B, в эндемичных регионах Российской Федерации, в том числе в вакцинированном поколении, сохраняется циркуляция HBV.
4. Существование пробелов в охвате своевременным введением первой и второй доз вакцины против гепатита B в реальной практике является одной из возможных причин (наряду с вертикальной передачей вируса), приводящей к продолжающейся циркуляции HBV среди когорты вакцинированных при рождении.
5. Генотипическое разнообразие HDV определяется циркуляцией только генотипа HDV-1 в Республиках Тыва и Дагестан и генотипов HDV-1 (54,2%) и HDV-2b (45,8%) в Республике Саха (Якутия).
6. В популяции пациентов с коинфекцией HBV/HDV в Республике Тыва и Республике Дагестан доминирует генотип HBV-D. В Республике Саха (Якутия) циркуляция генотипа HBV-A и HBV-D осуществляется в практически равных пропорциях. Отсутствует корреляция генотипов HBV и HDV у инфицированных пациентов.
7. При проведении анализа полногеномных последовательностей HDV применяется общепринятый алгоритм максимального правдоподобия (ML). В то же время достоверная реконструкция передачи HDV при использовании последовательностей фрагментов генома (участок R0 HDV) возможна только методом Байесовского анализа.

8. Семейные очаги гепатита D в эндемичных регионах формируются как в результате заражения вариантами вируса, полученными из разных источников, так и при передаче одного варианта HDV.
9. Распространение предков современных вариантов HDV произошло в 19-20 веках, равно как и формирование эндемичных по этой инфекции территорий.
10. Высокая степень генетического разнообразия HBV свидетельствует об интенсивной циркуляции вируса в регионе на протяжении длительного времени. Широкая распространенность HBV – предпосылка для формирования эндемичных по HDV территорий.
11. Основным прогностическим фактором, определяющим риск прогрессирования HDV-ассоциированного заболевания печени, – стабильная и активная репликация HDV, а также высокие уровни HBsAg ($>3,5$ Ig ME/мл) и повышение активности АСТ. Наличие детектируемой ДНК HBV и динамика уровней других биохимических маркеров функционального состояния печени не являются достоверными и информативными показателями для оценки риска прогрессирования и неблагоприятного исхода гепатита D.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор принял непосредственное участие во всех этапах работы, включая разработку дизайна исследования, научно-информационный поиск по теме диссертации, подготовку обзора литературы, определение цели и задач исследования, проведение серологических и молекулярно-генетических исследований, статистическую обработку данных, на основании которых сформулированы основные положения диссертационной работы, научно-практическая значимость исследования и выводы диссертации. Подготовка основных публикаций проведена автором или при непосредственном участии автора.

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в клиническую и организационно-методическую работу ГБУЗ Республики Тыва «Инфекционная больница», используются в процессе обучения в курсе ДПО и повышения квалификации кафедры вирусологии ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ в программе сертификационного курса «Вирусные инфекции, передающиеся половым путем»; «СПИД. Вирусные гепатиты. Оппортунистические инфекции»; «Вирусные инфекции беременных, плода,

новорожденных»; «Система биологической безопасности в вирусологических лабораториях»; «Вирусология», а также внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии и вирусологии Медицинского института РУДН.

Материалы диссертационного исследования использованы при подготовке методических рекомендаций Минздрава Российской Федерации «Хронический вирусный гепатит D (ХВГD) у взрослых» (2021год).

Степень достоверности и апробация материалов диссертации

Достоверность полученных результатов определяется использованием в работе современных методов исследований, репрезентативностью выборки, адекватным статистическим анализом. Научные положения и выводы диссертации обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Основные положения и фрагменты диссертации представлялись на международных и российских конференциях, конгрессах и симпозиумах: 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (Washington, USA, 2009); 16-й и 17-й Российских гастроэнтерологических неделях (Москва, 2010, 2011); EASL Monothematic Conference: Delta Hepatitis (Istanbul, Turkey, 2010); 16-ом Конгрессе «Гепатология сегодня» (Москва, 2011); IX Российской научно-практической конференции «Гепатит В, С и D – проблемы диагностики, лечения и профилактики» (Москва, 2011); 13-ом Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург-Гастро-2011» (Санкт-Петербург, 2011); 17-ом Конгрессе «Гепатология сегодня» (Москва, 2012); Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012); 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (Shanghai, China, 2012); 15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (Berlin, Germany, 2015); VI, VII, VIII и IX Межрегиональных научно-практических конференциях «Актуальные проблемы инфекционных болезней» (г. Кызыл, Республика Тыва, 2016, 2017, 2018, 2021); V Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием (г. Сочи, РФ, 2018); XI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (г. Москва, 2019); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы» (г. Москва, 2019); XXI Всероссийской научно – практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы эпидемиологии и

инфекционных болезней «Шамовские чтения» (г. Махачкала, Республика Дагестан, 2019); Первом конгрессе инфекционистов СЗФО (г. Санкт-Петербург, 2020); 20-й Российско-Итальянской конференции «Актуальные вопросы социально-значимых инфекционных и паразитарных заболеваний» (г. Великий Новгород, 2020); XII Ежегодном Всероссийском интернет-конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: диагностика, лечение и профилактика» (г. Москва, 2020); XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы» (г. Москва, 2021); XIII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: текущие и будущие угрозы» (г. Москва, 2021); X Юбилейной конференции «Молекулярная диагностика 2021 (г. Москва, 2021); Бюро отделения профилактической медицины РАН (г. Москва, 2022).

Апробация диссертационной работы состоялась на конференции отдела вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова 07.04. 2022 г., протокол № 2 и на заседании Ученого Совета ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова 28.04.2022г., протокол № 2.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 55 печатных работ, в том числе 21 статья в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России; 24 – в материалах международных конференций, 10 – в прочих печатных изданиях.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 292 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, содержащей результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив по дальнейшему использованию результатов и списка литературы, включающего 381 источник (из них – 38 отечественных и 343 зарубежных авторов). Работа содержит 28 таблиц, 41 рисунок, 2 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Все исследования были проведены в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации в отношении этических медицинских исследований с участием людей.

От всех лиц, образцы сыворотки крови и другие биологические образцы которых были исследованы в данной работе, получено подписанное информированное согласие.

Для проведения серологических исследований и динамики распространенности основных маркёров инфицирования HBV и HDV (2008 – 2019 годы) в Республиках Тыва и Саха (Якутия) использованы образцы сыворотки крови условно здорового населения в возрасте <1 года - >60 лет – 4364 образца. Охвачены десять возрастных групп: до 1 года, 1–4 года, 5–9 лет, 10–14 лет, 15–19 лет, 20–29 лет, 30–39 лет, 40–49 лет, 50–59 лет, и старше 60 лет. Каждым обследуемым заполнялась анкета, которая включала демографические данные, характеристику социального статуса, данные о наличии в анамнезе острого ГВ, вакцинации ГВ; сведения о факторах риска инфицирования HBV и HDV.

В исследование включались лица, проходящие рутинную диспансеризацию; посетители вакцинного кабинета, проходящие рутинную вакцинацию; пациенты, посещающие поликлинику по причинам, не связанным с инфекционными заболеваниями. Серологические маркёры инфицирования вирусами гепатитов В и дельта (HBsAg, анти-HBc, анти-HDV) определяли с использованием коммерческих тест-систем иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест» г. Новосибирск, согласно инструкции производителя.

Для пациентов с гепатитом D проведены исследования по определению генотипа HBV методом ИФА с использованием моноклональных антител, как единственно возможного метода для определения генотипа в образцах сывороток крови с недетектируемым уровнем ДНК HBV. Генотип HBV был определён у 227 пациентов из Республик Тыва, Саха (Якутия) и Дагестан на основании данных серотипирования HBsAg с использованием набора ИФА (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия). Тестирование HBsAg проводилось параллельно с тремя различными конъюгатами на основе моноклональных антител, что позволяло различать следующие серотипы /

генотипы HBV: ayw2 или ayw3 / D, adw2 / A, adr_q + / C, в соответствии с протоколом производителя.

Для проведения молекулярно-генетических исследований HBV и HDV (РНК HDV и ДНК HBV) использованы сыворотки крови пациентов с хроническим гепатитом дельта, проживающие в эндемичных регионах РФ (Республики Тыва, Саха (Якутия) и Дагестан) – 713 образцов.

Выделение нуклеиновых кислот из образцов сывороток крови проводили с помощью одного из двух наборов: MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I на автоматической станции MagNA Pure Compact (Roche Applied Science, Mannheim, Германия) или с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Германия). Все работы проводили в соответствии с инструкцией производителя. Определение ДНК HBV проводили методом in-house ПЦР-анализа с вложенными праймерами для перекрывающейся области генов S и P, кодирующих соответственно поверхностный белок и ДНК-полимеразу HBV. Чувствительность выявления ДНК HBV в данной реакции составляла не менее 25 МЕ/мл. Амплификацию в ПЦР с высокоточной ДНК-полимеразой проводили с помощью набора Fast Start High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Германия) по протоколу производителя. Выравнивание и анализ всех нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей HBV выполняли с помощью программного обеспечения MEGA 7.0.18. Генотип HBV определяли на основании результатов филогенетического анализа. Филогенетические деревья были построены методом ML (максимального правдоподобия), реализованного в пакете PhyML 3.0.

Образцы сывороток крови пациентов с гепатитом дельта были протестированы на наличие РНК HDV с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вложенными праймерами для области R0 генома вируса. Первичную нуклеотидную последовательность определяли на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (ABI, Foster City, США) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с протоколом производителя. Генотип HDV определяли на основе филогенетического анализа 400-нуклеотидного фрагмента области R0 с эталонными последовательностями HDV, рекомендованными в классификации ICTV 2018, с использованием метода максимального правдоподобия (ML) в программе MEGA 7.0.18.

Полные последовательности генома HDV были амплифицированы из полученных образцов сыворотки пациентов с гепатитом D из когорты исследования, собранных в 2017–2019 годах, с использованием праймеров и протокола, описанных в работе I. Celik и соавт. Затем первые 11 образцов были подвергнуты секвенированию по Сэнгеру с использованием того же протокола, что и для фрагмента R0 HDV. Остальные образцы секвенировали на платформе Ion Torrent S5. Библиотеки были подготовлены с использованием Ion 510, Ion 520 и Ion 530 Kit - Chef (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) для библиотек размером до 200 п.о. Все образцы считывались при покрытии не менее 500х, а качестве не ниже Q30. Сборка чтения была выполнена с помощью алгоритма BWA-MEM на эталоне, полученном из консенсуса для 11 образцов, секвенированных методом Сэнгера. Последовательности полного генома HDV, полученные из разных регионов РФ в нашем исследовании депонированы в GenBank под номерами: Республика Дагестан – ОК142798-ОК142819, ОК142940-ОК142942; Республика Тыва – ОК142859-ОК142919, ОК142930-ОК142937, МН791027-МН791030, Республика Саха (Якутия) – ОК142820-ОК142858, ОК142920-ОК142929, ОК142938-ОК142939.

Байесовский анализ проводился с использованием пакета программ BEAST v1.10.4. После пробных запусков для определения оптимальных параметров, модель замещения нуклеотидов SRD06 со строгими часами была выбрана для HDV в качестве оптимальной, изначальная скорость накопления замен - 0.0057 нуклеотидных замен на сайт в год, модель распределения возраста узлов – постоянный участок (constant site). Алгоритм был запущен для 100 миллионов генераций, каждое 10 000 дерево учитывалось. Для проверки качества запуска использовалась программа Tracer v1.6 (<http://beast.community/>). Эффективный размер выборки для всех параметров был более 200 (ESS >200). Запуск был произведен в двух повторах. Деревья аннотированы с помощью Tree Annotator v.1.10.4 с использованием каждого 1000 дерева и визуализированы с помощью FigTree v.1.4.3.

Для проведения анализа своевременного охвата вакцинацией против гепатита В у новорожденных в Республике Саха (Якутия) в течение первого года жизни в 2017–2018 годы получили сведения о прививках из 2182 индивидуальных карточек прививочного

анамнеза или из отдельных экземпляров формы № 63 (документ, формируемый на каждого ребенка при первом обращении в детскую поликлинику).

Для того, чтобы оценить частоту выявления основных маркёров инфицирования HBV и HDV в сыворотке крови, слюне и сухой капле крови как возможного варианта для серологических исследований среди населения эндемичного региона в условиях ограниченных лабораторных ресурсов исследованы 92 образца слюны и 197 образцов сухой капли крови, собранных в 2016- 2018 годы от больных хроническим вирусным гепатитом D.

Для анализа динамики клинических и лабораторных данных исследованы образцы сывороток крови и проанализированы данные медицинских карт 121 больного ХГД с различным течением заболевания. Анализ включал пол, возраст и стадию HDV-ассоциированного заболевания печени при постановке диагноза, наличие инфекции HDV среди членов семьи, а также клинико-биохимические показатели функционального состояния печени (АЛТ, АСТ, общий билирубин, ЩФ, ГГТП), оценку степени печеночной энцефалопатии (ПЭ) и скорость выполнения теста связи чисел (ТСЧ). Все пациенты принадлежали к одной этнической группе (тувинцы). Количество ежегодных обследований на протяжении периода наблюдения варьировало от 2 до 7.

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление и систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016 и программы статистической обработки данных GraphPadPism 4. Статистический анализ проводился с использованием программы Excel с использованием критерия Фишера и χ^2 -квadrата с поправкой Йетса (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% - $p < 0,05$).

Для проведения сравнительного анализа вирусологических параметров, оказывающих влияние на формирование различных клинических исходов ХГД, в работе использован метод многофакторного анализа с учетом поправки Бонферони-Хохберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика выявления серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и дельта среди различных возрастных групп условно здорового населения Республик Тыва и Саха (Якутия) за период 2008-2019 годы

С 2008 по 2014 годы число зарегистрированных хронических форм ГВ в Республике Тыва стабильно увеличивалось (в 2008 году заболеваемость ХГВ составляла 20,61 случаев на 100 тыс. населения, в 2014 году – 81,96), в 2019 году – 40,85 случаев на 100 тыс. населения и в настоящее время превышает практически в пять раз средние показатели по РФ. Показатель заболеваемости ХГВ в Республике Саха (Якутия) в 2008 году составил 34,7 случаев на 100 тыс. населения, в 2019 году – 24,9, что ниже, чем в Республике Тыва, однако также превышает аналогичный средний показатель РФ в 2,9 раза.

В 2008 году в Республике Тыва среди всех возрастных групп условно здорового населения HBsAg выявлялся в 7,7% случаях. Эти данные позволили отнести регион к гиперэндемичному. В 2019 году произошло снижение этого показателя, ключевого для оценки распространенности HBV и HDV, до 3,07%, в среднем во всех группах условно здорового населения, что уже характеризует территорию как среднеэндемичную. Однако, следует отметить резкое повышение уровня выявления HBsAg до 7,5% среди лиц в возрасте от 50 до 59 лет. В 2019 году не наблюдали столь выраженного снижения в выявлении HBsAg среди условно здорового населения республики Саха (Якутия), частота которого составила 3,2%.

Такой показатель позволяет отнести эти регионы к среднеэндемичным, в которых частота выявления HBsAg варьирует от 2 до 7% среди условно-здорового населения по определению J.J. Ott с соавт.

В настоящее время из парентеральных вирусных гепатитов только гепатит В может быть предупрежден средствами специфической профилактики. Вакцина против гепатита В, вызывающая выработку нейтрализующих антител к поверхностным белкам HBV, защищает и от коинфекции HDV. Специфичной вакцины против HDV не существует, в силу этого лица, уже инфицированные HBV, не защищены от суперинфекции HDV. Массовая вакцинация населения против гепатита В с использованием рекомбинантных

вакцин привела к уменьшению распространенности HBV, а также, опосредованно, к снижению распространения HDV. Сероэпидемиологические исследования, проведенные в динамике в 2008-2020 годах среди условно здорового населения Республик Тыва и Саха (Якутия), продемонстрировали значительное снижение и даже прекращение циркуляции HDV-инфекции среди поколений, охваченных вакцинацией против гепатита В при рождении. В среднем, частота выявления анти-HDV/HBsAg среди условно здорового населения снизилась в 2019 году до 1,0% в Республике Тыва (рис.1) и до нуля в Республике Саха (Якутия). В то же время, отмечено значительное увеличение частоты инфекции HDV/HBV среди лиц в возрасте 50-59 лет в Республике Тыва – этот показатель вырос с 1,6% в 2008 г. до 7,4% в 2019 г. ($p < 0,05$ (точный критерий Фишера)).

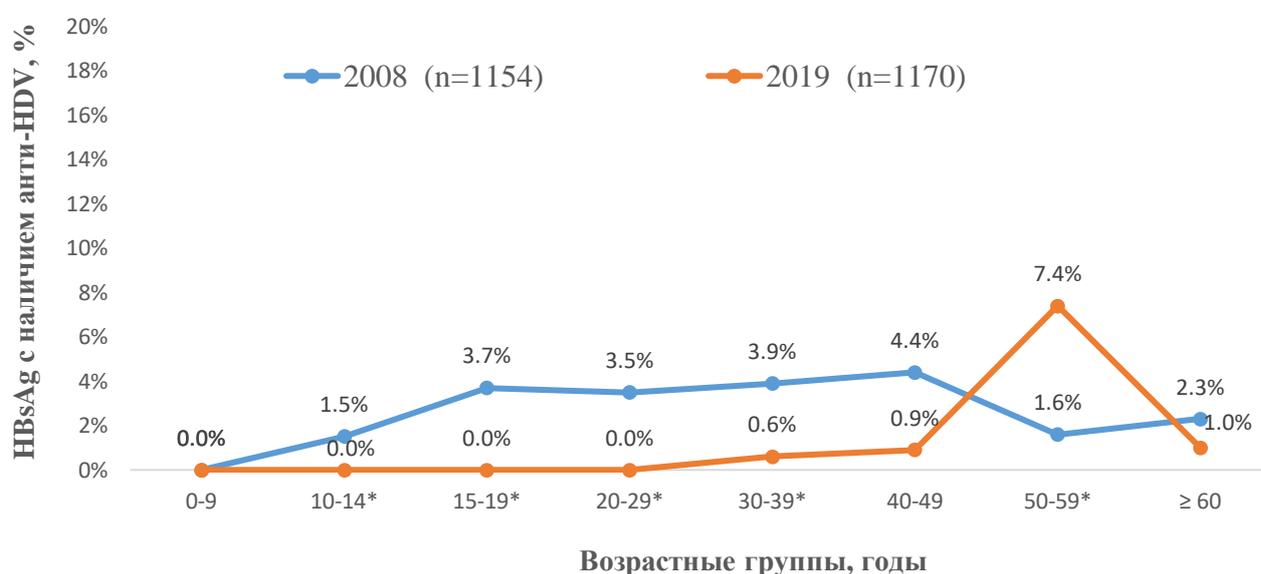


Рисунок 1. Доля лиц, имеющих анти-HDV среди HBsAg-положительных лиц из различных возрастных групп условно здорового населения Республики Тыва.

Примечание: * $p < 0,05$ (точный критерий Фишера) при сравнении данных за 2019 и 2008 годы.

О значительных показателях распространения HBV-инфекции среди условно здорового населения свидетельствуют результаты выявления антител к капсидному белку HBV (анти-HBc). Показано сохранение циркуляции HBV среди вакцинированного при рождении поколения, подтверждаемой высокой, до 12%-20%, частотой выявления анти-HBc среди лиц моложе 20 лет в Республиках Тыва (рис.2) и Саха (Якутия) (рис.3).



Рисунок 2. Частота выявления анти-НВс в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Тыва в 2008 и 2019 году.

Примечание: * $p < 0,05$ (точный критерий Фишера) при сравнении данных за 2019 и 2008 годы.

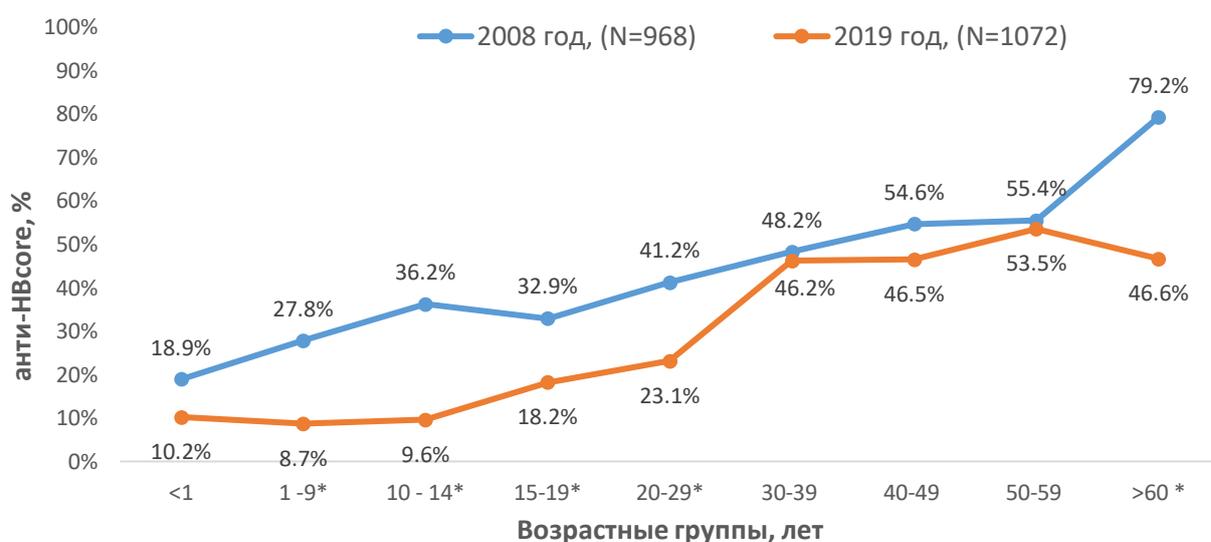


Рисунок 3. Частота выявления анти-НВс в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Саха (Якутия) в 2008 и 2019 годы.

Примечание: * $p < 0,05$ (точный критерий Фишера) при сравнении данных за 2019 и 2008 годы.

Анализ охвата вакцинацией против гепатита В новорожденных в Республике Саха (Якутия)

Самый эффективный подход к борьбе с гепатитом В - это всеобщая вакцинация новорожденных, при которой первая доза вводится через 24 часа после рождения. За последние 10 лет охват детей вакцинацией против гепатита в России достиг 90%.

Однако эта цифра основана на охвате полным курсом вакцинации в течение первого года жизни, а не на охвате наиболее важной первой дозой вакцины против гепатита В (доза при рождении; НерВ-BD). К сожалению, данные по этому ключевому индикатору в рамках глобальной стратегии здравоохранения ВОЗ по вирусному гепатиту в России ограничены.

Программа вакцинации против гепатита В обычно не включает мониторинг уровней антител, поскольку вакцина обладает высокой иммуногенностью и не требует дополнительной иммунизации, по крайней мере, у иммунологически компетентных лиц, получивших полный курс вакцинации. Предполагается, что защитные уровни антител после вакцинации младенцев первой дозой вакцины против гепатита В равны или лишь незначительно ниже, чем после введения трёх доз (НерВ3), поскольку полный курс иммунизации индуцирует защитные концентрации антител у более чем 95% здоровых младенцев, детей и молодых людей. Однако данные реальной практики показывают, что фактические показатели вакцин-ассоциированных антител могут быть намного ниже.

Отдельной проблемой остается «ненулевой» показатель выявления HBsAg среди детей самых младших возрастных групп в исследуемых регионах РФ. Достаточно правдоподобным объяснением выявления HBsAg у детей в возрасте до одного года и официально зарегистрированным охватом вакцины НерВ3 могут быть пробелы в вакцинации (незавершенные курсы или несвоевременное введение вакцины), которые способствуют передаче вируса от матери ребенку или горизонтальной передаче в течение первого года жизни. Одной из задач нашего исследования явилось определение фактических показателей охвата первой дозой вакцины против гепатита В (НерВ-BD) и полного курса вакцинации новорождённых (НерВ3) в регионе с высоким уровнем распространенности HBV и HDV - Республике Саха (Якутия). В предвакцинальный период распространенность HBV в регионе была в 3–4 раза выше, чем в среднем по Российской Федерации. В регионе самые низкие показатели наблюдались по своевременному охвату новорожденных второй дозой вакцины НерВ-2. Отмечены значительные различия в показателях охвата вакцинацией новорожденных против гепатита В в зависимости от расположения медицинских центров. В Республике Саха (Якутия) показатели охвата НерВ-BD, своевременным НерВ-2 и НерВ-3 в поликлиниках г. Якутска были ниже, чем в поликлиниках районных центров и в поликлиниках, расположенных в сельской местности (50,4% и 89,0%, соответственно) (таблица 1).

Даже если охват вакцинацией НерВ3 достигнет целевого показателя ВОЗ у младенцев к возрасту одного года, уровни охвата НерВ-ВD и своевременное введение второй дозы вакцины (НерВ-2) могут быть ниже ожидаемого уровня охвата в 90%. Своевременный охват НерВ-2 составил в нашем исследовании всего 64,7%, что позволяет предположить, что отсрочка вакцинации может быть широко распространенной практикой. Это создает потенциальный риск заражения до прохождения полного курса вакцинации. Было показано, что своевременность вакцинации НерВ-2 имеет решающее значение для защиты младенцев от горизонтальной передачи HBV [P. Tharmaphornpilas et al., 2009].

Таблица 1. Своевременное введение различных доз вакцины: НерВ-ВD, НерВ-2 и Нер-В3 в зависимости от расположения медицинского учреждения

Тип медицинского центра	Общее число детей	Дети, получившие НерВ-ВD		Дети, получившие вторую дозу вакцин НерВ-2 через 4–6 недель		Дети, получившие третью дозу вакцины НерВ-3 в возрасте до года	
		N	%	N	%	N	%
Поликлиники (г. Якутск)	811	803	99,0	409	50,4*	722	89,0
Поликлиники (районные центры)	752	745	99,1	527	70,1*	717	95,3
Поликлиники (сельская местность)	619	617	99,7	476	76,9*	569	91,9
Всего	2182	2165	99,2	1412	64,7	2008	92,0

Примечание: * - $p < 0,05$ (точный критерий Фишера) при сравнении данных охвата второй дозы вакцинации с первой и третьей.

В целом, оценка эпидемиологической динамики HDV и HBV в Республике Тыва указывает на продолжающуюся эпидемию гепатита D, которую поддерживает значительная часть людей с хронической HBV инфекцией в регионе. Данные проведенного серологического исследования показывают, что большинство случаев недиагностированной коинфекции HBV и HDV в настоящее время сконцентрировано в этом эндемичном регионе среди людей в возрасте 50 лет и старше. Не известен истинный охват вакцинацией против HBV в этой группе, но высокий уровень анти-HBc-положительных лиц (более 60%) в этой когорте указывает на то, что значительная часть людей уже встречалась с HBV. По-видимому, большинство случаев инфицирования

HBV и HDV в этой возрастной группе произошло давно, о чем свидетельствует очень высокая доля пациентов с циррозом печени при обращении. В то же время в регионе проживает очень большое количество людей с моноинфекцией HBV, что создает благоприятные условия для продолжения циркуляции HDV.

Таким образом, в эндемичных по HBV регионах, HDV не исчезает полностью в результате проводимой вакцинопрофилактики гепатита В и без эффективных профилактических мер он может интенсивно распространяться среди большого числа HBV-инфицированных или восприимчивых к HBV и HDV лиц, создавая серьезное бремя для общественного здравоохранения.

Выявление маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и D в биологических средах и сухой капле крови

Одним из альтернативных вариантов для сероэпидемиологических исследований в условиях ограниченных лабораторных ресурсов является оценка частоты выявления маркёров инфицирования HBV и HDV в биологических средах организма (слюне и сухой капле крови (СКК)). Оба этих вируса передаются при контакте с кровью или другими физиологическими жидкостями инфицированного человека, и, соответственно, могут находиться в них в достаточном для детекции количестве.

Для проведения сравнительных исследований мы использовали пары образцов сывороток крови и СКК, а также пары образцов сывороток крови и слюны от больных хроническим гепатитом В и D, проживающих в Республике Тыва.

Результаты выявления HBsAg, анти-HBc, анти-HDV в образцах биологических сред представлены в таблице 2. В отличие от маркеров HBV, исследования по определению анти-HDV в образцах СКК и слюны ранее не проводились. Нами впервые описано отсутствие положительного результата при тестировании анти-HDV в этих типах образцов, полученных от больных хроническим гепатитом В и D. В то же время, анти-HDV в сыворотке крови присутствовали в 100% образцов, хранившихся 2-3 года при -70 °С. Вероятно, концентрация анти-HDV значительно ниже, что объясняет отсутствие этих антител в слюне. В то же время, очевидно, высушивание сказывается на сохранности иммуноглобулинов, что привело к неудаче при детекции анти-HBc и HDV в образцах СКК.

Таким образом, слюна и СКК могут служить альтернативным материалом для выявления HBsAg. Определение анти-HBc в образцах этих типов у пациентов с

хронической инфекцией HBV и HDV, на наш взгляд, является нецелесообразным ввиду высокой вероятности получения ложноотрицательных результатов. По той же причине серологическая диагностика HDV с использованием альтернативных типов образцов не представляется возможной в связи с получением ложноотрицательных результатов в образцах СКК и слюны по сравнению с сывороткой крови. Ввиду высокой вероятности суперинфицирования вирусом HDV больных с хроническим гепатитом В на эндемичных территориях в случае выявления HBsAg в альтернативных клинических материалах (слюна, СКК) маркеры инфицирования HDV следует определять в сыворотке крови.

Таблица 2. Частота выявления HBsAg, анти-HBc и анти-HDV в образцах сыворотки крови, слюны и сухой капли крови от пациентов с хроническим гепатитом дельта.

Маркер \ Тип образца	Сыворотка крови, (%, n/N)	Слюна, (%, n/N)	Сухая капля крови, (%, n/N)
HBsAg	100% (325 / 325)	95,6% (110 / 115)	94,8% (199 / 210)
анти-HBc	100% (232 / 232)	9,6% (11/115)	0% (0/115)
анти-HDV	100% (232 / 232)	15,4% (18 /117)	0% (0/117)

Генотипы HDV и HBV у пациентов из эндемичных регионов РФ. Генотипы HDV

Доступные в настоящее время молекулярно-генетические данные для HDV остаются ограниченными. Хотя всестороннее определение клинической значимости генотипов HDV до сих пор не проводилось в больших когортах, исследования на небольших группах пациентов показали, что генотипы HDV могут влиять на тяжесть инфекции HDV-HBV [D. Roulot et al., 2020]. В РФ данные о циркулирующих в популяции генотипах вируса гепатита дельта весьма ограничены некоторыми регионами [V. Ivaniushina et al., 2001, E. Flodgren et al., 2000]. На территории Республики Дагестан такие исследования никогда не проводились.

Для определения генетического разнообразия HDV, циркулирующего в различных регионах РФ, нами исследованы геномные последовательности вируса, кодирующие область R0 (400 нт), изолятов, выделенных из сыворотки крови больных хроническим

HBV и HDV из Республики Тыва (n=514), Республики Саха (Якутия) (n=59) и Республики Дагестан (n=58).

В результате проведенных исследований определена циркуляция вируса только 1-го генотипа HDV (HDV-1) в Республиках Тыва и Дагестан и генотипов 1 и 2 HDV – в Республике Саха (Якутия). В Республике Саха (Якутия) частота выявления генотипа 1 составила 54,2 (32/59), генотипа 2 (HDV-2) – 45,8 (27/59) и достоверно не различалась ($p > 0,05$ (точный критерий Фишера)).

Впервые в РФ нами определён генотип HDV, циркулирующий в Республике Дагестан (HDV-1). Распределение циркулирующих в исследуемых регионах РФ генотипов HDV также проиллюстрировано на рисунке 4.

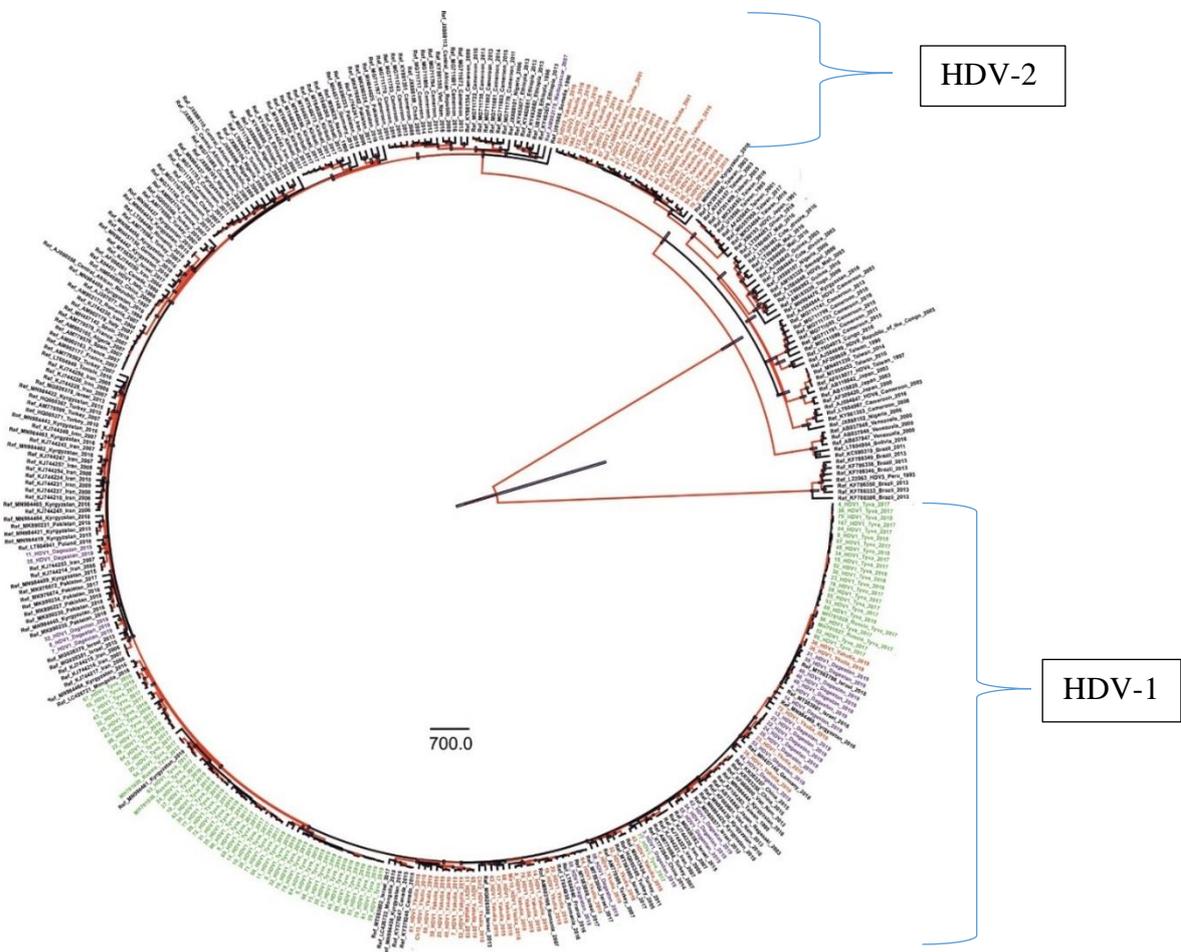


Рисунок 4. Распределение циркулирующих в исследуемых регионах РФ генотипов HDV. Филогенетический анализ с временной шкалой с использованием Байесовского анализа последовательностей HDV; 454 референсных последовательности. Последовательности HDV из республики Тыва – зеленый цвет, из республики Саха (Якутия) – красный цвет, из республики Дагестан – синий цвет.

Генотипы вируса гепатита В у HBV-моноинфицированных и HBV/HDV-коинфицированных пациентов из эндемичных регионов РФ

Известно, что различные генотипы и мутации генома HBV определяют характер течения заболевания печени и его прогрессирование. Однако наши знания о генотипах HBV и его генетических вариантах у пациентов с гепатитом D весьма ограничены из-за противоречивых данных из разных регионов [Y. Yang et al., 2015; Z. Ge et al., 2019; J. Gao et al., 2019].

Генотип HBV зачастую трудно определить молекулярными методами у пациентов с гепатитом D, поскольку у значительной части таких пациентов вирусемия HBV очень низкая или даже не определяется из-за подавления репликации HBV [K. Giersch et al., 2015], что также было подтверждено в экспериментах *in vitro* [D. Alfaiate et al., 2016]. В нашем исследовании менее 20% пациентов с гепатитом D имели детектируемую ДНК HBV в сыворотке крови. В связи с этим мы использовали метод ИФА для предсказания генотипа HBV A, D или C на основе идентифицированного серотипа HBsAg. Результаты валидации этого метода показали, что его можно использовать для надежного генотипирования HBV у пациентов с неопределяемой вирусной нагрузкой. С помощью разработанного набора МАТ для группы образцов сывороток крови больных ХГВ с выделенной ДНК HBV получено 99% валидных результатов.

Из данных по исследованиям 280 образцов сывороток крови становится очевидным, что на обследованных территориях Российской Федерации (Республика Тыва и Республика Дагестан) в популяции пациентов с сочетанным вирусным поражением печени (HBV/HDV) циркулируют два основных генотипа: А и D с доминированием генотипа D (14,3% против 85,7%, $p < 0,05$, (Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса)). Для пациентов из Республики Дагестан подобные исследования проведены впервые. Исключение на территории РФ составляет Республика Саха (Якутия), где определена циркуляция генотипа HBV-A и HBV-D в практически равных пропорциях (49,9 и 50,1%, соответственно) (таблица 3).

Таблица 3. Результаты распределения основных циркулирующих генотипов вируса гепатита В в образцах сыворотки крови пациентов с хроническим гепатитом В и дельта из эндемичных регионов РФ.

Регион	Всего образцов (N)	Генотип А	Генотип D	Генотип С
Республика Тыва	196	11/196 (5,6%)	185/196 (94,4%)*	0 (0%)
Республика Саха (Якутия)	59	29 (49,9%)	30 (50,1%)*	0 (0%)
Республика Дагестан	25	0 (0%)	25/25 (100%)*	0 (0%)
Всего	280	40/280 (14,3%)	240/280 (85,7%)*	0 (0%)

* - различия достоверны ($p < 0,05$, (Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса))

Более того, генотипы HBV-A и HBV-D одинаково распространены у пациентов с инфекцией-HDV в регионе, без какого-либо конкретного предпочтения. Корреляции между генотипами HBV и HDV у пациентов с коинфекцией не наблюдалось (коэффициентом корреляции $r = -0,016069332$).

Эти данные предполагают, что оба генотипа HDV (HDV-1 и HDV-2) могут использовать HBsAg вирусов HBV-A или HBV-D примерно с одинаковой вероятностью и/или эффективностью.

Реконструкция истории распространения вируса гепатита дельта в мире и на территории Российской Федерации

До проведения нашего исследования в мировой литературе отсутствовали данные об истории распространения и длительности циркуляции HDV в популяции в мире и в Российской Федерации. Работы, посвященные молекулярной эпидемиологии HDV, описывают генетическое разнообразие вариантов вируса, циркулирующих в различных регионах мира без учета временных рамок.

Впервые нами реконструирована история распространения и длительность циркуляции HDV в мире. Реконструкция истории распространения HDV в мире, выполненная с помощью Байесовского анализа с использованием полногеномных последовательностей вируса, выделенных в разные годы в эндемичных регионах, показала, что общий предок (прародитель) HDV имеет возраст около 6,5 тысяч лет (95% НРD составляет 4300 – 7300 лет). В это время произошло разделение на две ветви – это

генотип 3 HDV, который циркулирует в Латинской Америке и в настоящее время, и генотипы 1,2, 4-8.

Генотип 3 HDV выявлен только в странах Латинской Америки и в современном виде сформирован около 400 лет назад (95% HPD: 280-440). Генотип образует отдельную кладу, которая является аутгруппой на филогенетическом дереве для всех современных вариантов вируса (рис. 5).

На основании данного анализа показано существование второй клады HDV, сформированной генотипами 1,2,4-8, циркулирующими в различных регионах мира, и определено историческое время распространения современных вариантов вируса. Общий корень происхождения всех этих генотипов – Африканский континент, временное расхождение вариантов вируса произошло в этой филогенетической кладе около 1070 лет назад (95% HPD: 860 – 1340 лет назад).

Изучение генетического разнообразия HDV на территории Российской Федерации показало, что генотип HDV-1 является единственным циркулирующим на территории страны вариантом вируса, за исключением Якутии, где с одинаковой частотой встречаются генотипы HDV-1 и HDV-2b.

Реконструкция истории распространения HDV в мире, выполненная с помощью Байесовского анализа с использованием полногеномных последовательностей вируса, выделенных в разные годы в эндемичных регионах страны, продемонстрировала, что занос и распространение HDV на территории России произошло в начале 19 века, в отличие от предков современных штаммов HBV, история циркуляции которых насчитывает тысячи лет. Возраст современных штаммов HDV составляет не более 200 лет (рис. 5).

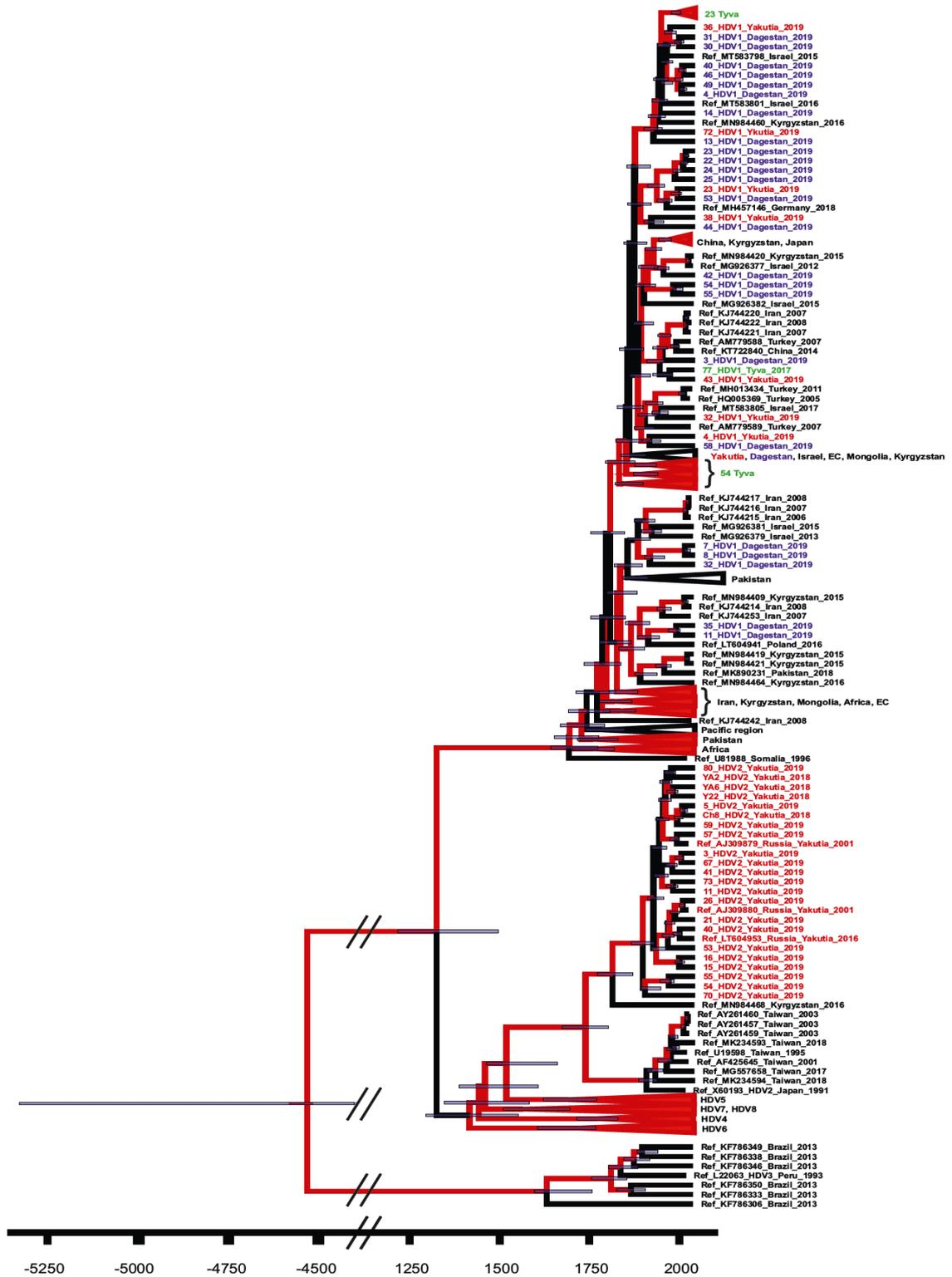


Рисунок 5. Филогенетическое дерево с временной шкалой, построенное с использованием Байесовского анализа для полногеномных последовательностей HDV (1619 п.о); 454 референсных последовательности. Изоляты HDV из Республики Тыва – зеленый цвет, из Республики Саха (Якутия) – красный цвет, из Республики Дагестан – синий цвет. Для каждой последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Последовательности этого исследования выделены бирюзовым цветом. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность $> 90\%$. В каждом узле 95% плотность апостериорного распределения, или Highest Posterior Density (HPD) показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Результаты проведенного в исследовании филогенетического анализа показали, что первый занос вируса гепатита дельта на территорию Российской Федерации произошёл около 210 лет назад (95% НДР: 165-250 лет) с территории современного Кыргызстана и из Монгольской республики в Республику Тыва. Вероятно, увеличение числа охарактеризованных референсных полногеномных последовательностей внесёт корректировки в полученные в настоящее время данные. Интродукция определила начало циркуляции HDV-1 и положила начало формированию на территории Республики Тыва эндемичного региона с группированием трёх больших кластеров из геновариантов, характерных для данной территории и дальнейшим распространением вируса по территориям РФ. Современные варианты HDV из Республики Тыва образуют две основные клады (рис. 6).

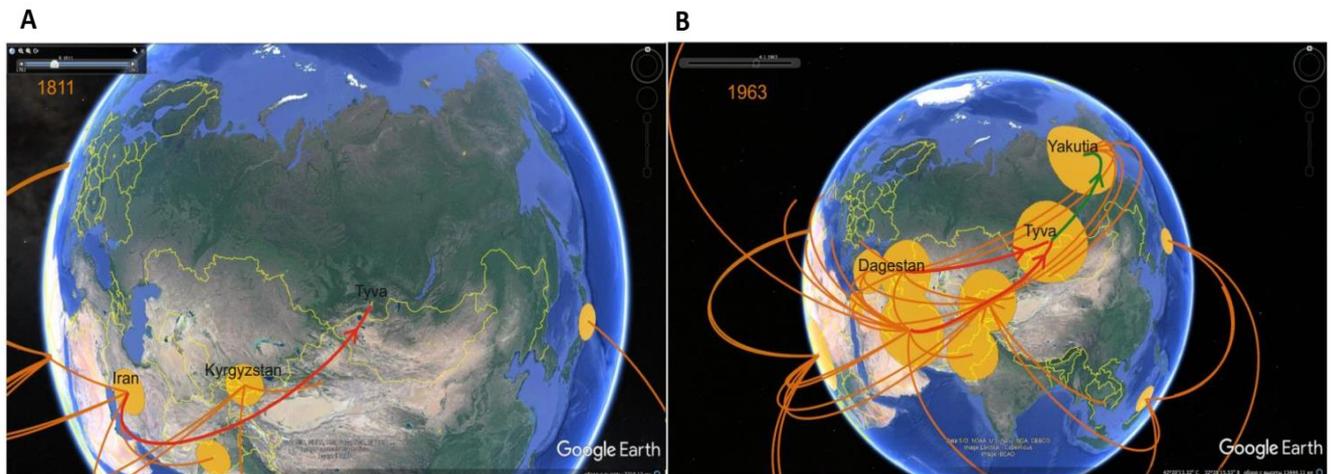


Рисунок 6. Филогеографическая дисперсия HDV в Республике Тыва для первой (А) и второй (В) волн интродукции (Байесовский филодинамический анализ). Пространственно-филогенетическая реконструкция эволюционной динамики, прослеживаемой в исследовании, показана на карте, относящейся к региону исследования. Красные линии указывают на импорт HDV в Республику Тыва, зеленые линии - на импорт из Республики Тыва.

Первая клада, будучи более древней, включает три субклады последовательностей из Республики Тыва, Монголии и Кыргызстана, а время ее последнего общего предка датируется 1811 годом (95% НДР: 1741–1834). Эти штаммы произошли от предков, которые были связаны с Ближним Востоком и Центральной Азией. Вторая клада последовательностей HDV из Республики Тыва появилась позже. Ее самый недавний общий предок датируется 1963 годом (95% НДР: 1953 - 1979) и возник в результате второй волны интродукции HDV в Тыву, на этот раз с территории других регионов России.

Филодинамический и филогеографический анализ нуклеотидных последовательностей HDV-1, выделенных на территории Республики Дагестан, продемонстрировал, что длительная, более 150 лет, циркуляция вируса в регионе привела к формированию эпидемических геноизолятов, являющихся предками вариантов HDV-1, встречающихся на других территориях РФ. Очевидно, что речь не идет о прямом переносе HDV с территории на территорию. На данном этапе анализа отсутствует доступный дополнительный генетический материал промежуточных вариантов распространения вируса внутри страны, приведших к попаданию предковых вариантов, в том числе в Республику Саха (Якутия), где сейчас и циркулируют их потомки.

История циркуляции HDV в Республике Саха (Якутия) представлена на рисунке 7. Генотип HDV-1 неоднократно заносился в регион, начиная от 180 (95% HPD: 150 - 210) лет назад до настоящего времени. Все занесенные в Республику Саха (Якутия) варианты HDV-1 имели восточноевропейское или ближневосточное происхождение. Зачастую варианты этого генотипа сначала циркулировали в России, на территории Республик Дагестан или Тыва, а уже потом были завезены в Якутию. Все последовательности HDV-2 из Республики Саха (Якутия) относятся к субгенотипу 2b и образуют монофилетическую группу, что свидетельствует о существовании «эффекта основателя», т.е. данная группа геноизолятов HDV возникла в результате одной волны интродукции. Появившись в Республике Саха (Якутия) примерно 135 (95% HPD: 60–350) лет назад, генотип HDV-2 широко распространился по территории региона, но не вышел за его пределы, так как нигде в Российской Федерации пока не обнаружен. Вопреки ранее существовавшим представлениям о том, что вариант HDV-2 попал в Республику Саха (Якутия) из Восточной Азии, полученные данные продемонстрировали наличие промежуточного предка, ближайший «потомок» которого сейчас циркулирует на территории Кыргызстана.



Рисунок 7. Байесовское филогенетическое дерево на основе полногеномных последовательностей HDV. Для каждой последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Последовательности этого исследования выделены бирюзовым цветом. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность $> 90\%$. В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Реконструкция истории распространения вируса гепатита В на территории Республики Тыва

Так как жизненный цикл HDV не может быть осуществлён без HBV, нами реконструирована история заноса, время формирования и циркуляция основных генотипов HBV на территории Республики Тыва, при использовании изолятов HBV от больных хроническим гепатитом В из этого региона. Репликация HDV значительно подавляет репликацию HBV в инфицированном организме, поэтому для восстановления истории распространения HBV нами использованы последовательности вируса, полученные от моноинфицированных пациентов из этого же региона.

Для реконструкции истории распространения HBV на территории Республики Тыва построено филогенетическое дерево с временной шкалой для HBV – на основании анализа нуклеотидной последовательности участка S-гена вируса гепатита В (672 п.о., 149–766; нумерация по прототипному штамму DM059405) для 73 изолятов, выделенных в 2008-2009 годы от пациентов с хроническим гепатитом В (рис. 8). Мы использовали референсные последовательности HBV различных генотипов (А – F) с известной датой сбора и страной происхождения образца, а также последовательности, выделенные из мумифицированного материала, полученного в ходе археологических исследований в Германии, Венгрии, Киргизии и Казахстане. Эти материалы обозначены на дереве как ancient с датировкой возраста органических ископаемых по углероду-14. В связи с возможностью использовать такие точные данные, реконструкция истории распространения HBV представляется следующим образом. Для исследуемых образцов из Республики Тыва показана циркуляция двух генотипов А (3 образца – 4,8%) и D (70 образцов – 95,2%).

В отличие от истории эволюции HDV в Республике Тыва, охватывающей около двух веков, продолжительность эволюции HBV в этом регионе намного длиннее и охватывает более тысячи лет. Для субгенотипа А2 HBV первый занос в регион определяется в 999 году (95% HPD: 240 год до н.э. - 1199 год). В эту же полиморфную группу входят представители Кубы, Польши, Японии, Бразилии, Испании, Великобритании и Швеции.

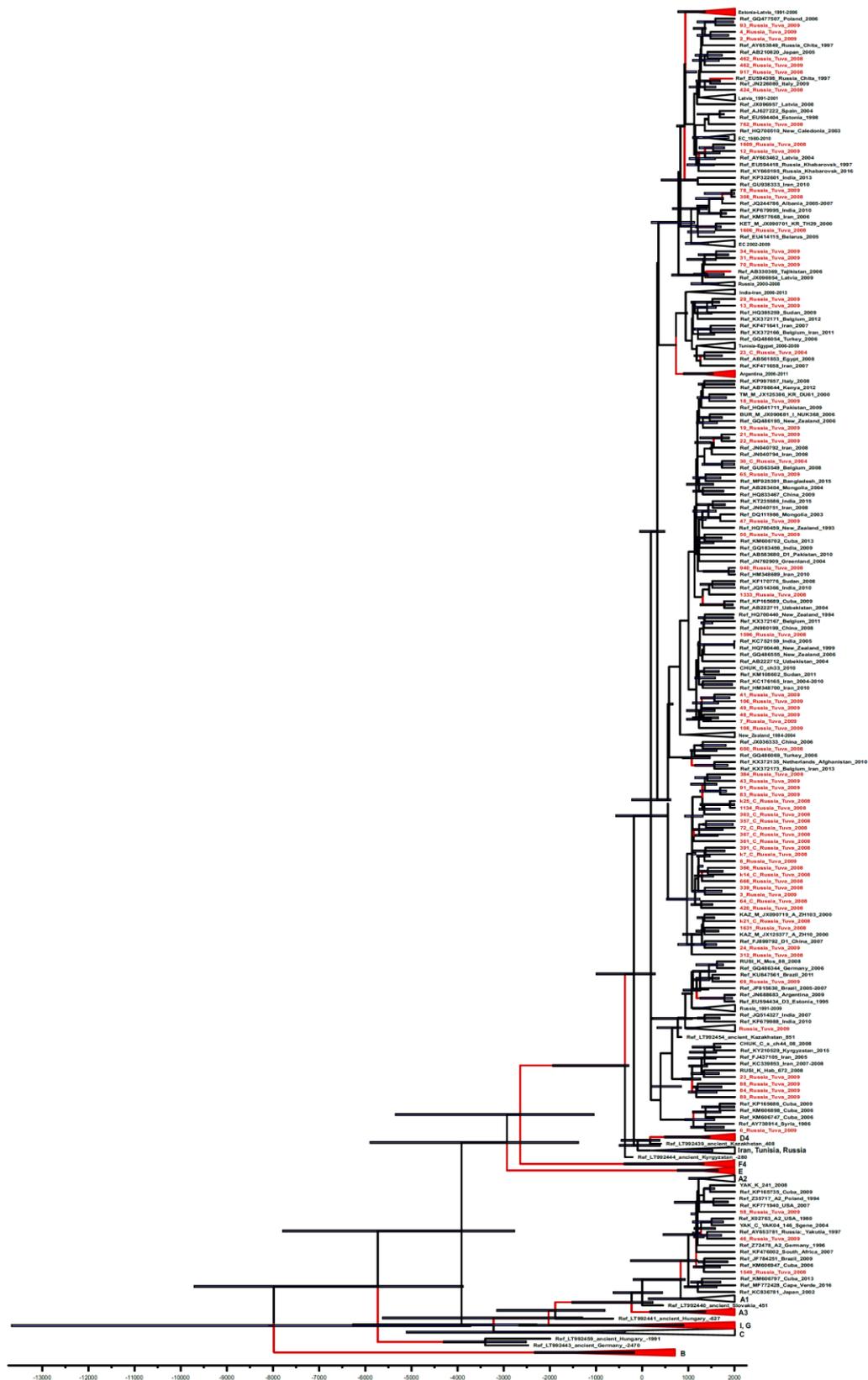


Рисунок 8. Байесовское филогенетическое дерево на основе частичных последовательностей S-гена HBV (676 п.о.). Для каждой последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HBV, страна и год выделения. Последовательности S-гена HBV изолятов из республики Тыва показаны красным цветом. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность $> 90\%$. В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Это ещё раз демонстрирует длительную и широкую географию распространения HBV в мире. На филогенетическом дереве (рис. 8) отмечается большая длина ветвей, которая определяет отношение этих вариантов к одному генотипу А и свидетельствует о том, что их общий предок существовал несколько сотен лет назад.

История эволюции преобладающего в Республике Тыва генотипа D очень сложна. Субгенотип D1 был завезен в регион в 972 году (95% HPD: 535 – 1253 год) и стал широко распространенным вариантом. Геноизоляты HBV субгенотипа D1 образуют монофилетическую группу, состоящую из 25 последовательностей из Республики Тыва, объединяясь с несколькими изолятами из Казахстана и Китая. Еще 18 последовательностей субгенотипа D1 из Республики Тыва сгруппированы с последовательностями из Китая, Индии, Монголии, Узбекистана, Бельгии и Кубы со временем более 100 лет до отхождения от самых недавних общих предков в этой группе.

Субгенотип D2 также широко распространен в Республике Тыва и был ввезён в регион несколько раз, начиная с 1274 года (95% HPD: 936 – 1384 год). Интродукции субгенотипа D3 в регионе датируются 1173 годом (95% HPD: 1005 – 1618 год). Последовательности D3 из Республики Тыва объединены с геноизолятами из Сирии, Ирана и Дальнего Востока России (Хабаровский край и Чукотка).

Последовательности изолятов HBV из Республики Тыва, которые можно классифицировать как субгенотип D5, сгруппированы вместе с изолятами из Судана и Египта и их расчетное время до самых недавних общих предков датируется 1201 годом (95% HPD: 1172-1509 го) и 1349 (95% HPD: 1132– 1736 год), соответственно.

Таким образом, при анализе филогенетических отношений и реконструкции истории распространения и времени заноса HBV на территорию Республики Тыва показано, что варианты вируса гепатита В, циркулирующие в этом регионе, имеют историю эволюции протяженностью несколько тысячелетий. Высокая степень генетического разнообразия HBV свидетельствует об интенсивной циркуляции вируса в регионе на протяжении длительного времени. Можно утверждать, что на протяжении столетий Республика Тыва оставалась эндемичным по HBV регионом, что нашло отражение в формировании эпидемических вариантов вируса, характерных для данной территории. Распространение же вируса гепатита дельта произошло на фоне интенсивной циркуляции HBV, обеспечившей высокую степень возможности

суперинфекции, которая, как известно, заканчивается формированием хронической HDV-инфекции.

Определение механизмов формирования семейных очагов HDV инфекции в эндемичных регионах

Обращает на себя внимание частое формирование семейных очагов гепатита D в эндемичных регионах, возникающих как в результате горизонтальной передачи одного геноизолята HDV, так и в следствие неоднократных заносов в семью разных вариантов вируса.

Значительную роль в получении достоверных данных играют не только применяемые методы, но и параметры исследования, задаваемые в данной работе.

Данные, полученные нами в эндемичных регионах Российской Федерации, продемонстрировали важность выбора адекватных методических подходов к анализу филогенетических отношений между изолятами HDV, выделенными из образцов сывороток крови членов одной семьи. В настоящее время метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) является «золотым стандартом» для исследований филогенетических взаимоотношений и основывается на использовании моделей эволюции. Метод ML использует эти модели для построения филогенетического дерева, опираясь на оценку вероятности нахождения конкретного нуклеотида в конкретной позиции.

Казалось бы, что достоверная оценка филогенетических отношений с помощью «золотого стандарта» и, соответственно, определение механизмов формирования семейных очагов HDV инфекции в эндемичном регионе не вызывает сомнения. Однако, нужно отметить, что не существует какого-то определенного метода филогенетического анализа, превосходящего все другие методы [В.В. Лукашов, 2009].

Мы оценили возможность распространения HDV внутри отдельных семейных очагов из различных регионов Российской Федерации с помощью алгоритма максимального правдоподобия (ML) для последовательностей участка R0 гена HDV (353 нт) и последовательностей полного генома HDV (1690 нт), а также с использованием Байесовского анализа для последовательностей участка R0-гена HDV.

Всего среди пациентов с хроническим гепатитом D наблюдалось 15 семейных очагов HDV инфекции, в том числе 11 очагов в Республике Тыва (22 пациента) и 4 в

Республике Дагестан (10 пациентов). По результатам анкетных данных известно, что все пациенты являются совместно проживающими членами семей (1-3 поколения), в которых сформированы очаги инфицирования вирусами гепатита В и D. Степень родства оценивалась как 1, 2 и 3 поколения: мать – дети, муж – жена, брат – сестра. Медиана возраста пациентов на момент сбора образцов составил 37 лет. Преобладали женщины (21 из 32 человек). У 22 человек диагностирован хронический гепатит В и D; 10 пациентов из них имели цирроз печени класса (А – С) по шкале Child-Pugh.

Результаты, полученные при проведении филогенетического анализа с использованием алгоритма ML полногеномных последовательностей HDV, выделенных из изолятов семейных очагов Республики Дагестан, показали существование одного источника инфицирования для каждой из этих семей. Однако, при использовании алгоритма ML для последовательностей фрагмента R0 генома HDV (как наиболее доступных для анализа) показано значительно удаленное расположение друг от друга пар последовательностей, относящихся к одному семейному очагу. Такая нарушенная топология филогенетического дерева неверно предполагает существование различных источников инфицирования для членов одной семьи. Нами оценена возможность изменения результатов анализа филогенетических взаимоотношений изолятов HDV из семейных очагов Республики Дагестан и Республики Тыва, при использовании Байесовского анализа для последовательностей фрагмента R0-гена HDV, выполненного для определения взаимосвязи между последовательностями с учетом скорости накопления мутаций и использованием временной шкалы для определения возможной передачи вируса в семейных очагах. В результате получены данные, аналогичные показанным при использовании метода ML для полногеномных последовательностей HDV, подтверждающие инфицирование членов семьи от одного источника.

Результаты анализа последовательностей HDV из семейных очагов в Республиках Тыва и Дагестан продемонстрировали, что для расшифровки случаев передачи вируса филогенетические исследования участка генома R0 HDV, наиболее часто используемого для биоинформатики, целесообразно проводить с помощью Байесовского анализа, а решение таких задач с помощью анализа полного генома возможно также с использованием алгоритма максимального правдоподобия (ML).

Среди проанализированных случаев распространения HDV в семейных очагах жителей Республики Тыва и Республики Дагестан мы определили высокую частоту

внутрисемейных кластерных случаев, характерных для эндемичных территорий. Только половина внутрисемейных кластеров HDV-инфекция наблюдалась у родителей и их детей, в то время как другие кластеры инфекции были связаны с супругами или братьями и сестрами, что указывает на низкую вероятность вертикальной передачи HDV. Действительно, сообщается, что HDV редко передается вертикально, в отличие от HBV [P.O. Sellier et al., 2018]. В основном, горизонтальная передача HDV зарегистрирована у детей в эндемичных странах [S. François-Souquière et al., 2016]. Более того, в Республике Тыва, за исключением одного случая, все кластерные случаи инфекции в семьях были вызваны разными вариантами вируса, то есть не являлись случаями внутрисемейной передачи. И наоборот, в Республике Дагестан все проанализированные кластерные случаи были результатом последовательной передачи HDV от одного источника инфицирования.

Таким образом, полученные данные показали, что механизмы формирования групповой внутрисемейной заболеваемости в эндемичных регионах Российской Федерации различаются и определяются значительным спектром возможных путей передачи HDV и источников инфицирования.

Течение хронического вирусного гепатита D у жителей эндемичного региона

Учитывая, что пациенты с гепатитом D в Республике Тыва представляют собой довольно однородную группу, как этнически, так и с точки зрения генотипов HDV и HBV, эта когорта чрезвычайно интересна для оценки влияния факторов вируса и организма-хозяина на прогрессирование и исходы хронической HDV-инфекции. Особенную проблему в данном регионе представляет поздняя диагностика гепатита D и, соответственно, позднее обращение за медицинской помощью. Так, среди 786 пациентов с гепатитом D, находящихся в региональном регистре в Тыве, у 37,5% при первичном обращении уже был выявлен цирроз печени, а средний возраст у таких пациентов составлял 45 лет.

Динамическое наблюдение 121 пациента с гепатитом D в Республике Тыва продемонстрировало, что хроническая HDV-инфекция имеет три различные формы протекания – быстрое прогрессирование в цирроз печени с частым летальным исходом; непрогрессирующий в цирроз печени хронический гепатит и непрогрессирующий цирроз класса А по Child-Pugh. Полученные в относительно однородной когорте

пациентов (этнос - тывинцы, инфицированы одним генотипом HDV (HDV-1) и в 95% одним генотипом HBV (HBV-D)), результаты показали, что основным прогностическим фактором, определяющим риск прогрессирования HDV-ассоциированного заболевания печени, является стабильная и активная репликация HDV. Соотношение рисков (OR) для этого показателя составляет 1,5 раза ($p=0,047$). Также значимым фактором, определяющим риск прогрессирования заболевания, являются высокие ($>3,5$ lg ME/мл) уровни HBsAg (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительный анализ биохимических и вирусологических параметров, оказывающих влияние на формирование различных исходов ХГ дельта.

Факторы риска	Соотношение рисков, OR (95% ДИ)	Значения достоверных различий (p^*)
АЛТ	1,33 (0,73-2,4)	0,349
АСТ	1,74 (0,95-3,2)	0,071
ЩФ	0,63 (0,15-2,7)	0,538
Билирубин	1,23 (0,77-2,0)	0,396
ТСЧ	2,26 (0,54-9,5)	0,267
ДНК HBV	1,0 (0,70-1,4)	0,992
РНК HDV	1,5 (1,00-2,4)	0,047
HBsAg ($>3,5$ lg)	2,3 (0,81-6,4)	0,117

* - расчет корреляционной матрицы с поправкой Бенджамини-Хохберга

Представляется важным отметить статистически значимо более высокие показатели активности ЩФ, ГГТП и содержания общего билирубина при прогрессирующем течении заболевания. Это ещё раз подтверждает, что HDV-инфекция запускает механизм гепатоканцерогенеза опосредованно через активацию печёночного воспаления и формирования ЦП [Z. Abbaz et al., 2012, 2015]. Тем не менее, результаты проведенного нами многофакторного анализа показали, что гиперферментемию не следует рассматривать в качестве достоверного прогностического фактора неблагоприятного исхода заболевания. Только повышение активности АСТ является статистически достоверно доказанным признаком неблагоприятного исхода (табл. 4). Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности мониторинга РНК HDV, уровней HBsAg и АСТ для оценки рисков исхода ХГД и выбора тактики ведения и лечения таких пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гепатит D является наиболее тяжелой и трудно поддающейся лечению инфекцией из всего ряда вирусных гепатитов. Нерешенными остаются многие вопросы, связанные с диагностикой, терапией и профилактикой гепатита D, а также надзором за данной инфекцией. Проведенные нами сероэпидемиологические исследования и полученные результаты продемонстрировали значительное снижение и даже прекращение циркуляции HDV среди поколений, охваченных вакцинацией против гепатита B при рождении. В то же время, отмечено значительное увеличение частоты инфекции, вызванной HDV в старших возрастных группах, среди лиц старше 50 лет. Также вызывает озабоченность сохранение в ряде регионов циркуляции HBV среди вакцинированного при рождении поколения, подтверждаемой относительно высокой частотой выявления антител к анти-HBc среди лиц моложе 20 лет. Обращает на себя внимание частое формирование семейных очагов гепатита D в эндемичных регионах Российской Федерации, обусловленное реализацией различных путей инфицирования членов одной семьи.

Особенную проблему представляет поздняя диагностика гепатита D и, соответственно, далее, уже на этапе формирования цирроза печени, обращение за медицинской помощью. Установлено, что основным прогностическим фактором, определяющим риск прогрессирования данного заболевания печени, является стабильная и активная репликация HDV, высокие уровни HBsAg, а также АСТ. В то же время, наличие детектируемой ДНК вируса гепатита B и динамика уровней биохимических маркеров функционального состояния печени (АЛТ, ГГТП, ЩФ и билирубин) не являются достоверными и информативными показателями с точки зрения оценки риска прогрессирования и неблагоприятного исхода дельта-ассоциированного заболевания печени. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности мониторинга РНК HDV, уровней HBsAg и АСТ для оценки рисков исхода ХГД и выбора тактики ведения и лечения таких пациентов.

Анализ распространения HDV продемонстрировал продолжающуюся эпидемию инфекции. В основном распространение вируса происходит среди лиц с хронической инфекцией HBV, широкая распространенность которой в ряде регионов страны является причиной продолжающейся циркуляции HDV.

В совокупности, последние имеющиеся данные указывают на недостаточный контроль за распространением HBV и HDV с помощью имеющихся в арсенале средств профилактики и свидетельствуют о необходимости строгого контроля качества и охвата вакцинацией против гепатита В, а также реализации программы скрининга на маркеры гепатитов В и D.

Таким образом, анализ особенностей циркуляции HDV и HBV в условиях изменяющейся эпидемиологии данных инфекций и изучение взаимоотношений этих вирусов и человеческого организма позволили получить новые данные для разработки стратегии борьбы с гепатитом D, что имеет существенное значение для здравоохранения.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено значительное увеличение частоты коинфекции HBV/HDV в 2019 г. в Республике Тыва среди лиц старших возрастных групп по сравнению с 2008 г. (7,4% против 1,6%, соответственно). Массовая вакцинация против гепатита В, проводимая более 20 лет в эндемичных регионах Российской Федерации, привела к отсутствию случаев выявления HBsAg с наличием анти-HDV среди поколения, вакцинированного при рождении.
2. Несмотря на проводимую вакцинацию против гепатита В в эндемичных регионах Российской Федерации сохраняется циркуляция HBV. В Республике Тыва частота обнаружения HBsAg среди лиц условно здорового населения – 1,2%, анти-HBc – 29,9%, а в Республике Саха (Якутия) – 3,2% и 24,4%, соответственно.
3. Выявлены пробелы в охвате своевременным введением первой и второй доз вакцины против гепатита В в реальной практике (до 30%), несмотря на высокий охват тремя дозами вакцины у детей к первому году жизни (92 %). Снижение охвата вакцинацией приводит к продолжающейся циркуляции HBV среди когорты вакцинированных при рождении.
4. Слюна и сухая капля крови могут служить альтернативным материалом для выявления HBsAg в сероэпидемиологических исследованиях. Определение анти-HBc и анти-HDV в этих образцах у пациентов с хронической инфекцией HBV и HDV нецелесообразно ввиду высокой вероятности получения ложноотрицательных результатов.

5. В Республиках Тыва и Дагестан циркулирует только генотип HDV-1, в Республике Саха (Якутия) – генотипы HDV-1 (54,2%) и HDV-2b (45,8%). У пациентов с коинфекцией HBV/HDV в Республиках Тыва и Дагестан встречаются два генотипа HBV: А и D с доминированием генотипа D (14,3% и 85,7%, соответственно). В Республике Саха (Якутия) генотипы HBV-A и HBV-D выявлены в равных пропорциях (49,9 и 50,1%, соответственно). Корреляция между генотипами HBV и HDV у коинфицированных пациентов отсутствует.
6. Для достоверной реконструкции внутрисемейной передачи HDV методом Байесовского анализа могут использоваться не только полногеномные последовательности вируса, но и последовательности фрагментов генома (участок R0), как наиболее широко представленные в доступных базах данных и позволяющие корректно оценивать эволюционные различия между вариантами вируса. Решение таких задач с использованием алгоритма максимального правдоподобия (ML) требует анализа полногеномных последовательностей HDV.
7. Показано, что семейные очаги в эндемичном регионе (Республика Тыва), сформировались в результате существования значительного числа источников инфекции и реализации множественных путей передачи вируса. В Республике Дагестан семейные очаги формируются в результате передачи HDV от одного источника.
8. Длительная циркуляция HDV на одной территории привела к формированию эпидемических вариантов HDV на эндемичных территориях (Республики Тыва, Якутия, Дагестан). Распространение предков современных вариантов HDV произошло относительно недавно, в 19-20 веках, равно как и формирование эндемичных по этой инфекции территорий.
9. В отличие от HDV, варианты HBV, циркулирующие на территории Республики Тыва, имеют историю эволюции протяженностью несколько тысячелетий, что нашло отражение в формировании эпидемических геновариантов, характерных для данной территории. Широкая распространенность HBV послужила предпосылкой для формирования эндемичных по HDV территорий.
10. Установлено, что основными прогностическими факторами, определяющими риск прогрессирования HDV-ассоциированного заболевания печени, являются стабильная и активная репликация HDV, высокие уровни HBsAg ($>3,5$ Ig ME/мл) и повышенные уровни АСТ. Наличие детектируемой ДНК HBV и динамика таких

биохимических маркеров, как АЛТ, ГГТП, ЩФ и билирубин, не являются достоверными и информативными показателями для оценки риска прогрессирования и неблагоприятного исхода гепатита дельта. Мониторинг виремии HDV и уровней HBsAg и АСТ целесообразен для оценки рисков исхода гепатита дельта и выбора тактики ведения и лечения таких пациентов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендовать строгий контроль качества и охвата своевременной вакцинацией против гепатита В, основанный на системе вакцинного аудита – случайной выборочной проверке медицинских записей и определении анти-HBs в группах вакцинированных, сформированных методом случайной выборки.

Рекомендовать обязательное тестирование на анти-HDV всем лицам, у которых выявлен HBsAg, а также рекомендовать расширение скрининговых программ на HBsAg, включив данный тест в перечень выполняемых при ежегодной диспансеризации.

Рекомендовать тестирование альтернативных образцов (слюна и сухая капля крови) для выявления HBsAg при скрининге и в научных сероэпидемиологических исследованиях в случаях, когда тестирование этого маркера в сыворотке крови недоступно. Не рекомендуется в клинической практике определение анти-HBs и анти-HDV в образцах слюны и сухой капли крови ввиду высокой вероятности получения ложноотрицательных результатов. Данные маркеры рекомендуется определять только в сыворотке и/или плазме крови.

Рекомендовать использовать метод генотипирования HBV в иммуноферментном анализе (ИФА) с серотип-специфичными моноклональными антителами для определения генотипа HBV у пациентов с гепатитом дельта.

Рекомендовать использовать в практической работе с целью расследования случаев заражения HDV филогенетический анализ фрагмента генома R0 с помощью Байесовского анализа. Решение же таких задач с использованием алгоритма максимального правдоподобия (ML) рекомендуется проводить с помощью анализа полного генома HDV.

Рекомендовать мониторинг виремии HDV, уровней HBsAg и АСТ для оценки рисков исхода хронического гепатита D и выбора тактики ведения и лечения пациентов, инфицированных HDV.

Рекомендовать усиление системы контроля за вирусологической безопасностью препаратов донорской крови в эндемичных регионах РФ с целью более четкого выявления в них маркёров инфицирования HBV и HDV.

Рекомендовать включение острого и хронического гепатита D в Перечень инфекционных и паразитарных болезней и других состояний, подлежащих регистрации и учету.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшая разработка данной тематики, основанная на изучении полногеномных последовательностей HDV, позволит идентифицировать факторы вируса и организма-хозяина, определяющие клиническое течение и исходы HDV-инфекции. Также, основываясь на многолетних наблюдениях в когорте пациентов с хроническим гепатитом D, возможно будет получить приоритетные данные о микроэволюции HDV на протяжении многолетней хронической инфекции, определить скорость накопления замен в разных фрагментах вирусного генома и выявить изменения, связанные с ускользанием вируса от иммунного ответа.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Асратян, А.А. Тенденция и анализ эпидемической ситуации по парентеральным вирусным гепатитам В и С в Российской Федерации и отдельных регионах / А.А. Асратян, **О.В. Исаева**, М.И. Михайлов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 4. – 40 с. (ВАК)
2. Распространенность первичной лекарственной резистентности вируса гепатита В к аналогам нуклеозидов и нуклеотидов у инфицированных вирусом пациентов в различных регионах России / Т.В. Кожанова, **О.В. Исаева**, В.В. Клушкина, Н.Д. Ооржак, Р.М. Саян, М.Н. Алексеева, Н.И. Миронова, Н.И. Громова, О.О. Знойко, М.Н. Цыкина, Л.Ю. Ильченко, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – № 1 (56). – С. 17–21. (ВАК)
3. Клиническое течение и исходы хронической дельта-инфекции в эндемичном регионе / Л.Ю. Ильченко, Т.В. Кожанова, А.А. Сарыглар, Я.Н.Д. Сонам-Байыр, О.Н. Сарыг-Хаа, Р.М. Соян, Ю.П. Зубков, **О.В. Исаева**, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Архив внутренней медицины. – 2012. – № 5 (7). – С. 51–56. (ВАК)
4. Распространенность скрытой HBsAg-негативной инфекции / И.В. Гордейчук, К.К. Кюрегян, А.А. Ганина, **О.В. Исаева**, М.И. Михайлов // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2. – № 1-2. – 437 с. (ВАК)
5. Панели сывороток, содержащие разные субтипы и мутантные формы HBsAg, для оценки диагностической чувствительности наборов реагентов для выявления HBsAg /

Т.В. Кожанова, В.В. Клушкина, **О.В. Исаева**, О.Е. Попова, И.Г. Нетесова, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 10. – С. 54–57. (ВАК)

6. Циркуляция вариантов вируса гепатита В, несущих мутации в гене полимеразы, среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов / Т.В. Кожанова, Л.Ю. Ильченко, **О.В. Исаева**, М.Н. Алексеева, А.А. Сарыглар, Н.И. Миронова, Н.И. Громова, М.Н. Цыкина, Ю.П. Зубков, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т. 5. – № 2. – С. 60–64. (ВАК)

7. Эпидемиология вирусных гепатитов / М.И. Михайлов, Е.Ю. Малинникова, И.А. Потемкин, Т.В. Кожанова, **О.В. Исаева**, Л.Ю. Ильченко, К.К. Кюрегян // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 1. – С. 78–85. (ВАК)

8. Частота выявления серологических маркеров вирусных гепатитов В и D среди условно здорового населения республики Тыва / Т.В. Кожанова, Л.Ю. Ильченко, В.В. Клушкина, М.А. Лопатухина, Е.П. Амон, А.А. Сарыглар, **О.В. Исаева**, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Детские инфекции. – 2014. – Т. 13. – № 2. – С. 13–16. (ВАК)

9. Impact of Universal Hepatitis B Vaccination on Prevalence, Infection-Associated Morbidity and Mortality, and Circulation of Immune Escape Variants in Russia / К.К. Kyuregyan, Т.В. Kozhanova, О.Е. Popova, Р.Г. Dubrovina, **О.В. Isaeva**, I.V. Gordeychuk, М.И. Mikhailov // PLoS One. – 2016. – Jun, 9. – Vol. 11(6). – doi: 10.1371/journal.pone.0157161. PMID: 27280884; PMCID: PMC4900554. (IF – 2,74; WoS)

10. Вирусные гепатиты – проблема общественного здоровья в Российской Федерации (проект программы по контролю и ликвидации вирусных гепатитов) / М.И. Михайлов, Н.Д. Ющук, Е.Ю. Малинникова, К.К. Кюрегян, **О.В. Исаева**, О.О. Знойко, Е.А. Климова // ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучения. – Вестник ВШОУЗ. – 2018. – № 2 (12). – С. 20–29. (ВАК)

11. Проект программы по контролю и ликвидации вирусных гепатитов как проблемы общественного здоровья в Российской Федерации / М.И. Михайлов, Н.Д. Ющук, Е.Ю. Малинникова, К.К. Кюрегян, **О.В. Исаева**, О.О. Знойко, Е.А. Климова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7. – № 2 (25). – С. 52–58. (ВАК)

12. Исаева, О.В. Вирусный гепатит дельта: недооцененная угроза / **О.В. Исаева**, К.К. Кюрегян // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 8. – № 2 (29). – С. 72–79. (ВАК)

13. Влияние вакцинации против гепатита В на распространенность гепатита дельта в эндемичном регионе / **О.В. Исаева**, Л.Ю. Ильченко, Т.В. Кожанова, В.В. Клушкина, А.А. Сарыглар, Ш. Аль-Шараби, Е.П. Амон, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 8. – № 2 (29). – С. 36–42. (ВАК)

14. Вирусные гепатиты: прогнозы и проблемы / М.И. Михайлов, К.К. Кюрегян, Е.Ю. Малинникова, **О.В. Исаева**, А.А. Карлсен, И.А. Потемкин, В.С. Кичатова, А.С. Аль-Шараби Шукри, Д.И. Догадов, Л.И. Корзая, М.Е. Игнатьева, А.Д. Поляков // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2019. – Т. 9. – № 1. – С. 71–80. (ВАК)

15. Выявление маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и D в биологических средах и сухой капле крови / **О.В. Исаева**, Л.Ю. Ильченко, В.С. Кичатова, И.А. Потемкин, Е.П. Амон, А.А. Сарыглар, Ш.А.С. Аль-Шараби, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 95–99. (ВАК)
16. Летальные исходы хронического гепатита дельта: клинико-биохимическая и вирусологическая характеристика / **О.В. Исаева**, К.К. Кюрегян, Л.Ю. Ильченко, А.А. Карлсен, Ф.А. Асади Мобархан, А.А. Сарыглар, М.И. Михайлов // Терапия. – 2021. – Т. 7. – № 4 (46). – С. 48–56. (ВАК)
17. Исаева, О.В. Дельта-подобные вирусы (Kolmioviridae:Deltavirus) животных и происхождение вируса гепатита D (hepatitis D virus) человека / **О.В. Исаева**, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Вопросы вирусологии. – 2021. – Т. 66. – № 5. – С. 340–345. (ВАК)
18. Течение и исходы хронического вирусного гепатита D у жителей республики Тыва как эндемичного региона / **О.В. Исаева**, Л.Ю. Ильченко, А.А. Сарыглар, А.А. Карлсен, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Вопросы вирусологии. – 2021. – Т. 66. – № 1. – С. 74–83. (ВАК)
19. Coverage with Timely Administered Vaccination against Hepatitis B Virus and Its Influence on the Prevalence of HBV Infection in the Regions of Different Endemicity / К.К. Kyuregyan, V.S. Kichatova, **O.V. Isaeva**, I.A. Potemkin, E.Y. Malinnikova, M.A. Lopatukhina, A.A. Karlsen, F.A. Asadi Mobarhan, E.V. Mullin, O.S. Slukinova, M.E. Ignateva, S.S. Sleptsova, E.E. Oglezneva, E.V. Shibrik, M.G. Isaguliants, M.I. Mikhailov // Vaccines (Basel). – 2021. – Jan, 23. – Vol. 9(2). – 82 p. – doi: 10.3390/vaccines9020082. PMID: 33498794; PMCID: PMC7912110. (IF – 4,127; WoS)
20. Different evolutionary dynamics of hepatitis B virus genotypes A and D, and hepatitis D virus genotypes 1 and 2 an endemic area of Yakutia, Russia/ A.A. Karlsen, К.К. Kyuregyan, **O.V. Isaeva**, V.S. Kichatova, F.A. Asadi Mobarkhan, L.V. Bezuglova, I.G. Netesova, V.A. Manuylov, A.A. Pochtovyi, V.A. Gushchin, S.S. Sleptsova, M.E. Ignateva, M.I. Mikhailov // BMC Infectious Diseases. – 2022. – 22:452. – <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07444-w> (IF – 3,401; WoS).
21. Генотипы вируса гепатита В у пациентов с гепатитом D, определенные с помощью панели моноклональных антител собственной разработки / Л.В. Безуглова, **О.В. Исаева**, А.А. Карлсен, Л.Ю. Ильченко, С.С. Слепцова, А.А. Сарыглар, В.А. Порываева, Я.Д. Мосина, О.А. Агафонова, А.К. Могильных, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов, С.В. Нетесов, И.Г. Нетесова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2022. – 40. – № 2. – С. 43–50. <https://doi.org/10.17116/molgen20224002143>. (ВАК)

СПИСОК ПРОЧИХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сравнительная характеристика двух тестов, предназначенных для количественного определения ДНК вируса гепатита В в сыворотке крови и плазме, основанных на применении двух разных методов детекции / Б.А. Жуман Авад, **О.В. Исаева**, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Тем. сб. 7-ой научно-практической конференции «Вирусные гепатиты – эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика. – М., 2007. - С. 23-25.

2. Частота выявления скрытой ВГВ- инфекции среди доноров крови и в группах риска инфицирования ВГВ / Ганина А.А., **О.В. Исаева**, П.Н. Дмитриев, О.Н. Потятинник, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Мир вирусных гепатитов. – 2007. - № 4. – С. 8-10.
3. Изучение вирусов, вызывающих гепатиты, с помощью молекулярно-биологических методов / К.К. Кюрегян, **О.В. Исаева**, О.Е. Попова, А.А. Ганина, П.Н. Дмитриев, М.И. Михайлов // Тем. сб. IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск. - 2008. – С. 356.
4. ВГВ-инфекция в Российской Федерации – результаты популяционного исследования / К.К. Кюрегян, О.Е. Попова, **О.В. Исаева**, Т.В. Кожанова, А.А.Ганина // Мир вирусных гепатитов. - 2009. - № 3. - С. 3-7.
5. Частота выявления маркеров ВГВ-инфекции в Республике Тыва (результаты популяционного исследования) / Т.В. Кожанова, В.В. Клушкина, **О.В. Исаева**, М.И. Михайлов, Сарыглар А.А. и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии. – 2010. - № 1. – Т. 20. – С. 35-37.
6. Первичная лекарственная резистентность вируса гепатита В к аналогам нуклеоз(т)идов у ВГВ-инфицированных пациентов / Т.В. Кожанова, **О.В. Исаева**, В.В. Клушкина, Н.Д. Ооржак, Р.М. Саян, М.Н.Алексеева, Н.И. Миронова, Н.И. Громова, О.О. Знойко, М.Н. Цыкина, Л.Ю. Ильченко, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2011. – № 18. – Т. 18. – С. 17-21.
7. Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов среди условно здорового населения Республики Тыва / Т.В. Кожанова, Л.Ю. Ильченко, В.В. Клушкина, **О.В. Исаева**, В.С. Кичатова, М.И. Михайлов и др. // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология. - 2013. - Т. 27. - № 2. - С. 74-78.
8. Республика Тыва – регион Российской Федерации, эндемичный по гепатиту дельта, как модель для изучения и профилактики этой инфекции / Т.В. Кожанова, Л.Ю. Ильченко, В.В. Клушкина, **О.В. Исаева**, А.А. Сарыглар, Я.Н.Д. Сонам-Байыр, О.Н. Сарыг-Хаа, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология. - 2016. - Т. 30. - № 1. - С. 62-63.
9. Current epidemiology of hepatitis delta in the Russian Federation / **O.V. Isaeva**, L.Yu. Ilchenko, T.V. Kozhanova, A.A. Saryglar, S.S. Sleptsova, A.A. Karlsen, S.A. Magomedova, K.K. Kyuregyan, M.I. Mikhailov // APASL (Baku). - 2019. – С.19-20.
10. Phylodynamic analysis of hepatitis delta virus genotypes 1 and 2 in Russian Federation / A.A. Karlsen, **O.V. Isaeva**, L.Yu. Ilchenko, T.V. Kozhanova, A.A. Saryglar, S.S. Sleptsova, S.A. Magomedova, Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. // APASL (Baku). - 2019. – С.47-48.

Клинические рекомендации:

Ильченко Л.Ю. Хронический вирусный гепатит D (ХВГD) у взрослых / Л.Ю. Ильченко, **О.В. Исаева**, Е.Ю. Малинникова, М.И. Михайлов, К.Е. Новак, Е.В. Эсауленко, В.П. Чуланов, П.О. Богомоллов // Клинические рекомендации: Москва, 2021. – 54 стр.

Выражаю глубокую и искреннюю признательность моему Учителю – члену-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору Михаилу Ивановичу Михайлову за все научные и жизненные уроки, которые очень важны для меня. Искренне благодарю научного консультанта, доктора биологических наук, профессора РАН Кюрегяна Карена Кареновича за совместную работу и за неоценимую помощь в работе над диссертационным исследованием. Выражаю глубокую признательность за всестороннюю помощь, совместные экспедиции и тёплое отношение научному консультанту, доктору медицинских наук, профессору Ильченко Людмиле Юрьевне.

Благодарю за активную помощь в проведении исследований, результатом которых стала данная диссертация сотрудников лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова Карлсен А. А., к.м.н. Кичатову В.С., к.м.н. Потемкина И.А., Асади Мобархана Ф.А.

Искренне признательна за совместную работу: главному врачу 1-й Инфекционной больницы г. Кызыла (Республика Тыва), заслуженному деятелю науки Республики Тыва, к.м.н. Сарыглар Анне Александровне; доценту кафедры инфекционных болезней ФПК и ППС ФГБОУ ВО ДГМУ, к.м.н. Магомедовой Саняит Ахмедгаджиевне; зам. директора по научной работе ФГАОУ ВО «СВФУ имени М.К. Аммосова», д.м.н. Слепцовой С.С.

Посвящается моей маме